Rôle des exotoxines superantigéniques dans le choc toxique et le choc septique à Staphylococcus aureus

Tristan Ferry

▶ **To cite this version:**

Tristan Ferry. Rôle des exotoxines superantigéniques dans le choc toxique et le choc septique à Staphylococcus aureus. Autre [q-bio.OT]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00184923v2

HAL Id: tel-00184923

https://theses.hal.science/tel-00184923v2

Submitted on 11 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 177 Année 2007

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2007

par

Monsieur Tristan Ferry

TITRE :

Rôle des exotoxines superantigéniques dans le choc toxique et le choc septique à *Staphylococcus aureus*

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Jérôme Etienne

JURY : Monsieur le Professeur Dominique Peyramond, Président
Madame le Professeur Anne-Claude Crémieux, Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean-François Timsit, Rapporteur
Monsieur le Professeur Frédéric Lucht
Monsieur le Docteur Guillaume Monneret

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	**M. le Professeur L. COLLET**
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Professeur J. LIETO
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. SIMON
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
UFR STAPS	Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. LIETO
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
IUT B	Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Mis à jour le 16/01/2007

à toi que je n'oublierai jamais,

à Côme et Eliott,

à Cloé,

à toi qui m'a tant donné et tant appris…

LISTE DES ABREVIATIONS **3**

INDEX DES FIGURES **4**

INDEX DES TABLEAUX **6**

I. INTRODUCTION **7**

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES **9**

II. 1. GENERALITES SUR S. AUREUS *9*
II. 2. DEFINITION ET EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS GRAVES A S. AUREUS *10*
II. 3. HISTOIRE NATURELLE DE LA RESISTANCE A LA METICILLINE ET APPARITION DES SARM HOSPITALIERS ET COMMUNAUTAIRES *12*
II. 4. RESERVOIRS, MODE DE TRANSMISSION ET FACTEURS DE RISQUE D'ACQUISITION DE SARM *20*
II. 5. DESCRIPTION DES FACTEURS DE VIRULENCE *22*
II. 5. 1. La capsule et la paroi de S. aureus *23*
II. 5. 2. Les protéines d'adhésion exprimées par S. aureus *24*
II. 5. 3. Invasion intracellulaire des cellules de l'hôte *26*
II. 5. 4. Lyse cellulaire et envahissement tissulaire *27*
II. 5. 5. Dissémination dans l'organisme *29*
II. 5. 6. Persistance dans l'organisme *31*
II. 5. 7. Particularités des exfoliatines *34*
II. 5. 8. Particularité des exotoxines superantigéniques *34*
II. 6. INFECTIONS GRAVES A S. AUREUS *ET IMPLICATION DES FACTEURS DE VIRULENCE* *40*
II. 6. 1. Choc toxique, choc septique et purpura fulminans *40*
II. 6. 2. Bactériémies persistantes à S. aureus et localisations secondaires *51*
II. 6. 3. Pathologies focales associées ou non à un état de choc ou à une bactériémie *52*
II. 6. 4. Spécificités pédiatriques *77*
II. 6. 5. Bilan sur l'état des lieux des connaissances concernant l'implication des facteurs de virulence dans les infections sévères à S. aureus *84*
II. 7. SUSCEPTIBILITE AUX INFECTIONS GRAVES A S. AUREUS *85*
II. 7. 1. Susceptibilité génétique aux infections graves à S. aureus *85*
II. 7. 2. Susceptibilité à la PVL *85*
II. 7. 3. Susceptibilité aux exotoxines superantigéniques *86*
II. 8. DIAGNOSTIC *86*
II. 8. 1. Diagnostic microbiologique de genre et d'espèce *86*
II. 8. 2. Diagnostic de la résistance à la méticilline et caractérisation des clones SARM *87*
II. 8. 3. Diagnostic des SARM de sensibilité diminuée à la vancomycine et impact clinique *90*
II. 8. 4. Détection directe de certains facteurs de virulence *91*
II. 8. 4. Détection indirecte de certains facteurs de virulence *92*
II. 8. 5. Impact potentiel de l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire dans le diagnostic des bactériémies à S. aureus *94*
II. 9. TRAITEMENT *95*
II. 9. 1. Antibiothérapie anti-staphylococcique *95*
II. 9. 2. Traitements adjuvants antitoxiniques *96*
II. 9. 3. Immunothérapie anti-MSCRAMMs *102*
II. 9. 4. Thérapeutiques anti-agr *102*
II. 10. MESURES SANITAIRES ET PREVENTION *103*

CONCLUSION DE LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE **105**

III. ARTICLES DE REVUE **107**

III. 1. PREMIER ARTICLE DE REVUE :
"VIRULENCE DETERMINANTS IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND THEIR INVOLVEMENT IN CLINICAL SYNDROMES" *107*

III. 2. DEUXIEME ARTICLE DE REVUE :
"VIRULENCE DETERMINANTS IN COMMUNITY AND HOSPITAL METICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS" *117*

IV. TRAVAIL PERSONNEL.....123

IV. 1. INTRODUCTION 123

IV. 2. PREMIERE PARTIE : EPIDEMIOLOGIE DES GENES CODANT LES EXOTOXINES SUPERANTIGENIQUES AU COURS DU CHOC TOXIQUE ET SEPTIQUE A S. AUREUS*, LIEN POTENTIEL AVEC LA GRAVITE CLINIQUE ET ETUDE DES PROPRIETES INFLAMMATOIRES DES EXOTOXINES SUPERANTIGENIQUES D'INTERET 125*

IV. 2. 1. Première publication :
"ONE IN FIVE MORTALITY IN NON MENSTRUAL TOXIC SHOCK SYNDROME VERSUS NO MORTALITY IN MENSTRUAL CASES IN A BALANCED FRENCH SERIES OF 55 CASES" 125

IV. 2. 2. Deuxième publication :
"COMPARATIVE PREVALENCE OF SUPERANTIGEN GENES IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATES CAUSING SEPSIS WITH AND WITHOUT SEPTIC SHOCK" 147

IV. 2. 3. Troisième publication :
"COMPARATIVE INFLAMMATORY PROPERTIES OF STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGENIC ENTEROTOXINS SEA AND SEG: IMPLICATIONS FOR SEPTIC SHOCK" 156

IV. 3. DEUXIEME PARTIE : CARACTERISATION DU CLONE SARM HOSPITALIER PREDOMINANT EN FRANCE ET ETUDE DE SES FACTEURS DE VIRULENCE 164

IV. 3. 1. Quatrième publication :
"TOXIN GENE CONTENT OF THE LYON METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS CLONE COMPARED WITH THAT OF OTHER PANDEMIC CLONES" 164

IV. 3. 2. Cinquième publication :
"VIRULENCE PROPERTIES OF MRSA LYON CLONE ISOLATES RESPONSIBLE FOR BLOODSTREAM INFECTIONS" ...169

IV. 4. TROISIEME PARTIE : MISE EN EVIDENCE D'UNE PRODUCTION D'EXOTOXINE SUPERANTIGENIQUE IN VIVO *.200*

IV. 4. 1. Sixième publication :
"DETECTION OF SUPERANTIGENIC TOXIN VBETA T CELL SIGNATURES DURING MENSTRUAL AND NON-MENSTRUAL STAPHYLOCOCCAL TOXIC SHOCK SYNDROME BUT NOT DURING S. AUREUS *SEPTIC SHOCK" 200*

IV. 4. 2. Septième publication :
"EARLY DIAGNOSIS OF STAPHYLOCOCCAL TOXIC SHOCK SYNDROME SECONDARY TO PHARYNGITIS BY DETECTION OF THE TSST-1 VBETA SIGNATURE IN PERIPHERAL BLOOD OF A 12-YEAR-OLD BOY" 233

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....250

VI. REFERENCES 254

ANNEXES 266

ANNEXE 1 :
"HETEREGENEOUS BUT HIGHER ADHESIVE PROPERTIES OF HOSPITAL-ACQUIRED MRSA LYON CLONE ISOLATES IN COMPARISON TO MSSA ISOLATES".....267

ANNEXE 2 :
"USEFULNESS OF ANALYSIS OF THE VBETA REPERTOIRE OF T CELLS FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF STAPHYLOCOCCAL AND STREPTOCOCCAL TOXIC SHOCK SYNDROME".....270

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribo nucléique
agr : a*ccessory gene regulator*
CD : c*lusters of differenciation*
CDC : *center of disease control and prevention*
CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA : cellule présentatrice d'antigène
Clf : *clumping factor* (protéine de liaison au fibrinogène)
Cna : *collagen-binding protein*
CTS : choc toxique staphylococcique
egc : enterotoxin gene cluster
ETs : exfoliatines
FnBP : f*ibronectin-finding protein*
HLA : *Human leucocyte antigen*
IL : interleukine (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12)
IFN : interféron
kb : kilo (paire de) base
kDa : kilo dalton
MIP-1alpha : *Macrophages inflammatory protein*-1 alpha
MSCRAMMS : *microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*
NTED : *Neonatal toxic shock like exanthematous disease*
PBMCs : *peripherical blood mononuclear cells*
pb : paire de base
PBS : *phosphate buffer saline*
PCR : *polymerase chain reaction*
PVL : *panton valentine leucocidin*
SaPIs : *S. aureus* p*athogenicity islands*
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
SE : *staphylococcal enterotoxin*
SE*l* : *staphylococcal enterotoxin-like*
SIRS : s*ystemic inflammatory response syndrome*
spa : gène codant la protéine A
TARC : *Thymus and activation regulation chemokine*
TCR : *T cell receptor*
Th : lymphocyte T *helper*
TLR : *Toll-like receptor*
TNF-alpha : *Tumor necrosis factor* alpha
TSS : *Toxic shock syndrome*
TSST-1 : *toxic shock syndrome toxin-1*
Vbeta : portion variable beta du TCR

Index des Figures

Figure 1. Interactions entre *S. aureus* et son hôte. Page 10

Figure 2. Epidémiologie des hospitalisations pour sepsis aux USA. Page 11

Figure 3. Structure des différents types de cassette SCC*mec*. Page 13

Figure 4. Principaux clones SARM hospitaliers pandémiques. Page 15

Figure 5. Origine et évolution des clones SARM hospitaliers. Page 15

Figure 6. Variation temporelle de la prévalence des SARM hospitaliers. Page 16

Figure 7. Représentation circulaire du chromosome de la souche N315 (NY/J). Page 18

Figure 8. Représentation circulaire du chromosome de la souche FPR3757 (USA300). Page 20

Figure 9. Prévalence du portage à *S. aureus* selon les sites anatomiques. Page 21

Figure10. Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par *S. aureus*. Page 23

Figure 11. Structure de la paroi de *S. aureus*. Page 24

Figure 12. Structure des MSCRAMMs. Page 25

Figure 13. Adhérence *in vitro* du clone Brésilien. Page 26

Figure 14. Invasion *in vitro* de cellules bronchiques par le clone Brésilien. Page 27

Figure 15. Mécanisme d'assemblage des monomères d'alpha-toxine. Page 28

Figure 16. Mécanisme d'assemblage des monomères de lukF-PV et de lukS-PV. Page 29

Figure 17. Mécanisme d'activation du locus *agr* selon la densité bactérienne. Page 30

Figure 18. Schématisation et structure d'un biofilm en microscopie électronique. Page 31

Figure 19. Biofilm produit *in vitro* par le clone Brésilien. Page 32

Figure 20. Aspect du phénotype variant microcolonie sur gélose au sang. Page 33

Figure 21. Aspect tridimensionnel de TSST-1 et arbre phylogénétique. Page 35

Figure 22. Ilots de pathogénicité de *S. aureus*. Page 37

Figure 23. Mécanisme d'activation lymphocytaire par une exotoxine superantigénique. Page 38

Figure 24. Séquence des symptômes cliniques au cours du CTS. Page 40

Figure 25. Epidémiologie du CTS menstruel et non-menstruel aux USA. Page 42

Figure 26. Evolution de la balance Th1/Th-2 au cours du choc septique. Page 44

Figure 27. Induction d'une perméabilité vasculaire par les *staphopain* A et B. Page 47

Figure 28. Effet de l'injection intraveineuse de *staphopain* A sur la pression artérielle. Page 47

Figure 29. Mortalité au cours du sepsis chez la souris après immunisation anti-SEA. Page 48

Figure 30. Description de cinq cas de purpura fulminans à *S. aureus*. Page 50

Figure 31. Théorie sur le « choc mixte ». Page 51

Figure 32. Photographie du parenchyme pulmonaire dans un modèle de PAVM. Page 54

Figure 33. Adhésion *in vitro* de *S. aureus* responsables de pneumonie nécrosante. Page 55

Figure 34. Effets inflammatoires directs et indirects de la PVL au niveau pulmonaire. Page 56

Figure 35. Hypothèse physiopathologique au cours de la pneumonie nécrosante. Page 57

Figure 36. Effet de la PVL au niveau des alvéoles pulmonaires. Page 57

Figure 37. Hémoptysie et survie des patients ayant une pneumonie nécrosante. Page 58

Figure 38. Furoncle à SARM d'origine communautaire. Page 59

Figure 39. Prévalence des SARM communautaires aux Urgences aux USA. Page 60

Figure 40. SARM communautaires et infections des tissus mous en France. Page 61

Figure 41. Cellulite orbitaire bilatérale à SARM communautaire. Page 61

Figure 42. Pyomyosite avec aspect d'érysipèle. Page 62

Figure 43. Fasciite nécrosante à SASM producteur de PVL. Page 63

Figure 44. Puce à ADN génomique d'un clone épidémique en réanimation. Page 67

Figure 45. Physiopathologie de l'endocardite infectieuse sur valve native. Page 69

Figure 46. Section de végétation et d'endothélium après marquage de ClfA. Page 70

Figure 47. Effet des anticorps anti-ClfA au cours d'une endocardite expérimentale. Page 70

Figure 48. Epidémiologie des infections osseuses de l'adulte. Page 73

Figure 49. Variants micocolonies de *S. aureus* au cours d'une ostéoarthrite chronique. Page 74

Figure 50. Exanthème généralisé au cours du NTED. Page 77

Figure 51. Décollement bulleux au cours du syndrome d'exfoliation généralisé. Page 78

Figure 52. Physiopathologie du syndrome d'exfoliation généralisé. Page 79

Figure 53. Ostéomyélite à SASM producteur de PVL chez un enfant de 12 ans. Page 81

Figure 54. Le syndrome de Waterhouse-Friderichsen. Page 83

Figure 55. Technique du *multilocus sequence typing*. Page 88

Figure 56. Mise en évidence d'une hétérorésistance à la vancomycine. Page 91

Figure 57. Expansion des lymphocytes T Vbeta 2 positifs au cours de CTS. Page 91

Figure 58. Expansion des lymphocytes T Vbeta 2 positifs au cours de NTED. Page 93

Figure 59. Effet des antibiotiques sur la production de TSST-1 *in vitro*. Page 87

Figure 60. Effet des antibiotiques sur la production de PVL *in vitro*. Page 87

Figure 61. D-test témoignant d'une résistance inductible à la clindamycine. Page 89

Figure 62. Effet des immunoglobulines polyvalentes sur l'activité de la PVL *in vitro*. Page 100

Index des Tableaux

Tableau 1. Signature Vbeta des exotoxines superantigéniques de *S. aureus*. Page 39

Tableau 2. Critères diagnostiques du CTS. Page 41

Tableau 3. Epidémiologie du choc septique. Page 44

Tableau 4. Facteurs de virulence impliqués dans les infections graves à *S. aureus*. Page 84

Tableau 5. Caractéristiques des clones SARM en France. Page 89

I. Introduction

Staphylococcus aureus est un pathogène majeur de l'homme qui a la capacité d'entraîner un spectre très large d'infections suppuratives et de maladies toxiniques (Lowy 1998). Les infections staphylococciques peuvent être localisées à un organe et engager le pronostic fonctionnel mais aussi disséminer dans l'organisme et engager le pronostic vital (Lowy 1998). Malgré l'utilisation optimale d'antibiotiques efficaces, la morbidité et la mortalité des infections staphylococciques graves restent élevées (Lowy 1998). Au cours des dix dernières années, de très nombreux efforts ont été réalisés pour mieux comprendre les infections à *S. aureus*. Il est admis que certains facteurs liés à l'hôte (diabète, immunosuppression, etc.) sont des facteurs de risque de développer une infection grave (Lowy 1998). Toutefois de très nombreux facteurs de virulence ont été identifiés et la plupart d'entre eux sont exprimés de façon fréquente par les isolats cliniques de *S. aureus* (Lowy 1998; Becker, Friedrich et al. 2003). L'implication de certain facteur de virulence dans la gravité clinique est même suspecté dans certaines situations (Lowy 1998).

L'épidémiologie des infections graves à *S. aureus* s'est profondément modifiée depuis l'émergence des *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) (Lowy 1998; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). L'acquisition de cette résistance, couplée à la possibilité d'acquérir des gènes codant des facteurs de virulence particuliers permet à *S. aureus* d'être "bien armé" à la fois en termes d'épidémicité mais également en termes de pouvoir pathogène pour l'homme (Lowy 1998; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). En conséquence, certains SARM, porteurs d'un arsenal de facteurs de virulence, diffusent dans le monde hospitalier, mais aussi en milieu communautaire, et peuvent être responsables d'infections sévères (Lowy 1998; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006).

Le but de ce travail bibliographique est de lister les principaux facteurs de virulence identifiés à ce jour chez *S. aureus* et de discuter, selon des données *in vitro* et *in vivo*, de leur impact sur la gravité et le pronostic des infections sévères à *S. aureus.* La meilleure compréhension des mécanismes d'action des facteurs de virulence de *S. aureus* permet d'envisager de développer : (1) des outils diagnostiques afin de mettre en évidence leur présence *in vivo*, (2) de nouvelles thérapeutiques additionnels à l'antibiothérapie dont le but est de bloquer leur action afin de limiter la sévérité de la maladie. Dans un premier temps, le travail bibliographique de cette thèse permettra : (1) de lister les facteurs de virulence de *S. aureus* connus à ce jour, (2) de faire la lumière sur leurs mécanismes d'action et sur les connaissances concernant leur implication en pathologie humaine selon des données *in vitro* et *in vivo*. Le travail personnel se focalisera sur l'implication de certaines toxines, les toxines superantigéniques, dans la physiopathologie du choc toxique et du choc septique à *S. aureus*.

II. Rappels bibliographiques

II. 1. Généralités sur *S. aureus*

Les staphylocoques ont été identifiés pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle. En 1880, Pasteur a isolé ce genre bactérien, dénommé “vibrion pyogénique”, à partir de pus d’anthrax et chez un patient souffrant d’une ostéomyélite. En 1883, Sir Alexander Ogston, chirurgien anglais, donne le nom de staphylocoque pour ce genre bactérien qui ressemble à des grains (*kokkos* en grec) rassemblés sous forme de grappe (*staphule*) (Lyell 1989). En 1884, Rosenbach donne une première classification à partir de la couleur des colonies observées après culture sur milieu gélosé : blanches ou dorées.

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de la famille des micrococcacae. Parmi les 43 espèces et sous-espèces de staphylocoques décrites, *S. aureus* est une espèce particulière. Elle s’oppose aux autres espèces d’un point de vue phénotypique et clinique. *S. aureus* produit une enzyme appelée coagulase (capable de coaguler le plasma) qui les distingue des autres espèces regroupées en staphylocoques coagulase négatif (*S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, etc.) (Pfaller and Herwaldt 1988; Lowy 1998). D’un point de vue clinique, *S. aureus* est l’espèce la plus pathogène et sa virulence a été reconnue dès l’ère pasteurienne. A l’opposé, le rôle pathogène des staphylocoques coagulase négative n’a été établi que dans les années 80 et concerne principalement des infections sub-aiguës favorisées par la présence de matériel étranger (Pfaller and Herwaldt 1988).

S. aureus est une bactérie commensale et pathogène. Elle est commensale car elle la possibilité de coloniser un hôte au niveau d’un site anatomique cutané ou muqueux sans causer de dommage ni de réaction inflammatoire pendant des années (Lowy 1998). Elle est pathogène car elle peut, à partir d’un site colonisé mais

pas nécessairement, entraîner une infection et une réaction inflammatoire dont l'importance dépend des moyens de défense de l'hôte, de la porte d'entrée et du pouvoir d'invasion de l'isolat de *S. aureus* en question. Cette bactérie est donc versatile et responsable d'une grande variété d'infections dont l'expression clinique dépend de la capacité de l'isolat à produire des facteurs de virulence et à interagir avec l'hôte (Figure 1) (Lowy 1998).

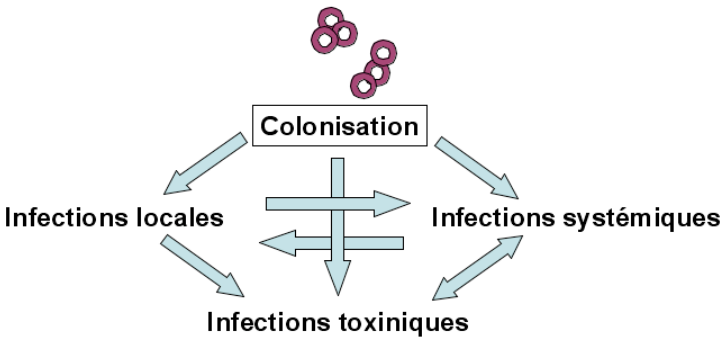


Figure 1. Multiples possibilités d'interactions entre *S. aureus* et l'hôte. A partir d'une simple colonisation, *S. aureus* peut entraîner des infections locales pouvant conduire à une infection systémique ou toxinique. Cette bactérie peut également entraîner des infections systémiques d'emblée, responsables d'infections locales secondaires ou des pathologies toxiniques sans infection locale ni systémique.

II. 2. Définition et épidémiologie des infections graves à *S. aureus*

Le syndrome inflammatoire qui accompagne toute infection bactérienne est le résultat de la réponse de l'hôte à l'agression. Le syndrome inflammatoire de réponse systémique (SIRS) est défini en pratique clinique par deux des quatre critères suivants : (1) une température corporelle >38°C ou ≤36°C, (2) un nombre de leucocytes circulants >12 G/l ou ≤4G/l, (3) une tachycardie >90 battements par minute, (4) une polypnée >20 par minute (Bone, Sibbald et al. 1992). Cette réponse inflammatoire peut s'observer au cours de très nombreuses situations cliniques, pas forcément d'origine infectieuse, comme la pancréatite aiguë ou au cours d'un polytraumatisme. Lorsqu'elle est associée à une infection suspectée ou documentée, cette réponse inflammatoire est dénommée sepsis (Bone, Sibbald et al. 1992). Le sepsis peut concerner des infections de bon pronostic pouvant être pris en charge en ambulatoire ou des infections plus graves nécessitant une hospitalisation.

L'hospitalisation d'un patient qui présente un sepsis se justifie en fonction du terrain, de la localisation du foyer infectieux (pouvant menacer le pronostic fonctionnel) et de l'importance de la réponse inflammatoire systémique qui à l'extrême peut entraîner un choc septique avec défaillance multiviscérale menaçant le pronostic vital (Lowy 1998; Annane, Bellissant et al. 2005). En trente ans, l'épidémiologie du sepsis a changée (Lowy 1998; Annane, Bellissant et al. 2005). Martin et al. a constaté aux Etats-Unis une augmentation de l'incidence des hospitalisations pour sepsis entre 1979 et 2000 avec 82,7 cas pour 100 000 habitants en 1979 et 240,4 cas pour 100 000 habitants en 2000 (Martin, Mannino et al. 2003). Dans les années 1980, c'était les bactéries à Gram négatif les plus grand pourvoyeuses de sepsis, juste devant les bactéries à Gram positif et loin devant les infections fongiques. Par la suite, l'incidence de ces trois types de pathogène a augmenté mais c'est surtout l'incidence des infections fongiques et des infections à Gram positif qui a le plus augmenté (Figure 2) (Martin, Mannino et al. 2003).

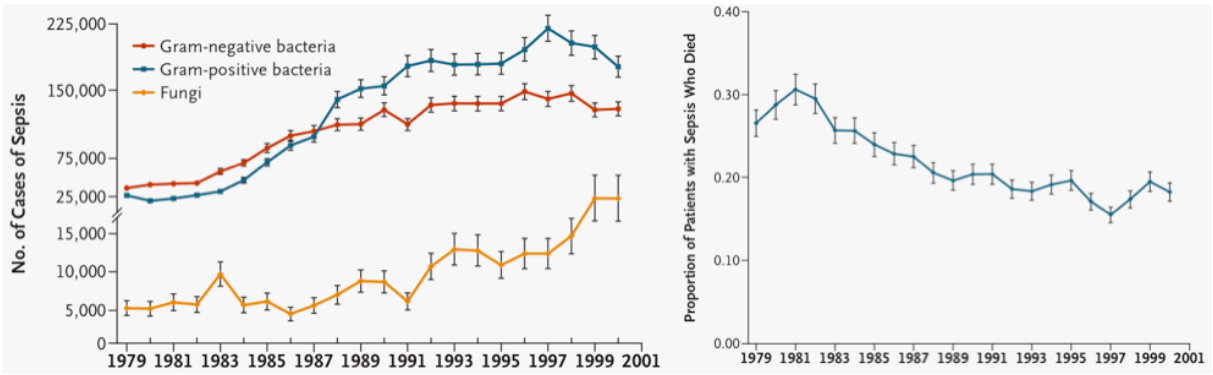


Figure 2. Incidence croissante des hospitalisations pour sepsis aux Etats-Unis (en fonction du temps et selon le type de micro-organisme en cause, à gauche) avec diminution progressive de la mortalité (à droite). D'après Martin, Mannino et al. 2003.

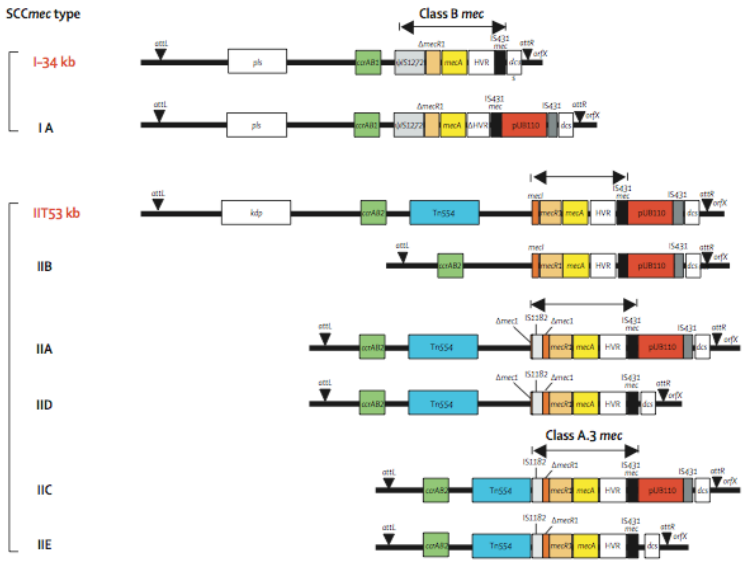
En 2000, les infections à Gram positif sont même devenus la principale cause de sepsis justifiant une hospitalisation, représentant 52,1% des sepsis contre 37,6% pour les bactéries à Gram négatif et 4,6% pour les champignons (Martin, Mannino et

al. 2003). L'augmentation de l'incidence du sepsis est probablement multifactorielle et la plus grande proportion de sujets immunodéprimés pourrait avoir un rôle déterminant dans cette évolution. L'augmentation des sepsis à Gram positif pourrait être également liée à l'utilisation croissante de matériel étranger comme les dispositifs intravasculaires (cathéter, valve cardiaque, ect.) ou le matériel orthopédique (Lowy 1998; Martin, Mannino et al. 2003; Annane, Bellissant et al. 2005). Il n'est pas exclu que cette augmentation puisse être expliqué, au moins en partie, par une virulence accrue de ces bactéries dont *S. aureus* fait partie, lié à l'acquisition de certains gènes pouvant favoriser leur dissémination. L'augmentation globale de l'incidence du sepsis s'est accompagnée d'une baisse de la mortalité, probablement grâce aux progrès thérapeutiques réalisés dans la prise en charge du sepsis (Martin, Mannino et al. 2003; Annane, Bellissant et al. 2005). Toutefois, la morbidité, la mortalité et le coût du sepsis restent très élevé, particulièrement lorsque *S. aureus* est impliqué (Martin, Mannino et al. 2003; Annane, Bellissant et al. 2005).

II. 3. Histoire naturelle de la résistance à la méticilline et apparition des SARM hospitaliers et communautaires

Rapidement après l'introduction de la méticilline en 1959, les premiers SARM hospitaliers ont été isolés (Lowy 1998; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). La résistance à la méticilline est due à la production d'une protéine liant les pénicillines (PLP) additionnelle, la PLP2a, qui a une affinité faible pour toutes les béta-lactamines. La PLP2a est codée par le gène *mecA* qui est inclus dans un élément génétique mobile dénommé SCC*mec* (*Staphylococcal chromosomal cassette mec*). Cette cassette est un fragment d'ADN exogène (21-67 kb) qui s'insère dans le chromosome de *S. aureus* toujours au niveau du même site ($attB_{scc}$). L'origine de cet élément est inconnue, mais il est probable qu'il soit membre d'une famille de cassette

permettant le transfert de gènes entre les différentes espèces de *S. aureus* (Lowy 1998; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). Il existe plusieurs types de cassettes SCC*mec* et toutes possèdent le complexe *mec* et le complexe *ccr* (*cassette chromosome recombinase,* permettant la mobilité de la cassette). La cassette SCC*mec* contient également des éléments accessoires comme des séquences d'insertion, des transposons ou des copies de plasmides portant des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques que les béta-lactamines (Lowy 1998; Hiramatsu, Cui et al. 2001; Oliveira, Tomasz et al. 2002; Ito, Okuma et al. 2003). Il existe plusieurs moyens de définir un type de cassette SCC*mec* selon les caractéristiques des différents complexes *mec* et complexes *ccr*. La classification la plus utilisée et celle décrite par Oliveira et al. en 2002, complété par Ito, Okuma et Shore en 2002, 2004 et 2005 (Figure 3) (Okuma, Iwakawa et al. 2002; Oliveira and de Lencastre 2002; Ito, Ma et al. 2004; Shore, Rossney et al. 2005).



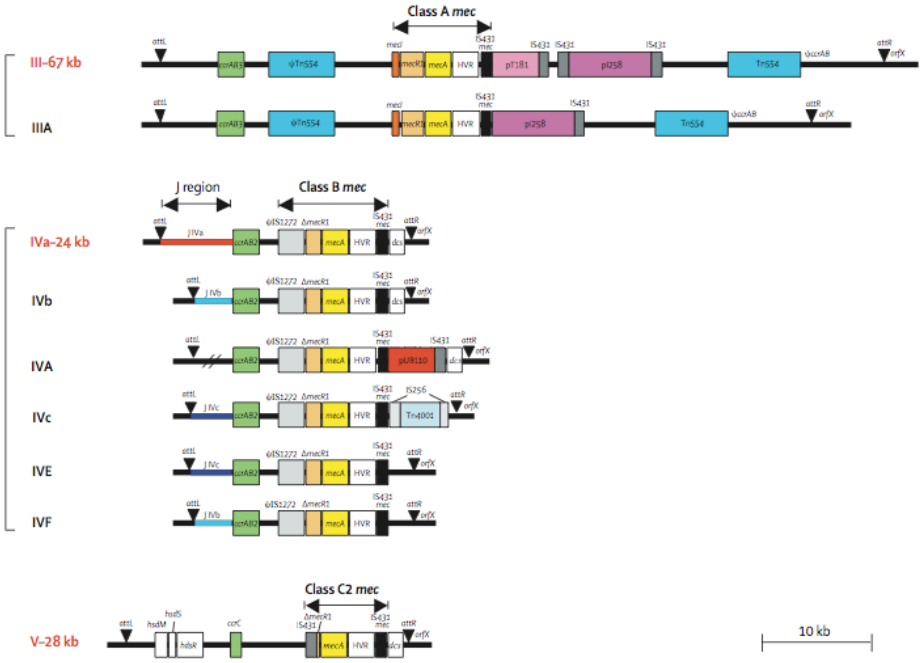


Figure 3. Structure schématique des différents types de SCC*mec* (I-V) et des variants IA, IIIA, IVA d'après Oliveira et al., V d'après Ito et al., IVa et IVb d'après Okuma et al., et IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IVc, IVE, IVF d'après Shore et al. Okuma, Iwakawa et al. 2002; Oliveira and de Lencastre 2002; Ito, Ma et al. 2004; Shore, Rossney et al. 2005.

Bien que la cassette SSC*mec* soit un élément génétique mobile, son acquisition *in vivo* est un phénomène exceptionnellement observé (Oliveira, Tomasz et al. 2002). Ainsi, quelques clones SARM hospitaliers ont émergé depuis l'introduction de la méticilline et sont responsables à eux seuls de la majorité des infections nosocomiales à *S. aureus* (Robinson and Enright 2003). Le développement des outils de biologie moléculaire a permis de bien caractériser le fond génétique de ces grands clones SARM hospitaliers pandémiques (on utilise le *sequence type* [ST], voir chapître II. 8. 2. pour les détails, par caractériser le fond génétique d'un clone SARM) et de montrer leur capacité à diffuser au niveau international (Oliveira, Tomasz et al. 2002; Robinson and Enright 2004). Ces clones SARM pandémiques sont regroupés en cinq grands groupes dénommés complexes clonaux (CC) (Figure 4) (Robinson and Enright 2004).

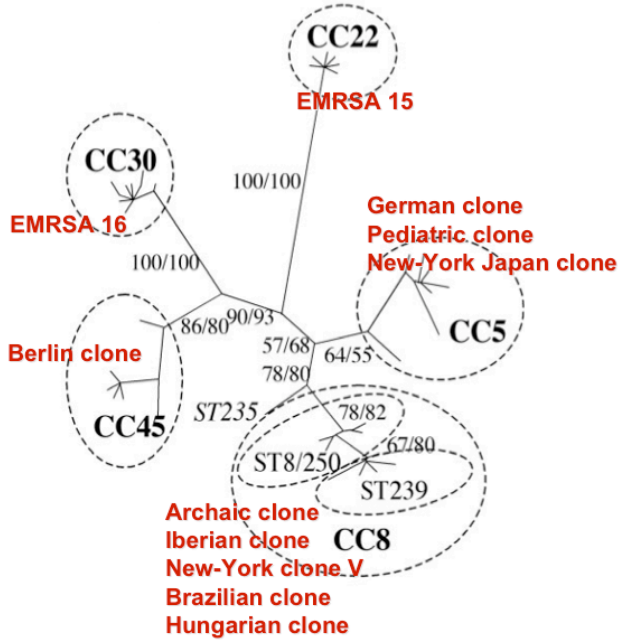


Figure 4. Principaux SARM hospitaliers pandémiques à l'échelle mondiale appartenant à cinq complexes clonaux différents. Le complexe clonal 8 est le plus représenté notamment avec le clone Archaïque (ST250), le clone Ibérique (ST250), le New-York clone V (ST5), le Clone Brésilien (ST239) et le clone Hongrois (ST239). Adapté de Robinson and Enright 2004.

Le clone SARM Archaïque serait le premier clone SARM pandémique a être apparu, au Danemark, dans les années 1950 (Robinson and Enright 2003; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). Ce clone dériverait d'un clone ancestral sensible à la méticilline. Par la suite, d'autres clones pandémiques, dérivant du clone Archaïque comme le clone Ibérique ou dérivant du clone ancestral sensible à la méticilline, ont été décrits (Figure 5) (Oliveira, Tomasz et al. 2002; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006).

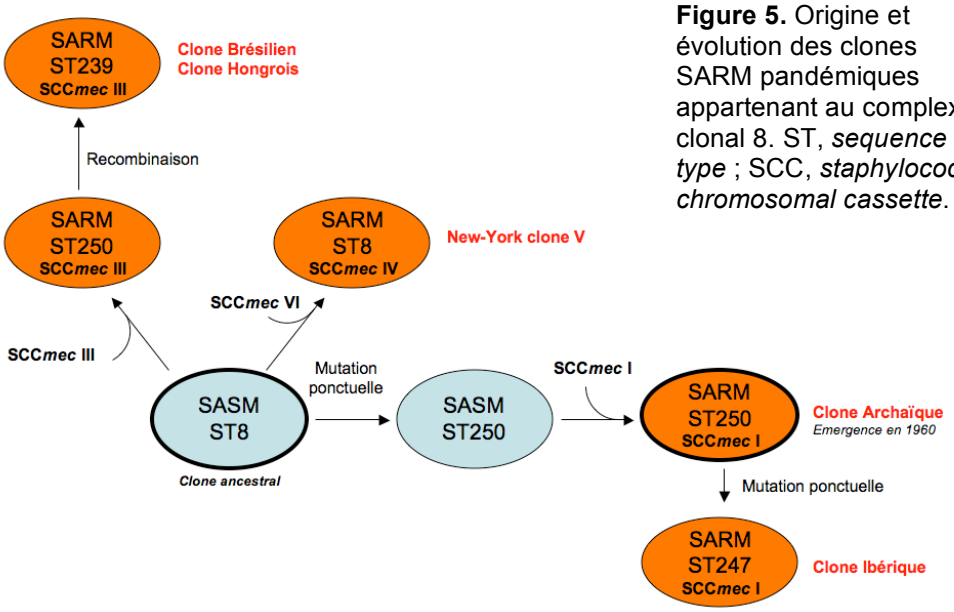


Figure 5. Origine et évolution des clones SARM pandémiques appartenant au complexe clonal 8. ST, *sequence type* ; SCC, *staphylococcal chromosomal cassette*.

Ces clones diffusent à l'échelle mondiale et l'épidémiologie des SARM hospitalier est en constante évolution. Le clone Ibérique initialement décrit en Espagne en 1989, était le clone prédominant dans le sud de l'Europe (Oliveira, Tomasz et al. 2002; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). Depuis 2000, le clone Ibérique est devenu minoritaire et a été remplacé en Espagne par le clone EMRSA-16 qui a été détecté pour la première fois en Angleterre (Figure 6) (Oliveira, Tomasz et al. 2002; Perez-Roth, Lorenzo-Diaz et al. 2004; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006).

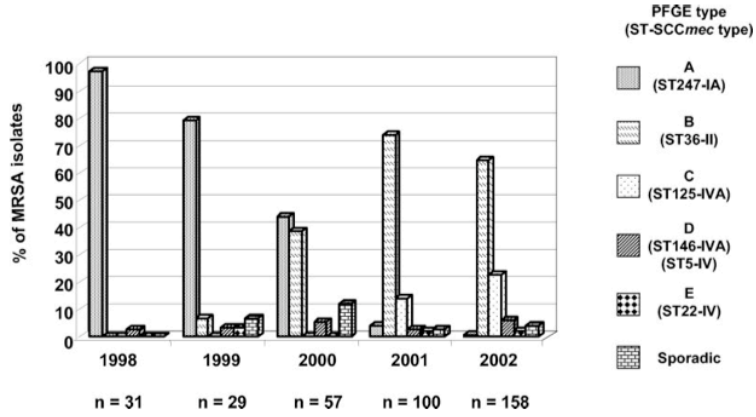


Figure 6. Variation temporelle de la prévalence de chacun des clones SARM en fonction du temps au *Nuestra de Candelaria University Hospital,* Tenerife, Espagne. Clone A, clone Ibérique ; clone B, clone EMRSA-16 ; clones C et D, clones dérivant du clone Pédiatrique ; clone E, clone EMRSA-15. D'après Perez-Roth, Lorenzo-Diaz et al. 2004.

Le clone Pédiatrique, découvert dans les services de Pédiatrie du Portugal en 1992, a été également retrouvé en Pologne, en Argentine et en Colombie (Oliveira, Tomasz et al. 2002; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). Le clone Brésilien prédomine dans les Hôpitaux d'Amérique du Sud alors que le clone New-York/Japon prédomine dans les Hôpitaux New-Yorkais, dans le New Jersey, la Pennsylvanie et le Connecticut aux USA. Le New-York clone V, un variant du clone Ibérique, a été pour la première fois identifié en Europe (République Tchèque) avant de devenir épidémique aux Etats-Unis (Oliveira, Tomasz et al. 2002; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). En France, le clone majoritaire en 1992 semblait être le clone Archaïque, mais depuis les SARM sont devenus sensible à la gentamicine ce qui pourrait traduire l'émergence d'un clone devenu pandémique dans les hôpitaux

Français (Laurent, Lelievre et al. 2001). A l'échelle Européenne, la prévalence des SARM hospitaliers prédomine au sud, avec une forte prévalence au Portugal, en Grèce, en Italie ou en Roumanie, par rapport au Nord (Oliveira, Tomasz et al. 2002; Grundmann, Aires-de-Sousa et al. 2006). Le système de surveillance Européen de la résistance antimicrobienne (EARSS), qui recueille des isolats cliniques de *S. aureus* à partir de nombreux laboratoires couvrant au moins 20% de la population de chaque pays Européen, retrouve cette tendance : prévalence de l'ordre de 45% pour le Portugal et la Grèce contre moins de 5% pour les pays scandinaves (European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2005. Bilthoven). Pour la France, la prévalence des SARM diminue, mais reste élevée puisque 30% des isolats de *S. aureus* responsables d'infections invasives en 2005 étaient des SARM (contre 35% en 2001) (European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2005. Bilthoven). Ces différences sont liées aux bonnes pratiques médicales (prescription adaptée des antibiotiques limitant la pression de sélection) et aux mesures mises en œuvre pour contrôler l'émergence et la dissémination des clones SARM hospitaliers (règles d'hygiène hospitalière limitant la transmission inter-individuelle). Afin de mieux comprendre le potentiel épidémique des clones SARM hospitaliers, Lee souches N315 et Mu50, appartenant au clone New-York/Japon, ont été séquencé en 2002 (Kuroda, Ohta et al. 2001). Ceci a permis de percer le secret du formidable pouvoir d'adaptation de *S. aureus* (Figure 7).

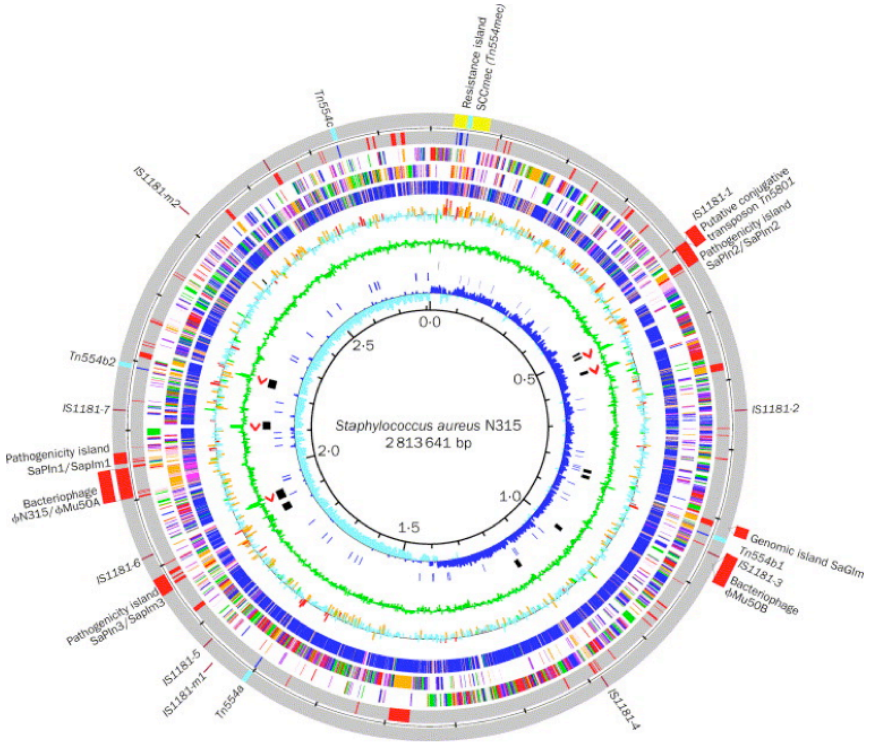


Figure 7. Représentation circulaire du chromosome de la souche N315 (et des éléments spécifiques de la souche Mu50) appartenant au clone New-York/Japon. Le cercle extérieur montre la distribution des éléments génétiques mobiles de N315 : en jaune, SCC*mec* ; en bleu clair, le transposon Tn554 ; en rouge, les phages et îlots de pathogénicité ; en marron, la séquence d'insertion IS1181. Les éléments spécifiques de Mu50, par comparaison avec N315, correspondent aux éléments en dehors du cercle extérieur. Les cercles intérieurs correspondent à des caractéristiques taxonomiques. D'après Kuroda, Ohta et al. 2001.

Le génome de *S. aureus* est parsemé d'éléments génétiques mobiles qui codent non seulement des résistances aux antibiotiques, mais aussi des facteurs de virulence. En dehors de mutations spontanées, *S. aureus* diversifie son génome grâce à sa dextérité à échanger du matériel génétique avec d'autres espèces bactériennes. Cette flexibilité génétique lui confère la capacité de s'adapter à toutes les conditions environnementales et notamment à l'Hôpital ou la pression de sélection est maximale. Les clones SARM hospitaliers peuvent également être isolés « en ville », lorsque les patients colonisés et/ou infectés par un clone SARM hospitalier retournent à leur domicile (Lowy 1998; Del Giudice, Blanc et al. 2006; Lescure, Locher et al. 2006). Jusque dans les années 1990, les infections à SARM diagnostiquées en dehors de l'hôpital étaient observées chez des patients ayant des facteurs de risque d'acquisition des SARM hospitaliers comme une hospitalisation

récente ou des contacts rapprochés avec une personne travaillant à l'hôpital (Lowy 1998; Salgado, Farr et al. 2003; Del Giudice, Blanc et al. 2006; Lescure, Locher et al. 2006). Depuis, des infections sévères à SARM ont été décrites alors que les patients n'avaient aucun facteur de risque d'acquérir un clone SARM hospitalier. L'analyse génétique de ces isolats a révélé qu'il s'agissait de clones SARM ayant émergé dans la communauté (Salgado, Farr et al. 2003; Vandenesch, Naimi et al. 2003). Ces clones ont acquis la cassette SCC*mec* dans la communauté et ont la capacité de produire la leucocidine de Panton Valentine qui est un facteur de virulence associé à des pathologies bien particulières (Lina, Piemont et al. 1999; Dufour, Gillet et al. 2002). Plusieurs clones SARM communautaires ont été caractérisés et ont émergé en même temps sur les cinq continents (Vandenesch, Naimi et al. 2003; Zetola, Francis et al. 2005). Un de ces clones, dénommé USA300, est le clone prédominant aux Etats-Unis (Vandenesch, Naimi et al. 2003; Zetola, Francis et al. 2005). Initialement responsables d'infections cutanées épidémiques dans certaines minorités sociales (aborigènes, indiens…), chez les homosexuels, les prisonniers, ou les équipes de football, il est devenu le clone SARM majoritaire chez les enfants hospitalisés aux Etats-Unis (Mishaan, Mason et al. 2005; Zetola, Francis et al. 2005). Depuis peu, ce clone diffuse dans les hôpitaux américains et est responsable d'infections nosocomiales, ce qui n'a pas encore été décrit avec le clone SARM communautaire européen (Gonzalez, Teruya et al. 2006; Seybold, Kourbatova et al. 2006). Le séquençage du génome du clone USA300 a révélé qu'il possédait un élément génétique mobile dénommé ACME (*arginin catabolic mobile element*), habituellement retrouvé chez *S. epidermidis* et pas chez *S. aureus*, qui pourrait favoriser la croissance et la survie et ainsi expliquer en partie le succès de ce clone (Figure 8) (Diep, Gill et al. 2006).

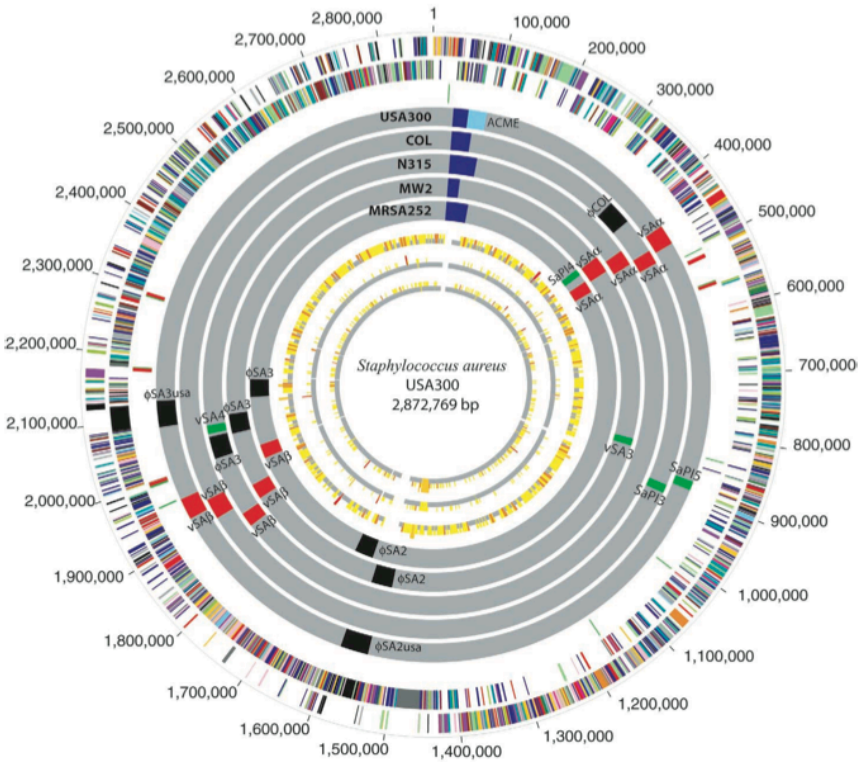


Figure 8. Représentation circulaire du chromosome de la souche FPR3757 appartenant au clone USA300 avec détail concernant les éléments génétiques mobiles, comparés à ceux des souches COL (clone Archaïque), N315 (clone New/York/Japon), MW2 (clone USA400) et MRSA252 (Clone EMRSA-16). En bleu, SCC*mec* ; en bleu clair, ACME ; en rouge, îlots alpha et béta ; en noir, prophages ; en vert, îlots de pathogénicité. L'élément ACME, qui favorise la survie et la croissance de *S. epidermidis*, a probablement été transféré horizontalement au clone USA 300 et pourrait expliquer en partie son succès. D'après Diep, Gill et al. 2006.

Le principal clone SARM communautaire en Europe a également émergé dans les années 1990. Ce clone, au fond génétique distinct du clone USA300, a été détecté en France, en Suisse, en Angleterre, en Belgique et en Allemagne, mais aussi au Danemark ou la prévalence des SARM hospitaliers est particulièrement faible. Ce clone reste minoritaire puisqu'il représente en 2005 entre 0,5% et 1% de la totalité des SARM isolés en France, mais sa prévalence pourrait augmenter (Tristan, Durand et al. 2005).

II. 4. Réservoirs, mode de transmission et facteurs de risque d'acquisition de SARM

L'homme est le principal réservoir de *S. aureus*. Toutefois, *S. aureus* peut être présent dans l'environnement, notamment sur certaines surfaces, ou coloniser des

animaux domestiques. *S. aureus* est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses, notamment au niveau de la muqueuse nasale (gîte privilégié définit comme la niche écologique de *S. aureus*), de l'oropharynx et du périné (Figure 9) (Lowy 1998; Wertheim, Melles et al. 2005).

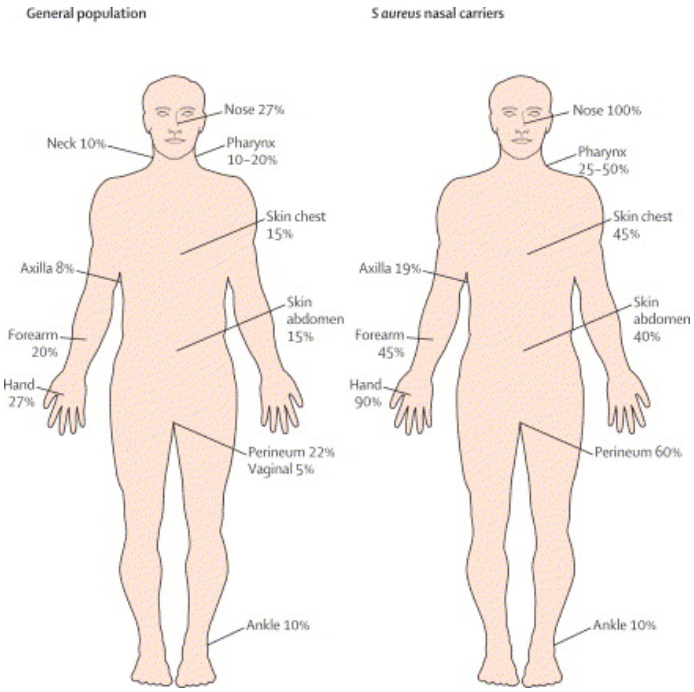


Figure 9. Prévalence du portage à *S. aureus* selon les sites anatomiques au sein de la population générale (à gauche) et chez les patients porteurs au niveau nasal (à droite). D'après Wertheim, Melles et al. 2005.

La fréquence du portage nasal varie de 20 à 30% dans la population générale. La majorité des sujets colonisés sont des porteurs occasionnels ou intermittents alors que d'autres sont des porteurs permanents (Lowy 1998; Wertheim, Melles et al. 2005). Les éléments déterminants dans le portage sont multiples, liés à la bactérie (capacité d'adhésion et à s'internaliser dans les cellules épithéliales de la muqueuse nasele) mais aussi à l'hôte (sexe, âge, type HLA, statut immunitaire, etc.) (Wertheim, Melles et al. 2005; Clement, Vaudaux et al. 2005). La transmission de *S. aureus* est interhumaine directe ou indirecte (via l'environnement) par voie manuportée. Les clones SARM hospitaliers diffusent dans les hôpitaux du fait de la pression de sélection des antibiotiques et par manuportage via le personnel soignant (Lowy 1998; Wertheim, Melles et al. 2005). Les principaux facteurs d'acquisition de SARM

hospitalier sont : l'hospitalisation prolongée (particulièrement en réanimation), toute chirurgie récente, une antibiothérapie récente (particulièrement lorsqu'elle est prolongée et constituée d'une beta-lactamine et/ou d'une fluoroquinolone), la présence d'un cathéter inttra-vasculaire, et la proximité avec un patient colonisé ou infecté à SARM hospitalier ou une personne travaillant à l'hôpital (Lowy 1998; Salgado, Farr et al. 2003; Lescure, Locher et al. 2006). Les clones SARM communautaires diffusent dans la communauté par des contacts cutanés rapprochés, au sein d'une population à risque (minorités sociales, homosexuels, prisonniers, etc.) et/ou au sein même famille et la population pédiatrique est maintenant devenue la principale source de SARM communautaire dans certaines villes des Etats-Unis (Martinez-Aguilar, Avalos-Mishaan et al. 2004; Zetola, Francis et al. 2005). Ces clones ont également la capacité de diffuser dans l'hôpital lorsqu'un patient infecté avec un de ces clones est hospitalisé (Gonzalez, Rueda et al. 2006).

II. 5. Description des facteurs de virulence

Les rapports de *S. aureus* avec l'hôte font intervenir à l'état commensal comme pathogène certains divers facteurs de virulence (Lowy 1998; Wertheim, Melles et al. 2005). Il a été démontré que le portage nasal avait un impact significatif sur la survenue d'une infection à *S. aureus* (Lowy 1998; Corne, Marchandin et al. 2005; Wertheim, Melles et al. 2005) et le pouvoir pathogène de *S. aureus* est lié aux nombreux facteurs de virulence qu'il est capable de produire (Foster and Hook 1998; Dinges, Orwin et al. 2000; Dufour, Jarraud et al. 2000; Yarwood, Bartels et al. 2004; Chavakis, Wiechmann et al. 2005) (Figure 10).

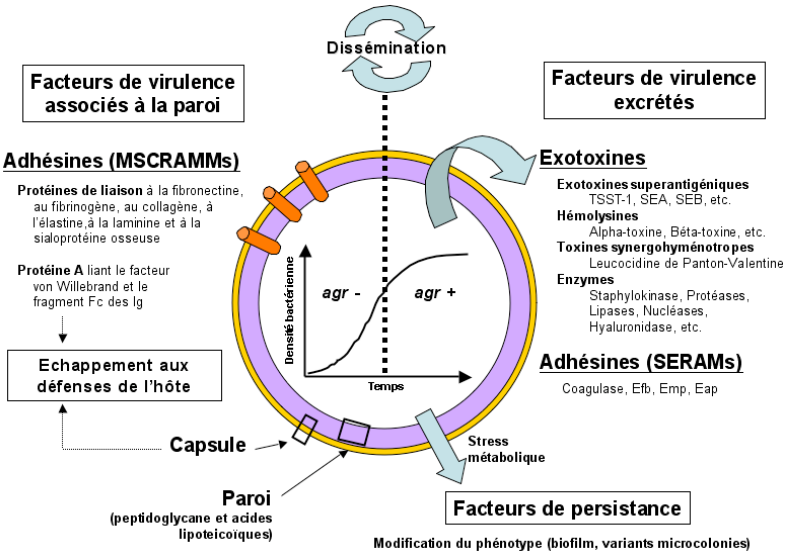


Figure 10. Facteurs de virulence exprimés à la surface ou excrétés par *S. aureus* en fonction de la densité bactérienne Foster and Hook 1998; Dinges, Orwin et al. 2000; Dufour, Jarraud et al. 2000; Yarwood, Bartels et al. 2004; Chavakis, Wiechmann et al. 2005.

Chaque isolat est constitué d'une paroi recouverte d'une capsule et exprime à sa surface des protéines capables d'initier la colonisation de l'hôte (Lowy 1998). *S. aureus* peut également produire dans le milieu extérieur des exotoxines (dont certaines sont superantigéniques) et des enzymes, avant de disséminer dans l'organisme (Lowy 1998; Dinges, Orwin et al. 2000)….

II. 5. 1. La capsule et la paroi de *S. aureus*

Les polysaccharides capsulaires sont présents chez 90% des isolats cliniques de *S. aureus* et sont classés en 11 sérotypes. Les sérotypes 5 et 8 sont les principaux rencontrés en pathologie humaine (Lowy 1998; Verdier, Durand et al. 2007). Les polysaccharides capsulaires sont présents chez 90% des isolats cliniques de *S. aureus* et sont classés en 11 sérotypes. Les sérotypes 5 et 8 sont les principaux rencontrés en pathologie humaine (Lowy 1998; Verdier, Durand et al. 2007). Les polysaccharides capsulaires permettent à *S. aureus* de mieux résister à la phagocytose (Lowy 1998). Associés aux polysaccharides produits dans le milieu

extérieur (PIA pour *polysaccharide intercellular adhesin*), les polysaccharides capsulaires majorent les propriétés d'adhésion de *S. aureus* (Lowy 1998; Yarwood, Bartels et al. 2004). Comme pour les autres *cocci* à Gram positif, la paroi de *S. aureus* est constituée d'acides lipoteichoïques et de peptidoglycane (figure 11) (Lowy 1998).

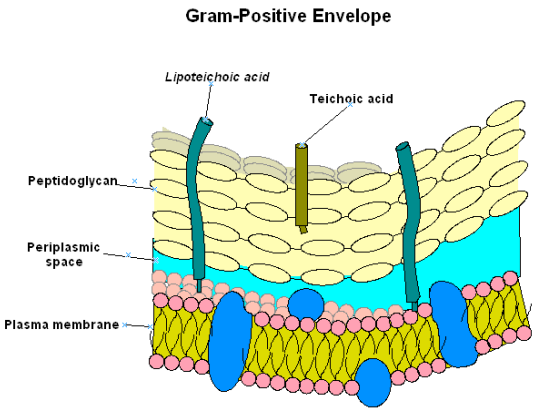


Figure 11. Paroi de *S. aureus*, localisée à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, constitué majoritairement de peptidoglycane (en jaune) au sein duquel sont enchassés les acides teichoïques et lipoteichoïques.

http://www.conceptdraw.com/sampletour/medical/GramPositiveEnvelope.gif

Les acides lipoteichoïques interviennent dans l'adhérence grâce à leur domaine hydrophobe et servent de molécule d'ancrage à certaines adhésines par des liaisons electrostatiques, alors que le peptidoglycane lie de manière covalente la plupart des protéines d'adhésion (Foster and Hook 1998; Lowy 1998).

II. 5. 2. Les protéines d'adhésion exprimées par *S. aureus*

L'adhésion bactérienne est un processus indispensable avant toute invasion des tissus de l'hôte (Lowy 1998). Elle évite la clearance bactérienne par des phénomènes mécaniques et permet l'action secondaire des toxines. L'adhésion de *S. aureus* est médiée par des forces physico-chimiques (notamment les liaisons hydrophobes des acides lipoteichoïques) mais aussi par des liaisons spécifiques aux différentes molécules du plasma, aux cellules de l'hôte et aux éléments de la matrice

extra-cellulaire grâce à l'expression de nombreuses adhésines (Figure 10) (Foster and Hook 1998; Lowy 1998). Les adhésines de *S. aureus* font partie de la famille des MSCRAMMs (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*) (Foster and Hook 1998). Ces protéines ont en commun plusieurs domaines : l'extrémité N-terminal constituée par le domaine S (permettant l'acheminement de la protéine vers le réticulum endoplasmique avant son insertion dans la membrane cellulaire) ; des domaines uniques ou répétés (A, B, C, D ou R, contenant le site de liaison au ligand) ; et une séquence à l'extrémité C-terminal constituée d'une région W, d'une région M (permettant l'ancrage dans la membrane cytoplasmique) encadrant un motif LPXTG (liaison covalente au peptidoglycane) (figure 12) (Foster and Hook 1998).

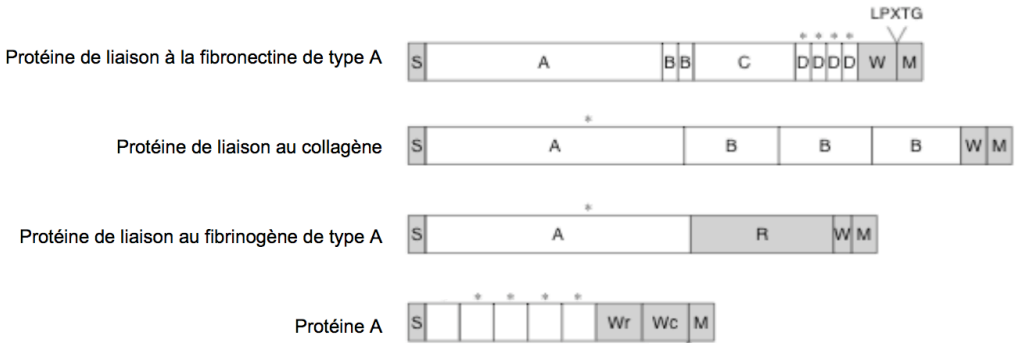


Figure 12. Structure des MSCRAMMs avec les domaines S (peptide signal), A, B, C, R (contenant les sites de fixation au ligand représentés par *) W et M (ces derniers étant séparés par le motif LPXTG). D'après Foster and Hook 1998.

Les adhésines les mieux caractérisées sont celles qui reconnaissent la fibronectine, le fibrinogène, le collagène, l'élastine, la laminine et la sialoprotéine osseuse. La protéine A est une MSCRAMM particulière car elle ne se lie pas à un des éléments de la matrice extracellulaire mais au facteur von Willebrand qui est une glycoprotéine présente dans le plasma et qui a un rôle dans l'agrégation plaquettaire (Foster and Hook 1998). Par ailleurs, la protéine A possède des propriétés anti-opsonisante en fixant le fragment Fc des immunoglobulines. Ainsi, les MSCRAMMs ont un rôle

majeur dans l'adhésion de *S. aureus* aux diverses cellules et aux divers tissus de l'hôte (Foster and Hook 1998; Lowy 1998). Récemment, des d'adhésines non exprimées à la surface de *S. aureus* mais produites dans le milieu extérieur ont été décrites. Cette famille d'adhésine se nomme SERAM (*secretable expanded repertoire adhesive molecules*) et comprend la protéine de liaison au fibrinogène extracellulaire (Efb), la protéine de liaison à la matrice extracellulaire (Emp) et la protéine d'adhésion extracellulaire (Eap) et comprend la coagulase (Figure 10) (Chavakis, Wiechmann et al. 2005). Un pouvoir d'adhésion accru pourrait expliquer le potentiel de diffusion des clones SARM dans le milieu hospitalier ou dans la communauté. Amaral et al. ont démontré que la capacité d'adhésion du clone Brésilien était 7 à 10 fois supérieure à des clones MRSA sporadiques et à des *S. aureus* sensibles à la méticilline (SASM) sur une lignée de cellule bronchique (Figure 13) (Amaral, Coelho et al. 2005).

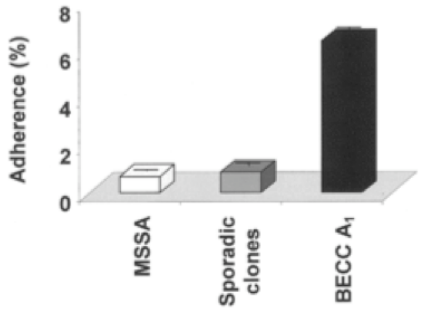


Figure 13. Adhérence accrue (p<0.001) du clone Brésilien (BECC, *Brazilian endemic clonal complex*) par rapport à des clones sporadiques ou à des SASM responsables d'infections invasives dans la même zone géographique (Belém, Brésil) pendant la même période de temps (1995-1997). Chaque isolat une fois marqué par la thymidine tritiée était laissé en contact 1 heure avec une lignée de cellules bronchiques (lignée 16HBE14o$^-$) avant lavage. D'après Amaral, Coelho et al. 2005.

II. 5. 3. Invasion intracellulaire des cellules de l'hôte

Après avoir adhéré, *S. aureus* a la capacité de pénétrer à l'intérieur des cellules non-phagocytaires de l'hôte (Lowy 1998; Garzoni, Francois et al. 2007). Ceci est médiée par les adhésines d'une part et aux intégrines présents à la surface des cellules de

l'hôte, d'autre part. A titre d'exemple, l'intégrine alpha5-béta1 qui se trouve à la surface des fibroblastes, des cellules épithéliales et endothéliales a comme ligand la fibronectine. Ainsi, grâce à la protéine de liaison à la fibronectine, *S. aureus* est capable d'adhérer à ces cellules via l'intégrine alpha5-béta1 et de s'internaliser dans les cellules non phagocytaires (Sinha, Francois et al. 1999). A l'intérieur de la cellule hôte, *S. aureus* est soit logé dans l'endosome, soit libre dans le cytoplasme (Bayles, Wesson et al. 1998). A ce stade, *S. aureus* peut soit persister, soit se multiplier et entraîner l'apoptose ou la nécrose de la cellule hôte (Bayles, Wesson et al. 1998; Lowy 1998). Amaral et al. a étudié les capacité d'invasion de cellules non phagocytaires par des isolats du clone Brésilien et a démontré que celle-ci était supérieure à celle des clones SARM sporadiques et des SASM (Amaral, Coelho et al. 2005).

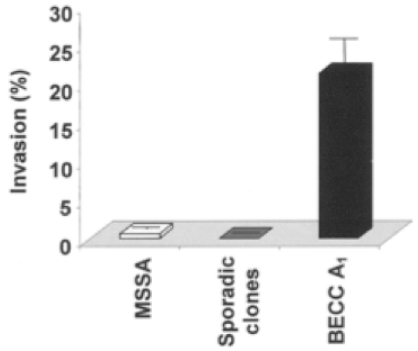


Figure Z. Invasion accrue des cellules bronchiques de la lignée 16HBE14o$^-$ par des isolats du clone Brésilien (BECC, Brazilian endemic clonal complex) après 3 heures 30 de contact. Calcul du pourcentage d'UFC après lyse des bactéries extracellulaires. D'après Amaral, Coelho et al. 2005.

II. 5. 4. Lyse cellulaire et envahissement tissulaire

S. aureus a la capacité de lyser les cellules et les tissus de l'hôte grâce à la mise en jeu d'un grand nombre de toxines et d'enzymes comme des protéases (Figure 10) (Lowy 1998; Dinges, Orwin et al. 2000). Certaines exotoxines ont une action de lyse membranaire spécifique de certaines cellules de l'hôte. L'alpha-toxine (ou hémolysine-alpha), la béta-toxine, la delta-toxine et la gamma-toxine sont des

hémolysines qui forment des pores dans la membrane cellulaire (Lowy 1998; Dinges, Orwin et al. 2000; Essmann, Bantel et al. 2003). L'alpha-toxine est une protéine monomérique qui agit sous la forme d'un heptamère et a pour cible les cellules endothéliales, les plaquettes et les monocytes (Figure 15) (Essmann, Bantel et al. 2003; Miles, Jayasinghe et al. 2006).

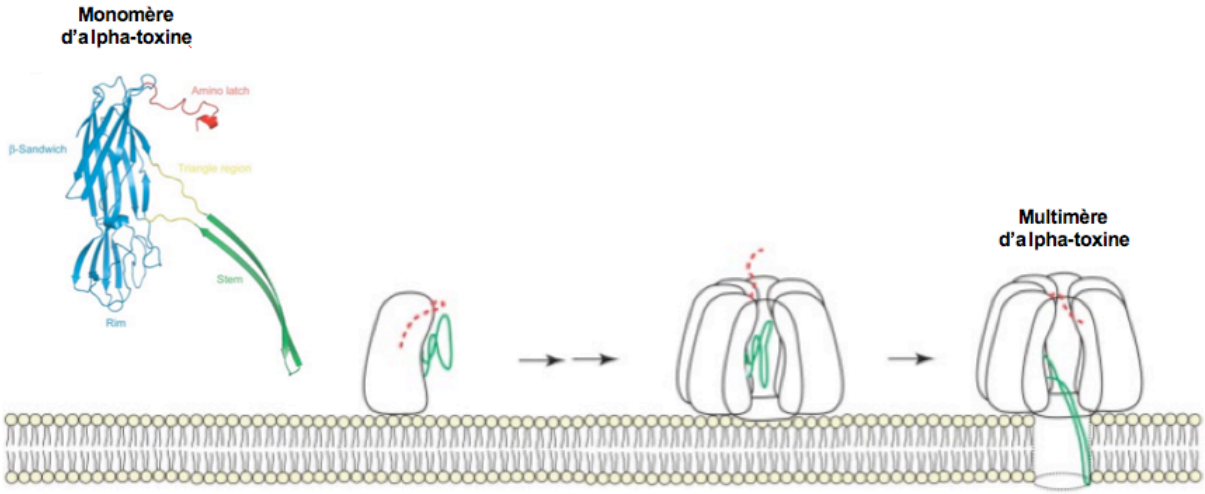


Figure 15. Mécanisme d'assemblage des monomères d'alpha-toxine pour former un multimère résistant à la protéolyse et formant un pore dans la membrane cytoplasmique. Adapté de Miles, Jayasinghe et al. 2006.

La gamma-toxine, au même titre que la leucocidine de Panton Valentine (PVL) et la leucocidine lukD-lukE, fait partie de la famille des toxines synergohyménotropes (Dinges, Orwin et al. 2000; Miles, Jayasinghe et al. 2006). Ces dernières sont formées de deux composants qui agissent de façon synergique pour lyser la membrane cellulaire. La PVL est constituée d'une protéine de classe S (LukS-PV) et d'une protéine de classe F (LukF-PV). Ces deux protéines s'associent à la surface de la membrane des cellules cibles, principalement les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages, pour former des pores octamériques (Figure 16) (Dinges, Orwin et al. 2000; Miles, Jayasinghe et al. 2006).

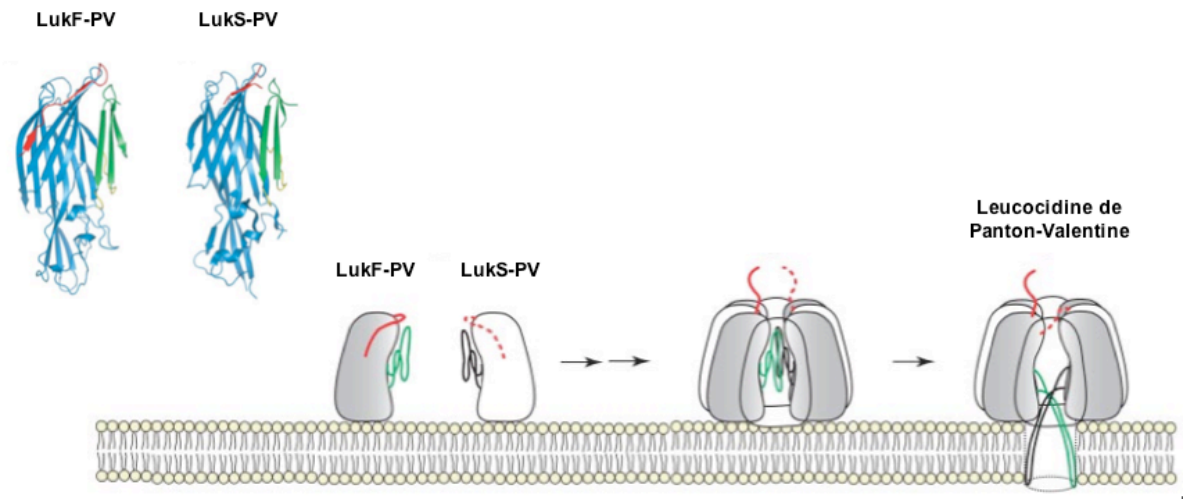


Figure 16. Mécanisme d'assemblage des monomères de lukF-PV et lukS-PV pour former la leucocidine de Panton-Valentine. Adapté de Miles, Jayasinghe et al. 2006.

Ces pores conduisent à la lyse cellulaire entraînant une libération massive de médiateurs et d'enzyme de dégradation à l'origine de lésions nécrotiques des tissus (Lowy 1998; Miles, Jayasinghe et al. 2006). A faible concentration cette même toxine induit l'apoptose des polycnucléaires par activation de la voie mitochondriale (Genestier, Michallet et al. 2005). Chez l'animal, l'injection intra-dermique ou sous-cutanée de PVL induit des lésions inflammatoires sévères avec une nécrose cutanée (dose dépendante) alors que l'injection intraveineuse entraîne une leucopénie (Cribier, Prevost et al. 1992; Zetola, Francis et al. 2005).

II. 5. 5. Dissémination dans l'organisme

La dissémination hématogène de *S. aureus* est liée à l'expression coordonnée des différents facteurs de virulence en fonction de la densité bactérienne (Lowy 1998; Dufour, Jarraud et al. 2000). Plusieurs régulateurs, dont le locus *agr* (*accessory gene regulator*) est le principal, interviennent dans ce programme séquentiel (Dufour, Jarraud et al. 2000). Le locus *agr* fonctionne selon un système de *quorum-sensing* à

deux composants, l'un senseur appelé AgrC sensible à la concentration d'un peptide auto-inducteur, et l'autre régulateur de réponse appelé AgrA dont l'activation entraîne la production de l'effecteur du système, appelé ARNIII. L'ARNIII non traduit induit à lui seul une réponse régulatrice. Il est indispensable à la transcription et/ou à la stabilisation des ARNm des exoprotéines et réprime la production des protéines de paroi comme les adhésines. Ainsi, lorsque la densité bactérienne est faible *in vitro*, le système *agr* n'est pas activé et la synthèse des protéines d'adhésion prédomine sur la synthèse des exoprotéines (Figure 17) (Dufour, Jarraud et al. 2000). A l'inverse, lorsque la densité bactérienne augmente, la synthèse des enzymes (protéases, nucléases, lipases) et des hémolysines prédomine sur la synthèse des protéines d'adhésion permettant *in vivo* l'extension du foyer infectieux en favorisant la diffusion locale et générale de l'infection (Lowy 1998; Dufour, Jarraud et al. 2000).

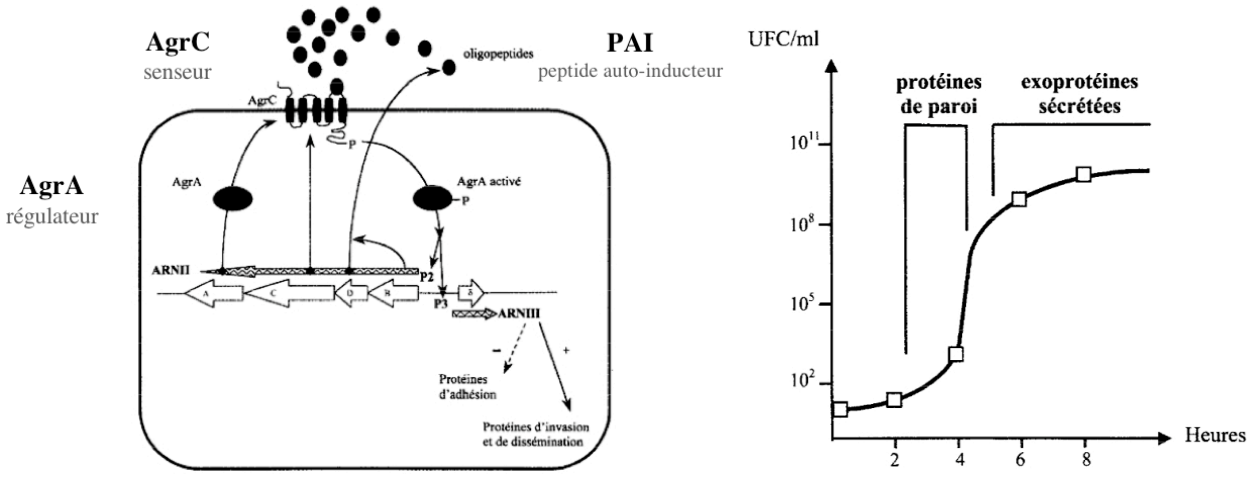


Figure 17. A faible densité bactérienne et au début de la phase exponentielle de croissance (faible concentration de peptide inducteur sans activation du régulateur par le système senseur), le système *agr* est réprimé et *S. aureus* exprime les facteurs d'adhésion. A la phase post-exponentielle de croissance, le système *agr* est activé (forte concentration de peptide inducteur et activation du régulateur par le système senseur) *S. aureus* produit les toxines et enzymes qui favorisent la destruction tissulaire et la dissémination de l'infection. D'après Dufour, Jarraud et al. 2000.

Au cours d'une dissémination hématogène, *S. aureus* favorise la formation de microthrombi et de métastases septiques. Dans un premier temps, la coagulase, qui

est une SERAM, transforme la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa) dans le sang circulant. Par la suite, la production d'une enzyme dénommée staphylokinase (enzyme fibrinolytique) fragmente le caillot et favorise la survenue de métastases septiques (Lowy 1998; Chavakis, Wiechmann et al. 2005).

II. 5. 6. Persistance dans l'organisme

Après invasion cellulaire et/ou dissémination dans l'organisme, *S. aureus* est capable de persister des mois et des années, notamment dans les os ou au contact de matériel (Lowy 1998; Yarwood, Bartels et al. 2004; Proctor, von Eiff et al. 2006; Plouin-Gaudon, Clement et al. 2006). En effet, sous l'influence d'un stress métabolique et dans certaines conditions environnementales, *S. aureus* est l'objet de modifications phénotypiques qui sont associées à la persistance chez l'hôte. La production de biofilm et/ou de variants microcolonies sont les deux principales voies d'adaptation (Yarwood, Bartels et al. 2004; Proctor, von Eiff et al. 2006). Le biofilm est un engainement d'une communauté de bactéries adhérente à une surface et protégée dans une matrice de polysaccharide dénommée *slime*) (Figure 18).

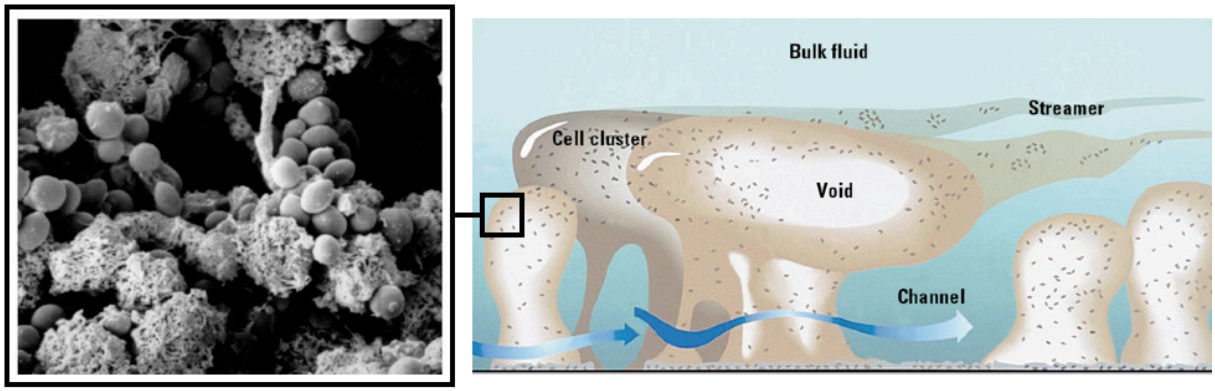


Figure Z. Communauté de bactéries constituant un biofilm (à gauche, photographie obtenue en microscopie électronique à balayage de l'extrémité visible d'un biofilm obtenu *in vitro* avec *S. aureus* Yarwood, Bartels et al. 2004 ; à droite schématisation du biofilm à plus grande échelle avec organisation en réseau [http://www.ehponline.org/docs/1998/106-12/innova-biofilmB.JPG]).

La surface contaminée peut être d'origine organique mais ce sont les surfaces abiotiques qui favorisent le plus la constitution de biofilm. Les bactéries qui constituent le biofilm ralentissent leur métabolisme, réduisent leur cinétique de multiplication et peuvent entrer en phase de dormance (Yarwood, Bartels et al. 2004). Lorsque le biofilm est constitué, il n'est plus possible de le dissocier de la surface qu'il a colonisé. Le *slime* produit par *S. aureus* est constitué par le *polysaccharide intercellular peptide* (PIA), codé par l'opéron *icaABCD* (Arciola, Collamati et al. 2001; Yarwood, Bartels et al. 2004). Cet opéron est présent chez la majorité des isolats cliniques de *S. aureus* (Arciola, Collamati et al. 2001). La régulation de son expression est complexe et dépend de multiples facteurs bactériens (comme la densité bactérienne ou *quorum-sensing*) et environnementaux (degré d'anaérobiose, stress osmotique, etc.) (Yarwood, Bartels et al. 2004). L'acquisition de la résistance à la méticilline pourrait avoir un impact sur la production de biofilm (Edgeworth, Yadegarfar et al. 2007). La capacité à produire du biofilm pourrait être une spécificité de certains SARM. Amaral et al. ont démontré qu'un sous-type du clone Brésilien avait une plus grande capacité à produire du biofilm par rapport à des clones SARM sporadiques et par rapport à des SASM (Figure 19) (Amaral, Coelho et al. 2005).

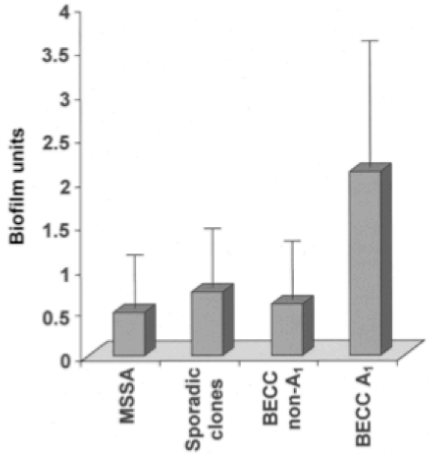


Figure 19. Capacité accrue d'une sous-population du clone Brésilien (BECC non-A1) à produire du biofilm *in vitro* sur plaque 96 puits au contact de polystyrène comparé à des clones SARM sporadiques et à des SASM. D'après Amaral, Coelho et al. 2005.

S. aureus a également la possibilité de persister chez l'hôte sous la forme de variants microcolonies (Proctor, von Eiff et al. 2006). Ce phénotype a la particularité d'être réversible et diffère du phénotype usuel par une modification des caractéristiques morphologiques et biochimiques du fait d'une altération du transport intracellulaire d'électron. Les variants microcolonies ont une croissance lente, forment des petites colonies atypiques, non pigmentées, non hémolytiques (Figure 20), produisent peu de coagulase et ont une résistance accrue pour les aminoglycosides, le triméthoprime-sulfaméthoxazole et les antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne (Proctor, von Eiff et al. 2006).

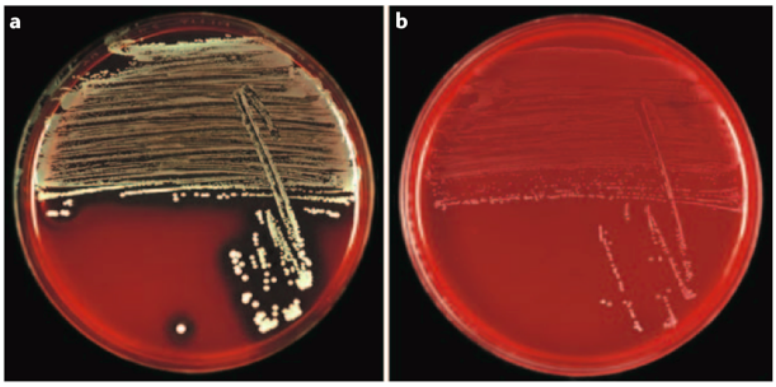


Figure 20. Aspect sur gélose au sang du phénotype usuel des colonies de *S. aureus* (à gauche) et du phénotype variant microcolonie (à droite). Les colonies du phénotype variant microcolonie poussent plus lentement, sont ponctiformes, non pigmentées et non hémolytiques. D'après Proctor, von Eiff et al. 2006.

Ces variants sont définis comme auxotrophes c'est-à-dire qu'ils nécessitent l'apport de certains substrats spécifiques (l'hémine et/ou la ménadione) pour que le transport intracellulaire d'électron soit restauré et pour que l'isolat retrouve les caractéristiques usuelles de *S. aureus*. La production de ces variants permet à *S. aureus* une meilleure survie chez l'hôte grâce à leur capacité à échapper à l'action de l'immunité innée, à s'internaliser et persister dans les phagocytes ou les fibroblastes, et à

résister à de nombreux antibiotiques (Proctor, von Eiff et al. 2006). La capacité des SARM à produire des variants microcolonies est inconnue.

II. 5. 7. Particularités des exfoliatines

Les exfoliatines sont des sérine protéases épidermolytiques impliquées uniquement dans certaines pathologies cutanées spécifiques (Ladhani 2001). Elles ont pour unique cible la desmogléine-1 qui est un des composant essentiel de l'adhésion intercellulaire au niveau de la peau et des muqueuses. L'analyse tridimensionnelle de la structure des exfoliatines révèle que la liaison avec le domaine extracellulaire de la desmogléine-1 aboutit à un changement de conformation et à une ouverture du site actif de l'enzyme. Le clivage du domaine extracellulaire de la desmogléine-1 aboutit à une disjonction intercellullaire. Il existe trois exfoliatines : l'exfoliatine A (ETA pour *exfoliative toxin* [ET] A), l'exfoliatine B (ETB) et l'exfoliatine D (ETD). ETA est une protéine thermostable codée par un gène localisé sur le chromosome, alors que ETB est thermolabile et codée par un gène localisé sur un plasmide (Ladhani 2001).

II. 5. 8. Particularité des exotoxines superantigéniques

II. 5. 8. 1. Généralités

Peu d'agents pathogènes ont la capacité de produire des exotoxines superantigéniques (Proft and Fraser 2003). Vingt-et-une exotoxines superantigéniques staphylococciques ont été individualisées à ce jour (Dinges, Orwin et al. 2000; Holtfreter and Broker 2005; Thomas, Chou et al. 2007). Il s'agit de la

toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1 codée par le gène *tst*) et de 20 entérotoxines (*staphylococcal enterotoxin* [SE] ou *staphylococcal enterotoxin-like* [SE*l*] lorsque la toxine ne possède pas de propriétés émétiques chez le singe) : SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SE*l*J, SE*l*K, SE*l*L, SE*l*M, SE*l*N, SE*l*O, SEP, SE*l*Q, SE*l*R, SE*l*U, SE*l*U2, SE*l*V codées respectivement par les gènes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *sep*, *selq*, *selr, selu, selu2, selv* (Dinges, Orwin et al. 2000; Holtfreter and Broker 2005; Thomas, Chou et al. 2007). Ces toxines ont une sont composées de deux domaines adjacents (Domaine A et B) séparés par une hélice centrale (Figure 21) (Dinges, Orwin et al. 2000). La construction d'arbres phylogéniques basée sur l'alignement des séquences d'acides-aminés des exotoxines superantigéniques montre une ségrégation en trois groupes monophylétiques, plus la TSST-1 qui est isolée (Figure 21) (Thomas, Chou et al. 2007).

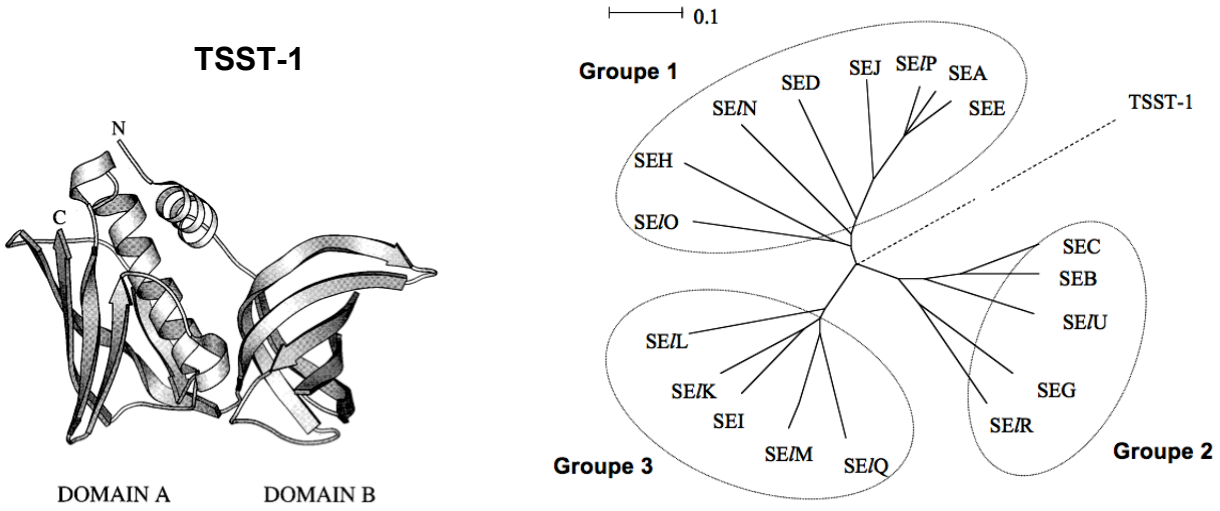


Figure X21. Aspect tridimensionnel de TSST-1 avec ses deux domaines, A et B, et son hélice centrale (à gauche, d'après Dinges, Orwin et al. 2000). Arbre phylogénétique des exotoxines superantigéniques révélant une ségrégation en trois groupe des entérotoxines (à droite, d'après Thomas, Chou et al. 2007).

Les gènes codant les exotoxines superantigéniques sont tous localisés sur des

éléments génétiques mobiles (plasmides, prophages ou îlots de pathogénicité) (Holtfreter and Broker 2005). Le gène *sea* et le gène *sep* ont été détectés sur le bacteriophage PhiSa3, au niveau du même locus. Le gène *see* semble lui aussi localisé sur un phage, distinct de PhiSa3. Les gènes *sed* et *sej* sont localisés conjointement sur le plasmide pIB485 avec le gène *bla* qui code la résistance à la pénicilline. Le gène *selr*, récemment découvert, est localisé avec les gènes *sed* et *sej* sur pIB485 ou seulement avec *sej* sur un autre plasmide. Les gènes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* et *selo* sont regroupés sur un opéron dénommé *egc* pour *enterotoxin gene cluster*. Cet opéron est localisé sur un îlots de pathogénicité (SaPI ; *Staphylococcus aureus Pathogenicity Islands*) dénommé SaPI3 avec deux autres groupes de gènes nommés *serin protease gene cluster* et *leucocidin gene cluster* (Holtfreter and Broker 2005). Les îlots de pathogénicité sont des segments d'ADN chromosomique de grande taille probablement d'origine phagique qui portent divers gènes de virulence dont au moins un gène codant une exotoxine superantigénique (Novick 2003). Cinq îlots de pathogénicité ont été décrits chez *S. aureus* (Figure 22) (Novick 2003; Holtfreter and Broker 2005). Quatre d'entre-eux appartiennent à la famille des TSST-1 *islands* et possèdent les gènes *tst* ou *seb* et sont associés à *sec*, *sel*, *seq* ou *sek*. Ces îlots de pathogénicité peuvent s'exciser et se répliquer de manière autonome (Novick 2003; Holtfreter and Broker 2005). Ils possèdent tous le gène *int* à une de leur extrémité qui code pour une intégrase nécessaire à l'intégration des TSST-1 *islands* dans le génome de *S. aureus* (Novick 2003; Holtfreter and Broker 2005).

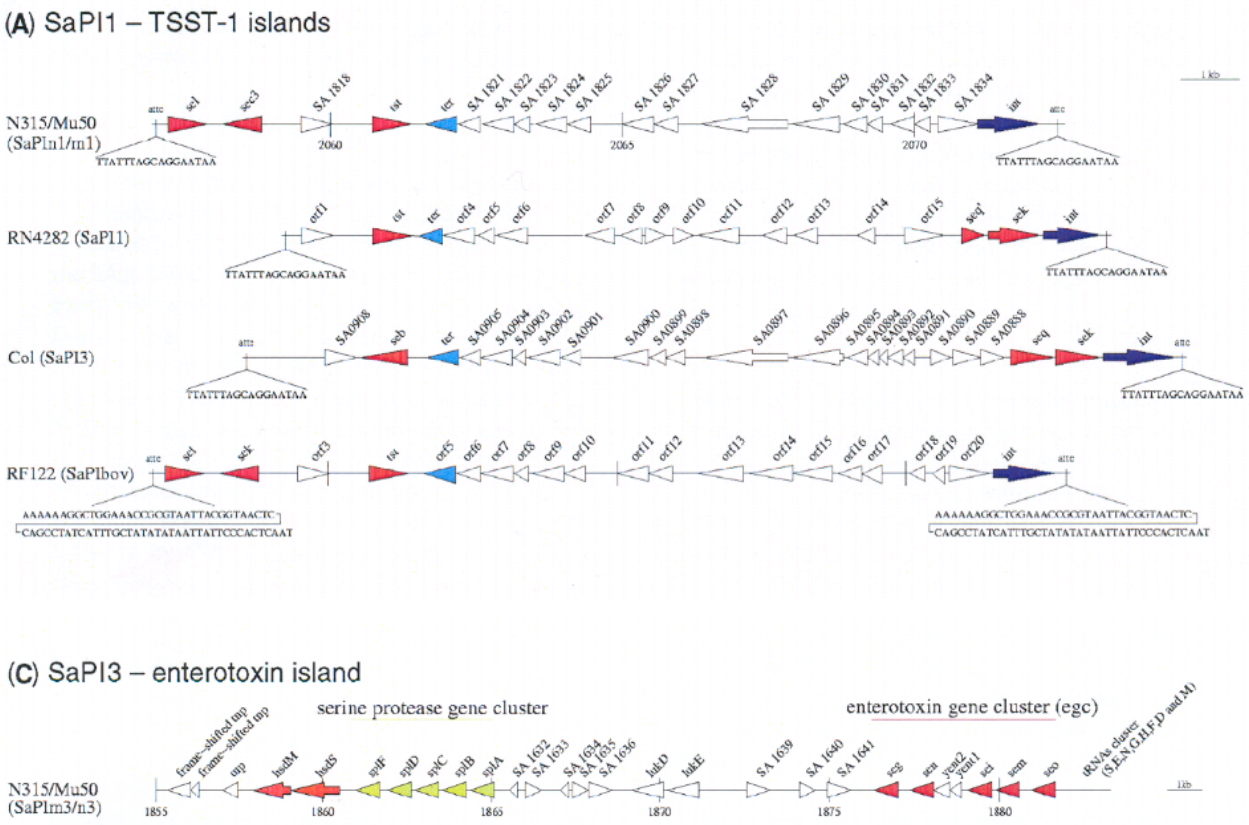


Figure 22. Les Îlots de pathogénicité de *S. aureus* comportant des gènes codant des exotoxines superantigéniques. En rouge, gène codant les exotoxines superantigéniques ; en jaune, gène de sérine protéase (*spl*) ; en bleu foncé, gène d'intégrase (*int*) ; en bleu clair, gène de terminase-*like* ; en blanc, cadre de lecture ouverts de fonction inconnus ; *tnp*, gène de transposase ; *luk*, gène de leucocidine. D'après Holtfreter and Broker 2005.

II. 5. 8. 2. Mécanisme d'action

Toutes ces protéines sont de puissants mitogènes, car contrairement à un antigène classique, elles ne sont ni internalisées, ni dégradées par la cellule présentatrice de l'antigène. Elles se fixent de manière conjointe, en dehors du site de présentation de l'antigène, sur la partie invariable du complexe majeur d'histocompatibilité de type II de la cellule présentatrice de l'antigène et sur la partie variable Vbeta du récepteur T des lymphocytes T. Alors qu'un antigène conventionnel active de manière spécifique 0,01% des lymphocytes T, quelques picogrammes d'un superantigène peuvent activer jusqu'à 40% d'entre eux (Figure 23) (Dinges, Orwin et al. 2000).

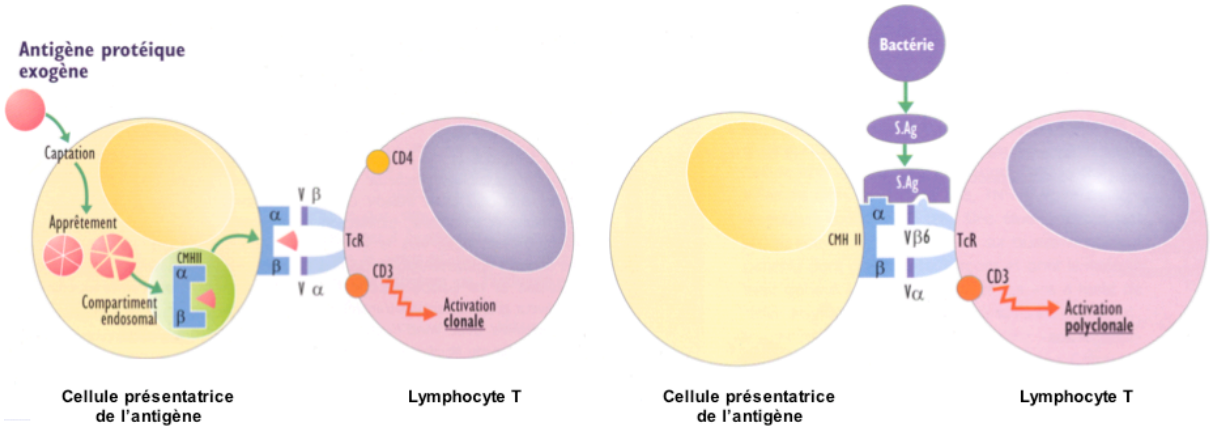


Figure 23. Activation lymphocytaire en présence d'un peptide antigénique (à gauche, après internalisation de l'antigène, dégradation et présentation au récepteur T des lymphocytes T par le CMH II entraînant une activation clonale spécifique des lymphocytes T [de l'ordre de 0,01% des lymphocytes T]) et en présence d'un superantigène (à droite, fixation du superantigène sur le CMH II et conjointement sur certains Vbeta du récepteur T des lymphocytes T [ici le Vbeta 6] induisant une activation polyclonale Vbeta dépendante des lymphocytes T [jusqu'à 40% des lymphocytes T activés])

L'activation lymphocytaire est polyclonale, massive et entraîne une production excessive de cytokines pro-inflammatoires de type T helper-1 (Th-1) dont l'IFN-gamma, le TNF-alpha, l'IL-1beta et l'IL-6 (Dinges, Orwin et al. 2000).

II. 5. 8. 3. Signature Vbeta

Chaque exotoxine superantigénique fixe un ou plusieurs des 24 principaux Vbeta d'un individu. Ainsi, chacune d'entre-elle possède théoriquement « une signature Vbeta » caractéristique (Dinges, Orwin et al. 2000; Thomas, Chou et al. 2007). La signature Vbeta de chacune des exotoxines superantigéniques a été déterminée *in vitro* (Tableau 1). TSST-1 a pour cible un seul Vbeta, le Vbeta 2, alors que les entérotoxines ont la capacité de fixer plusieurs Vbeta, par exemple jusqu'à 13 Vbeta différents pour SEA (Choi, Lafferty et al. 1990; Holtfreter and Broker 2005; Lavoie, Dumont et al. 2005; Llewelyn, Sriskandan et al. 2006). Comme aucune des entérotoxines ne peut fixer le Vbeta 2, celui-ci est spécifique de TSST-1. Par contre, aucun Vbeta n'est spécifique d'une entérotoxine, puisqu'un Vbeta ciblé par une

entérotoxine (par exemple Vbeta 14 ciblé par SEB) peut l'être également par une autre (SEC, SEG, SE/R, SE/U2) (Jarraud, Peyrat et al. 2001; Holtfreter and Broker 2005; Llewelyn, Sriskandan et al. 2006). De plus, selon certains auteurs, les différents Vbeta composant une signature d'une entérotoxine peuvent être considérés comme des Vbeta majeurs ou des Vbeta mineurs, selon l'intensité de leur expansion induite par l'exotoxine superantigénique en question (Holtfreter and Broker 2005; Thomas, Chou et al. 2007). Par exemple, SE/N induit une prolifération massive des lymphocytes T positifs pour le Vbeta 9, qui est un Vbeta majeur pour cette toxine alors que SE/O n'induit qu'une prolifération minime et inconstante des lymphocytes T positifs pour le Vbeta 9, qui est un Vbeta mineur pour cette toxine (Holtfreter and Broker 2005).

Exotoxines superantigéniques	Signature Vbeta obtenue *in vitro*	Références
TSST-1	2	(Choi et al. 1990; Holtfreter et al. 2005; Lavoie et al. 2005)
SEA	1, 5.1, 5.2, 5.3, 6.4, 7.2, 8, 9, 16, 18, 21.3, 22, 23	(Holtfreter and Broker 2005; Llewelyn, Sriskandan et al. 2006)
SEB	3, 6.4, 12, 13.2, 14, 15, 17, 20	(Holtfreter and Broker 2005; Llewelyn, Sriskandan et al. 2006)
SEC	3, 6.4, 12, 13.2, 14, 15, 17, 20	(Deringer, Ely et al. 1997; Holtfreter and Broker 2005)
SED	1, 5.3, 6.9, 7.4, 8, 12	(Holtfreter and Broker 2005)
SEJ	ND	
SEE	5.1, 6.3, 6.4, 6.7, 6.9, 8, 16, 18, 21.3	(Hudson, Robinson et al. 1993; Lamphear, Mollick et al. 1996)
egc locus		
SEG	3, 12, 13.1, 13.2, 13.6, 14, 15	(Jarraud, Peyrat et al. 2001; Holtfreter and Broker 2005)
SEI	1, 5.1, 5.2, 5.3, 6, 23	(Jarraud, Peyrat et al. 2001; Holtfreter and Broker 2005)
SE/M	5.1, 5.2, 5.3, 6, 18, 21.3, 23	(Jarraud, Peyrat et al. 2001; Holtfreter and Broker 2005)
SE/N	5.1, 5.2, 5.3, 9	(Jarraud, Peyrat et al. 2001; Holtfreter and Broker 2005)
SE/O	5.1, 7.1, 9	(Jarraud, Peyrat et al. 2001; Holtfreter and Broker 2005)
SHE	ND	
SE/P	5.1, 6, 8, 16, 18, 21.3	(Omoe, Imanishi et al. 2005)
SE/K	5.1, 5.2, 6.7	(Holtfreter and Broker 2005)
SE/Q	2, 5.1, 5.2, 6.7, 21.3	(Orwin, Leung et al. 2002; Holtfreter and Broker 2005)
SE/L	5.1, 5.2, 6.7, 7, 9, 16, 22	(Orwin, Fitzgerald et al. 2003; Holtfreter and Broker 2005)
SE/R	3, 11, 12, 13.2, 14	(Omoe, Imanishi et al. 2004; Holtfreter and Broker 2005)
SE/U	ND	
SE/U2	13.2, 14	(Thomas, Jarraud et al. 2006)
SE/V	6, 18, 21	(Thomas, Jarraud et al. 2006)

Tableau 1. Signature Vbeta de chacune des exotoxines superantigéniques de *S. aureus* déterminées *in vitro*.

II. 6. Infections graves à *S. aureus* et implication des facteurs de virulence

II. 6. 1. Choc toxique, choc septique et purpura fulminans

II. 6. 1. 1. Choc toxique staphylococcique

Le choc toxique staphylococcique (CTS) est une pathologie rare dont l'incidence précise est mal connue en France. Le CTS est caractérisé par de la fièvre, un rash cutané évoluant vers une desquamation secondaire et une atteinte multisystémique. (figure 24).

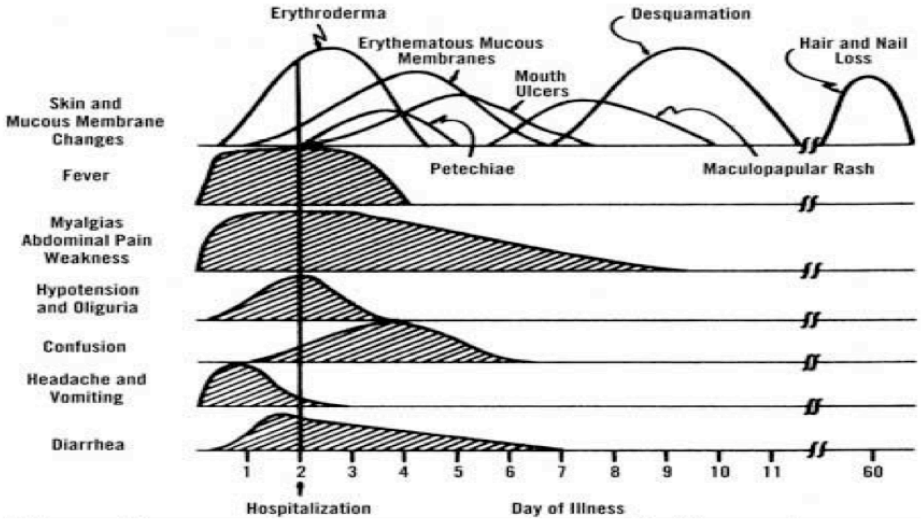


Figure 24. Séquence des symptômes cliniques au cours du CTS. D'après Chesney, Slama et al. 1981.

La présence de cinq ou de six des critères diagnostiques du *Center of Disease Control* (CDC) permet de définir respectivement les cas probables et les cas confirmés de CTS (Tabeau 2) (McCormick, Yarwood et al. 2001).

1. Fièvre > 38°8

2. Eruption maculaire diffuse

3. Desquamation cutanée 1 à 2 semaines après le début des symptômes, particulièrement au niveau des mains et de la plante des pieds

4. Hypotension définie par :
- Pression systolique < ou égale à 90 mmHg
- Baisse > ou égale à 15 mmHg de la pression diastolique à l'othostatisme
- Syncope à l'orthostatisme

5. Atteinte multisystémique (+ si 3/7)
- Gastrointestinale : diarrhées, vomissements
- Musculaire : myalgie ou CPK > 2N
- Muqueuse : hyperhémie vaginale, conjonctivale ou oropharyngée
- Rénale : hyperuricémie > 2N ou créatininémie >2N ou pyurie aseptique
- Hépatique : ASAT >2N ou ALAT >2N ou bilirubine >2N
- Hématologique : plaquettes < 100 G/l
- Système nerveux central : désorientation ou trouble de conscience sans focalisation

6. Critères paracliniques négatifs, si réalisés
- Hémocultures (sauf pour *S. aureus*), prélèvement de gorge, culture LCR
- Sérologie leptospirose, rougeole, *Rickettsia rickettsii*

Critères additionnels pathognomoniques de Parsonnet :

- Isolement d'une souche de *Staphylococcus aureus* à partir d'un prélèvement muqueux ou d'un site habituellement stérile
- Production par un isolat incriminé de *Staphylococcus aureus* d'une toxine connue pour être potentiellement responsable de TSS
- Absence d'anticorps dirigés contre la toxine concernée au début de la maladie
- Séroconversion pour la toxine concernée pendant la convalescence

Tableau 2. Critères diagnostiques du CDC d'un CTS. Un CTS est probable si 5 des 6 critères sont positifs. Un CTS est confirmé si tous les critères sont positifs. Pour Parsonnet et al., le CTS peut-être confirmé si 5 critères positifs sont associés à des critères additionnels. CPK, créatine phosphokinase ; ASAT, aspartate aminotransférase ; ALAT, alanine aminotransférase ; N, valeurs normales. D'après 1990; McCormick, Yarwood et al. 2001.

Le CTS peut-être d'origine menstruelle ou non-menstruelle (Stevens 1996; McCormick, Yarwood et al. 2001). Les CTS menstruels surviennent en dehors de toute infection, au cours des menstruations lors de l'utilisation de tampons périodiques à fort pouvoir absorbant ou de stérilets. Ces derniers sont colonisés par une souche de *S. aureus* productrice de TSST-1. La toxine superantigénique traverse la muqueuse vaginale (seule la TSST-1 a cette capacité), atteint la

circulation systémique et est responsable à elle seule de l'intégralité des signes cliniques et biologiques du CTS menstruel (Stevens 1996; McCormick, Yarwood et al. 2001). Dans les années 1980, du fait de la généralisation de l'utilisation de tampon à fort pouvoir absorbant, un grand nombre de cas a été décrits. Par la suite, la limitantion du pouvoir absorbant des tampons a permis de réduire le nombre de cas (Figure 25) (1990; Hajjeh, Reingold et al. 1999).

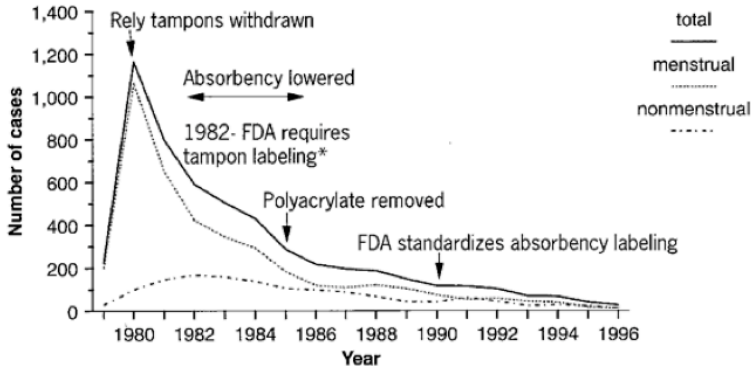


Figure 25. Epidémiologie du choc toxique menstruel et non-menstruel aux Etats-Unis. D'après Hajjeh, Reingold et al. 1999.

Les CTS non-menstruels sont rencontrés à la suite d'infections staphylococciques suppuratives superficielles ou profondes, le plus souvent post-opératoires (Stevens 1996; McCormick, Yarwood et al. 2001). Ils représentent maintenant la majorité des CTS. Les hémocultures sont parfois positives au cours du CTS non-mentruel (contrairement au CTS menstruel) et la mortalité des CTS non-mentruels semble plus élevée (Stevens 1996; McCormick, Yarwood et al. 2001). Du fait que le CTS non-menstruel s'associe à une infection focale et parfois à une bactériémie, il est difficile d'attribuer l'intégralité des symptômes cliniques, et notamment l'état de choc, seulement à l'exotoxine superantigénique. Ces données suggère que le CTS non-menstruel pourrait être une forme frontière entre le choc toxique et le choc septique. La réponse pro-inflammatoire serait liée dans ces cas, non seulement à la toxémie

mais aussi à la prolifération bactérienne et à la bactériémie (Holtfreter and Broker 2005). Le traitement du CTS fait appel à l'antibiothérapie anti-staphylococcique classique mais également à des traitements adjuvants anti-toxiniques (voir paragraphe II. 9. 2.) (McCormick, Yarwood et al. 2001). Le retrait du tampon est essentiel au cours du choc toxique menstruel. Au cours des CTS post-opératoires la reprise chirurgicale à visée diagnostique et surtout curative semble indispensable même si localement les signes inflammatoires sont modérés et même s'il ne semble pas exister d'abcédation (Stevens 1996; McCormick, Yarwood et al. 2001). La prévention de la récidive du choc toxique menstruel repose sur la contre-indication ultérieure à utiliser des tampons absorbants.

II. 6. 1. 2. Choc septique

Au cours du sepsis, la réponse inflammatoire a pour but d'éradiquer le pathogène (Annane, Bellissant et al. 2005). Le choc septique, la forme la plus grave de sepsis, survient lorsque la réponse pro-inflammatoire systémique (dénommée également réponse type Th-1) est excessive. Le choc septique se caractérise par une vasoplégie et une hypotension artérielle responsable de défaillance d'organe, réfractaire à l'expansion volémique et nécessitant l'administration d'amines vaso-actives. Parfois, la réponse pro-inflammatoire Th-1 est tellement explosive que le choc est réfractaire à tout traitement, y compris aux amines vaso-actives, et le patient décède dans un tableau de défaillance multiviscérale. En réponse à la phase pro-inflammatoire, une phase anti-inflammatoire Th-2 est mise en jeu pour pouvoir compenser ses effets. Lorsqu'elle est excessive, la phase anti-inflammatoire peut également être délétère en entraînant une immunoparalysie et favoriser les infections bactériennes nosocomiales, qui à leur tour peuvent menacer le pronostic

vital (Figure 26).

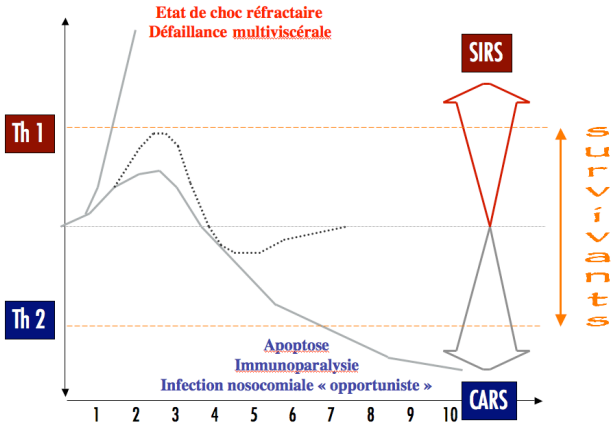


Figure 26. Evolution de la balance Th-1/Th-2 au cours du choc septique. Une réponse Th-1 ou Th-2 excessive en réponse à l'agression met en jeu le pronostic vital du patient par choc septique réfractaire ou par immunoparalysie. SIRS, *systemic inflammatory response syndrome* ; CARS, *compensatory anti-inflammatory response syndrome*.

S. aureus est une des bactéries les plus fréquemment responsable de choc septique (Tableau 3).

	Estimated frequency*
Gram-positive bacteria	30–50%
Meticillin-susceptible *S aureus*	14–24%
Meticillin-resistant *S aureus*	5–11%
Other *Staphylococcus* spp	1–3%
Streptococcus pneumoniae	9–12%
Other *Streptococcus* spp	6–11%
Enterococcus spp	3–13%
Anaerobes	1–2%
Other gram-positive bacteria	1–5%
Gram-negative bacteria	25–30%
E coli	9–27%
Pseudomonas aeruginosa	8–15%
Klebsiella pneumoniae	2–7%
Other *Enterobacter* spp	6–16%
Haemophilus influenzae	2–10%
Anaerobes	3–7%
Other gram-negative bacteria	3–12%
Fungus	
Candida albicans	1–3%
Other *Candida* spp	1–2%
Yeast	1%
Parasites	1–3%
Viruses	2–4%

Tableau 3. Principaux agents pathogènes responsables de choc septique, *S. aureus* étant la bactérie la plus fréquemment isolée (dans 19 à 35% des cas). D'après Annane, Bellissant et al. 2005.

Les pathologies associées au choc septique sont principalement les pneumopathies, les infections abdominales et urinaires (Annane, Bellissant et al. 2005). Dans plus d'un tiers des cas, les hémocultures sont positives et dans un quart des cas, il existe plusieurs sites infectés (Annane, Aegerter et al. 2003). La mortalité au cours des bactériémies à *S. aureus*, qui traduit une dissémination systémique de l'infection, varie de 7,4% à 32% selon les études (Mylotte, McDermott et al. 1987; Fowler,

Sanders et al. 1998) alors qu'elle était de 82% en 1941, avant l'avènement de la pénicilline G (Skinner and Keefer 1941). L'age des patients ainsi que les comorbidités associées ont un impact significatif sur la mortalité mais le pronostic et la survie dépendent principalement de la survenue d'un choc septique à la phase initiale de l'infection (Lesens, Methlin et al. 2003). Plusieurs facteurs microbiens pourraient avoir un impact sur la réponse inflammatoire systémique et sur la mortalité. L'inoculum bactérien, qui est un paramètre contrôlé en expérimentation animale, semble avoir un rôle sur la gravité d'une bactériémie à *S. aureus* (Bartell, Orr et al. 1968). Chez l'homme, un inoculum bactérien élevé au cours d'une bactériémie pourrait se traduire par un délai court de positivité des hémocultures. Un délai de positivité < à 12 h est associé à une plus grande survenue de choc septique et à une mortalité accrue par rapport à un délai de positivité > 12 h (Marra, Edmond et al. 2006). Les motifs bactériens de surface ont un rôle majeur dans la réponse pro-inflammatoire de l'hôte. Ils sont reconnus par des récepteurs cellulaires des monocytes et macrophages, majoritairement ceux de la famille des *toll-like receptors* (TLR) (Cook, Pisetsky et al. 2004; Annane, Bellissant et al. 2005). Une fois activés, les TLR induisent une signalisation intracellulaire dominée par l'activation transcriptionnelle dont le principal est le *nuclear factor*-kappaB. Il en résulte une production de cytokines de type Th-1 (TNF-alpha, IL-1beta, l'IL-6) qui ont un rôle majeur dans la réponse pro-inflammatoire (Cook, Pisetsky et al. 2004; Annane, Bellissant et al. 2005). Il existe une dizaine de TLR décrits. Ils diffèrent au niveau de leur domaine extracellulaire par des répétitions de motifs riches en Leucine (Cook, Pisetsky et al. 2004). Le peptidoglycane et les acides lipoteichoïques sont reconnus par le TLR-2 et participent ainsi à la réponse inflammatoire de l'hôte (Cook, Pisetsky et al. 2004; Annane, Bellissant et al. 2005). De nombreux autres facteurs de

virulence semblent être impliqués dans le choc septique à *S. aureus*. Les polysaccharides capsulaires de type 5 et 8 sont épidémiologiquement liés aux bactériémies à *S. aureus* chez l'homme et c'est le type 5 qui procure une plus grande virulence à *S. aureus* dans des modèles animaux (Roghmann, Taylor et al. 2005; Watts, Ke et al. 2005). Parmi les MSCRAMMs, la protéine de liaison au fibrinogène pourrait avoir un rôle déterminant dans le sepsis à *S. aureus*. En effet, chez l'animal, l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine a un effet protecteur au cours du sepsis et chez l'homme, il existe une augmentation significative du taux d'anticorps anti-protéine de liaison au fibrinogène après un épisode de bactériémie à *S. aureus* (Colque-Navarro, Soderquist et al. 1998; Hall, Domanski et al. 2003). Les protéines de liaison à la fibronectine semblent avoir un rôle primordial dans la survenue d'un choc septique dans un modèle animal d'arthrite (Palmqvist, Foster et al. 2005). De même, la protéine A pourrait avoir un rôle dans la sévérité du sepsis (Palmqvist, Foster et al. 2002). L'alpha-toxine est une toxine qui participe à la réponse pro-inflammatoire observée au cours du choc septique à *S. aureus*. En interagissant avec les plaquettes et les monocytes, l'alpha-toxine provoque *in vitro* une libération de médiateurs pro-inflammatoires et pourrait contribuer *in vivo* au cours du sepsis à *S. aureus* à la survenue d'une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) en détruisant les cellules endothéliales (Haslinger, Strangfeld et al. 2003). Par ailleurs, l'alpha-toxine favorise la dépression myocardique et la vasoconstriction coronarienne dans un modèle animal de rat et pourrait ainsi participer à la survenue d'une dysfonction cardiaque au cours du choc septique à *S. aureus* (Sibelius, Grandel et al. 2000). Parmi les facteurs de virulence impliqués dans le choc septique, les protéases dont les « *staphopain* » A et B, qui sont des cystéine protéases, pourraient avoir un rôle non négligeable puisqu'à elles seules, elles induisent une hypotension artérielle

par hyperperméabilité vasculaire et vasoplégie chez l'animal, via la bradikinine (Figure 27 et 28) (Imamura, Tanase et al. 2005).

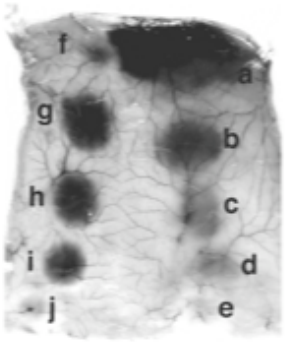


Figure 27. Induction d'une perméabilité vasculaire dose dépendante par les *staphopain* A et B injectés en intradermique à un cochon d'inde après injection intravasculaire de bleu d'Evans. a, *staphopain* A à 600 nM ; b, *staphopain* A à 200 nM ; c, *staphopain* A à 60 nM ; d, *staphopain* A à 20 nM ; e, *staphopain* A inactivée à 600 nM ; f , *staphopain* B à 600 nM ; g, bradykinine à 100 nM ; i, bradykinine à 10 nM ; j, PBS. D'après Imamura, Tanase et al. 2005.

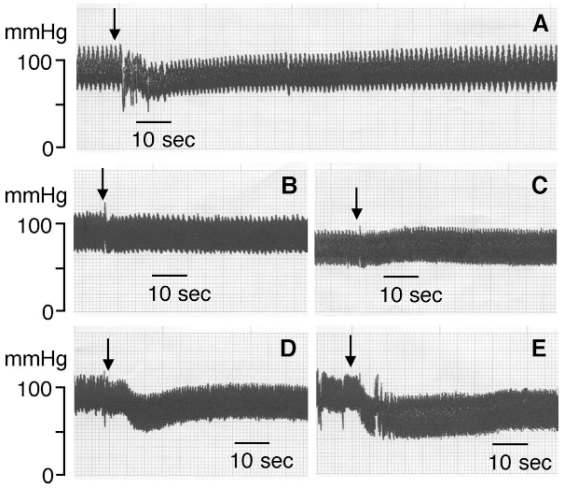


Figure 28. Evolution de la pression artérielle pulsée d'un cochon d'inde après injection intraveineuse : A, de *staphopain* A ; B, de *staphopain* A inactivée ; C, de *staphopain* A chez un cochon d'inde prétraité par un antagoniste de la bradykinine (HOE140) ; D, d'un analogue de la bradykinine (leucyl-methionyl-lysyl-bradykinine); E, de bradykinine. La diminution de la pression artérielle après l'injection de *staphopain* A était de 16.1 ± 5.3 mm Hg, était obtenue 15 secondes après l'injection, et 1 minute était nécessaire pour retrouver l'état basal. D'après Imamura, Tanase et al. 2005.

Les exotoxines superantigéniques pourraient également être impliquées dans la physiopathologie du choc septique à *S. aureus* (Holtfreter and Broker 2005). Plusieurs observations permettent d'étayer cette hypothèse : a) le potentiel à induire une réponse inflammatoire systémique du peptidoglycane et de l'acide lipoteichoïque reste bien inférieur à celui du lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif même s'ils sont synergiques entre eux (Dinges, Orwin et al. 2000); b) la prévalence des gènes codant les exotoxines superantigéniques est élevée au sein des isolats cliniques de *S. aureus* alors que les pathologies purement toxiniques restent rares (Becker, Friedrich et al. 2003); c) il peut exister de manière concomitante une bactériémie et une production d'exotoxine superantigénique (c'est parfois le cas au

cours des chocs toxiques non-menstruels) (Holtfreter and Broker 2005); d) les patients porteurs de *S. aureus* sont immunisés vis-à-vis des exotoxines superantigéniques propres à l'isolat qui les colonise et ceci pourrait expliquer le fait le pronostic du sepsis au cours de bactériémies nosocomiales soit meilleur lorsque les patients sont antérieurement colonisés (von Eiff, Becker et al. 2001; Holtfreter, Roschack et al. 2006). Ainsi, la réponse pro-inflammatoire responsable de la défaillance multiviscérale du sepsis pourrait, lorsque la souche de *S. aureus* est capable de produire une exotoxine superantigénique, être d'origine mixte, à la fois d'origine septique mais aussi d'origine toxinique. Associées à la réponse de l'immunité innée, les exotoxines superantigéniques et notamment SEA, pourraient majorer la réponse pro-inflammatoire au cours du sepsis en activant majoritairement les cellules de l'immunité acquise et pourraient en partie être responsable de la survenue d'un état de choc. En effet, chez la souris, l'utilisation d'un vaccin permettant d'obtenir une immunisation vis-à-vis de SEA dans un modèle de choc septique à *S. aureus* producteur de SEA, limite significativement la mortalité au 5ème jour (23% contre 77% dans le groupe non immunisé) (Figure 29) (Nilsson, Verdrengh et al. 1999).

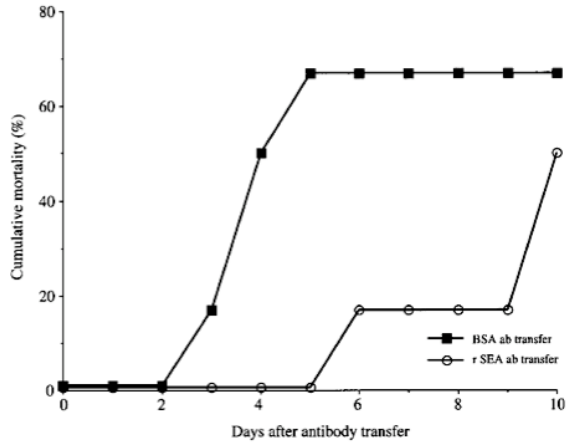


Figure 29. Mortalité cumulée de souris infectée par voie intraveineuse avec 6x10^7 UFC de *S. aureus* 24h après un traitement par 10 mg d'immunoglobuline anti-SEA (groupe r SEA ab transfer) ou avec 10 mg d'immunoglobuline anti-albumine bovine (groupe contrôle, BSA ab transfer). D'après Nilsson, Verdrengh et al. 1999.

Chez l'homme, seules des données épidémiologiques sont disponibles et le gène codant SEA est plus fréquemment détecté au sein des isolats responsables d'infections invasives par rapport aux isolats responsables de colonisation (Peacock, Moore et al. 2002). En somme, un ensemble de facteurs de virulence semble impliqué dans le sepsis à *S. aureus*, mais aucune donnée chez l'homme, à ce jour, ne permet de rattacher spécifiquement l'un d'entre eux au pronostic de l'infection.

L'impact de la résistance à la méticilline sur le pronostic des sepsis à *S. aureus* est largement débattu dans la littérature (Soriano, Martinez et al. 2000; Cosgrove, Qi et al. 2005; Zahar, Clec'h et al. 2005). En effet, il existe de multiples facteurs confondants, en partie liés à l'hôte, et en partie liés au traitement des infections à SARM (les glycopeptides utilisés pour traités les infections à SARM sont moins bactéricides que les pénicillines du groupe M utilisées pour le traitement des infections à SASM*)*. De plus, tous les SARM hospitaliers sont généralement regroupés dans ces études, sans caractérisation génétique du clone prédominant qui pourrait avoir une plus grande virulence par rapport aux SARM minoritaires. Enfin, la PVL pourrait avoir un rôle déterminant dans le pronostic des infections disséminées liés à un clone SARM communautaire (Gonzalez, Martinez-Aguilar et al. 2005). Toutefois, en France, la prévalence des gènes codant la PVL au sein des isolats de *S. aureus* responsable de bactériémie reste faible, inférieure à 1% (van der Mee-Marquet, Epinette et al. 2007). Le traitement du choc septique est symptomatique et fait appel à l'antibiothérapie conventionnelle dont la précocité d'administration a un impact pronostic (Annane, Bellissant et al. 2005). L'adjonction précoce d'un aminoglycoside à une pénicilline M (ou à un glycopeptide lorsqu'un SARM est en cause) pourrait prévenir la survenue d'un choc septique au cours d'une bactériémie à *S. aureus* (Lesens, Brannigan et al. 2006). Le blocage de la production d'alpha-

toxine et/ou des exotoxines superantigéniques pourraient avoir un intérêt mais l'implication de ces toxines dans le choc septique à *S. aureus* chez l'homme est encore à préciser. Un traitement anti-toxinique adjuvant (voir chapitre II. 9. 2.) à l'antibiothérapie conventionelle est conseillé lorsque l'isolat produit la PVL (Zetola, Francis et al. 2005; Salliot, Zeller et al. 2006).

II. 6. 1. 3. Purpura fulminans

Récemment, cinq cas de purpura fulminans survenus au cours d'infections sévères à *S. aureus* ont été rattaché à la production d'exotoxines superantigéniques (Kravitz, Dries et al. 2005). Un des isolats produisait également la PVL et a été identifié comme appartenant au clone USA300. Tous ces isolats produisaient *in vitro* des quantités importantes de TSST-1, de SEB ou de SEC (Figure 30).

Patient	Age in years/sex	Culture results	Toxin(s) produced[a]
1	40/F	MSSA on blood and sputum cultures	SEC, PVL
2	56/F	MSSA on blood culture	SEB
3	34/F	MSSA on blood, urine, and left-shoulder and left-knee aspirate cultures; *Escherichia coli* on blood culture; *Candida albicans* on blood culture	SEC, PVL
4	21/M	MRSA on sputum culture; negative blood culture results	SEC, PVL
5	43/F	MSSA on sputum culture; coagulase-negative staphylococci on blood culture	TSST-1

Figure 30. Description des toxines produites au cours des cinq cas de purpura fulminans à *S. aureus* avec photographies des lésions cutanées de deux des patients. D'après Kravitz, Dries et al. 2005.

Pour les auteurs, le purpura fulminans à *S. aureus* pourrait devenir une pathologie émergente, puisque ces cinq cas ont été rapportés dans la même région (Minneapolis-St. Paul, Minnesota, USA) sur une période de quatre ans. Il pourrait exister un effet combiné voire synergique entre l'effet des exotoxines superantigéniques et la PVL. Ainsi, le purpura fulminans, comme le CTS non-menstruels lorsq'il s'associe à une bactériémie, pourrait correspondre à un « choc mixte », forme frontière entre choc septique et choc toxique (Figure 31).

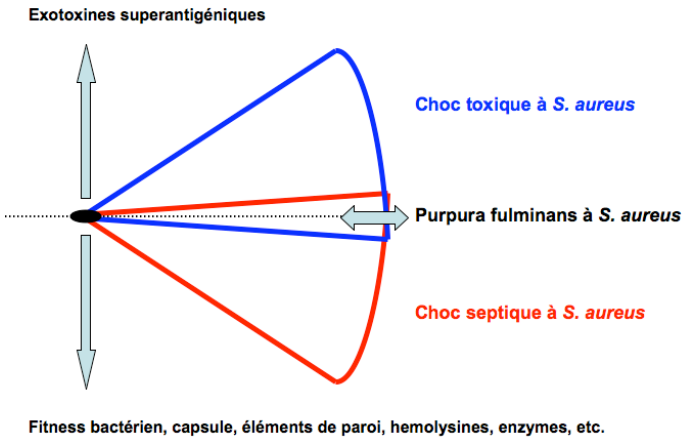


Figure 31. Théorie sur la co-existence d'une production d'exotoxine superantigénique et mise en jeu de multiples facteurs de virulence au cours du purpura fulminans à *S. aureus* (ainsi qu'au cours du CTS non-menstruel avec bactériémie).

Associé au traitement symptomatique et à l'antibiothérapie conventionnelle, les thérapeutiques anti-toxiniques (voir chapitre II. 9. 2.) pourraient avoir un impact sur le pronostic de cette pathologie.

II. 6. 2. Bactériémies persistantes à *S. aureus* et localisations secondaires

Les bactériémies à *S. aureus* peuvent persister et/ou se compliquer de localisations secondaires. L'endocardite infectieuse, qui est une forme de localisation secondaire, est une des principales causes de bactériémie persistante. Les autres facteurs associés aux bactériémies persistantes à *S. aureus*, malgré un traitement médical

bien conduit, sont le diabète, l'infection de cathéter laissé en place, et toutes les autres localisations secondaires, qui sont principalement les localisations ostéo-articulaires (incluant les arthrites septiques et les spondylodiscite). Elles sont d'autant plus fréquentes que la symptomatologie clinique est prolongée, que le patient est hémodialysé, qu'il possède un cathéter ou du matériel étranger (Khatib, Johnson et al. 2006). Les bactériémies persistantes et la survenue de localisations secondaires sont plus fréquentes lorsqu'un SARM est en cause. Ceci pourrait être la conséquence du traitement par vancomycine, dont l'efficacité sur les SARM est comparativement moindre par rapport à l'efficacité des pénicillines du groupe M sur les SASM, ou être en partie lié à l'implication de certains facteurs de virulence propres à certains clone SARM hospitaliers (Fowler, Sakoulas et al. 2004; Khatib, Johnson et al. 2006).

II. 6. 3. Pathologies focales associées ou non à un état de choc ou à une bactériémie

S. aureus a la capacité d'infecter tous les tissus de l'organisme. Lorsqu'elles sont sévères, toutes les infections focales peuvent s'associer à une bactériémie et inversement, toute bactériémie à *S. aureus* (d'autant plus qu'une endocardite est associée) peut entraîner des localisations secondaires, parfois révélées à distance de l'épisode infectieux initial (notamment pour les localisations osseuses) (Lowy 1998).

II. 6. 3. 1. Infections pulmonaires

II. 6. 3. 1. 1 Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité hospitalière élevée. *S. aureus* est le premier agent pathogène isolé au cours des PAVM (Kollef, Shorr et al. 2005). Selon les séries, les PAVM à *S. aureus* sont associées à une bactériémie dans 5 à 10% des cas, à un choc septique dans 25 à 55% des cas et leur taux de mortalité varie de 15 à 30% (Combes, Luyt et al. 2004; Kollef, Shorr et al. 2005; Zahar, Clec'h et al. 2005; Combes, Luyt et al. 2007). Les rechutes ou les récidives des PAVM à *S. aureus* sont plus fréquentes qu'avec les autres pathogènes responsables de PAVM, de l'ordre de 10 à 20% (Combes, Luyt et al. 2004; Kollef, Shorr et al. 2005). *S. aureus* est un pathogène des voies aériennes respiratoires car il est capable d'adhérer à l'épithélium pulmonaire, de léser la barrière alvéolo-capillaire, et d'induire un afflux de polynucléaires neutrophiles dans le poumon grâce à de multiples facteurs de virulence. Les éléments de la paroi et la coordination de leur expression semblent avoir un rôle majeur dans ce processus (Leemans, Heikens et al. 2003). Les MSCRAMMs, notamment la protéine de laison à la fibronectine, sont impliqués dans la colonisation et l'adhésion bactérienne à l'épithélium respiratoire (Mongodin, Bajolet et al. 2002). L'acide lipoteichoïque et le peptidoglycane, principalement via leur interaction avec le TLR-2, agissent de manière synergique pour activer et recruter au niveau pulmonaire les cellules de l'immunité innée (Leemans, Heikens et al. 2003). La protéine A, en se fixant sur le TNFR1 qui est un récepteur du TNF-alpha largement exprimé par les cellules épithéliales pulmonaires, semble être l'élément principal responsable de la réponse pro-inflammatoire locale (Gomez, Lee et al.

2004). L'alpha-toxine est impliquée dans le processus lésionnel de la barrière alvéolo-capillaire *in vitro* comme *in vivo* (figure 32), et serait un facteur déterminant dans la destruction tissulaire et la dissémination hématogène (McElroy, Harty et al. 1999).

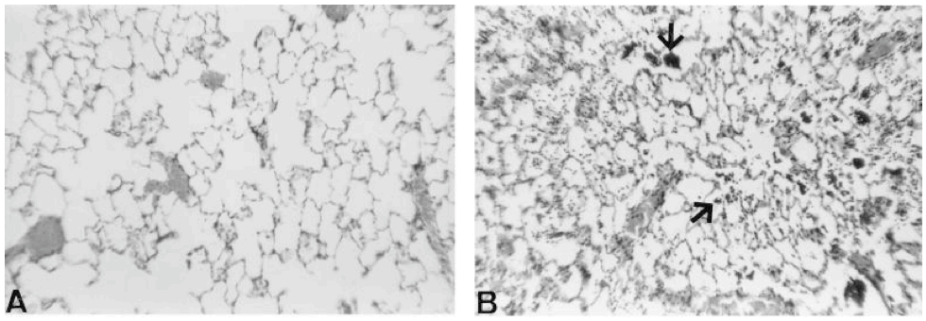


Figure 32. Photographies du parenchyme pulmonaire (coloré à l'hématoxyline et à l'éosine, grossissement x200) de rats intubés 4 h après l'instillation par voie trachéale de PBS (A) ou de *S. aureus* (B, souche 8325-4), révélant un afflux massif de polynucléaires neutrophiles avec *S. aureus*. L'aspect obtenu avec la souche DU1090, mutant isogénique de la souche 8325-4 après remplacement allélique du gène codant l'alpha-toxine, était identique à B, mais le lavage broncho-alvéolaire retrouvait des arguments pour une altération plus franche des pneumocytes de type I et de la barrière alvéolocapillaire avec 8325-4 comparativement avec DU1090 (plus grande quantité de protéine, particulièrement d'une protéine spécifique des pneumocytes de type I [protéine rTI40] et une plus grande quantité d'hémoglobine). D'après McElroy, Harty et al. 1999.

La coagulase, quant à elle, faciliterait la survenue de pneumopathie à *S. aureus* par voie hématogène au cours d'une bactériémie (Sawai, Tomono et al. 1997). L'ensemble de ces facteurs de virulence semble impliqué dans les PAVM à *S. aureus* et aucune donnée chez l'homme permet de rattacher spécifiquement l'un d'entre eux au pronostic de l'infection. Les PAVM à SARM représentent la moitié des PAVM à *S. aureus* et l'impact de la résistance à la méticilline sur le pronostic des PAVM à *S. aureus* est, comme au cours du sepsis, difficile à évaluer (Zahar, Clec'h et al. 2005). Toutefois, après ajustement de multiples facteurs confondants, la résistance à la méticilline ne semble pas affecter le pronostic dans une étude française récente (Zahar, Clec'h et al. 2005). Le traitement des PAVM à *S. aureus* fait appel à l'antibiothérapie conventionnelle. Pour les PAVM à SARM, le linézolide a

fait preuve de son efficacité et pourrait même être plus bénéfique que la vancomycine dans cette indication (Kollef, Rello et al. 2004), peut-être lié à son action sur la production d'alpha-toxine.

II. 6. 3. 2. 2. Pneumonie nécrosante

La pneumonie nécrosante est une pneumopathie à *S. aureus* producteur de PVL. Initialement décrite chez les enfants et les adultes jeunes, cette infection est également possible à l'âge adulte (Gillet, Vanhems et al. 2007). Exceptionnelle il y a quelques années, la pneumonie nécrosante est maintenant une pathologie émergente liée à la dissémination des clones SARM communautaires producteurs de PVL (Zetola, Francis et al. 2005). Elle se caractérise par de la fièvre, des hémoptysies, des infiltrats alvéolaires multilobaires et une leucopénie. Un épisode grippal précède souvent l'épisode de pneumonie nécrosante (Gillet, Vanhems et al. 2007). L'infection virale favoriserait le contact entre *S. aureus* et la membrane basale de l'épithélium respiratoire en détruisant les cellules de l'épithélium respiratoire. La plupart des isolats de *S. aureus* responsables de pneumonies nécrosantes possèdent le gène codant la protéine de liaison au collagène et l'expression de celle-ci favoriserait considérablement l'adhésion de *S. aureus* à la membrane basale (Figure 33) (de Bentzmann, Tristan et al. 2004).

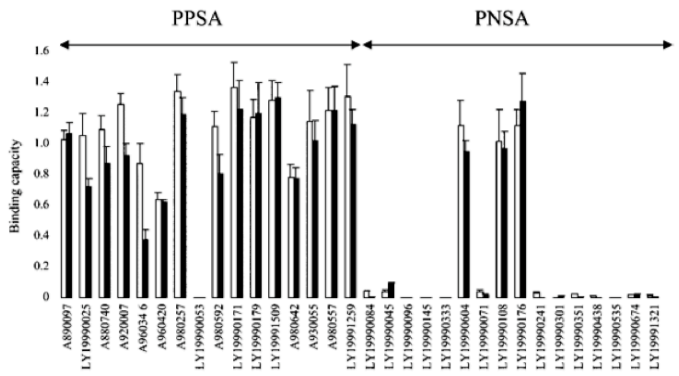


Figure 33. Adhésion *in vitro* de *S. aureus* responsables de pneumonies nécrosantes (PPSA pour PVL-*positive S. aureus* dont un seul isolat était un SARM) comparés à des isolats responsables de pneumonies non nécrosates (PNSA pour PVL-*negative S. aureus* dont 4 étaient des SARM) sur des plaques 96 puits coatés avec collagène de type I et révélé par densité optique. Résultats similaires avec le collagène IV et la laminine. D'après de Bentzmann, Tristan et al. 2004.

De plus, la présence des gènes codant la PVL induit une surproduction de protéine A (d'un facteur 12) qui du fait de son action agoniste sur le TNFR-1 favoriserait le recrutement des polynucléaires neutrophiles au niveau pulmonaire (Figure 34) (de Bentzmann, Tristan et al. 2004; Gomez, Lee et al. 2004; Kahl and Peters 2007).

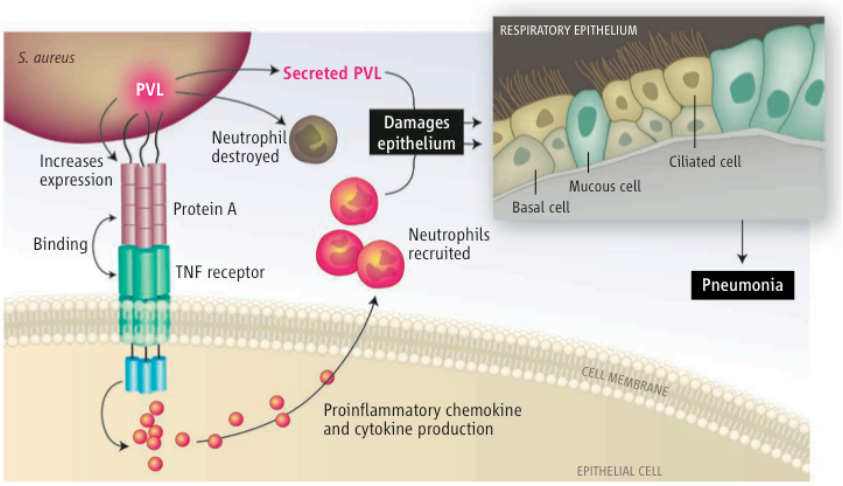


Figure 34. Effet proinflammatoire direct (en fixant le TNFR1) et indirect (en détruisant les polynucléaires neutrophiles et en majorant la réponse pro-inflammatoire) de la PVL sur l'épithélium respiratoire. D'après Kahl and Peters 2007.

A l'inverse, l'alpha-toxine ne paraît pas jouer un rôle déterminant dans la pneumonie nécrosante puisque sa production est réduite par la présence des gènes codant la PVL (Labandeira-Rey, Couzon et al. 2007). L'ensemble, associé au fait que la PVL a des effets proapoptotique et cytolytiques sur les polynucléaires, conduit à la

formation de foyers de nécrose hémorragique avec destruction alvéolaire au contact de *S. aureus* (Figure 35).

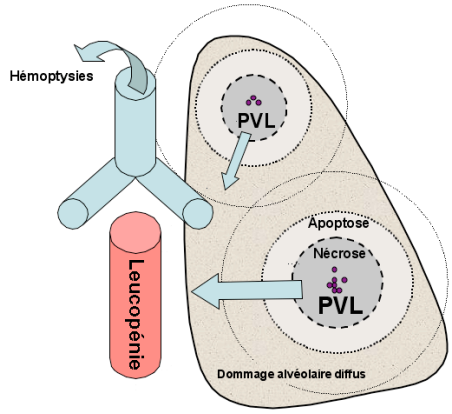


Figure 35. Hypothèses physiopathologiques au cours de la pneumonie nécrosante à *S. aureus* (sensible ou résistant à la méticilline) producteur de PVL : les différents foyers pulmonaires de pneumonie se nécrosent du fait de la forte concentration en PVL et entraînent une hémoptysie. Plus à distance du foyer, l'étude anatomopathologique retrouve des lésions non spécifiques de dommage alvéolaire diffus et la PVL est présente à plus faible concentration, favorisant l'apoptose des polynucléaires neutrophiles et expliquant la neutropénie.

La part de la PVL dans les lésions pulmonaires observées au cours de la pneumonie nécrosante a été étudiée dans un modèle animal de souris. La nécrose des septa alvéolaires et la survenue d'hémorragie alvéolaire serait bien rattachable à la production de PVL *in situ* (Figure 36).

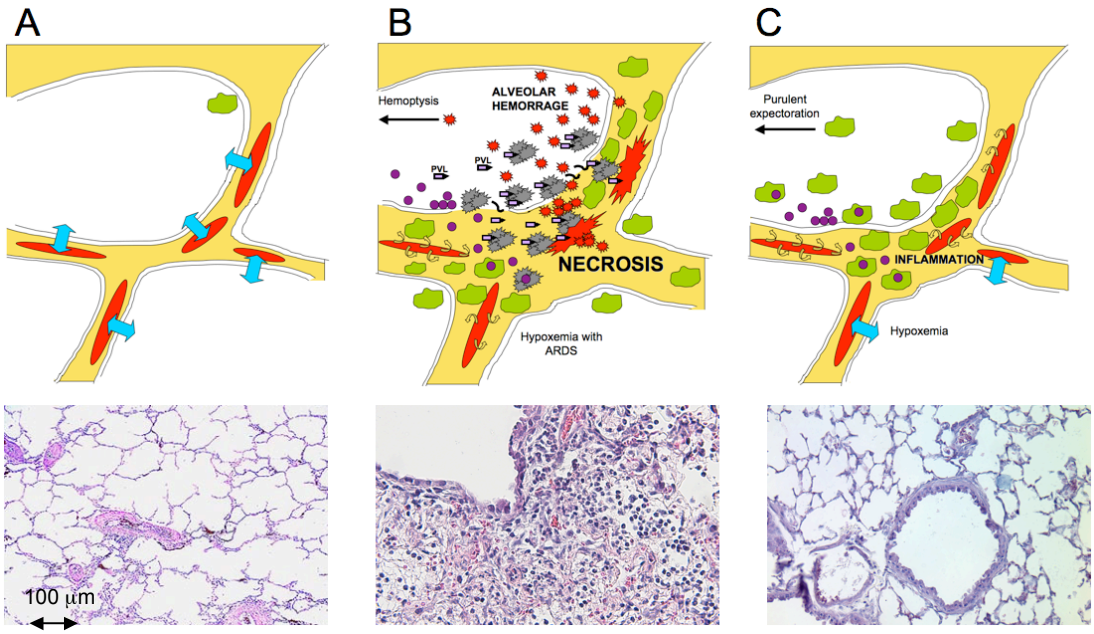


Figure 36. Vue schématique et anatomopathologique des alvéoles pulmonaires d'un poumon sain (A), d'un poumon de souris infecté par une souche produisant la PVL (B) et par une souche isogénique ne produisant plus la PVL, après délétion des gènes codant la PVL (C) Labandeira-Rey, Couzon et al. 2007. Au cours de l'infection avec production de PVL, il existe une nécrose des septa alvéolaires avec hémorragie alvéolaire. Après délétion des gènes codant la PVL, il existe une infiltration leucocytaire sans destruction parenchymateuse.

Dans la série de Gillet et al. la ventilation mécanique des patients atteints de pneumonie nécrosante était nécessaire dans 78% des cas et la létalité était très élevée, de l'ordre de 56%, avec un délai moyen de survie de 10 jours (Gillet, Vanhems et al. 2007). Le principal signe clinique associé à une évolution rapidement défavorable était l'hémoptysie qui survenait dans 44% des cas. (Figure 37.)

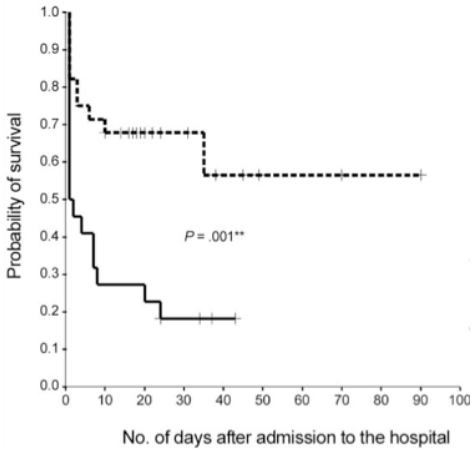


Figure 37. Courbes de survie des patients ayant une pneumonie nécrosante avec (courbe pleine) ou sans (courbe pointillée) hémoptysie révélant une plus précoce et plus grande mortalité lorsqu'il existe une hémoptysie. D'après Gillet, Vanhems et al. 2007.

D'un point de vue biologique, une leucopénie (potentiellement due à l'action directe de la PVL sur les polynucléaires circulants) constituait également un marqueur de gravité de la maladie. Il existait une relation linéaire entre la survie et la valeur absolue du nombre de leucocytes : la survie était <10% lorsque la leucopénie était sévère (<1000 éléments/mL), et >85% lorsqu'il existait une hyperleucocytose >10 000 éléments/mL. La pneumonie nécrosante peut également survenir par voie hématogène, dans les suites d'une infection suppurative à type d'abcès. Dans cette situation, les hémocultures sont plus souvent positives, les lésions pulmonaires sont rapidement extensives et se compliquent plus volontiers d'épanchements pleuraux. Ces formes hématogènes sont semble-t-il de gravité moindre (Zetola, Francis et al. 2005; Gillet, Vanhems et al. 2007). Le traitement de la pneumonie nécrosante, en

association avec l'antibiothérapie conventionnelle, fait appel aux traitements adjuvants anti-toxiniques (voir chapître II. 9. 2.) qui bloquent la production ou l'activité de la PVL *in vitro* mais qui n'ont toutefois pas démontré leur bénéfice en pratique clinique.

II. 6. 3. 3. Infections communautaires graves des tissus mous

Les infections des tissus mous à *S. aureus* sont dites primitives lorsque aucune porte d'entrée n'est retrouvée, et secondaires lorsqu'il existe une lésion cutanée préexistante. Les infections cutanées primitives communautaires, comme les furoncles ou l'impétigo, n'ont généralement aucun critère de gravité (Lowy 1998). Toutefois, certains furoncles sont liés à des souches de *S. aureus* productrices de PVL (sensibles ou résistantes à la méticilline) et la symptomatologie est généralement plus sévère avec des furoncles multiples nécessitant un drainage chirurgical (Figure 38) (Lina, Piemont et al. 1999; Issartel, Tristan et al. 2005).

Figure 38. Furoncle à SARM d'origine communautaire localisé au niveau du genou gauche nécessitant souvent un drainage chirurgical et dont la taille et le caractère inflammatoire est plus important par rapport aux furoncles à SASM ne produisant pas la PVL. Science Photo Library.

L'épidémiologie de infections graves des tissus mous s'est transformée aux Etats-Unis depuis l'émergence et la diffusion du clone SARM communautaire USA300.

Une étude américaine incluant 422 patients s'étant présenté aux urgences de 11 services d'urgences du pays au cours du mois d'août 2004 a révélé que la majorité des infections cutanées étaient liées à un clone SARM communautaire. *S. aureus* était isolé dans 76% des cas et le clone SARM USA300 représentait plus de 2/3 des isolats (Moran, Krishnadasan et al. 2006). La prévalence des SARM communautaires étaient donc très élevée, allant de 20% à 74% des infections de la peau et des tissus mous pris en charge aux urgences selon les différentes localisations géographiques (Figure 39).

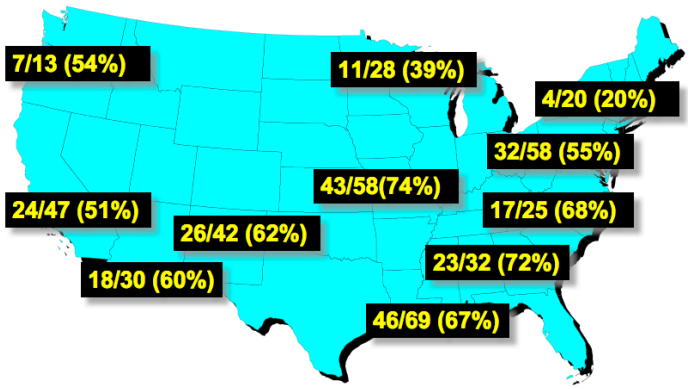


Figure 39. Prévalence des SARM communautaires chez les patients consultant dans les services d'urgence de 11 villes des Etats-Unis pour une infection de la peau et des tissus mous en Août 2004. D'après Moran, Krishnadasan et al. 2006.

En France, la prévalence des SARM communautaire dans les infections de la peau et des tissus mous n'est pas aussi élevée. Toutefois, l'évolution de son épidémiologie est inquiétante. En 2000, à l'hôpital de Fréjus, les SARM représentaient 4% des infections de la peau et des tissus mous et tous les patients présentaient des facteurs de risque d'acquisition de SARM hospitalier (Del Giudice, Blanc et al. 2006). Progressivement, le nombre d'infections de la peau et des tissus mous a augmenté avec apparition et rapide augmentation des infections à SARM communautaires (0% en 2000, 1,7% en 2001, 2,2% en 2002 et 6,8% en 2003) (Figure 40).

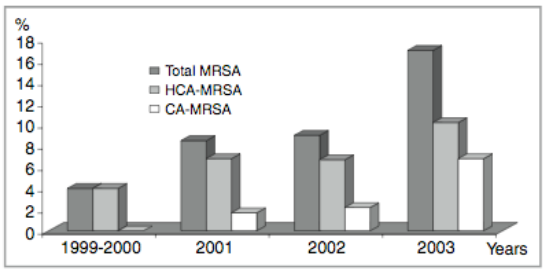


Figure 40. Evolution de l'épidémiologie des infections de la peau et des tissus mous à SARM à l'hôpital de Fréjus entre 1999 et 2000 chez 197 patients. HCA (*health care-associated)*-MRSA, SARM hopitalier; CA-MRSA, SARM communautaire produisant la PVL. D'après Del Giudice, Blanc et al. 2006.

Ces infections survenaient chez des patients n'ayant pas de facteur de risque d'acquisition de SARM hospitalier et ont nécessité dans tous les cas un drainage chirurgical (Del Giudice, Blanc et al. 2006).

Parfois, ces infections cutanées peuvent se compliquer localement et/ou être le point de départ d'une infection systémique. Les infections graves des tissus mous concernent la staphylococcie maligne de la face, la pyomyosite, et la fasciite nécrosante. Ces trois pathologies sont rares et majoritairement liées à des *S. aureus* sensible à la méticilline. Toutefois, l'incidence de ces pathologies augmente du fait de la diffusion des clones SARM communautaires. La staphylococcie maligne de la face est une infection cutanée généralement secondaire à la manipulation d'un furoncle localisé au niveau de l'aile du nez. La staphylococcie maligne de la face semble plus sévère lorsqu'elle est liée à un isolat producteur de la PVL puisqu'elle peut s'associer à une cellulite orbitaire et/ou une panendophtalmie menaçant le pronostic visuel (Figure 41) (Rutar, Chambers et al. 2006).

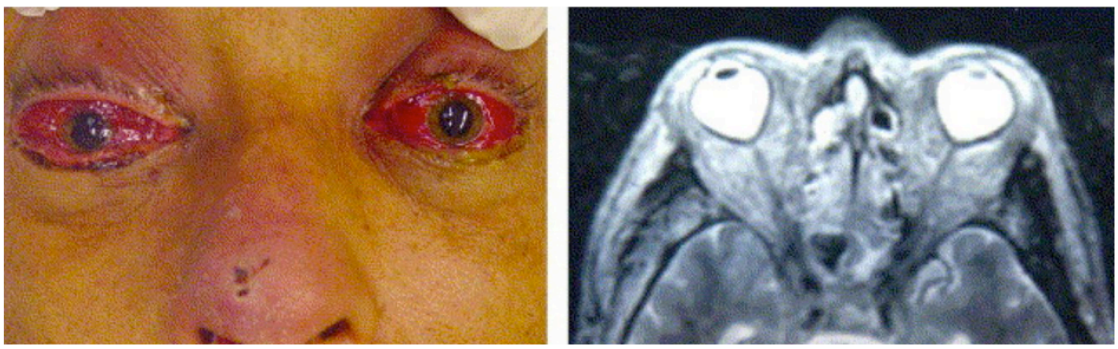


Figure 41. Cellulite orbitaire bilatérale à SARM communautaire (USA300) suite à un furoncle de l'aile du nez aboutissant à une cécité bilatérale chez un patient de 44 ans sans antécédents. D'après Rutar, Chambers et al. 2006.

La pyomyosite (inflammation musculaire profonde d'origine septique évoluant vers l'abcédation) à *S. aureus* (Figure 42), jusque-là limitée aux pays en voie de développement, est de plus en plus fréquente dans les pays développés, surtout chez les enfants, du fait de la diffusion des clones SARM communautaires (Pannaraj, Hulten et al. 2006).

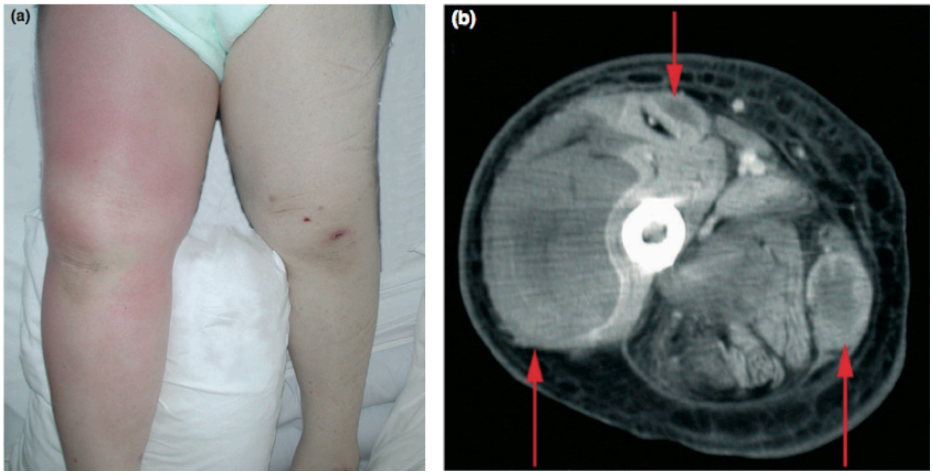


Figure 42. Pyomyosite avec aspect d'érysipèle chez une patiente de 72 ans ayant un lymphoedème chronique (à gauche). Abcédations multiples visibles au scanner au niveau des muscles de la cuisse droite (flèches rouges) avec un SARM en culture. D'après Yanagi, Kato et al. 2007

La fasciite nécrosante (infection profonde de l'hypoderme avec atteinte de l'aponévrose superficielle) monobactérienne à *S. aureus*, décrite dans la littérature comme étant rare et généralement associée à un terrain débilité et/ou à un isolat sensible à la méticilline et produisant la PVL (Figure 43), devient une pathologie émergente liée à la diffusion des clones SARM communautaires (Miller, Perdreau-Remington et al. 2005).

Figure 45. Fasciite nécrosante extensive de la jambe droite monomicrobienne à SASM producteur de PVL chez un patient de 56 ans sans antécédents (à gauche en préopératoire, à droite en post-opératoire immédiat). D'après Lee, Chou et al. 2005.

Une série de 14 cas de fasciite nécrosante liées au clone USA300 a été décrite en 2005. La moyenne d'âge des patients était de 46 ans. Six d'entre-eux étaient des toxicomanes, trois avaient un diabète et un une séropositivité pour le VIH. Le site de la fasciite était un membre inférieur (six cas), un membre supérieur (quatre cas), le tronc ou l'abdomen (deux cas) et la tête ou le cou (deux cas). Un débridement chirurgical radical de plus de 15 cm était nécessaire chez 11 patients (Miller, Perdreau-Remington et al. 2005). Récemment, un cas de fasciite nécrosante lié à un isolat de *S. aureus* non producteur de PVL, mais possédant le locus *egc*, a été décrit aux Etats-Unis, et un autre a été déclaré au Centre National de Référence (CNR) des staphylocoques en 2006 (Morgan, Caldwell et al. 2007). Le cas français était lié à un isolat appartenant à un clone SARM émergent en Europe (voir chapitre II. 8. 2. Tableau 5) (Durand, Bes et al. 2006). L'*egc*, regroupant les gènes codant les entérotoxines SEG, SEI, SE*l*M, SE*l*N et SE*l*O pourrait avoir un rôle de modulation de l'immunité acquise et pourrait majorer les capacités d'adhésion de l'isolat selon les auteurs (Jarraud, Peyrat et al. 2001; Becker, Friedrich et al. 2003; Morgan, Caldwell et al. 2007). Le traitement des infections communautaires graves des tissus mous fait appel à l'antibiothérapie conventionelle. Les antibiotiques ayant une activité anti-toxinique pourraient avoir un intérêt lorsque la PVL est en cause (Miller, Perdreau-

Remington et al. 2005). Le drainage chirurgical, indispensable lors des fasciites nécrosantes, est le plus souvent nécessaire dans toutes les pathologies graves des tissus mous lorsque l'isolat produit la PVL (Issartel, Tristan et al. 2005; Miller, Perdreau-Remington et al. 2005).

II. 6. 3. 4. Infections de site opératoire

S. aureus est le premier pathogène responsable des infections de site opératoire après « chirurgie propre » comme la chirurgie cardiaque ou orthopédique programmée. La contamination du site opératoire survient essentiellement en péri-opératoire, majoritairement à partir de l'isolat qui colonisait le patient déjà en pré-opératoire (Herwaldt 2003; RAISIN 2005). Le pouvoir d'adhésion de *S. aureus* joue un rôle déterminant et certains facteurs, comme la présence d'une nécrose tissulaire, d'un hématome, d'une mauvaise vascularisation, d'un corps étranger ou d'un implant, favorisent le développement d'une infection de site opératoire (Herwaldt 2003). Au cours des chirurgies cardiothoraciques, une médiastinite peut survenir (dans 1% des cas) et peut engager le pronostic vital. Au cours des chirurgies orthopédiques, les complications infectieuses sont rares (<1%) mais les conséquences fonctionnelles d'une infection du site opératoire peuvent être dramatiques (Herwaldt 2003; RAISIN 2005). L'infection du site opératoire peut persister malgré la prise en charge médicale lorsqu'il existe du matériel d'ostéosynthèse sur le site infecté (Herwaldt 2003). Le traitement des infections de site opératoire nécessite une antibiothérapie conventionnelle et parfois une reprise chirurgicale, d'autant plus justifiée que l'infection est profonde, abcédée et/ou au contact de matériel étranger. La prévention des infections de site opératoire en chirurgie propre repose en préopératoire sur la préparation cutanée, en per-

opératoire sur le respect des règles d'asepsie et l'entretien des salles opératoires, et en post-opératoire sur l'asepsie lors de la manipulation des drains ou lors de la réalisation des pansements. La décontamination pré-opératoire par application nasale de mupirocine (pendant cinq jours) a fait preuve de son efficacité dans la prévention des infections du site opératoire, notamment en chirurgie cardiaque et orthopédique (Herwaldt 2003). Toutefois, il n'est actuellement pas recommandé d'utiliser la mupicocine de manière systématique chez les patients porteurs de SARM pour prévenir la survenue d'infection du site opératoire à SARM (Hospitalière Paris - 5 mars 2004). Un antibioprophylaxie doit-être proposée pour toute chirurgie propre si l'acte opératoire est prolongé et s'il existe un risque d'infection grave (Hospitalière Paris - 5 mars 2004).

II. 6. 3. 5. Infection de cathéter

Toute surface abiotique, lorsqu'elle est insérée dans l'organisme, est rapidement recouverte par certaines protéines comme la fibrine ou la fibronectine. L'adhésion de *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négatifs à ces surfaces est médiée par les MSCRAMMs et par la production de PIA qui permet l'agrégation bactérienne et la constitution de biofilm (Arciola, Baldassarri et al. 2001; Yarwood, Bartels et al. 2004). Les staphylocoques à coagulase négatif représentent 40% des colonisations des cathéters alors que *S. aureus* ne représente que 10% de ces colonisations (équivalent à *Pseudomonas aeruginosa*) (Timsit 2005). Cependant, *S. aureus* a une capacité bien supérieure à infecter un cathéter comparé aux staphylocoques à coagulase négatif car 60% des cathéters colonisés à *S. aureus* s'infectent, contre moins de 30% pour les staphylocoques à coagulase négatif (Timsit 2005). Cette plus grande virulence pourrait être liée à une plus grande capacité à adhérer et à

proliférer au contact du cathéter. Le matériau utilisé pour fabriquer les cathéters doit limiter au maximum l'adhésion bactérienne en limitant le dépôt des protéines de l'hôte à son contact. Le polyuréthane est le matériau qui limite le plus cette adhésion c'est pourquoi la plupart des cathéters utilisés en pratique quotidienne sont constitués de polyuréthane. Cependant, ceci ne dispense pas des mesures drastiques de désinfection chirurgicale lors de la pose et d'entretien pour limiter la colonisation du cathéter. La colonisation s'effectue par voie extraluminale ou endoluminale (Timsit 2005). Les cathéters imprégnés d'antiseptique ou d'antibiotique pourraient réduire le nombre d'infection mais par manque de preuve formelle sur l'efficacité et sur l'inocuité, ce type de cathéter n'est pas recommandés actuellement (Lepape 2005). L'héparinisation régulière pourrait diminuer le risque d'infection en limitant la formation de caillot et le dépôt de protéine plasmatique. Toutefois, l'héparine favorise la production de biofilm *in vitro* et pourrait favoriser la production de biofilm lorsqu'un cathéter est colonisé (Shanks, Donegan et al. 2005). Les infections de cathéters à *S. aureus* peuvent être responsable de complications sévères à type de bactériémie, de thrombophlébite septique, d'endocardite, de localisation secondaire ostéoarticulaire et/ou de choc septique. La présence d'un cathéter veineux central de longue durée, la nécessité de recourir à l'épuration extra-rénale, la durée des symptômes associés à une bactériémie, et la résistance à la méticilline (pouvant promouvoir l'adhésion selon certains auteurs) sont des facteurs indépendants favorisant ce type de complications (Fowler, Justice et al. 2005). Enfin, il a récemment été observé qu'un clone SARM pouvait, en accumulant des éléments génétiques mobiles, entraîner non seulement une épidémie dans un service de réanimation mais surtout 4,5 fois plus de bactériémie au cours d'une infection de cathéter (Figure 44) (Edgeworth, Yadegarfar et al. 2007).

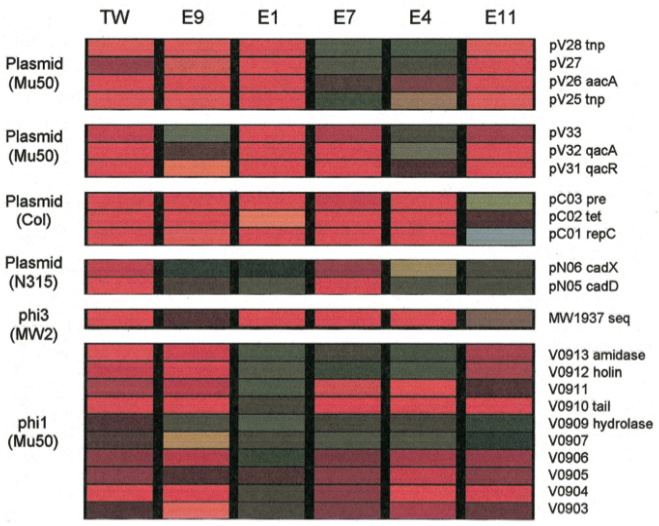


Figure 44. Puces à ADN génomique de la souche épidémique TW (ST-239) comparé aux clones épidémiques EMRSA-9 (E9), EMRSA-1 (E1), EMRSA-7 (E7), EMRSA-4 (E4) et EMRSA-11 (E11). Les gènes criblés appartiennent à des éléments génétiques mobiles : deux plasmides de la souche Mu50 (clone New-York-Japon) portant respectivement le gène codant la résistance à la gentamicine (*aaCa*) et celui conférant une résistance aux ammonium quaternaires (*qac*) ; un plasmide de la souche COL (clone Archaïque) conférant la résistance à la tétracycline ; un plasmide de la souche N315 (clone New-York-Japon) conférant la résistance au cadmium (métal toxique) ; le bactériophage phi3 de la souche MW2 (clone USA400) portant le gène codant SEG et le bactériophage phi1 de la souche Mu50. La couleur rouge-orange indique que le gène a été détecté, la couleur grise indique que le gène est absent. D'après Edgeworth, Yadegarfar et al. 2007.

Le traitement d'une infection de cathéter à *S. aureus* est avant tout de retirer le cathéter et d'instaurer une antibiothérapie conventionnelle dont la durée dépendra de la présence d'une complication. Certains auteurs proposent une antibiothérapie verrou afin de préserver les cathéters de longue durée mais les échec sont fréquents surtout lorsque *S. aureus* est en cause (Lepape 2005).

II. 6. 3. 6. Thrombophlébites septiques

Les thrombophlébites septiques peuvent compliquer une infection de cathéter à *S. aureus*. La présence d'un corps étranger dans la lumière vasculaire favorise la thrombose et *S. aureus* a également la capacité de produire de nombreux facteurs de virulence dont l'action est pro-thrombogène (Lowy 1998). Les SERAMs (notamment la coagulase), les MSCRAMMs (notamment les protéines de liaison au fibrinogène) et la protéine A favorisent la coagulation et l'agrégation plaquettaire alors que l'alpha-toxine active les cellules endothéliales (Dinges, Orwin et al. 2000; Chavakis, Wiechmann et al. 2005). Les thrombophlébites septiques à *S. aureus*

peuvent également s'observer dans d'autres situations comme au cours de la staphylococcie maligne de la face qui s'associe parfois à une thrombose du sinus caverneux (Rutar, Chambers et al. 2006). Enfin, les thrombophlébites septiques pourraient avoir un rôle dans la rechute des bactériémies à *S. aureus* ainsi que dans la dissémination de *S. aureus* dans l'organisme (Figure 2) (Gorenstein, Gross et al. 2000). L'anticoagulation curative dans les thrombophébites septiques n'a pas fait preuve de son efficacité. Le traitement repose avant tout sur l'antibiothérapie conventionnelle.

II. 6. 3. 7. Endocardites infectieuses

S. aureus est une bactérie les plus fréquemment responsable d'endocardite infectieuse (EI) (1/4 à 1/3 des endocardites) (Hoen 2002; Fowler, Miro et al. 2005). Les EI sur valves natives à *S. aureus* sont plus souvent associées à des complications neurologiques (survenant dans 20% des cas, comprenant l'accident vasculaire cérébral ischémique ou hémorragique, l'abcès cérébral et la méningite), à un événement embolique (60%) et à une mortalité élevée (20%) par rapport aux EI sur valves natives à un autre germe (Miro, Anguera et al. 2005). Les EI sur valves prothétiques sont également associées à une plus grande mortalité lorsque *S. aureus* est en cause (Wang, Athan et al. 2007). Les principaux facteurs de virulence impliqués dans la colonisation de la valve (native ou prothétique) et le développement de l'infection sont les MSCRAMMs (Figure 45) (Moreillon and Que 2004).

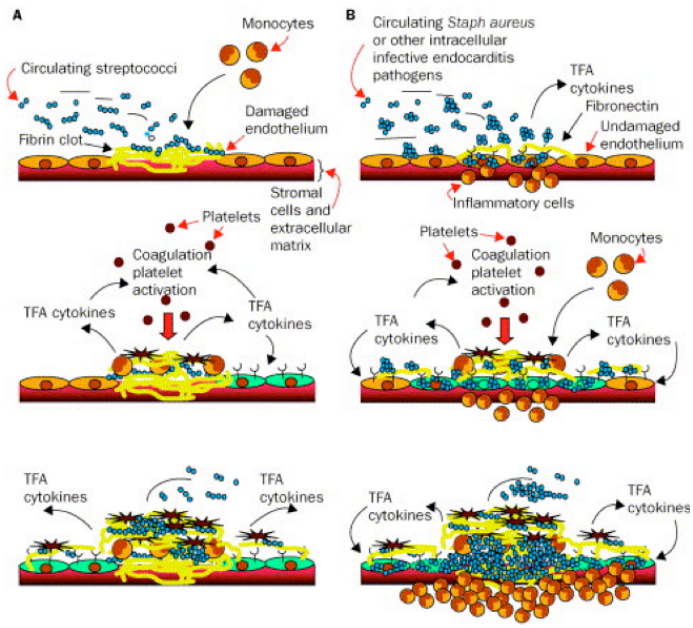


Figure 45. Physiopathologie de la colonisation et de l'infection d'une valve cardiaque native. L'endothélium valvulaire peut-être lésé exposant la matrice extracellulaire au flux vasculaire, aux plaquettes et aux bactéries circulantes qui adhèrent grâce aux MSCRAMMs, entraînent une réaction inflammatoire locale, et favorise la formation de végétation (A). L'endothélium valvulaire peut-être intact mais proche d'un tissu inflammatoire qui favorise l'expression d'intégrines par l'endothélium sur lesquelles se fixe la fibronectine plasmatique circulante puis *S. aureus* (grâce aux MSCRAMMs) qui s'internalise. Ceci majore la réponse pro-inflammatoire locale et favorise l'agrégation plaquettaire et la formation de végétation (B). D'après Moreillon and Que 2004.

La protéine de liaison au fibrinogène de type A et la protéine de liaison à la fibronectine ont un rôle majeur dans la capacité de l'isolat à induire une endocardite expérimentale. Celui de la coagulase et de la protéine de liaison au fibrinogène de type B semble par contre être limité (Moreillon, Entenza et al. 1995). La protéine d'adhésion au collagène ne semble impliqué que dans la phase toute initiale d'adhésion au tissu valvulaire (Thomas, Peacock et al. 1999). L'acide lipoteichoïque, en interagissant avec les cellules endothéliales, pourrait favoriser la colonisation de l'endocarde par *S. aureus* et la prolifération bactérienne (Moreillon and Que 2004). Plusieurs études *in vivo* démontrent le rôle critique de la protéine de liaison au fibrinogène de type A dans l'induction et la persistance des endocardites infectieuses expérimentales. Ainsi, dans un modèle animal d'EI chez le rat, les souches de *S. aureus* n'exprimant pas la protéine de liaison au fibrinogène de type A sont moins virulentes que les souches sauvages. A l'inverse, le transfert et l'expression du gène codant la protéine de liaison au fibrinogène de type A dans une bactérie commensale comme *Lactococcus lactis* rend cette dernière pathogène (Que, Haefliger et al.

2005). La protéine de liaison à la fibronectine facilite non seulement la colonisation et les dommages de l'endocarde valvulaire chez le rat, mais aussi l'internalisation bactérienne dans les cellules endothéliales au niveau de la végétation, mais également dans les cellules endothéliales proches de la végétation (Figure 46) (Moreillon and Que 2004; Que, Haefliger et al. 2005).

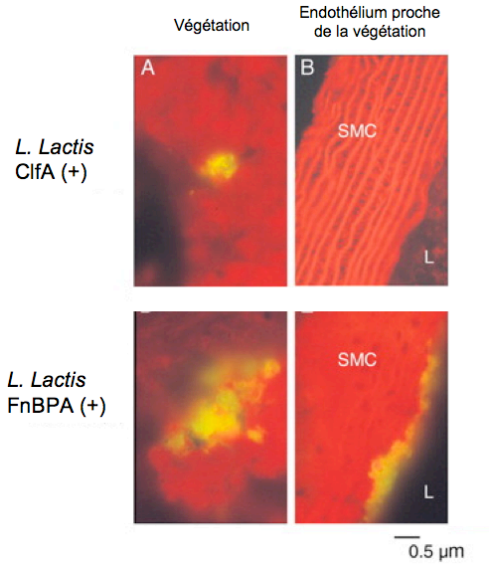


Figure 46. Photographie d'une section de végétation et de l'endothélium proche de la végétation après marquage de la protéine de liaison au fibrinogène de type A (ClfA) et de la protéine de liaison à la fibronectine de type A (révélation par immunohistochimie) lors d'une infection à *lactococcus lactis* exprimant ClfA ou FnBPA (après insertion du gène codant ClfA ou FnBPA). L'expression de ClfA permet la colonisation de la végétation (alors que *Lactococcus lactis* qui n'exprime habituellement pas ClfA n'en est pas capable) et l'expression de FnBPA permet la colonisation de la végétation mais aussi de l'endothélium adjacent non lésé, en s'internalisant comme la souche *S. aureus* Cowan I pris comme contrôle positif (selon les données de microscopie électronique). SMC, *smooth muscle cells* ; L, *left*. Adapté de Que, Haefliger et al. 2005.

L'utilisation d'anticorps anti-protéine de liaison au fibrinogène de type A, associés à la vancomycine, permet dans un modèle animal d'EI infectieuse à SARM de raccourcir le délai de stérilisation des hémocultures et des végétations (Figure 47) (Vernachio, Bayer et al. 2003).

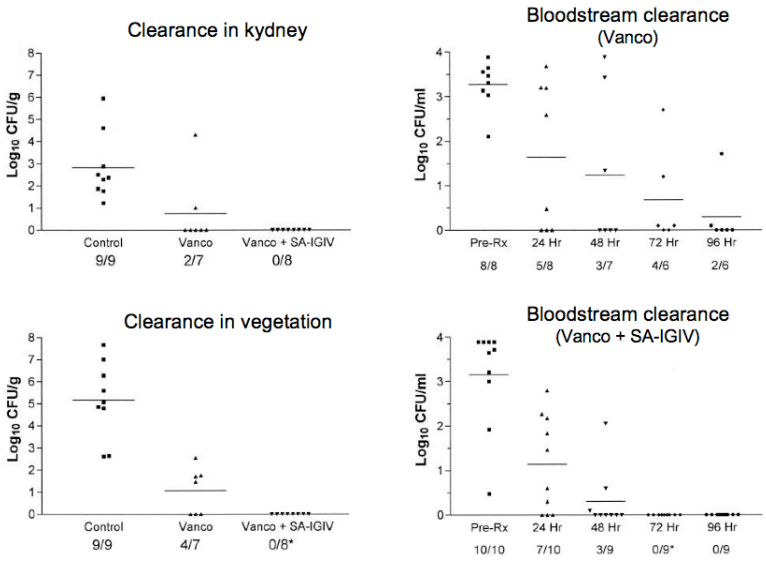


Figure 47. Quantité de SARM (souche 67-0) présent dans le rein (12 h après le début de l'infection), dans une végétation (12 h après le début de l'infection) et dans le sang (en fonction du temps) chez un lapin ayant une endocardite aortique à SARM traité par vancomycine seule ou en association avec des immunoglobulines polyclonales contenant une concentration élevée d'anticorps anti-protéine de liaison au fibrinogène de type A (SA-IGIV). D'après Vernachio, Bayer et al. 2003.

La protéine de liaison au fibrinogène de type A et la protéine de liaison à la fibronectine sont donc non seulement impliqués dans la survenue d'une endocardite infectieuse lors d'une bactériémie à *S. aureus*, mais pourraient également être déterminant dans le pronostic de cette maladie. Les facteurs de persistance comme la production de biofilm pourrait être responsable de la récidive, surtout lorsque l'infection atteint une valve prothétique (Yarwood, Bartels et al. 2004). Les endocardites à SARM hospitaliers représentent un quart des endocardites à *S. aureus* sur valve native et un tiers des endocardites à *S. aureus* sur valves prothétiques (Hoen 2002; Miro, Anguera et al. 2005; Wang, Athan et al. 2007). Les endocardites à SARM hospitalier sont indépendamment associées aux bactériémies persistantes (Khatib, Johnson et al. 2006). L'endocardite à SARM communautaire est rarement décrite malgré la diffusion des SARM communautaires et leur grande capacité d'adhésion. Parmi une collection de 172 isolats cliniques de *S. aureus* du CNR des staphylocoques au sein desquels les gènes codant la PVL étaient majoritairement associés aux furonculoses et aux pneumonies nécrosantes, aucun des 21 isolats responsables d'endocardite infectieuse ne possédait ces gènes (Lina, Piemont et al. 1999). Ceci pourrait être lié au fait que les SARM communautaires diffusent dans une population jeune où la prévalence des lésions valvulaires est faible. L'incidence des endocardites à SARM communautaire pourrait donc augmenter si les SARM communautaires diffusaient au sein de populations plus agées. Récemment, cinq patients (dont trois avaient plus de 40 ans) ayant une endocardite à SARM communautaire ont été recensés sur une période d'un an à l'Hôpital de Baltimore (Bahrain, Vasiliades et al. 2006). Les patients étaient agés de 19 à 47 ans et l'endocardite survenait au cours d'une bactériémie après un épisode de furonculose sévère. Il existait des localisations secondaires chez trois patients à

type d'abcès épidural, d'empyème et d'abcès pulmonaire. Un patient présentait une leucopénie avec une destruction valvulaire nécrotique rapide nécessitant une chirurgie en urgence. Aucun patient n'est décédé. Les complications des endocardites infectieuses à *S. aureus* concernent essentiellement les métastases septiques. Le traitement médical repose sur l'antibiothérapie conventionnelle à forte dose (association pénicilline du groupe M, gentamicine et rifampicine surtout s'il existe une prothèse valvulaire) et sur la chirurgie lorsque le risque embolique et/ou les dégats valvulaires sont trop importants. La prévention des EI à *S. aureus* repose sur l'éradication de tout porte d'entrée potentielle et sur l'antibioprophylaxie lors de procédures à risque (Moreillon and Que 2004).

II. 6. 3. 8. Spondylodiscite, arthrite, ostéites et ostéoarthrites

Les infections ostéoarticulaires peuvent être graves en engageant le pronostic vital (lorsqu'elles s'associent à une bactériémie et à un sepsis sévère) ou le pronostic fonctionnel (lorsqu'elles deviennent chroniques). *S. aureus* est la première bactérie responsable d'infection ostéoarticulaire. La spondylodiscite est une infection d'un disque vertébral et des plateaux vertébraux sus et sous-jacents. Comme l'arthrite, elle est le plus souvent secondaire à une bactériémie à *S. aureus*. Les ostéites et les ostéoarthrites sont le plus souvent liées à une inoculation directe de *S. aureus*, suite à un traumatisme, lors d'une chirurgie ou à la suite d'une plaie du pied chez le diabétique (Figure 48) (Lew and Waldvogel 2004).

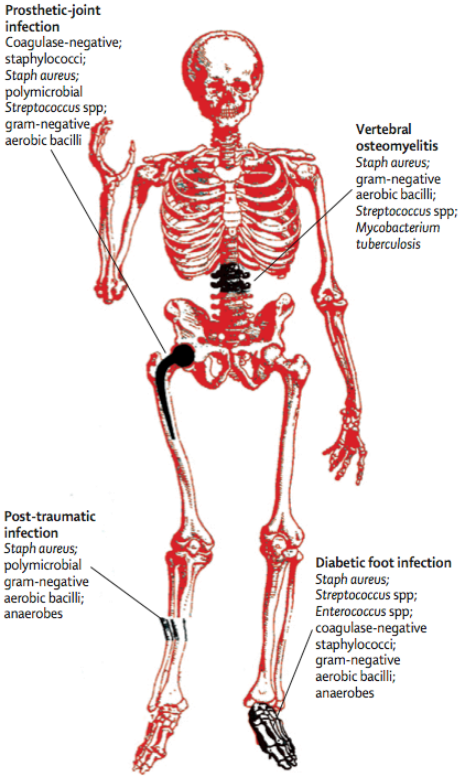


Figure 48. Les ostéites par inoculation hématogène (spondylodiscite) ou par inoculation directe (infection de matériel orthopédique, infection post-traumatiques secondaires à une fracture ouverte ou pied diabétique) sont essentiellement liés à *S. aureus* qui est le premier pathogène responsable de ce type d'infections. D'après Lew and Waldvogel 2004.

Au sein du tissu osseux, *S. aureus* privilégie ses capacités d'adhésion en interagissant avec la matrice extracellulaire de l'hôte, dégrade les éléments de la matrice extracellulaire, s'internalise dans les cellules épithéliales et endothéliales et modifie son comportement pour pouvoir persister dans ce milieu confiné (Lew and Waldvogel 2004). Les adhésines permettent d'initier l'infection ostéoarticulaire en favorisant la colonisation de l'os et/ou d'un corps étranger localisé dans l'os. Toutes les MSCRAMMs ne semble pas avoir la même importance, selon que l'inoculation se fasse par voie hématogène ou par inoculation directe et selon qu'il existe ou non du matériel orthopédique (Hudson, Ramp et al. 1999). Dans divers modèles animaux, la protéine de liaison à la fibronectine semble jouer un rôle déterminant dans les ostéites à inoculation directe et la protéine A pourrait favoriser la survenue d'une arthrite par voie hématogène (Johansson, Flock et al. 2001; Palmqvist, Foster et al. 2002). Le rôle précis de la protéine de liaison à la sialoprotéine osseuse est inconnu

(Tung, Guss et al. 2000). Au cours d'une infection ostéoarticulaire à *S. aureus*, la production de PVL pourrait avoir un impact sur la gravité de l'infection, mais ceci n'est pour l'instant décrit qu'au cours des ostéomyélites de l'enfant (Arnold, Elias et al. 2006; Bohin, Gillet et al. 2007). Les infections ostéoarticulaires sont des infections difficiles à traiter. Lorsqu'elles deviennent chroniques et lorsqu'elles sont associées à du matériel étranger, le risque d'échec du traitement est maximal, surtout lorsque le matériel est laissé en place (Boibieux, Brechignac et al. 1998). La capacité de *S. aureus* à produire du biofilm ainsi que l'apparition de variants microcolonies pourrait jouer un rôle déterminant dans la physiopathologie des infections persistantes à *S. aureus* ainsi que dans leurs récurrences (Figure 49) (Lew and Waldvogel 2004; Yarwood, Bartels et al. 2004; Proctor, von Eiff et al. 2006; Sendi, Rohrbach et al. 2006).

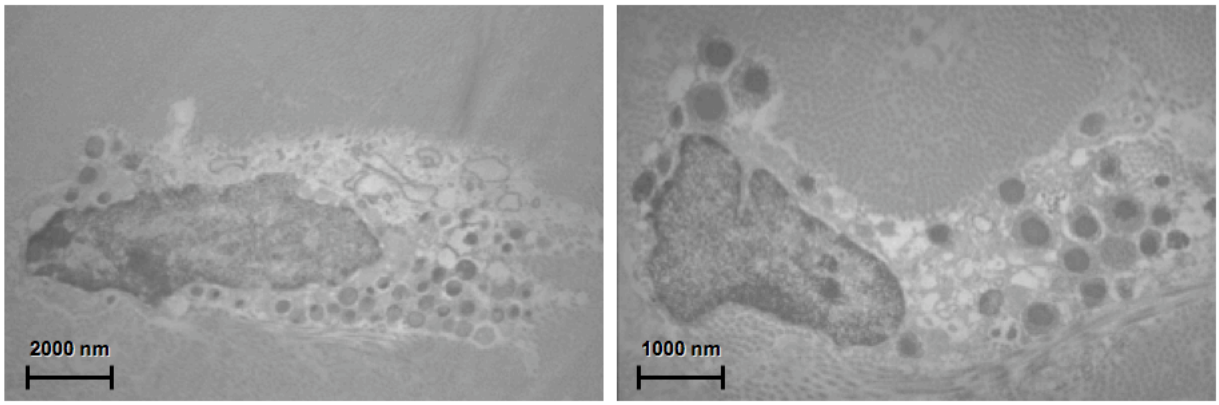


Figure 49. Microscopie électronique d'une biopsie réalisée au niveau de la capsule articulaire d'un patient présentant une ostéoarthrite chronique à *S. aureus* de la hanche. Fibroblastes avec présence de cocci en intracellulaire et de variants microcolonies de *S. aureus* en culture. D'après Sendi, Rohrbach et al. 2006.

Il existe quelques spécificités dans la prise en charge des patients présentant une infection ostéoarticulaire à *S. aureus*, selon le caractère aigu ou chronique et s'il existe ou non du matériel.

II. 6. 3. 9. Infections et atteinte du système nerveux

II. 6. 3. 9. 1. Abcès épidural

L'épidurite et l'abcès épidural surviennent généralement chez des sujets prédisposés comme chez les diabétiques ou les éthyliques qui présentent une anomalie au niveau du rachis (dégénérescence vertébrale, traumatisme du rachis, chirurgie, matériel d'ostéosynthèse ou cathéter épidural) associé à une infection à *S. aureus* (infection de la peau et des tissus mous, infection des voies urinaires, infection de cathéter veineux central, etc.) (Darouiche 2006). Le système nerveux central ou périphérique est atteint lorsque l'abcès épidural comprime directement la moelle épinière ou les racines nerveuses dans le canal médullaire. *S. aureus*, par production de certains de ses facteurs de virulence, favorise également la survenue de thrombophlébites septiques dans le canal médullaire pouvant rendre la moelle épinière ischémique (Darouiche 2006). L'abcès épidural s'étend jusqu'à la hauteur de trois ou quatre vertèbres mais peut intéresser toute la hauteur du rachis (infection panspinale). Le traitement de l'épidurite et de l'abcès épidural implique une antibiothérapie conventionnelle et un geste neurochirurgical lorsqu'il existe une symptomatologie neurologique associée (Darouiche 2006).

II. 6. 3. 9. 2. Abcès cérébraux

Une bactériémie à *S. aureus* peut-être associée à des localisations secondaires au niveau de l'encéphale. La reconnaissance de *S. aureus* par les cellules gliales via le TLR2 semble déterminante dans la constitution d'un abcès cérébral de même que la production d'alpha-toxine par *S. aureus* (Kielian, Cheung et al. 2001; Kielian, Haney

et al. 2005). Le traitement des abcès cérébraux à *S. aureus* est médical par administration d'une antibiothérapie conventionnelle et la chirurgie peut se discuter selon la taille et la topographie de l'abcès.

II. 6. 3. 9. 3. Méningite

Les méningites communautaires à *S. aureus* sont rares et sont la conséquence d'une localisation hématogène au cours d'une infection disséminée (Pedersen, Benfield et al. 2006). Elles surviennent plus souvent chez les patients qui ont une ou plusieurs comorbidités et une infection disséminée grave. *S. aureus* ne possède pas de facteur de virulence lui permettant de franchir facilement la barrière neuro-méningée. Toutefois, une infection disséminée prolongée avec un fort inoculum pourrait favoriser le passage de *S. aureus* dans le liquide céphalorachidien. D'ailleurs, la majorité des patients présentant une méningite communautaire à *S. aureus* ont une endocardite et/ou autre localisation secondaire associée (notamment osseuse) (Pedersen, Benfield et al. 2006). Les méningites à *S. aureus* isolées (sans bactériémie) sont généralement d'origine nosocomiales surviennent dans un contexte neurochirurgical, avec ou sans matériel étranger (Weisfelt, van de Beek et al. 2007). Dans ce dernier cas, l'ablation du matériel étranger est généralement nécessaire à la guérison définitive. Dans tous les cas, une antibiothérapie conventionnelle est indiquée.

II. 6. 4. Spécificités pédiatriques

II. 6. 4. 1. Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease

Le Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease (NTED) est une pathologie toxinique qui a été décrite pour la première fois en 1992, lorsqu'un grand nombre de nouveau-nés japonais ont présenté au cours de leur première semaine de vie une pathologie associant fièvre, exanthème mais sans choc ni desquamation (Figure 50) (Takahashi 2003).

Figure 50. Exanthème généralisé au cours du NTED. D'après Takahashi 2003.

Ces enfants étaient colonisés par un clone SARM hospitalier porteur du gène codant la toxine TSST-1. La production de TSST-1 a été prouvée par mise en évidence de la signature de TSST-1 *in vivo* (voir chapitre II. 8. 4.) (Takahashi 2003). Cette pathologie est plutôt de bon pronostic. Toutefois, certains auteurs proposent une antibiothérapie ayant un effet anti-toxinique (voir paragraphe II. 9. 2.). Il existe un risque de dissémination de la souche et d'épidémie dans les services de soins (Takahashi 2003).

II. 6. 4. 2. Syndrome d'exfoliation généralisée

Le syndrome d'exfoliation généralisée, ou syndrome de Ritter, est un syndrome touchant surtout le nouveau-né et l'enfant de moins de 5 ans. Il est provoqué par les toxines épidermolytiques ETA et ETB, et plus particulièrement l'ETB. La production de ces toxines survient à partir d'un isolat colonisant (au niveau des narines ou de l'ombilic) ou infectant (pneumopathie, ostéomyélite, etc.) l'hôte (Ladhani 2001; Stanley and Amagai 2006). Le syndrome clinique associe de la fièvre et des macules initialement limitées au pourtour des yeux, des narines et des lèvres rapidement suivie par une éruption scarlatiniforme généralisée prédominante au niveau des plis. En 24-48h, des lésions bulleuses avec décollement de la peau apparaissent. De grandes surfaces de peau peuvent être touchées donnant un aspect « ébouillanté » à l'enfant (Figure 51).

Figure 51. Décollement bulleux au cours d'un syndrome d'exfoliation généralisé chez un enfant de deux ans, trois jours après le début des premiers signes cliniques (fièvre et éruption érythémateuse). D'après Ladhani 2001.

Il n'existe pas de lésion muqueuse. Le signe de Nikolsky est positif et d'un point de vue anatomopathologique, du fait de la répartition des différentes desmogléines, seule la couche superficielle de l'épiderme (stratum granulosum) est atteinte. (Figure 52)

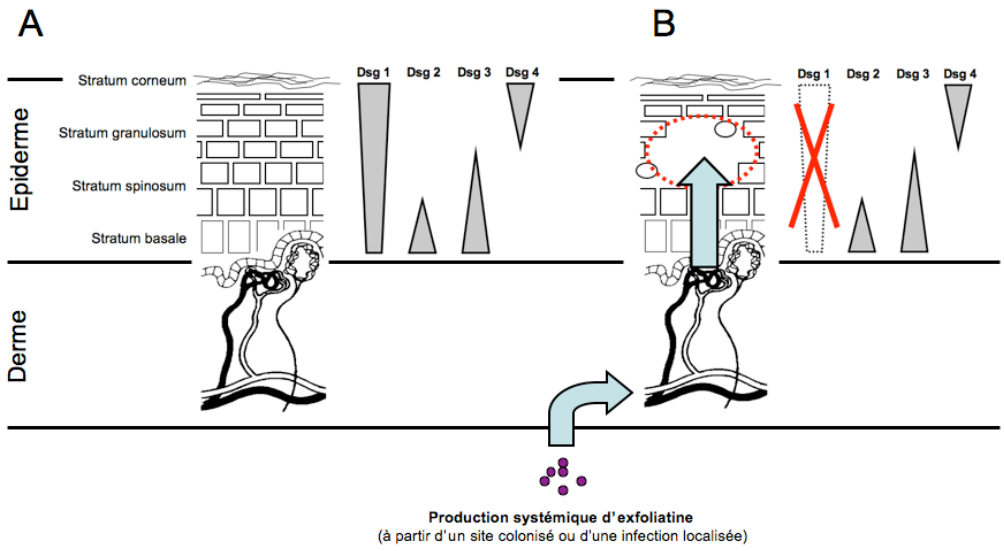


Figure 52. A, répartition des différentes desmogléines au niveau de l'épiderme. B, formation de lésions bulleuses au niveau de l'épiderme (par production systémique d'exfoliatine) ou le clivage de la desmogléine-1 n'est pas compensé par les autres desmogléines (principalement au niveau du stratum granulosum). Adapté de Ladhani 2001; Stanley and Amagai 2006.

L'absence de lésion muqueuse (le clivage de la desmogléine-1 est compensée par les autres desmogléines au niveau des muqueuses), les localisations intra-épidermiques du clivage et l'absence de nécrose en anatomopathologie différencie ce syndrome du syndrome de Lyell. La mortalité, qui dépend de la surface de peau lésée, est de l'ordre de 5%. Bien que le syndrome d'exfoliation généralisé soit considéré comme une spécificité pédiatrique, quelques cas ont été décrits chez l'adulte. Il s'agissait de patients immunodéprimés (éthylisme chronique, infection par le VIH, néoplasie) et/ou insuffisants rénaux (l'insuffisance rénale favoriserait l'accumulation des exfoliatines par défaut de clearance). L'association à une pneumopathie et/ou une bactériémie est fréquente chez l'adulte et le taux de mortalité est beaucoup plus élevé (entre 40% et 60%) (Mockenhaupt, Idzko et al. 2005). Certaines souches de SARM communautaires ont acquis le gène codant ETA et ont été isolées au Japon et en Suisse (respectivement en 2002 et 2004) à partir de lésion d'impétigo bulleux, qui est une forme mineure et localisée du syndrome d'exfoliation (Yamaguchi, Yokota et al. 2002; Liassine, Auckenthaler et al. 2004).

Aucun cas de syndrome d'exfoliation associé à un SARM communautaire n'a été rapporté à ce jour. Le traitement du syndrome d'exfoliation est avant tout symptomatique associé à une antibiothérapie conventionnelle pour éradiquer le foyer de l'infection. Des épidémies ont été décrites dans des services de néonatologie, imposant des mesures d'isolement (Ladhani 2001; Stanley and Amagai 2006).

II. 6. 4. 3. Ostéomyélite

L'ostéomyélite est une infection osseuse de l'enfant d'origine hématogène qui touche surtout la médullaire de la métaphyse des os longs. Du fait de la présence du cartilage de croissance, la vascularisation épiphysaire et métaphysaire est distincte alors que la métaphyse est plus susceptible aux greffes bactériennes du fait du moindre nombre de cellules réticulo-endothéliales et du ralentissement du flux circulatoire. *S. aureus* est le premier agent pathogène responsable d'ostéomyélite chez l'enfant. Dans la majorité des cas, l'ostéomyélite à *S. aureus* de l'enfant est liée à un isolat sensible à la méticilline, touche la partie proximale du tibia ou le fémur, est isolée, et guérie sans séquelle avec un traitement antibiotique adapté. Les ostéomyélites à *S. aureus* producteur de PVL sont en augmentation croissante et de même, la proportion des ostéomyélites de l'enfant liée à des isolats résistants à la méticilline augmente (4% en 2000 puis 40% en 2004 à l'Hôpital de Memphis), du fait de la diffusion des clones SARM communautaires (Dohin, Gillet et al. 2001; Arnold, Elias et al. 2006). Lorsque l'isolat produit la PVL, l'infection est localement plus grave car significativement plus souvent associée à une atteinte extensive de l'os, à un abcès sous-périosté ou intra-médullaire, à une extension aux tissus mous adjacents, à une myosite, une pyomyosite ou à une fasciite nécrosante (Figure 53) (Dohin, Gillet et al. 2001; Arnold, Elias et al. 2006).

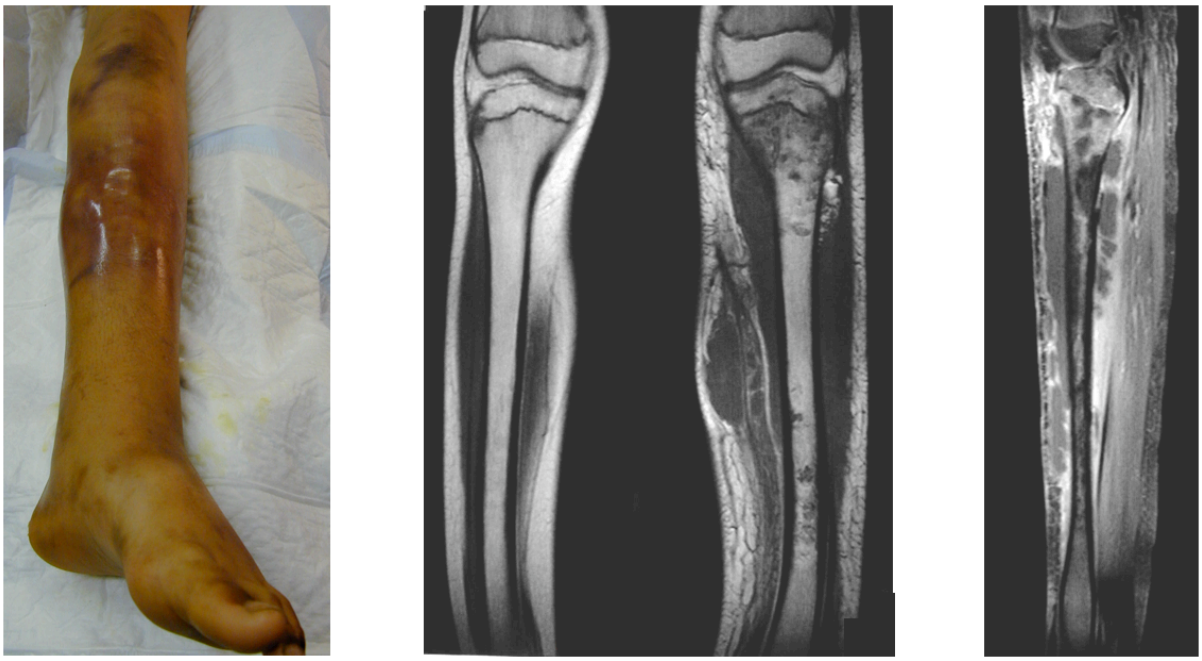


Figure 53. Ostéomyélite du tibia à *S. aureus* sensible à la méticilline producteur de PVL chez un patient de 12 ans. Cliniquement, un abcès était palpable à la face interne du tibia. A l'IRM (sans puis avec injection de gadolinium), il existait une atteinte osseuse extensive, un abcès sous-périosté et une extension aux tissus mous adjacents avec une pyomyosite. (Avec la permission du Docteur Bruno Dohin, Service de Chirurgie Pédiatrique, Pavillon T bis, Hôpital Edouard Herriot, Lyon) Dohin, Gillet et al. 2001.

Les ostéomyélites à *S. aureus* producteur de PVL sont aussi plus grave d'un point de vue général, car elles sont également significativement associées à la survenue d'un sepsis sévère ou d'un choc septique. Une thrombophlébite septique serait de plus, plus souvent retrouvée et favoriserait les formes sévères et les localisations à distance (Dohin, Gillet et al. 2001; Gonzalez, Martinez-Aguilar et al. 2005). Enfin, l'infection à SARM communautaire fragiliserait l'os atteint et pourrait entraîner une fracture pathologique pouvant survenir des mois après l'infection (Gelfand, Cleveland et al. 2006). Les ostéomyélites de l'enfant nécessitent une antibiothérapie conventionnelle, à laquelle il est conseillé d'associée la clindamycine lorsque la PVL est en cause (Martinez-Aguilar, Hammerman et al. 2003). Le drainage chirurgical est plus souvent nécessaire lorsque l'isolat produit la PVL et il doit être répété pour

permettre l'exérèse de tissu nécrotique pour améliorer la symptomatologie clinique et espérer la guérison (Dohin, Gillet et al. 2001; Arnold, Elias et al. 2006).

II. 6. 4. 4. Infections disséminées à *S. aureus* de l'enfant

Hieber et al. ont décrits en 1977 la maladie disséminée à staphylocoque chez l'enfant. Cette infection, mortelle dans 13 à 27% des cas survient surtout chez les enfants agés de cinq à 15 ans (Hieber, Nelson et al. 1977). Elle se définit comme étant une infection à *S. aureus* avec au moins deux sites anatomiques atteints et isolement de la bactérie dans les hémocultures et/ou un des sites infectés. La constitution de thrombophébites septiques pourrait jouer un rôle crucial dans la physiopathologie de cette infection (Gorenstein, Gross et al. 2000). La PVL est un facteur de virulence pouvant être déterminant dans les infections disséminées de l'enfant. La diffusion des clones SARM communautaires est responsable d'une augmentation de l'incidence des infections sévères à *S. aureus* chez l'enfant, laissant présagé un rôle direct de la PVL dans la gravité de ces infections (Gonzalez, Martinez-Aguilar et al. 2005). Le syndrome de Waterhouse-Friderichsen, surtout décrit chez l'enfant avec les infections disséminées à *Neisseria meningitidis*, est caractérisé par une CIVD associée à une nécrose hémorragique des surrénales. Récemment, trois cas fatals liés à des isolats producteurs de PVL, dont deux correspondaient à un clone SARM communautaire ont été recensés à Chicago (Figure 54) (Adem, Montgomery et al. 2005).

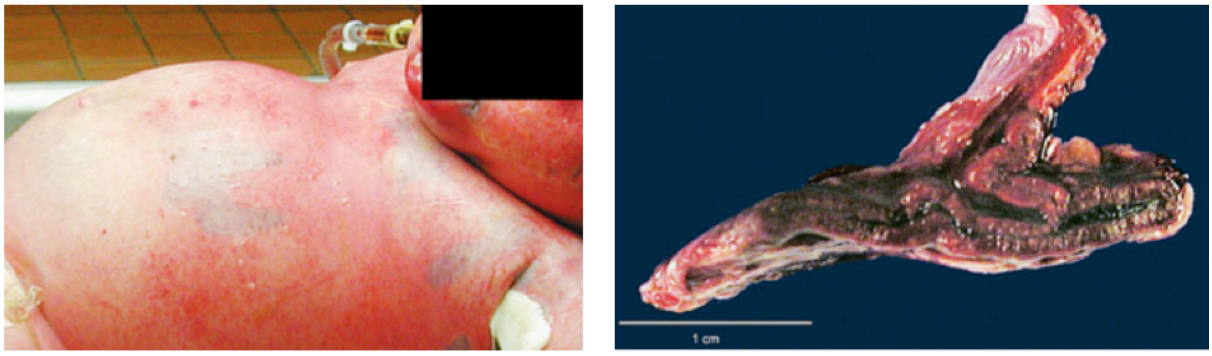


Figure 54. Lésions cutanées à type de rash pétéchial associé à une nécrose cutanée (à gauche) chez un enfant de 17 mois qui a présenté une CIVD avec nécrose hémorragique des surrénales (à droite) au cours d'une infection à SARM communautaire. D'après Adem, Montgomery et al. 2005.

Associé à l'antibiothérapie conventionnelle, il est proposé d'associer des antibiotiques inhibant la production de PVL lorsqu'elle est associée (Adem, Montgomery et al. 2005).

II. 6. 5. Bilan sur l'état des lieux des connaissances concernant l'implication des facteurs de virulence dans les infections sévères à *S. aureus*

Pathologies graves à *S. aureus*	Facteurs de virulence	Mécanisme d'action
Infections suppuratives		
PAVM	Acide lipoteichoique et peptidoglycane	Recrutement et activation des cellules de l'immunité innée par interaction avec le TLR2
	Protéine A	Production de cytokines Th-1 en interagissant avec le récepteur R1 au TNF-alpha
	Protéine de laison à la fibronectine	Adhésion à l'épithelium respiratoire
	Alpha-toxine	Lyse de l'épithélium respiratoire et destruction de la membrane alvéolo-capillaire
Infection de cathéter	Protéine de liaison au fibrinogène	Adhésion au fibrinogène recouvrant l'interface
	Protéine de liaison à la fibronectine	Adhésion à la fibronectine recouvrant l'interface
	Adhésine intercellulaire PIA	Persistance par production de biofilm
EI et autre infection endovasculaire	Coagulase	Transformation du fibrinogène en fibrine par activation de la prothrombine
	Protéine de liaison au fibrinogène	Agrégation plaquettaire en liant le fibrinogène circulant
	Protéine de liaison à la fibronectine	A grégation plaquettaire en liant la fibronectine circulante
	Protéine A	Agrégation plaquettaire en liant le facteur von Willebrand
	Alpha-toxine	Activation de l'endothélium vasculaire
	Adhésine intercellulaire PIA	Persistance par production de biofilm (valve prothétique)
Ostéite et ostéoarthrite	Protéine de liaison à la sialoprotéine osseuse	Adhésion au tissu osseux
	Protéine de laison au collagène	Adhésion au tissu osseux
	Protéine de laison au fibrinogène	Adhésion au tissu osseux
	Protéine A	Arthrite par voie hématogène
	Adhésine intercellulaire PIA	Persistance par production de biofilm (prothèse ou matériel d'ostéosynthèse)
	Variants microcolonies	Persistance dans les cellules de l'hôte
Choc septique	Acide lipoteichoique et peptidoglycane	Activation des cellules de l'immunité innée en interagissant avec le TLR2
	Polysaccharide capsulaire de type 5 et 8	Résistance à la phagocytose
	Protéine de laison au fibrinogène	Agrégation plaquettaire en liant le fibrinogène circulant
	Protéine A	Résistance à la phagocytose
	Alpha-toxine	Activation endothéliales, dysfonction myocardique, apoptose
	Protéases *Staphopain* A et B	Production de bradikinine favorisant une hyperperméabilité vasculaire et une vasoplégie
Pathologies toxiniques		
Choc toxique staphylococique	TSST-1, SEA, SEB, SEC-E, SEG-I, SE*I*J-U	Activité superantigénique avec production de cytokines Th-1
Syndrome d'exfoliation généralisée	ETA, ETB	Epidermolyse
Infections émergentes		
Pneumonie nécrosante	Acide lipoteichoique et peptidoglycane	Recrutement et activation des cellules de l'immunité innée par interaction avec le TLR2
	Protéine de liaison au collagène	Adhésion à la membrane basale de l'épithélium respiratoire
	Protéine A	Production de cytokines Th-1 en interagissant avec le récepteur R1 auTNF-alpha
	Leucocidine de Panton-Valentine	Lyse et apoptose des polynucléaires neutrophiles, nécrose du parenchyme pulmonaire
Infection grave des tissus mous et fasciite nécrosante	Leucocidine de Panton-Valentine	Lyse et apoptose des polynucléaires neutrophiles, nécrose des tissus mous
	egc	Adhésion
Ostéomyélite grave de l'enfant	Leucocidine de Panton-Valentine	Lyse et apoptose des polynucléaires neutrophiles, abcès sous-périosté, extension aux tissus mous
NTED	TSST-1	Activité superantigénique avec production de cytokines Th-1
Purpura fulminans et syndrome de Waterhouse– Friderichsen	TSST-1, SEB, SEC	Activité superantigénique avec production de cytokines Th-1
	Leucocidine de Panton-Valentine	Lyse et apoptose des polynucléaires neutrophiles

Tableau 4. Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans chacune des infections graves à *S. aureus*. PAVM, pneumopathie acquise sous ventilation mécanique ; EI, endocardite infectieuse ; NTED, *neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease* ; TSST-1, *toxic-shock-syndrome-toxin-1* ; SEA, *staphylococcal enterotoxin* A ; ETA*, exfoliatin toxin* A.

II. 7. Susceptibilité aux infections graves *à S. aureus*

II. 7. 1. Susceptibilité génétique aux infections graves à *S. aureus*

Les cellules participant à l'immunité innée reconnaissent les éléments de surface bactériens grâce à des récepteurs cellulaires dont certains appartiennent à la famille TLR. Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur le choc septique (II. 6. 1. 2.), le TLR-2 participe à la reconnaissance des éléments de surface des bactéries à Gram positif. Des modèles expérimentaux ont montré que des souris déficientes en TLR-2 avait une plus grande susceptibilité aux méningites à *S. pneumoniae* et aux bactériémies à *S. aureus* (Texereau, Chiche et al. 2005). Chez l'homme, le génotype 16933AA du TLR-2 était associé à une plus grande prévalence de sepsis dans une cohorte de 252 patients caucasiens admis en réanimation, et particulièrement pour des infections à Gram positif (Sutherland, Walley et al. 2005). Par ailleurs, dans une première étude, le polymorphisme Arg753Gln du TLR-2 semblait associé aux infections graves à *S. aureus*, mais ceci n'a pas été retrouvé à partir d'une plus large série (Lorenz, Mira et al. 2000; Moore, Segal et al. 2004). A l'avenir, l'étude de l'expression du TLR-2 pourrait fournir des informations intéressantes sur l'impact de la fonctionnalité de ce récepteur sur le pronostic des infections graves à *S. aureus*.

II. 7. 2. Susceptibilité à la PVL

Aucune susceptibilité génétique vis-à-vis de la PVL a été authentifiée à ce jour. Les formes graves d'infection à *S. aureus* producteur de PVL (pneumonie nécrosante, infections disséminées) semblent survenir plus fréquemment chez les enfants et les adultes jeunes et des antécédents de furoncles semblaient être associés à une

moins grande mortalité dans la série de pneumonie nécrosante et Gillet et al. Même si la différence n'était pas significative (27,8% des survivants contre 6,3% des décédés, p = 0,18), il est concevable qu'un passé d'infection cutanée à *S. aureus* producteur de PVL puisse immuniser unn patient vis-à-vis de la PVL. Cette théorie est soutenue par le fait que les immunoglobulines polyvalentes, produites à partir de sérums d'adultes, contiennent des anticorps qui bloquent l'action de la PVL *in vitro*.

II. 7. 3. Susceptibilité aux exotoxines superantigéniques

La susceptibilité aux exotoxines superantigéniques pourrait varier selon les individus. D'une part, il semble exister des différences dans la liaison aux exotoxines superantigéniques avec le CMH II selon ses différentes formes alléliques (Herman, Croteau et al. 1990). Il pourrait en résulter un niveau d'activation lymphocytaire variable selon le type d'allèle. D'autres part, l'immunité humorale peut-être prise en défaut puisqu'en l'absence de séroconversion vis-à-vis de TSST-1 ou de SEB après un TSS menstruel ou non-menstruel, il existe un risque de récurrence (Andrews, Parent et al. 2001; McCormick, Yarwood et al. 2001).

II. 8. Diagnostic

II. 8. 1. Diagnostic microbiologique de genre et d'espèce

Le diagnostic d'infection à *S. aureus* repose avant tout sur l'isolement de *S. aureus* par les méthodes de cultures bactériennes usuelles. Toutefois, l'isolement et l'identification de *S. aureus* nécessitent un temps incompressible de culture, souvent de 48 heures. Dans certaines infections sévères comme le choc septique, une antibiothérapie probabiliste inadaptée a un impact sur le pronostic (Annane,

Bellissant et al. 2005). L'utilisation des techniques de biologie moléculaire devrait permettre dans l'avenir un diagnostic microbiologique beaucoup plus rapide.

II. 8. 2. Diagnostic de la résistance à la méticilline et caractérisation des clones SARM

Un isolat de *S. aureus* se définit comme résistant à la méticilline lorsqu'il possède le gène *mecA* (et donc la cassette SCC*mec*). En routine, c'est la sensibilité à l'oxacilline qui est testée et un isolat apparaît comme résistant lorsque sa CMI est ≥ 4 mg/L. Parfois, il existe un doute sur la sensibilité à l'oxacilline lorsque l'isolat ne possède pas le gène *mecA* mais produit des grandes quantités de béta-lactamase ou lorsqu'il possède le gène *mecA* mais présente une résistance très hétérogène à l'oxacilline. Dans ces cas, c'est la présence du gène *mecA* qui confirme qu'il s'agit vraiment d'un SARM. Ensuite, l'antibiogramme, bien que n'étant pas complètement spécifique, peut-être informatif pour distinguer l'origine d'un SARM puisque les SARM pandémiques hospitaliers sont multi-résistants aux antibiotiques alors que les SARM communautaires restent sensibles à l'érythromycine et surtout aux fluoroquinolones alors qu'ils ont une sensibilité intermédiaire à l'acide fusidique (voir Tableau 4 ci-après) (Vandenesch, Naimi et al. 2003; Zetola, Francis et al. 2005). Il est possible d'aller plus loin dans la caractérisation des SARM, afin de déterminer à quel clone pandémique l'isolat appartient. Pour cela, il est nécessaire d'analyser le fond génétique d'un isolat et de le comparer à celui des clones pandémiques. L'électrophorèse en champ pulsé est une technique très répandue mais trop discriminante (utilisée surtout dans l'investigation des épidémies locales) et ne permet pas l'échange de données entre laboratoires, ce qui est limitant pour investiguer la dissémination d'un clone SARM à l'échelle mondiale. Avec cette

technique, deux isolats sont génétiquement reliés lorsqu'ils ont moins de 7 bandes de différences (soit plus de 80 % d'homologie) (Tenover, Arbeit et al. 1995). Les techniques basées sur le séquençage sont actuellement les techniques de référence pour caractériser et comparer le fond génétique des SARM et ce sont surtout les technique du *multilocus sequence typing* (MLST) et du *spa typing* qui sont utilisées (Enright and Spratt 1999; Harmsen, Claus et al. 2003). La technique MLST consiste à séquencer sept gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire de base et conservés au sein de *S. aureus* (gènes de ménage). Chaque séquence différente constitue un allèle distinct désigné par un numéro arbitraire attribué par la base de données http://www.mlst.net (quel que soit l'origine de la différence, mutation ponctuelle ou d'une large recombinaison). Pour un isolat donné, la combinaison des sept chiffres constitue le profil allélique ou *sequence type* (ST) désigné par un autre numéro arbitraire. Ensuite, les isolats possédant au moins cinq loci identiques sur les sept sont considérés comme étant génétiquement reliés et sont regroupés en unité appelée complexe clonal, désigné encore une fois par un numéro arbitraire, grâce au logiciel BURST (http://www.mlst.net/BURST/burst.htm) qui regroupe les isolats en famille (Figure 55) (Enright and Spratt 1999).

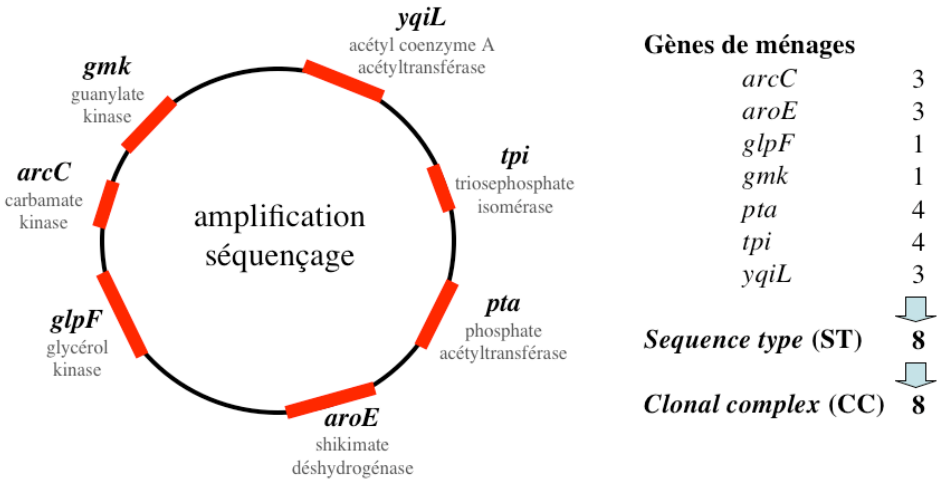


Figure 55. Caractérisation du fond génétique d'un isolat par la technique MLST. La combinaison obtenue après amplification et séquençage des gènes de ménages correspond au ST8 qui appartient au CC8.

Ainsi, le clone SARM hospitalier pandémique en France appartient au ST8 et le clone SARM communautaire prédominant en Europe appartient au ST80. Grâce à cette technique, un clone SARM émergent en France, responsable d'un spectre très varié d'infections communautaires comme nosocomiales (fasciite nécrosate, chocs toxiques menstruels, sepsis, etc.) a été détecté en 2006. Ce clone possède le locus *egc* et le gène codant TSST-1. Comme le clone SARM communautaire, il est sensible aux fluoroquinolones et a une sensibilité intermédiaire à l'acide fusidique (Tableau 5) (Durand, Bes et al. 2006).

	Clone SARM hospitalier prédominant en France	Clone SARM communautaire prédominant en Europe	Clone SARM émergent en France
Type d'infection	Nosocomiales	Communautaires	Communautaires et nosocomiales
Pathologies associées	Infections de matériel étranger Infections de site opératoire PAVM Endocardites Sepsis	Infection des tissus mous Furonclulose Fasciite nécrosante Pneumonie nécrosante Sepsis	Choc toxique staphylococcique NTED infection des tissus mous Surinfection de varicelle Fasciite nécrosante Sepsis
ATBG caractéristique			
Résistant	P, Ox, K, To, E*, L*, Of*	P, Ox, K, Te*	P, Ox, K, To, E*, L*, Te*
Intermédiaire	-	F	F
Sensible	G*, Te, P, R, C	G, To, Of*, E*, L, P, R, C	G, Of, P, R, C
MLST	ST8, CC8	ST80, CC 80	ST5, CC5
Facteurs de virulence caractéristiques	SEA	Protéine de liaison au collagène PVL	TSST-1 *egc*

Tableau 5. Caractéristiques des clones SARM hospitaliers et communautaires en France . ATBG, antibiogramme ; P, pénicliine G ; Ox, oxacilline ; K, kanamycine ; G, Gentamicine ; To, Tobramycine ; Te, Tétracycline ; E, Erythromycine ; L, Lincosamidess ; P, Pristinamycine ; Of, Ofloxacine ; R, Rifampicine ; C, Cotrimoxazole ; F, acide fusidique ; * résistance ou sensibilité inconstante ; MLST, *multilocus sequence typing*. D'après Vandenesch, F., T. Naimi, et al. (2003) ; Durand, G., M. Bes, et al. (2006).

Les données obtenues par la MLST sont reproductibles et accessibles grâce à une base de données disponible via internet (http://saureus.mlst.net) et échangeable entre tous les laboratoires. L'autre technique permettant de caractériser le fond génétique d'un isolat, *le spa typing*, est également basée sur le séquençage. Cette

technique analyse la région polymorphique X du gène de la protéine A (toujours présent chez *S. aureus*). La diversité de cette région provient de délétions et de duplications de séquences répétées ou bien de mutation ponctuelle. Ces variations reflètent le fond génétique d'un isolat et à chaque *spa type* est attribué un numéro arbitraire par le *Ridom Staph Type software* (http://www.ridom.de.spacerver). Ainsi, deux isolats appartiennent au même clone pandémique lorsqu'ils ont : (1) un maximum de 6 bandes de différence en électrophorèse en champ pulsé ; (2) un même ST ; (3) un même *spa* (à des différences mineures près) et (4) la même cassette SCC*mec* (Oliveira, Tomasz et al. 2002).

II. 8. 3. Diagnostic des SARM de sensibilité diminuée à la vancomycine et impact clinique

S. aureus est considéré comme sensible à la vancomycine lorsque la CMI est < 4 mg/L, intermédiaire lorsque la CMI est entre 4 et 8 mg/L et résistant lorsque la CMI est ≥ 8 mg/L (Soussy 2007). Les VISA (*vancomycin intermediate S. aureus*) et les VRSA (*vancomycin resistant S. aureus*) sont associés à des échecs de traitement par la vancomycine ainsi qu'à des récurrences (Hiramatsu, Cui et al. 2001). Certains SARM, bien qu'ayant une CMI < 4 mg/L, sont dit hétéro-résistant à la vancomycine (croissance d'une sous-population bactérienne au delà de 4 mg/L de vancomycine) et serait des précurseurs de VISA (Figure 56) (Hiramatsu, Cui et al. 2001; Walsh and Howe 2002).

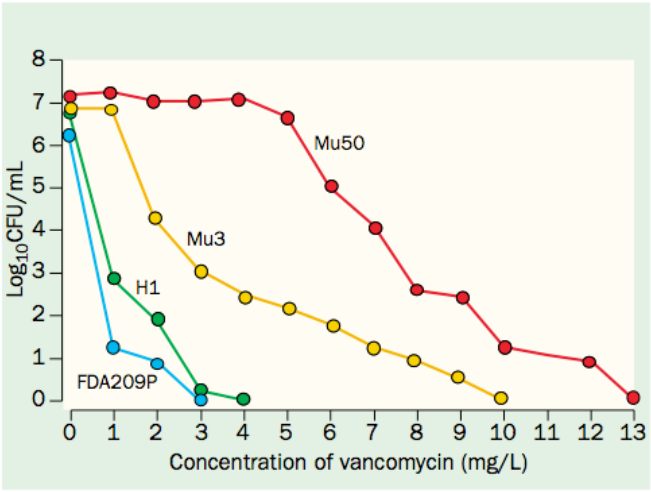


Figure 56. Analyse de population (1) de la souche Mu50 résistante à la vancomycine avec 100% de sa population bactérienne (10^7 UFC) qui croit avec une concentration de vancomycine de 4 mg/L, (2) de la souche Mu3 hétérorésistante à la vancomycine avec une sous-population bactérienne minoritaire (environ 200 UFC) poussant à une concentration de vancomycine 4 mg/L, (3) et des souches H1 et FDA209P toutes deux sensibles à la vancomycine. D'après Hiramatsu, Cui et al. 2001.

Ces isolats sont le plus souvent associés aux infections osseuses chroniques et à une exposition prolongée à la vancomycine. Les différents clones SARM hospitaliers peuvent acquérir ce type de résistance (Howe, Monk et al. 2004).

II. 8. 4. Détection directe de certains facteurs de virulence

La détection directe des exfoliatines, des exotoxines superantigéniques et de la PVL faciliterait le diagnostic des pathologies ou ces toxines sont impliquées. A ce jour, il n'existe pas de moyen utilisable en routine pour détecter directement ces toxines dans des liquides biologiques. La détection directe des exfoliatines ou des exotoxines superantigéniques est réalisable *in vitro* après mise en culture, mais ne renseigne pas sur la production de toxine *in vivo* (Ladhani 2001; Vernozy-Rozand, Mazuy-Cruchaudet et al. 2004).

II. 8. 4. Détection indirecte de certains facteurs de virulence

II. 8. 4. 1. Détection des gènes codants les toxines

Actuellement, il est possible de détecter les gènes codant les toxines d'intérêt (principales exotoxines superantigéniques et PVL) par biologie moléculaire en envoyant l'isolat au CNR des staphylocoques (adresse et feuille de renseignements disponibles sur le site http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR_staphylocoques/). Cette analyse, longue, coûteuse et réalisée *a posteriori*, renseigne sur le potentiel de l'isolat à produire une ou des toxines, mais ne renseigne aucunement sur la production *in vivo*. De plus, bien que les gènes codants les différentes toxines soient majoritairement localisées sur des éléments génétiques mobiles, il existe un lien entre la présence de ces gènes et le fond génétique des isolats de *S. aureus*. Jarraud et al. a démontré non seulement qu'il existait un lien entre le type de locus *agr* (type 1, 2, 3 ou 4) et le fond génétique, mais aussi entre les gènes codant les toxines (exfoliatines, hémolysines, toxines synergohyménotropes et exotoxines superantigéniques) avec le fond génétique (Jarraud, Mougel et al. 2002). En effet, il existe des combinaisons de gènes préférentiellement liés à un fond génétique donné, et des gènes « en opposition » c'est à dire rarement détectés chez un même isolat et retrouvés dans des fonds génétiques distincts. Ainsi, il est nécessaire de trouver des techniques alternatives pour prouver la production *in vivo* de toxine puisque la présence du gène ne peut-être que le reflet du fond génétique de l'isolat.

II. 8. 4. 2. Détection de l'effet des exotoxines superantigéniques

Depuis peu, il est possible de mettre en évidence *in vivo* l'effet de TSST-1 et ainsi de conclure à la production de cette toxine *in vivo*. Il est possible de détecter la prolifération lymphocytaire que TSST-1 induit par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD3 (pour identifier les lymphocytes T) et d'anticorps anti-Vbeta 2 (pour identifier les sous-populations lymphocytaires stimulées par la TSST-1). TSST-1 induit une prolifération des lymphocytes T Vbeta 2 *in vitro* comme *in vivo* et cela a été prouvé au cours de CTS menstruels et non-menstruels et ainsi au cours du NTED (Figure 57 et 58) (Matsuda, Kato et al. 2003; Takahashi 2003).

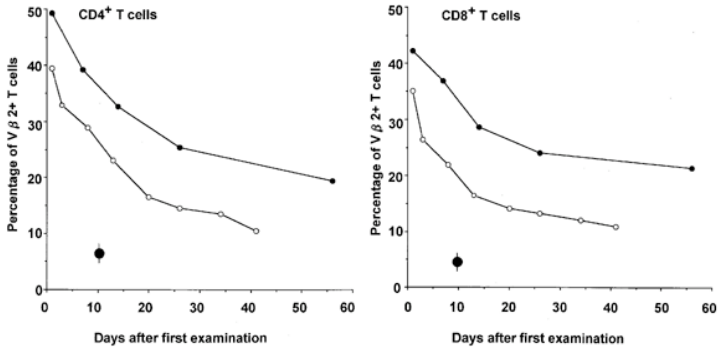


Figure 57. Pourcentage des lymphocytes circulant CD4+ (à gauche) et CD8+ (à droite) chez deux femmes (○ et •, respectivement) présentant un CTS à *S. aureus* produisant TSST-1. ● représente la valeur moyenne chez des adultes sains (de l'ordre de 7-8%). D'après Matsuda, Kato et al. 2003.

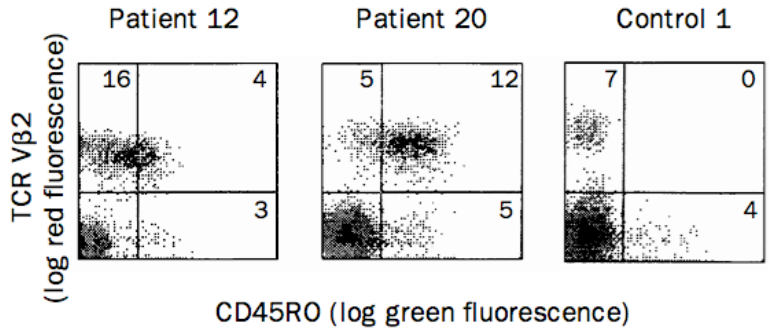


Figure 58. Pourcentage des lymphocytes T circulants positifs pour le Vbeta 2 chez deux patients présentant un NTED (patient 12 et patient 20) comparé à un sujet contrôle (control 1). En plus d'un pourcentage élevé de lymphocytes T positifs pour le Vbeta 2, ces lymphocytes T expriment le CD45RO (surtout le patient 20) qui est un marqueur d'activation lymphocytaire. D'après Takahashi 2003.

Cette technique, encore expérimentale, n'est disponible que dans certains hôpitaux. La signature Vbeta des entérotoxines, notamment au cours de CTS non-menstruel, n'a à ce jour jamais été mise en évidence *in vivo*.

II. 8. 5. Impact potentiel de l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire dans le diagnostic des bactériémies à *S. aureus*

Les progrès de la biologie moléculaire, notamment sa miniaturisation et son automatisation, devrait révolutionner le diagnostic microbiologique dans les années à venir. Plusieurs équipes et industriels ont développé des outils de biologie moléculaire afin d'identifier *S. aureus* (et d'autres germes pathogènes) directement à partir de prélèvements cliniques comme les flacons hémocultures. L'utilisation de sondes spécifiques dirigées contre des gènes d'intérêt, la PCR temps réelle ou encore plus récemment les puces à ADN permettent de réduire au maximum le délai du diagnostic microbiologique, dès lors qu'un flacon d'hémoculture est détecté comme positif (Paule, Pasquariello et al. 2005). La technique des puces à ADN semble prometteuse car non seulement elle permet un diagnostic de genre et d'espèce en ciblant les gènes spécifiques de *S. aureus*, mais en plus elle permet de détecter les principaux gènes qui confèrent la résistance aux antibiotiques (i.e. le gène *mecA* mais aussi d'autres gènes comme celui qui confère la résistance à la gentamicine ou à la clindamycine) ainsi que les gènes codant les principales toxines (SEA, TSST-1 et peut-être un jour la PVL) (Cleven, Palka-Santini et al. 2006). Cette technique, très coûteuse et encore non disponible en routine, pourrait avoir un impact significatif sur l'administration du traitement anti-staphylococcique et notamment le traitement anti-toxinique.

II. 9. Traitement

II. 9. 1. Antibiothérapie anti-staphylococcique

Les antibiotiques antistaphylococciques de référence sont les antibiotiques dont la cible est la paroi et particulièrement le peptidoglycane. Lorsque l'isolat est sensible à l'oxacilline, ce sont les pénicillines du groupe M qui sont utilisées (oxacilline, cloxacilline ou nafcilline) alors que lorsque l'isolat est un SARM, ce sont les glycopeptides (vancomycine ou teicoplanine). Pour toute infection grave à *S. aureus*, un antistaphylococcique de référence peut-être associé avec un autre antibiotique, actif sur *S. aureus*, pour augmenter la bactéricidie (par exemple avec la gentamicine au cours d'une bactériémie) ou prévenir l'apparition de mutant résistant (par exemple avec la pristinamycine ou la rifampicine au cours d'une ostéite). Dans certaines situations comme l'endocardite à SARM sur prothèse valvulaire, une trithérapie peut-être proposée. La voie d'administration (per os, intraveineuse en discontinu ou en continue), les posologies (100 à 200 mg/kg pour l'oxacilline et 30 à 50 mg/kg pour la vancomycine) et la durée nécessaires, dépendent du site infecté et de l'évolution clinique.

Les antibiotiques agissant sur la paroi de *S. aureus* n'ont pas d'activité anti-toxinique propre. A l'inverse, à de faibles concentrations (dites sub-inhibitrices car n'inhibant plus la croissance bactérienne) les pénicillines du groupe M (nafcilline comme oxacilline) entraînent une surproduction d'exotoxine *in vitro* (alpha-toxine, TSST-1 et PVL) chez les SARM comme chez les isolats sensibles à la méticilline (Stevens, Ma et al. 2007). En pratique clinique, de nombreuses infections graves à *S. aureus* peuvent limiter la pénétration des antibiotiques au niveau de certains sites anatomiques (est donc la concentration d'antibiotique *in situ* peut-être sub-inhibitrice)

malgré l'utilisation de fortes doses d'antibiotiques. C'est probablement le cas lorsqu'il existe une abcédation, une localisation osseuse ou un foyer de nécrose. L'antibiothérapie antistaphylococcique convenntionnelle peut donc être insuffisante dans certaines situations cliniques, surtout lorsque l'alpha-toxine, les exotoxines superantigéniques ou la PVL sont impliqués dans la physiopathologie de l'infection. De plus, une antibiothérapie inadaptée par pénicilline M sur les pathologies induites par les SARM producteurs de toxine, pourrait favoriser théoriquement la production de toxine sans inhiber la croissance bactérienne et aggraver ainsi la situation clinique. Afin d'améliorer le pronostic des infections graves à *S. aureus* médiées par la production de toxine, des thérapeutiques adjuvantes anti-toxiniques peuvent être proposées.

II. 9. 2. Traitements adjuvants antitoxiniques

II. 9. 2. 1. Antibiothérapie anti-toxinique

Les antibiotiques ayant pour cible le ribosome bactérien inhibent la synthèse protéique et bloquent ainsi la production d'exotoxine. *in vitro*, des concentrations sub-inhibitrices de clindamycine et de linézolide inhibe la production d'alpha-toxine, des exotoxines superantigéniques et de la PVL (Figure 59 et 60) (Stevens, Wallace et al. 2006; Dumitrescu, Boisset et al. 2007; Stevens, Ma et al. 2007).

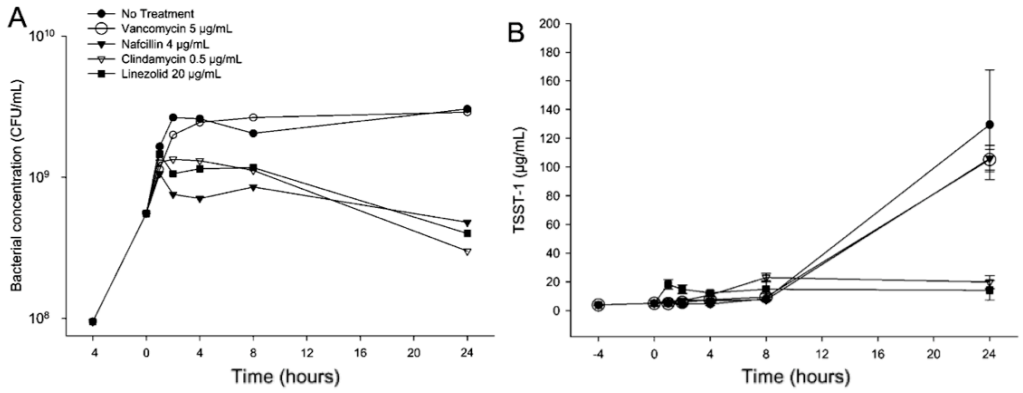


Figure 59. Inhibition de la production de TSST-1 *in vitro* par des concentrations sub-inhibitrices de clindamycine et le linézolide (la production de TSST-1 avec des concentrations sub-inhibitrices de vancomycine et de pénicilline M [nafcillin] est similaire avec celle obtenue sans traitement antibiotique). D'après Stevens, Wallace et al. 2006.

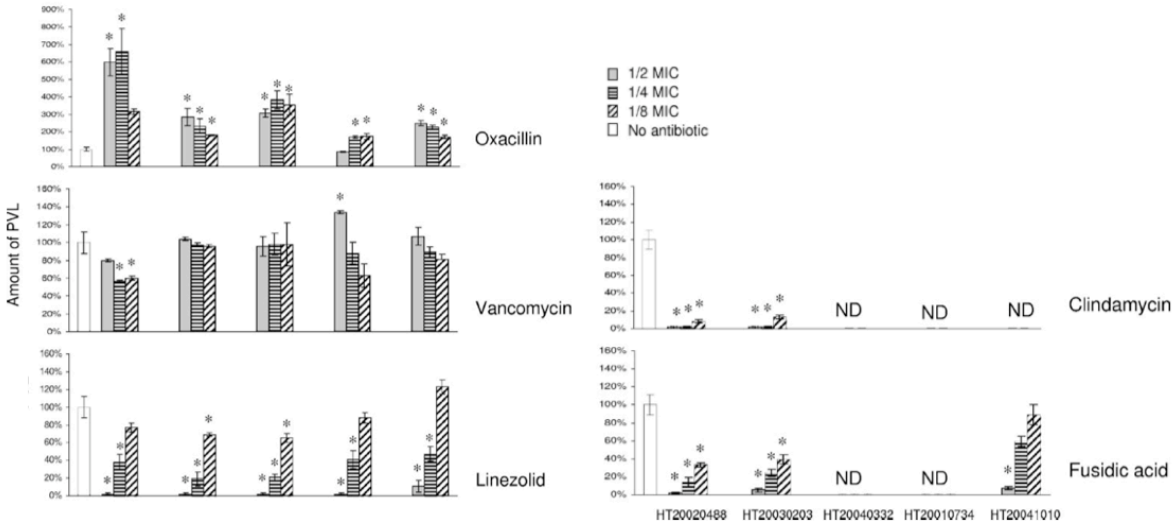


Figure 60. Effet de plusieurs antibiotiques sur la production de PVL *in vitro* par des isolats de clones SARM communautaires. Inhibition de la production de PVL par des concentrations sub-inhibitrices (1/2, 1/4 et 1/8 de la concentration minimale inhibitrice) de clindamycine, de linézolide et d'acide fusidique ; absence d'effet de la vancomycine ; majoration de la production de PVL avec l'oxacilline. ND, non déterminé ; *, p <0,05. D'après Dumitrescu, Boisset et al. 2007.

L'action des synergistines (pristinamycine ou dalfopristine/quinupristine utilisable par voie intraveineuse dans des pathologies graves) n'est pas connue comme celles de molécules plus récentes comme ta tigécycline (alors que la doxycycline inhibe la production d'exotoxine superantigénique à dose sub-inhibitrice) ou la daptomycine. Bien qu'il n'y ait pas de données cliniques formelles pour un effet bénéfique, la clindamycine (à la dose de 600 mg à 900 mg toutes les 8 heures) est conseillée en

association avec une pénicilline de groupe M (à la dose de 2 g toutes les 6 heures) pour traiter le CTS chez l'adulte (Murray 2005). Au cours des infections graves liées à des SARM, les antibiotiques anti-toxiniques, en association ou non avec un glycopeptide, pourraient être bénéfiques. La majorité des SARM hospitaliers sont résistants à la clindamycine (résistance aux macrolides de type MLS_B constitutive lié à la présence du gène *erm* aboutissant à une résistance à l'érythromycine et aux lincosamides) et l'association vancomycine-linézolide n'est pas recommandée en pratique clinique car il existe un antagonisme *in vitro* entre ces deux molécules (Grohs, Kitzis et al. 2003). Dans le CTS à SARM hospitalier, le linézolide peut-être utilisé mais aucune étude n'a comparé le linézolide à la vancomycine au cours de cette pathologie (Stevens, Ma et al. 2007). Le linézolide, comparé à la vancomycine, a démontré son efficacité dans les PAVM et les bactériémies à SARM (Kollef, Rello et al. 2004; Gomez, Garcia-Vazquez et al. 2007). Sa supériorité est même actuellement discutée dans ces deux situations cliniques et il n'est pas exclu qu'une inhibition de l'alpha-toxine (et de la production d'exotoxine superantigénique au cours du sepsis) puisse participer à ce bénéfice (Kollef, Rello et al. 2004; Gomez, Garcia-Vazquez et al. 2007). Concernant les clones SARM communautaires producteur de PVL, ils sont le plus souvent sensibles à la clindamycine et la clindamycine a démontré son efficacité dans les infections invasives à SARM communautaire de l'enfant (Martinez-Aguilar, Hammerman et al. 2003). Cependant, lorsque l'isolat est sensible à la clindamycine mais résistant à l'érythromycine, il existe une résistance inductible à la clindamycine détectable *in vitro* par le D-test (phénotype MLS_B inductible) (Figure 61) (Lewis and Jorgensen 2005).

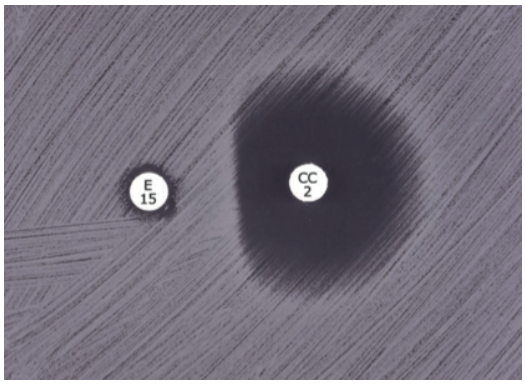


Figure 61. D-test positif. L'isolat de *S. aureus*, porteur du gène *erm*, est résistant à l'érythromycine (disque E) et sensible à la clindamycine (disque CC) mais il existe un émoussement de la zone d'inhibition obtenue avec la clindamycine du coté du disque d'érythromycine (formant la lettre D) témoignant d'une résistance inductible à la clindamycine. D'après Lewis and Jorgensen 2005.

La clindamycine est active *in vitro* et souvent efficace *in vivo*, mais l'isolat peut exprimer un phénotype MLS_B constitutif sous traitement et des rechutes peuvent être observées (Martinez-Aguilar, Hammerman et al. 2003; Siberry, Tekle et al. 2003). En pratique, il est possible d'utiliser la clindamycine à la phase initiale des infections à SARM communautaires graves en sachant qu'il existe un risque de rechute lorsqu'elle est utilisée en monothérapie et que l'isolat exprime le phénotype MLS_B inductible (résistance à l'érythromycine, sensibilité aux lincosamides, D-test positif) (Martinez-Aguilar, Hammerman et al. 2003; Siberry, Tekle et al. 2003). L'antibiothérapie idéale, probabiliste mais aussi une fois que la documentation microbiologique est effective, des infections sévères à SARM communautaire est actuellement débattue et nécessite des essais cliniques pour déterminer la stratégie la plus efficace à la phase aiguë et la plus adaptée pour améliorer la morbidité et la mortalité de ces infections graves. En plus de l'utilisation d'antibiotiques anti-toxinique, il est possible d'avoir recours à l'immunothérapie.

II. 9. 2. 2. Immunothérapie anti-toxinique

Les immunoglobulines intraveineuses (IgIV) polyvalentes ont la particularité de pouvoir neutraliser l'effet des exotoxines superantigéniques et de la PVL. Dans un

modèle animal *in vivo* de choc toxique streptococcique, les IgIV bloquent l'activité des exotoxines superantigéniques et diminuent la réponse inflammatoire systémique (Sriskandan, Ferguson et al. 2006). *in vitro*, les IgIV inhibent avec une plus grande efficacité les exotoxines superantigéniques produites par *S. pyogenes* par rapport à celles produites par *S. aureus* et ainsi une dose importante d'IgIV pourrait être nécessaire pour obtenir une efficacité clinique au cours du choc toxique staphylococcique (Darenberg, Soderquist et al. 2004). Des IgIV spécifiques dirigées contre les exotoxines superantigéniques pourraient être développées. Associées à l'antibiothérapie, les IgIV polyvalentes ont fait preuve de leur efficacité dans le choc toxique streptococcique (Kaul, McGeer et al. 1999; Darenberg, Ihendyane et al. 2003). Bien qu'il n'existe pas de preuves *in vivo*, les IgIV polyvalentes peuvent être utilisées dans le choc toxique staphylococcique de manière empirique (McCormick, Yarwood et al. 2001; Murray 2005). Concernant l'inhibition de la PVL par les IgIV, il a été démontré que les IgIV contenaient des anticorps anti-PVL et qu'ils bloquaient l'action lytique de la PVL vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles *in vitro* (Figure 62) (Gauduchon, Cozon et al. 2004).

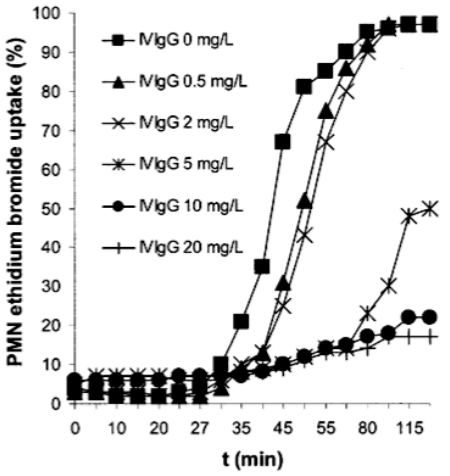


Figure 62. Effet des immunoglobulines polyvalentes utilisées en thérapeutique humaine (Tégéline®, constituées à partir de pool d'immunoglobulines humaines et possédant des anticorps anti-lukS-PV et anti lukF-PV) sur la cytotoxicité de la PVL sur les polynucléaires neurophile. La cytotoxicité de la PVL sur les polynucléaires neutrophiles est mesurée par le pourcentage de polynucléaires neutrophiles ayant capté le bromure d'éthidium (témoignant de la formation de pore transmembranaire). D'après Gauduchon, Cozon et al. 2004.

Dans les cadre des infections grave à SARM communautaires producteurs de PVL (pneumonies nécrosantes, fasciite nécrosantes et infections disséminées), la prescription précoce d'IgIV a donc un intérêt théorique, bien qu'il n'y ai pas de preuve clinique formelle de leur efficacité, surtout lorsque la fièvre et/ou l'état de choc persiste malgré une antibiothérapie adaptée (Gauduchon, Cozon et al. 2004; Salliot, Zeller et al. 2006; Gillet, Vanhems et al. 2007).

II. 9. 2. 3. Autres thérapeutiques adjuvantes anti-toxiniques

Les techniques d'hémofiltration pourraient avoir un intérêt dans la clearance des exotoxines superantigéniques circulantes. En effet, la faible mortalité observée au cours de l'étude de Steygmar et al. sur le choc septique à *S. pyogenes* a été en partie attribuée à l'utilisation large des échanges plasmatiques (Stegmayr, Bjorck et al. 1992). Récemment, au cours d'un cas de choc toxique staphylococcique lié à la production de TSST-1 et de SEA, l'utilisation des échanges plasmatiques a permis de réduire rapidement la concentration plasmatique des exotoxines superantigéniques et a limité la gravité de la symptomatologie clinique (Kohro, Imaizumi et al. 2004). Fukuyama et al. ont développé un système extra-corporel en polystyrène capable d'absorber plus de 70% des exotoxines superantigéniques produites par *S. aureus* et *S. pyogenes*. L'utilisation de ce système sur un modèle animal d'infection intra-abdominale à *S. aureus* producteur de TSST-1 chez le lapin a permis de réduire significativement la concentration sérique de TSST-1 ainsi que le délai de survenue de l'état de choc (Fukuyama, Miwa et al. 2005).

II. 9. 3. Immunothérapie anti-MSCRAMMs

La neutralisation des MSCRAMMs pourrait limiter la gravité des bactériémies à *S. aureus*, la colonisation de l'endocarde valvulaire, les localisations staphylococciques secondaires et les rechutes (Vernachio, Bayer et al. 2003). Récemment, un essai de phase II, testant la tolérance d'un anticorps monoclonal anti-protéine de liaison au fibrinogène de type A (le tefibazumab) au cours de bactériémies à *S. aureus* a été conduit avec succès (Weems, Steinberg et al. 2006). Une étude complémentaire est en cours.

II. 9. 4. Thérapeutiques anti-*agr*

Le locus *agr* est déterminant pour l'expression séquentielle des facteurs de virulence de *S. aureus* et de nombreux modèles animaux ont montré que les isolats de *S. aureus* invalidés pour ce locus avaient une virulence atténuée. Des thérapeutiques bloquant l'activité du locus *agr* pourrait avoir un intérêt en pratique clinique pour améliorer le pronostic des infections graves à *S. aureus*. Le peptide RIP (RNAIII inhibiting peptide) est un peptide qui a pour rôle de contrôler l'activation du locus *agr*. *in vitro*, le peptide RIP, comme certains de ses dérivés de synthèse, inhibe l'ARNIII et bloque la production de toxine (Vieira-da-Motta, Ribeiro et al. 2001). Le peptide RIP pourrait s'utiliser *in vivo*, mais le blocage du locus *agr* pourrait faciliter la persistance bactérienne et la production de production de variants microcolonies (Proctor, von Eiff et al. 2006).

II. 10. Mesures sanitaires et prévention

L'isolement « contact » (chambre seule, gants, sarraux, lavage des mains) permet de limiter la dissémination dans une structure de soin d'une souche de *S. aureus* résistante aux antibiotiques et/ou ayant une virulence particulière. Ce type d'isolement doit être appliqué pour les patients porteurs d'un SARM hospitalier ou communautaire et est également conseillé aux patients présentant un NTED ou un syndrome d'exfoliation généralisée, que l'isolat soit sensible ou résistant à la méticilline.

Lorsqu'un patient est porteur d'un SARM, il est possible d'éradiquer le portage nasal en utilisant localement de la mupirocine (Bactroban®, une application deux fois par jour pendant cinq jours). Toutefois, *S. aureus* peut acquérir une résistance à la mupirocine et il n'est actuellement pas conseillé de décontaminer systématiquement tous les patients porteurs de SARM hospitalier (Hospitalière Paris - 5 mars 2004). Concernant les SARM communautaires, afin d'éviter la dissémination des clones SARM communautaires en France et en Europe, dans la communauté ou à l'hôpital, il est actuellement conseillé de décontaminer les patients présentant une infection grave à SARM communautaire ainsi que les membres de la famille vivant sous le même toit. l'Afin d'améliorer la probabilité de succès de l'éradication de ces patients, il est conseillé de réaliser pendant 7 jours l'application biquotidienne de mupirocine associée à une douche antiseptique quotidienne (Chlorhexidine solution moussante) et à l'utilisation large d'eau de javel pour stériliser l'environnement (Mach 2006).

Les infections graves à *S. aureus* pourraient être prévenu chez certains patients grâce à l'utilisation de la vaccination. Staphvax® est un vaccin polysaccharidique conjugué immunisant l'hôte vis-à-vis des polysaccharides capsulaires de type 5 et 8. Une première étude a démontré que ce vaccin conférait une protection contre les

bactériémies à *S. aureus* chez des patients dialysés mais la protection était transitoire et ces résultats n'ont pas été secondairement confirmé par un essai de phase trois incluant 3600 patients (Shinefield, Black et al. 2002). La constitution d'un vaccin immunisant l'hôte, non seulement vis-à-vis des polysaccharides capsulaires, mais aussi vis-à-vis des MSCRAMMs ou de certaines toxines comme la PVL, pourrait réduire l'incidence des infections graves et le portage nasal à SARM, et limiter la dissémination des clones SARM (Zhou, Xiong et al. 2006).

Conclusion de la partie bibliographique

Nous avons pu, dans la partie bibliographique, lister les différents facteurs de virulence de *S. aureus* et voir quel était l'état des lieux des connaissances concernant leur implication dans les infections graves à *S. aureus*. Dans toutes les infections localisées à un tissu ou à un organe (infections pulmonaires, endocardite et infection de cathéter, infection grave des tissus mous, etc.) les MSCRAMMs semblent jouer un rôle déterminant. Les exotoxines quant à elles, sont impliquées dans des pathologies focales (alpha-toxine et PAVM, PVL et pneumonie nécrosante), mais peuvent également être impliquées dans des pathologies systémiques (exfoliatines et syndrome d'exfoliation généralisé, exotoxines superantigéniques et CTS). Concernant le choc septique, souvent associé à une infection disséminée qui est la forme la plus graves des infections à *S. aureus*, une multitude de facteurs de virulence semblent impliqués dans la réponse pro-inflammatoire de l'hôte. La production systémique *in vivo* de certaines toxines, s'ajoutant à la susceptibilité de l'hôte et au rôle sur la réponse inflammatoire des éléments de la paroi de *S. aureus* (capsule, peptidoglycane et acides lipoteichoïques) pourraient avoir un impact majeur sur la gravité du choc septique à *S. aureus* et la coproduction à un haut niveau d'exotoxine superantigénique pourrait conduire à la survenue d'un purpura fulminans.

Les syndromes cliniques associés aux infections à *S. aureus* sont souvent reconnaissables. Toutefois, détecter directement ou indirectement un facteur de virulence pourrait permettre : (1) un diagnostic de certitude de l'implication d'un facteur de virulence donné dans une pathologie donnée ; (2) d'adapter au mieux et précocément les thérapeutiques visant à bloquer la production ou à inhiber le facteur

de virulence concerné pour améliorer le pronostic souvent réservé des infections gravées à *S. aureus*.

III. Articles de revue

III. 1. Premier article de revue :

"Virulence determinants in Staphylococcus aureus and their involvement in clinical syndromes"

Tristan Ferry, Thomas Perpoint, François Vandenesch, Jerome Etienne

Current Infectious Disease Reports 2005;7:420-8.

Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus* and Their Involvement in Clinical Syndromes

Tristan Ferry, MD, Thomas Perpoint, MD, François Vandenesch, MD, PhD, and Jerome Etienne, MD, PhD*

Address
*Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France.
E-mail: tristan.ferry@univ-lyon1.fr

Current Infectious Disease Reports 2005, **7:**420–428
Current Science Inc. ISSN 1523-3847
Copyright © 2005 by Current Science Inc.

Staphylococcus aureus is a major human pathogen responsible for a variety of toxin-mediated and suppurative diseases. About 50 staphylococcal virulence factors have been described to date. In this review, we examine the clinical implications of key staphylococcal virulence factors in toxin-mediated diseases, septic shock, and severe focal infections such as arthritis, infective endocarditis, pneumonia acquired during mechanical ventilation, and necrotizing pneumonia. Staphylococcal pathogenicity is sometimes due principally to a single virulence factor, as in toxic shock syndrome and necrotizing pneumonia. In contrast, several virulence factors are involved in other staphylococcal disease, such as septic shock. A better knowledge of the mechanism of action of each virulence factor involved in the different staphylococcal diseases could open the way to the use of specific inhibitors in the clinical setting.

Introduction

Staphylococcus aureus is a major human pathogen. This bacterium possesses genes encoding a wide range of virulence factors, located either on the chromosome or on mobile elements [1•,2]. These factors mediate host colonization, invasion of damaged skin and mucosae, dissemination through the body, and evasion of host defense mechanisms [2]. Some have superantigenic properties. About 50 potential virulence determinants with a wide range of biologic activities have been described in *S. aureus* [2,3]. With the exception of toxin-mediated diseases such as staphylococcal scalded-skin syndrome (SSSS) and toxic shock syndrome (TSS), it is generally considered that staphylococcal pathogenicity is not due to a single virulence factor [2,3]. Staphylococcal infections occur in a stepwise manner, each step involving one or several specific virulence factors [3]. Superficial *S. aureus* infection can spread to the bloodstream and hence cause metastatic infections or septic shock [2]. Despite optimal treatment, severe staphylococcal infections are still associated with high rates of mortality and morbidity [2,4].

Acquisition of genes mediating antibiotic resistance, such as the *mecA* gene conferring resistance to methicillin, can further favor epidemic spread by promoting acquisition of additional virulence factors [1•]. Several epidemic and pandemic methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clones are spreading both in hospitals and in the community, sometimes generating new clinical syndromes [2].

In this review, we examine current data on key *S. aureus* virulence factors and their clinical implications. We focus first on toxin-mediated diseases, then on septic shock and severe focal infections (arthritis, infective endocarditis [IE], and pneumonia) (Table 1).

Staphylococcus aureus Virulence Factors

Staphylococcus aureus cells possess a capsule and a cell wall [2]. They express exotoxins and enzymes capable of lysing and invading host tissues, and some produce superantigenic toxins that interact directly with the immune system [2,3,5].

The capsule and cell wall

Eleven capsular polysaccharide types of *S. aureus* have been identified. Ninety percent of clinical isolates are encapsulated [2]. Most human infections are due to capsular types 5 and 8, whereas a significant minority are due to the capsular type 336 [2,6••]. The vast majority of MRSA isolates are capsular type 5 [6••]. Together with intercellular polysaccharide adhesins, *S. aureus* capsular polysaccharides enhance biofilm constitution by augmenting adhesiveness [2]. The capsule enhances resistance to phagocytosis. Like other gram-positive cocci, *S. aureus* has two main components to the cell wall, namely lipoteichoic acid and peptidoglycan. The hydrophobic domain of lipoteichoic acid has a role in adherence, whereas peptidoglycan covalently links adhesive proteins [2,3].

Table 1. Known and possible virulence factors involved in staphylococcal diseases

	Staphylococcal diseases	Virulence factors [reference]	Mechanism of action
Toxin-mediated diseases	Scaled-skin syndrome	Exfoliatine B [15]	Targeting the desmoglein-1 protein
	Toxic shock syndrome	TSST-1 [18]	Superantigenic activity
		SEA–E, SEH–U [18]	Superantigenic activity
Suppurative diseases	Arthritis and osteomyelitis	Bone sialoprotein-binding protein [31]	Adhesion to extracellular matrix
		Collagen-binding protein [32]	Adhesion to extracellular matrix
		Clumping factor A and B [25••]	Adhesion to extracellular matrix
		Hemolysin-α [33]	Cell-lysis
		Protein A [33]	Adhesion to extracellular matrix
	Infective endocarditis	Clumping factor A [35••,36••,37••]	Adhesion to extracellular matrix
		Fibronectin-binding protein A [34••,36••]	Adhesion to extracellular matrix
		Collagen-binding protein [38]	Adhesion to extracellular matrix
	Pneumonia acquired under mechanic ventilation	Lipoteichoic acid and peptidoglycan [41]	Interaction with TLR2
		Protein A [9]	Interaction with TNF-R1
		Fibronectin-binding protein [40••]	Adhesion to extracellular matrix
		Hemolysin-α [42,43]	Cell-lysis, injury of the alveolo-capillary barrier
	Necrotizing pneumonia	Panton Valentin leukocidin [13••,44••]	Polymorphoneutrophils lysis
		Collagen-binding protein [46••]	Adhesion to extracellular matrix
	Septic shock	Lipoteichoic acid and peptidoglycan [21]	Interaction with TLR2
		Capsular types 5 and 8 [6••]	Resistance to host immune defenses
		Clumping factor A and B [25••]	Adhesion to extracellular matrix
		Protein A [26]	Resistance to host immune defenses
		Extracellular fibronectin-binding protein [28••]	Adhesion to extracellular matrix
		Hemolysin-α [5,29]	Loss of cardiac performance, endothelial cell-lysis
		SEA [22,23•]	Superantigenic activity
Emerging diseases	Neotnatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease	TSST-1 [51]	Superantigenic activity
	Staphylococcal purpura fulminans	TSST-1, SEB, SEC [19••]	Superantigenic activity

SE—staphylococcal enterotoxin; TLR—toll-like receptor; TNF—tumor necrosis factor; TSST—toxin shock syndrome toxin.

Adhesins

S. aureus possesses various secreted and surface-anchored proteins by which it binds to host extracellular matrix and plasma components [2,3]. Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) adhesins are generally covalently anchored to cell wall peptidoglycan [7]. MSCRAMMs recognize collagen (collagen-binding protein [Cna]), fibronectin (fibronectin-binding proteins [FnBP], such as FnBPA and FnBPB), and fibrinogen (clumping factors [Clf], such as ClfA and ClfB) [2,7]. MSCRAMMs have a major role in adhesin to host tissues. Protein A (Spa) belongs to the MSCRAMM family because it binds to the von Willebrand factor, a large glycoprotein that mediates platelet adhesin at site of endothelial damage [3]. Spa displays several additional properties: it interferes with immunoglobulin-mediated opsonization; it mimics a B-cell superantigen; and it binds to tumor necrosis factor (TNF)-R1, a TNF-α receptor [2,3,8,9].

Superantigenic exotoxins

Nineteen superantigenic exotoxins have been described in *S. aureus*. They comprise toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1, encoded by the *tst* gene) and staphylococcal enterotoxins (SE) A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, and U, encoded by *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, and *seu*, respectively. Five enterotoxin genes (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) are located on the same operon, named the enterotoxin gene cluster (*egc*) [10•,11••]. These proteins are potent mitogens, are pyrogenic, and augment lipopolysaccharide lethality in animal models [5]. They stimulate large populations of T cells expressing a particular Vβ element in their T-cell receptor, leading to massive T-cell proliferation and uncontrolled release of proinflammatory (Th-1) cytokines such as interferon-γ, TNF-α, interleukin (IL)-1β and IL-6 [5,11••].

Cell lysis and tissue invasion

Certain toxins provoke inflammation by forming pores in host cells, leading to their lysis. The α-, β-, δ- and γ-toxins are hemolysins and pore-forming toxins [2,3,5]. Alpha-hemolysin is cytotoxic for endothelial cells, thrombocytes, and monocytes. It binds to specific surface receptors and stimulates several host cell signaling cascades, resulting in the release of proinflammatory cytokines and induction of apoptosis [3,5]. Panton Valentine leukocidin (PVL), together with γ-hemolysin and other leukocidins, belongs to the family of "bicomponent synergohymenotropic toxins" [3,5]. These leukocidins form a family of two-component, pore-forming toxins that act in synergy to lyse host cell membranes [12,13••]. The two active proteins are designated S and F. PVL is encoded by two contiguous and cotranscribed genes, *lukF-PV* and *lukS-PV*, that are borne by several different phages [12,13••].

Host cell membrane attack begins with the recognition of a specific receptor by a soluble molecule (LukS). Incorporation of the second component, LukF, followed by oligomerization, leads to the formation of a β-barrel molecular complex perpendicular to the plane of the membrane, thereby creating a pore. PVL is active on human polymorphonuclear neutrophils (PMN), monocytes and macrophages [12,13••]. It induces calcium channels to open, leading to calcium influx and massive release of inflammatory mediators such as leukotriene B4, IL-8, and histamine [12,13••]. These mediators attract PMN to the site of infection, where they release degradative enzymes (degranulation) and reactive oxygen species, which can damage bystander tissues. PVL-triggered histamine release by basophilic granulocytes and mastocytes can cause local vasodilatation and secondary infiltration by inflammatory cells [12,13••]. A single intravenous injection of PVL to experimental animals induces leukopenia followed, 12 hours later, by leukocytosis and myelemia [14]. PVL induces severe inflammatory lesions when injected intradermally to rabbits, with capillary dilation, chemotaxis, PMN infiltration, PMN karyorrhexis, and skin necrosis. The degree of necrosis depends on the dose of PVL. None of these effects occur in rabbits immunized against LukS-PV and LukF-PV [14].

S. aureus lyses host tissues by producing nucleases, proteases, lipases, hyaluronidase, and toxins. The main proteolytic enzymes secreted by *S. aureus* consist of a metalloproteinase and cysteine proteinases such as staphopain [2,3]. Three exfoliative toxins (ET)—A, B, and D, encoded by *eta, etb,* and *etd*, respectively—act as epidermolytic proteases by targeting desmoglein-1, a molecule with an important role in maintaining cell to cell adhesin in the superficial epidermis [15].

***Staphyloccus aureus* spread through the body**

Together with MSCRAMMs, coagulase, a prothrombin activator converting fibrinogen to fibrin, contributes to the formation of microthrombi (septic thrombophlebitis) [2,3]. Hematogenous dissemination of *S. aureus* may be facilitated by staphylokinase, a potent plasminogen activator and fibrinolytic enzyme that can fragment fibrinous clots and cause septic metastasis [2,3]. These virulence factors are expressed in a coordinated and sequential fashion that depends on bacterial cell density. Regulatory loci such as accessory gene regulator (*agr*) and staphylococcal accessory regulator (*sar)* coordinate the gene expression of most *S. aureus* components and secreted products [16•]. *S. aureus* adhesins are expressed during the early exponential growth phase, when bacterial cell density is low, whereas hemolysins, toxins, and enzymes facilitating tissue destruction and dissemination are expressed at the end of the exponential phase and during the stationary phase [16•]. The *agr* system coordinates this sequential expression of virulence factors by repressing genes expressed during the early log phase and by activating genes expressed post-exponentially. Both *agr* and *sar* are required for *S. aureus* pathogenicity [16•].

Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Toxin-mediated Diseases

Staphylococcal scalded skin syndrome

The term SSSS encompasses a spectrum of superficial blistering skin disorders caused mainly by the toxin ETB (Table 1) [2,15]. SSSS typically affects neonates and infants but can also occur in predisposed adults [15]. Outbreaks have been reported on hospital wards and in nurseries. In generalized SSSS, which affects the entire body surface, exfoliative toxins spread through the bloodstream from a focal site of infection, causing epidermal damage at distant sites. Nikolsky's sign is present in generalized SSSS: gentle rubbing of uninvolved or healed skin dislodges the superficial epidermis. An ET-producing *S. aureus* strain can be isolated from a site of colonization (nares, eyes, umbilicus, groin), a wound site, or a site of infection. Biopsy shows mid-epidermal splitting at the level of the zona granulosa. Most cases respond to antibiotic treatment. The mortality rate is low in infants but can be as high as 67% in adults, depending on the extent of skin involvement and comorbidity [15]. In the localized form—bullous impetigo (mainly caused by the toxin ETA)—the skin damage is restricted to the site of infection [15].

S. aureus enters through damaged skin. It can be cultured from blister contents in bullous impetigo. According to a recent review, the higher incidence of generalized SSSS in children may be due to less efficient renal clearance of the toxin and to immunologic immaturity (low anti-exfoliative toxin antibody titers) [17].

Staphylococcal toxic shock syndrome

TSS is associated with the diffusion of superantigenic toxins, TSST-1, or enterotoxins (Table 1). TSS is an acute-onset multisystemic illness characterized by five clinical criteria, namely fever (≥ 38.9° C or 102° F), hypotension

(systolic pressure < 90 mmHg), a diffuse erythematous rash, variable multiorgan involvement (vomiting or diarrhea at onset, mucosal hyperemia, severe myalgia, acute renal failure, hepatic cytolysis, hematologic abnormality, and/or disorientation), and cutaneous desquamation (occurring up to 2 weeks after onset). TSS is considered probable when one of the five criteria is lacking. TSS usually occurs when large amounts of staphylococcal superantigenic toxins are secreted into the circulation [18]. The clinical manifestations result from massive cytokine release causing a capillary leak syndrome [18]. TSS is subdivided into two main categories. Nonmenstrual TSS (nmTSS) is now more common than menstrual TSS (mTSS). All cases of mTSS are caused by TSST-1, which efficiently crosses mucosal barriers. Use of high-absorbency tampons can lead to cervical or vaginal colonization by toxin-producing *S. aureus* [18]. MTSS is one of the rare instances in which a single virulence factor can lead to multiple organ failure and death. NmTSS occurs in patients with superficial or deep-seated staphylococcal infections, especially after surgery or in the postpartum setting. Screening for superantigenic toxins detects TSST-1 in less than 50% of cases of nmTSS. At least one enterotoxin gene (eg, *seb* or *sec*) is carried by the causative strain [18]. In the United States, the annual incidence is about 3.4 cases per 100,000 women of menstrual age and is increasing for unknown reasons [18]. Twenty-two definite or probable cases of TSS were collated in France in 2004 (Perpoint, personal data). Nineteen other cases met only three criteria of the above Centers for Disease Control and Prevention case definition. Diagnostic confirmation relies on laboratory tests. Specific expansion of Vβ T cells among peripheral blood mononuclear cells is a possible biologic sign. Treatment is based on antibiotics, such as clindamycin, that inhibit protein synthesis at the ribosomal level [18]. Because of the crucial role of humoral immunity, polyspecific intravenous immunoglobulins may be an effective adjunctive therapy, but their potential clinical benefit remains to be confirmed [18]. The mortality rate has remained stable at about 5%, but seems to be higher in nmTSS (Perpoint, personal data). As nmTSS can be associated with deep-seated *S. aureus* infection and bacteremia, it can be difficult to distinguish it from septic shock. Five cases of *S. aureus* infection associated with severe purpura, superantigenic toxin production (TSST-1, SEB, and SEC), and septic shock were recently reported, indicating that superantigenic toxins may be involved in the pathophysiology of *S. aureus* septic shock [19••].

Staphylococcus aureus Virulence Factors in Staphylococcal Septic Shock

Septic shock is the leading cause of death among critically ill patients in industrial countries. Despite optimal symptomatic care and treatment of the infection, the overall mortality rate of *S. aureus* septic shock is still 40% to 60% [4]. A recent French study showed a 75% increase in the attack rate of severe sepsis in intensive care units over the past decade [20•]. Improved care of the elderly and of immunocompromised patients, combined with the widespread use of invasive devices, has probably contributed to this increase, but the specific involvement of particular virulence factors cannot be ruled out.

S. aureus is one of the most frequent causes of septic shock, a disorder due to an uncontrolled inflammatory response [4]. This response is mainly mediated by the innate immune system that triggers massive release of proinflammatory Th1 cytokines such as TNF-α, IL-1β, IL-6 and IFN-γ [21]. Several staphylococcal virulence factors may be involved in this excessive inflammatory response (Table 1) [2,21].

Superantigenic toxins trigger T-cell proliferation, which may in turn lead to massive Th1 cytokine release [2,5,18]. In a mouse model of sepsis due to an SEA-producing strain of *S. aureus*, vaccination against SEA protected the animals against septic shock and reduced the 5-day mortality rate (23% and 77% in immunized and nonimmunized mice, respectively) [22]. A recent study has shown that the *sea* gene is associated with septic shock in patients with *S. aureus* bloodstream infection [23•]. These data raise the hypothesis that proinflammatory responses triggered both by cell wall components and by superantigenic toxins such as SEA may co-exist during *S. aureus* bloodstream infection, leading to "mixed shock" (Fig. 1) [11••,22,23•].

Staphylococcal cell wall components—lipoteichoic acid and peptidoglycans—are recognized by toll-like receptor 2 (TLR2), which, when activated, triggers activation of the a transcription factor called nuclear factor κB (NF-κB), which in turn controls the expression of genes encoding Th1 cytokines [4,21]. *S. aureus* cell wall components can induce systemic inflammation and organ dysfunction during sepsis. By conferring a net negative charge on the surface of *S. aureus*, cell wall components can also activate the plasma kallikrein/kinin system, causing vascular leakage and contributing to the onset of shock [21,24].

Capsular types 5 and 8 account for about 85% of human *S. aureus* bacteriemia isolates. In a recent phase III trial, a bivalent *S. aureus* conjugate vaccine containing capsular polysaccharides type 5 and 8 protected patients with end-stage renal failure from bacteremia [6••].

MSCRAMMs are critical virulence factors in several experimental model of sepsis. The mortality rate in an experimental model of septic arthritis was higher after challenge with strains carrying the *fnbpA* and *fnbpB* genes compared with a *fnbpA- fnbpB-* double mutant [25••]. Likewise, intravenous challenge with an *S. aureus* wild-type strain produced a higher mortality rate than challenge with an isogenic spa mutant in a murine model, indicating that Spa may act as a virulence factor in *S. aureus* sepsis [26]. Infusion of a monoclonal antibody against ClfA proved to be protective in a murine model of bloodstream infection [27••]. Finally, a serologic response to Clfs and extracellular fibrinogen binding protein has been observed in patients with deep-seated bacteremic *S. aureus* infection [28••].

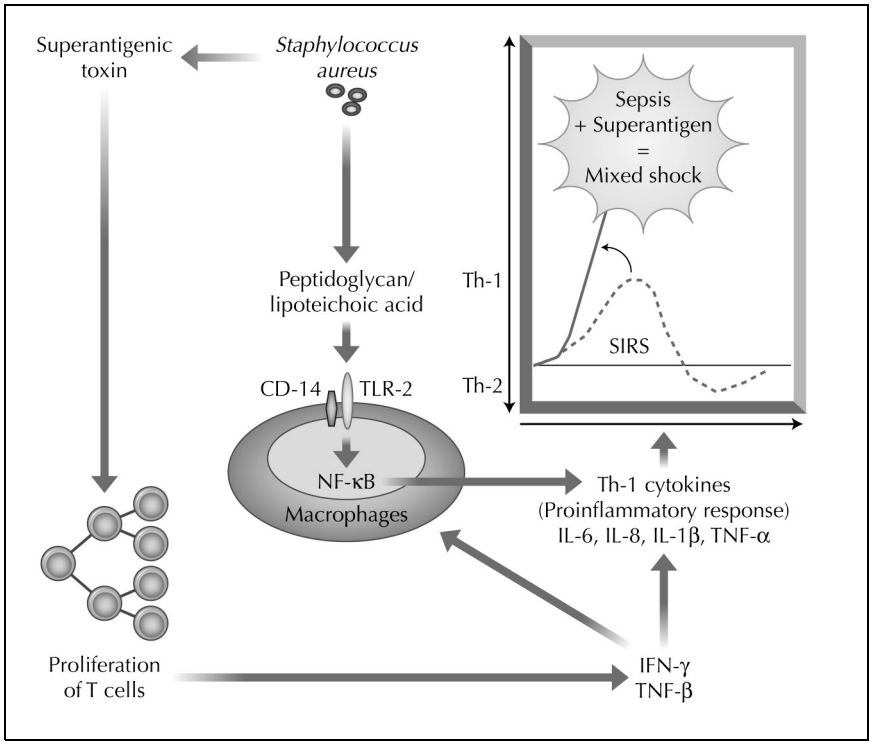


Figure 1. A model of "mixed shock" occurring during a *Staphylococcus aureus* bloodstream infection is shown. The proinflammatory (Th-1) response induced by cell wall components (peptidoglycan and lipoteichoic acid) is potentiated by the proinflammatory response triggered by superantigenic toxin. IFN—interferon; IL—interleukin; NF—nuclear factor; SIRS—systemic inflammation response syndrome; TLR—toll-like receptor; TNF—tumor necrosis factor.

Alpha-hemolysin also seems to be involved in *S. aureus* septic shock. By targeting monocytes, platelets and endothelial cells, α-hemolysin induces the production of proinflammatory mediators in vitro, and may contribute to the onset of disseminated intravascular coagulation in vivo [5]. Alpha-hemolysin may be also involved in the loss of cardiac performance during *S. aureus* septic shock. In a rat model of sepsis, this toxin provoked coronary vasoconstriction and a loss of myocardial contractility [29].

Proteases such as staphopain A and B can be secreted by *S. aureus* at sites of infection or into the circulation. Experimentally, those cysteine proteases induce vascular leakage mediated by bradykinin, the end-product of kallikrein/kinin system activation [30••].

Staphylococcus aureus Virulence Factors in Focal Infections

Arthritis and osteomyelitis

Osteomyelitis mainly affects infants and children. Septic arthritis due to *S. aureus* can cause irreversible joint damage and death [2]. In both types of infection the staphylococci reach the bone or joint region via the bloodstream, and multiple virulence factors may be involved in these infections (Table 1).

Bone sialoprotein-binding protein (BSP) may be important in infection of bone tissue and may, therefore, be involved in the pathogenesis of *S. aureus* osteomyelitis. Indeed, BSP is an extracellular matrix glycoprotein found only in bone and dentine and is selectively bound by *S. aureus* cells isolated from patients with osteomyelitis and septic arthritis [31].

Among the MSCRAMMs, Cna was shown in a murine model to contribute to the ability of *S. aureus* to infect bone by hematogenous spread [32]. In a murine model of septic arthritis, clumping factors A and B were found to contribute significantly to the arthritogenicity of *S. aureus*, whereas FnBPs had no such effect. In contrast, FnBPs contributed to infection-induced weight loss and mortality. Thus, these virulence factors play distinct roles in the pathogenesis of staphylococcal infections [25••]. Otherwise, a model of septic arthritis in mice indicates that expression of genes encoding Spa and α-hemolysin play a major role in the pathogenesis of the disease [33].

Infective endocarditis

S. aureus is a major cause of endovascular infections, including both native- and prosthetic-valve endocarditis. *S. aureus* is one of the most common pathogens isolated from patients with IE [2,34]. MSCRAMMs play a central role in the pathogenesis of staphylococcal endocarditis by enhancing bacterial adherence to host proteins present in endovascular lesions (Table 1) [34••]. Several experimental studies have shown the role of ClfA and FnBP in valve colonization, infection and persistence of IE [34••,35••,36••,37]. Mutant strains of *S. aureus* that lack ClfA expression were less virulent than the parental strain in a rat IE model, and deletion of a determinant domain of FnBP abrogated valve infection [35••,36••]. Likewise, when ClfA is expressed in recombinant commensals such as *Streptococcus gordon* and *Lactococcus lactis*, the bacteria become more virulent and can successfully colonize damaged valves. FnBP-expressing lactococci grew slowly on vegetations and invaded the adjacent epithelium [34••,35••]. FnBP also triggers bacterial internalization by endothelial cells in vitro,

by bridging to integrin-α5β1 [36••]. Finally, treatment with anti-ClfA immunoglobulin plus vancomycin enhanced bacterial clearance from the bloodstream and vegetations in a rabbit model of IE [37]. ClfA and FnBP may cooperate in *S. aureus* valve colonization and endothelial invasion in vivo [36••]. In rats with experimental IE, ClfA-expressing lactococci were restricted to vegetations, whereas FnBPA-positive lactococci also invaded the adjacent endothelium [34••,35••]. ClfA and FnBP appear to be key players in both the onset and outcome of IE. Clinical use of anti-ClfA and anti-FnBP immunoglobulin might have the potential to limit valve colonization, infection and destruction in infective endocarditis. ClfB and coagulase seem to be less important in the pathogenesis of IE [34••,35••]. Cna seems to be involved in the early step of adhesin to valve tissue [38].

Cell wall lipoteichoic acid, which interacts with endothelial cells, may also contribute to the onset and progression of IE. A lack of teichoic acid expression reduced the capacity of *S. aureus* to colonize cardiac vegetations and to proliferate in a rabbit model of IE [39].

Thus, ClfA and FnBP seem to play a role in the occurrence of IE, but none appears to be linked to the outcome of the infection. Appropriate coordination of virulence factor expression also seems to have a major role, as *agr-sar* dual knock-out mutants are less virulent than their wild-type counterparts in experimental IE [16•].

Pneumonia

Staphylococcus aureus pneumonia acquired during mechanic ventilation

Pneumonia acquired during mechanic ventilation (PAMV) is associated with major morbidity and mortality. *S. aureus*, the leading pathogen in PAMV, is able to adhere to the respiratory epithelium, to damage the alveolocapillary barrier, and to attract PMN, through the action of multiple virulence factors (Table 1) [9,40••,41–43].

Lipoteichoic acid and peptidoglycan, through their interaction with the TLR2, act synergistically to activate and recruit cellular mediators of innate immunity to the lungs [41]. MSCRAMMs, and particularly FnBP and Spa, were shown to be involved in the colonization of and adhesin to the respiratory epithelium in an animal model of pneumonia [40••,42]. Spa, by binding to TNFR1 (widely expressed by pulmonary epithelial cells), induces an inflammatory response that mimics TNF-α activation of airway cells [9]. It is thus a major player in the local proinflammatory reaction.

Alpha-hemolysin damages the alveolocapillary barrier in vivo and in vitro and could be a major determinant of tissue destruction and hematogenous dissemination [42,43].

Mutations in the regulatory loci *agr* and *sar* significantly reduce both the mortality rate and the frequency of associated bacteremia in experimental PAVM [42].

Necrotizing pneumonia

Community-onset necrotizing pneumonia due to *S. aureus*-carrying PVL is a worrying emerging infection with a frequently fatal outcome (Table 1) [44••]. Most published cases have involved children and teenagers. Necrotizing pneumonia is a rapidly progressive form of extensive pneumonia leading to acute respiratory distress with pleural effusion, hemoptysis and leucopenia [44••]. Autopsy shows diffuse bilateral necrotic and hemorrhagic pneumonia, where as lung computed tomography shows destruction of the parenchyma [44••,45]. *S. aureus* can infect the lungs via the bloodstream or, more commonly, after aspiration of the upper respiratory flora. Influenza usually precedes the onset of *S. aureus* necrotizing pneumonia, causing airway epithelial damage that impairs ciliary function and bacterial clearance, and exposing type I and IV collagens and laminin. PVL *S. aureus* strains often harbor the gene *cna*. Cna protein could promote *S. aureus* adhesin to basal cells of the respiratory epithelium [46••]. Given the capacity of PVL to cause cell damage in vitro, PVL may play a major role in the inflammation and necrosis of the respiratory epithelium and parenchyma. PVL is also the most likely cause of peripheral leukopenia in this setting. PVL-positive *S. aureus* necrotizing pneumonia carries a high mortality rate. Gillet *et al.* [44••] reported a crude lethality rate of 75% among 16 cases. The survival rate 48 hours after admission was only 62.5%, and death was associated with hemoptysis and severe leucopenia [44••]. Polyclonal immunoglobulins contain specific antibodies that inhibit PVL leukocytotoxicity by direct neutralization, but controlled studies are hindered by the rapid onset of death [47••]. Appropriate first-line antibiotic therapy is crucial, as the PVL locus is a stable genetic marker of clonally spreading community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) infection [45,48•].

Virulence Factors Associated with MRSA Clones

MRSA strains are now the leading cause of hospital-acquired infections worldwide, particularly in intensive care units. Molecular epidemiologic studies show that a few pandemic clones are responsible for most MRSA infections worldwide [49]. Successful MRSA clones may have acquired virulence factors in order to compensate for the loss of fitness associated with antibiotic resistance [1•]. Superantigenic toxins are preferentially detected in hospital-acquired MRSA clones (Ferry, personal data), whereas the PVL genes are mostly associated with CA-MRSA [13••].

CA-MRSA clones contain the PVL genes and have been detected worldwide [48•]. These clones are responsible for the increasing incidence of primary deep-seated follicular infection and necrotizing pneumonia. CA-MRSA clones spread during outbreaks of skin abscesses, that have been observed in various geographic regions and community settings [13••,48•]. Direct airway transmission can also occur [50].

Almost all pandemic hospital-acquired MRSA clones harbor one or more genes encoding a superantigenic toxin (Ferry, personal data). SEA may have a role in septic shock due to New York clone V, the Hungarian clone, the Iberian clone

and the EMRSA 16 clone, all of which harbor the *sea* gene (Ferry, personal data). Peacock *et al.* [51] found that *sea* was significantly more common in invasive isolates in the United Kingdom, probably owing to the fact that the EMRSA-16 clone (positive for *sea*) is highly prevalent in this country. *S. aureus* clones that produce SEA might have a propensity to induce shock, and the spread of a *sea*-positive MRSA clone may account for the increase in the septic shock attack rate observed in France [20,23•]. TSST-1 is produced by an MRSA clone that predominates in Japan and is now spreading through Europe. This clone is responsible for outbreaks of nosocomial toxic shock syndrome and for an emergent toxin-related disease called neonatal TSS-like exanthematous disease [52]. This clone has been detected in France and may be associated with bloodstream infections (Ferry, personal data). As during *sea*-positive *S. aureus* bloodstream infections, this *tst*-positive clone may lead to a "mixed shock".

Conclusions

S. aureus produces many virulence factors, most of which act in a synergistic and coordinated fashion. Some appear to be specifically associated with certain severe infections and are produced by worldwide distributed MRSA clones. PVL has emerged as a major virulence factor in CA-MRSA infections. In particular, the leukotoxic action of PVL is responsible for the high mortality rate associated with necrotizing pneumonia. Superantigenic exotoxins appear to be major virulence factors in hospital MRSA clones, and SEA may be involved in the pathophysiology of septic shock. MSCRAMMs, and particularly ClfA and FnBP, have prognostic significance in experimental infective endocarditis and PAMV, but this remains to be documented in human infections. A wide variety of virulence factors appear to be involved in septic shock. Specific inhibition of 1) MSCRAMMs or the loci that coordinate their production (*sar* and *agr*) in endocarditis and PAVM and 2) individual factors such as PVL in necrotizing pneumonia, superantigenic exotoxins in TSS and SEA in septic shock (if the model of "mixed shock" is confirmed) has potentially exciting therapeutic possibilities.

Acknowledgment

The authors would like to acknowledge David Young for editing.

References and Recommended Reading

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- • Of importance
- •• Of major importance

1.• Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, *et al.*: **Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA.** *Lancet* 2002, **359:**1819–1827.

This article provides new insight into the genome content of CA-MRSA carrying the PVL genes.

2. Lowy FD: **Staphylococcus aureus infections.** *N Engl J Med* 1998, **339:**520–532.
3. Cheung AL, Projan SJ, Gresham H: **The genomic aspect of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in Staphylococcus aureus.** *Curr Infect Dis Rep* 2002, **4:**400–410.
4. Astiz ME, Rackow EC: **Septic shock.** *Lancet* 1998, **351:**1501–1505.
5. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM: **Exotoxins of Staphylococcus aureus.** *Clin Microbiol Rev* 2000, **13:**16–34.

6.•• Robbins JB, Schneerson R, Horwith G, *et al.*: **Staphylococcus aureus types 5 and 8 capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines.** *Am Heart J* 2004, **147:**593–598.

This article documents the protective effect for human of a vaccine against *S. aureus* using capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines.

7. Foster TJ, Hook M: **Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus.** *Trends Microbiol* 1998, **6:**484–488.
8. Silverman GJ, Goodyear CS: **A model B-cell superantigen and the immunobiology of B lymphocytes.** *Clin Immunol* 2002, **102:**117–134.
9. Gomez MI, Lee A, Reddy B, *et al.*: **Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1.** *Nat Med* 2004, **10:**842–848.

10.• Lina G, Bohach GA, Nair SP, *et al.*: **Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus.** *J Infect Dis* 2004, **189:**2334–2336.

This article is an attempt to establish a comprehensive nomenclature for the staphylococcal superantigens.

11.•• Holtfreter S, Broker BM: **Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis?** *Arch Immunol Ther Exp* 2005, **53:**13–27.

This review on the staphylococcal superantigens and an attempt to define their roles in sepsis places emphasis on the so-called two-hit model of sepsis.

12. Finck-Barbancon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA: **Pore formation by a two-component leukocidin from Staphylococcus aureus within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes.** *Biochim Biophys Acta* 1993, **1182:**275–282.

13.•• Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, *et al.*: **Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia.** *Clin Infect Dis* 1999, **29:**1128–1132.

This article documents the epidemiologic association of PVL with primary skin infections (confirmatory) and with necrotizing pneumonia (first description).

14. Cribier B, Prevost G, Couppie P, *et al.*: **Staphylococcus aureus leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study.** *Dermatology* 1992, **185:**175–180.
15. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, *et al.*: **Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome.** *Clin Microbiol Rev* 1999, **12:**224–242.

16.• Pragman AA, Schlievert PM: **Virulence regulation in Staphylococcus aureus: the need for in vivo analysis of virulence factor regulation.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004, **42:**147–154.

This article reviews the difficulties to match in vitro studies of regulation of gene expression with the in vivo reality.

17. Ladhani S: **Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of Staphylococcus aureus.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, **39:**181–189.
18. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM: **Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update.** *Annu Rev Microbiol* 2001, **55:**77–104.

19.•• Kravitz GR, Dries DJ, Peterson ML, Schlievert PM: **Purpura fulminans due to Staphylococcus aureus.** *Clin Infect Dis* 2005, **40:**941–947.

This article describes cases of purpura fulminans directly associated with severe infection due to *S. aureus* strains that produce high levels of superantigenic toxins.

20.• Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B: **EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units.** *Intensive Care Med* 2004, **30:**580–588.

This article indicates that the attack rate of severe sepsis in French intensive care units appears to have increased over the past decade.

21. Fournier B, Philpott DJ: **Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system.** *Clin Microbiol Rev* 2005, **18:**521–540.
22. Nilsson IM, Verdrengh M, Ulrich RG, *et al.*: **Protection against Staphylococcus aureus sepsis by vaccination with recombinant staphylococcal enterotoxin A devoid of superantigenicity.** *J Infect Dis* 1999, **180:**1370–1373.
23.• Ferry T, Thomas D, Genestier AL, *et al.*: **Comparative prevalence of superantigen genes in staphylococcus aureus isolates causing sepsis with and without shock.** *Clin Infect Dis* 2005, In press. http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/rapid.html. Accessed August 12, 2005.

This article indicates the possible role of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in *S. aureus* septic shock.

24. Wang JE, Dahle MK, Yndestad A, *et al.*: **Peptidoglycan of Staphylococcus aureus causes inflammation and organ injury in the rat.** *Crit Care Med* 2004, **32:**546–552.
25.•• Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald JR, *et al.*: **Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation.** *J Infect Dis* 2005, **191:**791–8.

This indicates that the Clfs significantly contributed to the arthritogenicity of *S. aureus* in an experimental model of septic arthritis, FnPBs had no effect on the development of arthritis. Conversely, FnPBs played an important role in the induction of systemic inflammation, characterized by IL-6 secretion, severe weight loss, and mortality.

26. Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E: **Protein A is a virulence factor in Staphylococcus aureus arthritis and septic death.** *Microb Pathog* 2002, **33:**239–249.
27.•• Hall AE, Domanski PJ, Patel PR, *et al.*: **Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing Staphylococcus aureus MSCRAMM protein clumping factor A.** *Infect Immun* 2003, **71:**6864–6870.

This article suggests that a anti-ClfA monoclonal antibody should be further investigated as a novel immunotherapy for the treatment and prevention of life-threatening *S. aureus* infections.

28.•• Colque-Navarro P, Palma M, Soderquist B, *et al.*: **Antibody responses in patients with staphylococcal septicemia against two Staphylococcus aureus fibrinogen binding proteins: clumping factor and an extracellular fibrinogen binding protein.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, **7:**14–20.

This demonstrates the in vivo production of *S. aureus* fibrinogen binding proteins during deep *S. aureus* infections and a possible diagnostic and prophylactic role of the corresponding serum antibodies in such infections.

29. Sibelius U, Grandel U, Buerke M, *et al.*: **Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation.** *Circulation* 2000, **101:**78–85.
30.•• Imamura T, Tanase S, Szmyd G, *et al.*: **Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from Staphylococcus aureus.** *J Exp Med* 2005, **201:**1669–1676.

This article suggests that production of bradykinin and leucyl-methionyl-lysyl-bradykinin by staphopains is a new mechanism of *S. aureus* virulence and bacterial shock. Therefore, staphopain-specific inhibitors and kinin-receptor antagonists could be used to treat this disease.

31. Yacoub A, Lindahl P, Rubin K, *et al.*: **Purification of a bone sialoprotein-binding protein from Staphylococcus aureus.** *Eur J Biochem* 1994, **222:**919–925.
32. Elasri MO, Thomas JR, Skinner RA, *et al.*: **Staphylococcus aureus collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis.** *Bone* 2002, **30:**275–280.
33. Gemmell CG, Goutcher SC, Reid R, Sturrock RD: **Role of certain virulence factors in a murine model of Staphylococcus aureus arthritis.** *J Med Microbiol* 1997, **46:**208–213.
34.•• Moreillon P, Que YA: **Infective endocarditis.** *Lancet* 2004, **363:**139–149.

This extensive review on infective endocarditis places emphasis on pathophysiology of this disease.

35.•• Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, *et al.*: **Role of Staphylococcus aureus coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis.** *Infect Immun* 1995, **63:**4738–4743.

Using isogenic strains of *S. aureus*, this article provides experimental evidences for the role of clumping factor in the pathogenesis of infective endocarditis.

36.•• Que YA, Haefliger JA, Piroth L, *et al.*: **Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in Staphylococcus aureus experimental endocarditis.** *J Exp Med* 2005, **201:**1627–1635.

Using a gain of function approach in *L. lactis*, this article provides experimental evidences for the cooperative role of fibrinogen and fibronectin binding in the pathogenesis of infective endocarditis.

37. Vernachio J, Bayer AS, Le T, *et al.*: **Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in an experimental model of infective endocarditis.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47:**3400–3406.
38. Hienz SA, Schennings T, Heimdahl A, Flock JI: **Collagen binding of Staphylococcus aureus is a virulence factor in experimental endocarditis.** *J Infect Dis* 1996, **174:**83–88.
39. Weidenmaier C, Peschel A, Xiong YQ, *et al.*: **Lack of wall teichoic acids in Staphylococcus aureus leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis.** *J Infect Dis* 2005, **191:**1771–1777.
40.•• Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, *et al.*: **Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus are involved in adherence to human airway epithelium.** *Infect Immun* 2002, **70:**620–630.

This article documents the adherence of *S. aureus* to human airway epithelial cells (HAEC) via the FnBPs. This reveals that *S. aureus* adhere mainly to undifferentiated HAEC and poorly to differentiated HAEC.

41. Leemans JC, Heikens M, van Kessel KP, *et al.*: **Lipoteichoic acid and peptidoglycan from Staphylococcus aureus synergistically induce neutrophil influx into the lungs of mice.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2003, **10:**950–953.
42. Heyer G, Saba S, Adamo R, *et al.*: **Staphylococcus aureus agr and sarA functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung.** *Infect Immun* 2002, **70:**127–133.
43. McElroy MC, Harty HR, Hosford GE, *et al.*: **Alpha-toxin damages the air-blood barrier of the lung in a rat model of Staphylococcus aureus-induced pneumonia.** *Infect Immun* 1999, **67:**5541–5544.
44.•• Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, *et al.*: **Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients.** *Lancet* 2002, **359:**753–759.

This article documents the clinical and biologic characteristics of 16 cases of pneumonia due to *S. aureus* carrying PVL and compares them with 36 cases of PVL-negative *S. aureus* pneumonia.

45. Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, *et al.*: **Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the Panton-Valentine leukocidin genes.** *Clin Infect Dis* 2005, **40:**100–107.
46.•• de Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, *et al.*: **Staphylococcus aureus isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin.** *J Infect Dis* 2004, **190:**1506–15.

This documents the increased affinity for damaged airway epithelium and especially for exposed basement membrane of PVL-positive *S. aureus*, possibly mediated via Cna.

47.•• Gauduchon V, Cozon G, Vandenesch F, *et al.*: **Neutralization of Staphylococcus aureus Panton Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro.** *J Infect Dis* 2004, **189:**346–353.

This article indicates that commercial intravenous immunoglobulins contain antibody against PVL that neutralize the PVL-induced necrosis in vitro.

48.• Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, *et al.*: **Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9:**978–984.
This documents the emergence of CA-MRSA and describes the worldwide distribution of virulence and resistance determinants.
49. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H: **Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** *Lancet Infect Dis* 2002, **2:**180–189.
50. Chalumeau M, Bidet P, Lina G, *et al.*: **Transmission of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus to a physician during resuscitation of a child.** *Clin Infect Dis* 2005, **41:**e29–30.
51. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, *et al.*:**Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of Staphylococcus aureus.** *Infect Immun* 2002, **70:**4987–4996.
52. Kikuchi K: **Genetic basis of neonatal methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan.** *Pediatr Int* 2003, **45:**223–229.

III. 2. Deuxième article de revue

"Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant Staphylococcus aureus"

Anne Tristan, Tristan Ferry, Geraldine Durand, Olivier Dauwalder, Michele Bes, Gerard Lina, François Vandenesch, Jerome Etienne

Journal of Hospital Infection 2007, sous presse.

Journal of Hospital Infection (2007) •(S•) S38–S42

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

www.elsevierhealth.com/journals/jhin

Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Anne Tristan*, Tristan Ferry, Geraldine Durand, Olivier Dauwalder, Michele Bes, Gerard Lina, François Vandenesch, Jerome Etienne

INSERM E0230, Lyon; Université Lyon 1, Centre National de référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, Lyon, France

KEYWORDS
Staphylococcus aureus;
Virulence factors;
Superantigenic toxins;
Panton Valentine leukocidin;
Meticillin resistance

Summary *Staphylococcus aureus* produces many virulence factors, most of which act in a synergistic and coordinated fashion. Some appear to be specifically associated with certain severe infections and are produced by meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones distributed worldwide. Superantigenic exotoxins appear to be major virulence factors in hospital MRSA clones (HA-MRSA), and staphylococcal enterotoxin A (SEA) may be involved in the physiopathology of septic shock. Panton Valentine Leucocidin (PVL) has emerged as a major virulence factor in community-acquired *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) infections. In particular, the leukotoxic action of PVL is responsible for the high mortality rate associated with necrotizing pneumonia. CA-MRSA can also harbour the toxic shock toxin 1 (TSST-1) and rarely the exfoliative toxin.
© 2007 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Two categories of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are now recognized: hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) – the leading cause of HA-infections worldwide, particularly in intensive care units – and community-acquired MRSA (CA-MRSA). Molecular epidemiological studies show that a few pandemic clones are responsible for most MRSA infections worldwide [1]. Successful MRSA clones may have acquired virulence factors in order to compensate for the loss of fitness associated with antibiotic resistance [2]. Superantigenic toxins are especially detected in hospital-acquired MRSA clones [3], whereas the Panton Valentine leukocidin genes are mostly associated with CA-MRSA [4].

In this review, we examine current data on *Staphylococcus aureus* virulence factors associated with HA- and CA-MRSA and their clinical implications.

HA-MRSA clones and virulence determinants

Population genetics studies based on multilocus sequence typing (MLST) have shown that major MRSA clones have emerged from five clonal complexes (CCs): CC5, CC8, CC22, CC30 and

* Corresponding author. A. Tristan. Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France.
Tel.: +33 04 78 77 86 57; fax: +33 04 78 77 86 58.
E-mail: anne.tristan@chu-lyon.fr (A. Tristan).

Table 1
Genetic characteristics of pandemic MRSA clones and other MRSA clones newly described

Clone	Origin	CC	ST	*agr* type	Virulence determinants			
					sea	*egc*	*tst*	*luk*S/*luk*F-pv
Pediatric clone	H	5	5	2	−	+	−	−
New-York/Japan clone	H	5	5	2	−	+	+	−
German clone	H	5	228	2	−	+	−	−
TSST-1-MRSA	H/C	5	5	2	−	+	+	−
European minor clone	C	5	5	2	−	+	−	+
Archaic clone	H	8	250	1	−	−	−	−
New-York clone V	H	8	8	1	+	−	−	−
Hungarian clone	H	8	239	1	+	−	−	−
Brazilian clone	H	8	239	1	−	−	−	−
Iberian clone	H	8	250	1	+	−	−	−
Lyon clone	H	8	8	1	+	−	−	−
USA 300	C	8	8	1	−	−	−	+
EMRSA-15	H	22	22	1	−	+	−	−
European minor clone	C	22	22	1	−	+	−	+
EMRSA-16	H	30	36	3	+	+	+	−
Oceania clone	C	30	30	3	−	+	+/−	+
Berlin clone	H	45	45	1	−	+	−	−
European clone	C	singleton	80	3	−	−	−	+

ST, sequence type; *sea*, staphylococcal enterotoxin A; *egc*, enterotoxin gene cluster; *tst*, toxin shock syndrome toxin 1 gene; *luk*S/*luk*F-pv, Panton Valentine leukocidin encoding genes; CC, clonal complexes (CCs were assigned according to the MLST database at http://www.mlst.net); *agr*, accessory gene regulator; H, hospital origin; C, community origin.

CC45 [5]. Within each CC, prevalent clones (such as Archaic, Iberian, German and Lyon clone) have been genetically characterized by sequence type (ST), *spa* type, and SCC*mec* cassette [1].

All representatives of MRSA clones belonging to CC5 (German clone, New-York/Japan clone and Pediatric clone), to CC22 (EMRSA-15), and to CC45 (Berlin clone) shared the enterotoxin gene cluster locus (*egc*) encoding five superantigenic enterotoxin genes (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) and occasionally the *tst* gene, encoding the toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). The representative strain of the EMRSA-16 clone, which represents CC30, shared both the *sea* gene, encoding the staphylococcal enterotoxin A (SEA) and the *egc* locus. MRSA belonging to CC8 (Archaic clone, New-York clone V, Hungarian clone, Brazilian clone, Iberian clone, Lyon clone) mainly harbored the *sea* gene (except Archaic clone and Brazilian clone). The Brazilian clone was the only clone that lacked all the tested superantigenic toxin genes (Table 1).

Ferry *et al.* [3] have shown that the presence of *sea* gene is associated with septic shock in patients with *S. aureus* bloodstream infection. These data have led to the hypothesis that proinflammatory responses triggered by superantigenic toxins such as SEA may co-exist during *S. aureus* bloodstream infection, leading to "mixed shock" [3]. Dauwalder *et al.* [6] have shown that the severity of *S. aureus* sepsis is positively associated with SEA and negatively associated with *egc* locus. They postulated that the variable, clinical severity of *S. aureus* sepsis might be a result of differences in the inflammatory properties of staphylococcal superantigens. They demonstrated that SEA products more important proinflammatory effect than SEG.

In conclusion, with the exception of the Brazilian clone, all pandemic HA-MRSA clones contain at least one gene encoding a superantigenic toxin. Superantigenic toxins could partly account for the virulence of hospital-acquired MRSA infections.

CA-MRSA clones and virulence determinants

Panton Valentine leukocidin positive MRSA

Community-acquired meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clones contain the Panton Valentine leukocidin (PVL) genes and harbour a type IV staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) element, but some isolates with the SCC*mec* V element have been reported [7]. Infections

occur mainly in previously healthy young patients [8] and are predominantly represented by skin and soft-tissue infection, but deep-seated infections such as necrotizing pneumonia or disseminated invasive osteomyelitis are described [9]. CA-MRSA clones spread during outbreaks of skin abscesses, that have been observed in various geographic regions and community settings [4,10]. Direct airway transmission can also occur [11].

The PVL positive MRSA belong to different clones that have spread throughout the world [10]. In a study published in 2003 [10], the number of described clones and their geographical distribution were limited. Schematically, ST80 was detected in Europe, ST8 and ST1 in the USA and ST30 in Oceania. We observe today what appears to be the result of intercontinental exchanges of the various clones: (i) from the USA towards Europe with ST8 clone (USA 300); (ii) from the USA towards Europe and Asia with ST1 clone (USA 400); (iii) from the USA towards Asia with ST59 clone (USA 1000); (iv) from Europe towards Asia with ST80 clone [12]; (v) from Oceania towards Europe with ST30 clone. Countries with numerous international exchanges were those for which we detected higher clone diversity (e.g. Singapore).

Some new clones have been detected only since 2003. ST22, recently described, has been found in Europe only. Moreover, a new clone ST766, that belongs to the same clonal group CC22 as ST22 was found in Singapore [12]. Clone ST377 (with a type V SCC*mec*) was described, at the same time, in Europe and in Australia [7]. Conversely, clone ST5 has been detected in Europe only. Clone ST93, described in Australia before 2003, has not been detected in other countries. Currently PVL positive MRSAs are progressively becoming responsible for hospital-acquired infections in countries where the prevalence of CA-MRSA is high, such as in the USA. Kourbatova *et al.* [13] reported nine prosthetic joint infections that occurred over a 13-month period, at the Grady Memorial Hospital of Atlanta: five (56%) were associated with PVL-positive CA-MRSA, three with PVL-negative MSSA and no bacteria were cultured in the last infection.

Panton Valentine leukocidin (PVL), together with γ-haemolysin and other leukocidins, belongs to the family of "bicomponent synergohymenotropic toxins" [14,15]. These leukocidins form a family of two-component pore-forming toxins that act in synergy to lyse host cell membranes [4,16]. The two active proteins are designated S and F. PVL is encoded by two contiguous and cotranscribed genes, *lukF-PV* and *lukS-PV*, that are borne by several different phages [4,16]. PVL is active on human polymorphonuclear neutrophils (PMN), monocytes and macrophages [4,16]. It induces calcium channels to open, leading to calcium influx and massive release of inflammatory mediators such as leukotriene B4, IL-8 and histamine [4,16]. PVL induces severe inflammatory lesions when injected intradermally to rabbits, with capillary dilation, chemotaxis, PMN infiltration, PMN karyorrhexis, and skin necrosis. The degree of necrosis depends on the dose of PVL. None of these effects occur in rabbits immunized against LukS-PV and LukF-PV [17]. Community-onset necrotizing pneumonia due to *S. aureus* carrying PVL is a worrying emerging infection with a frequently fatal outcome [18]. Given the capacity of PVL to cause cell damage in vitro, PVL may play a major role in the inflammation and necrosis of the respiratory epithelium and parenchyma. PVL is also the most likely cause of peripheral leucopenia in this setting.

Exfoliative toxins positive MRSA

The study of Yamaguchi *et al.* [19] in 2002 raises the question of whether new exfoliative toxin A (with the *eta* gene) and exfoliative toxin B (with the *etb* gene) positive MRSA groups are emerging worldwide. In 2003, Liassine *et al.* [20] reported CA-MRSA harbouring exfoliative toxins genes in Switzerland. The Japanese exfoliative toxin-producing CA-MRSA strains were all associated with bullous impetigo, whereas the strains from Switzerland were isolated from patients with impetigo. Three exfoliative toxins (ETA, B and D) cause exfoliation of the epidermis without necrolysis or inflammatory response of the skin. These exfoliative toxins act as epidermolytic proteases that specifically cleave desmoglein 1, a desmosomal protein connecting epidermal cells predominant in granular layer of epidermis [21].

TSST-1 positive HA- and CA-MRSA clones

Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) is a superantigenic toxin secreted by some *S. aureus* isolates. TSST-1, encoded by the *tst* gene, is a major virulence factor in toxic shock syndrome, staphylococcal scarlet fever, and neonatal toxic shock-like exanthematous diseases described in Japan and France [22–24]. *tst*-positive MRSA strains appear to be highly virulent and to cause a variety of illness, ranging from toxic shock syndrome to various suppurative infections.

MRSA clones harboring *tst* gene have been detected in France and in Switzerland since 2002. The *tst*-positive MRSA belonged to two clones: a major clone with ST5 and *agr*2 and a minor clone with ST30 and *agr*3. MRSA clones

were associated with both hospital-acquired and nosocomial-acquired infections [25]. The MRSA clones were mainly isolated from children (overall median age, 3 years). They caused a variety of clinical syndromes, including toxic shock syndrome and suppurative infections. Both clones were found to harbor SCC*mec* IV cassette. The origin of these clones is unclear. The *tst*-positive *agr*2 MRSA clone has the same ST as two pandemic nosocomial clones (Pediatric clone and New-York/Japan clone).

TSST-1 is also produced by an MRSA clone that predominates in Japan and is now spreading through Europe. This clone is responsible for outbreaks of nosocomial toxic shock syndrome and for an emergent toxin-related disease called neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease (or NTED) [26]. This clone has also been detected in France and may be associated with bloodstream infections [3]. As for *sea*-positive *S. aureus* bloodstream infections, this *tst*-positive clone may lead to a "mixed shock".

References

1. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis 2002;**2**:180–189.
2. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, *et al*. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 2002;**359**:1819–1827.
3. Ferry T, Thomas D, Genestier AL, *et al*. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. Clin Infect Dis 2005;**41**:771–777.
4. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, *et al*. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999;**29**:1128–1132.
5. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003;**47**:3926–3934.
6. Dauwalder O, Thomas D, Ferry T, *et al*. Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. J Leukoc Biol 2006.
7. Garnier F, Tristan A, Francois B, *et al*. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. Emerg Infect Dis 2006;**12**:498–500.
8. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, *et al*. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. J Am Med Assoc 2003;**290**:2976–2984.
9. Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO, Jr., Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. Pediatrics 2006;**117**:433–440.
10. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, *et al*. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 2003;**9**:978–984.
11. Chalumeau M, Bidet P, Lina G, *et al*. Transmission of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* to a physician during resuscitation of a child. Clin Infect Dis 2005;**41**:e29–30.
12. Hsu LY, Tristan A, Koh TH, *et al*. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Singapore. Emerg Infect Dis 2005;**11**:341–342.
13. Kourbatova EV, Halvosa JS, King MD, Ray SM, White N, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as a cause of health care-associated infections among patients with prosthetic joint infections. Am J Infect Control 2005;**33**:385–391.
14. Cheung AL, Projan SJ, Gresham H. The Genomic Aspect of Virulence, Sepsis, and Resistance to Killing Mechanisms in *Staphylococcus aureus*. Curr Infect Dis Rep 2002;**4**:400–410.
15. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000;**13**:16–34.
16. Finck-Barbancon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA. Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. Biochim Biophys Acta 1993;**1182**:275–282.
17. Cribier B, Prevost G, Couppie P, Finck-Barbancon V, Grosshans E, Piemont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. Dermatology 1992;**185**:175–180.
18. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, *et al*. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet 2002;**359**:753–759.
19. Yamaguchi T, Yokota Y, Terajima J, *et al*. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. J Infect Dis 2002;**185**:1511–1516.
20. Liassine N, Auckenthaler R, Descombes MC, Bes M, Vandenesch F and Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes. J Clin Microbiol 2004;**42**:825–828.
21. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. Clin Microbiol Rev 1999;**12**:224–242.
22. Kikuchi K, Takahashi N, Piao C, Totsuka K, Nishida H, Uchiyama T. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease in neonatal and perinatal wards. J Clin Microbiol 2003;**41**:3001–3006.
23. Floret D. [Clinical aspects of streptococcal and staphylococcal toxinic diseases]. Arch Pediatr 2001;**8**(Suppl 4):762s–768s.
24. van der Mee-Marquet N, Lina G, Quentin R, *et al*. Staphylococcal exanthematous disease in a newborn due to a virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

strain containing the TSST-1 gene in Europe: an alert for neonatologists. J Clin Microbiol 2003;**41**:4883–4884.
25. Durand G, Bes M, Meugnier H, *et al*. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J Clin Microbiol 2006;**44**:847–853.
26. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, *et al*. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 2002;**70**:4987–4996.

IV. Travail personnel

IV. 1. Introduction

Nous avons pu, dans la partie bibliographique, lister les différents facteurs de virulence de *S. aureus* et parmis les 21 exotoxines superantigéniques décrites à ce jour, toutes ne semblent pas avoir la même capacité à être associée à une pathologie donnée, et toutes ne semblent pas avoir les même propriétés inflammatoires. De plus, la capacité des clones SARM hospitaliers pandémiques à produire une exotoxine superantigénique est inconnue, alors que ces clones peuvent acquérir facilement certains des éléments génétiques mobiles comportant les gènes codant ces toxines.

Au cours du travail personnel de cette thèse, nous allons nous focaliser sur les exotoxines superantigéniques et leur rôle dans le choc toxique et septique à *S. aureus*. Dans un premier temps, nous allons analyser l'épidémiologie des gènes codant les exotoxines superantigéniques au sein d'isolat de *S. aureus* responsables de CTS pour essayer de faire un lien entre la gravité de l'infection (notamment au cours du CTS non-menstruel) et la présence d'un gène codant une exotoxine superantigénique. De même, nous allons analyser l'épidémiologie des gènes codant les exotoxines superantigéniques au sein d'isolat de *S. aureus* responsable de bactériémie pour essayer de faire un lien entre la gravité de l'infection (survenue d'un choc septique) et la présence d'un gène codant une exotoxine superantigénique. Ensuite, nous comparerons les propriétés inflammatoires *in vitro* des exotoxines superantigéniques d'intérêt, afin de voir s'il existe des différences pouvant expliquer les résultats obtenus. Dans une deuxième partie, nous nous focaliserons le clone SARM hospitalier prédominant en France. Les caractéristiques génétiques de ce

clone seront comparées aux grands clones SARM hospitaliers pandémiques dans le monde et le profil des gènes codant les exotoxines superantigéniques du clone SARM Français, mais aussi des principaux clones SARM pandémiques, seront analysés. Ensuite, la virulence du clone SARM pandémique en France sera étudiée *in vitro* et *in vivo* dans un modèle animal de bactériémie afin de déterminer si les exotoxines superantigéniques potentiellement produites par les SARM pourraient être associés à la mortalité. Dans une dernière partie, nous essayerons de mettre en évidence chez des patients présentant un CTS ou un choc septique à SASM, ou au clone SARM pandémique en France, une production d'exotoxine superantigénique *in vivo*.

IV. 2. Première partie : Epidémiologie des gènes codant les exotoxines superantigéniques au cours du choc toxique et septique à *S. aureus*, lien potentiel avec la gravité clinique et étude des propriétés inflammatoires des exotoxines superantigéniques d'intérêt

IV. 2. 1. Première publication :

"One in five mortality in non menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases"

Elodie Descloux, Thomas Perpoint, Tristan Ferry, Gerard Lina, Michèle Bes, François Vandenesch, Ismaël Mohammedi, Jerome Etienne

Article soumis le 27 février 2007, accepté le 10 juillet 2007, sous presse.

European Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology

Cet article rapporte les données cliniques et microbiologiques de CTS déclarés au CNR des staphylocoques sur une période de 26 mois. Le but était de comparer les CTS menstruels aux non-menstruels et d'analyser les facteurs de risque de mortalité, notamment au cours des CTS non-menstruels.

Parmi les patients déclarés, 55 présentaient un CTS probable ou confirmé, 21 étaient des CTS menstruels et 34 des CTS non-menstruels. Les patients ayant un CTS non-menstruels étaient significativement plus agés, avaient plus de comorbidités, et avaient plus souvent des hémocultures positives à *S. aureus* (50% versus aucune des patientes ayant un CTS menstruel). Les patientes présentant un CTS non-menstruel (donc lié uniquement à TSST-1) avaient plus souvent des symptômes digestifs et plus souvent une hyperhémie muqueuse. A l'inverse, les patients ayant un CTS non-menstruel avaient plus souvent des symptômes neurologiques. Ceci pourrait être lié à des propriétés distinctes entre exotoxines superantigéniques, propres à TSST-1 ou à certaines entérotoxines. La mortalité était plus élevée dans le groupe CTS non-menstruel (22% versus aucun décès chez les patientes ayant un CTS menstruel). La conjonction d'une production systémique d'exotoxine superantigénique et d'une bactériémie pourrait promouvoir une plus grande réaction pro-inflammatoire et expliquer ainsi en partie, la plus grande sévérité des CTS non-mentruels avec hémocultures positives. Parmi les patients ayant un CTS non-mentruel, en comparant les survivants avec les non survivants, aucune différence n'a pu être mise en évidence, notamment aucun lien entre la présence d'un gène codant une exotoxine superantigénique et la mortalité n'a été retrouvé.

Ainsi, le CTS non-menstruel est une pathologie plus grave que le CTS menstruel. Ceci pourrait s'expliquer par la population touchée (qui a plus de comorbidité) et par la plus grande survenue de bactériémie associée.

One in five mortality in non menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases

E. Descloux · T. Perpoint · T. Ferry · G. Lina · M. Bes · F. Vandenesch · I. Mohammedi · J. Etienne

E. Descloux · T. Ferry · G. Lina (✉)· M. Bes · F. Vandenesch · J. Etienne,

INSERM, U851, Lyon F-69008 France; Université Lyon 1, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, 7 rue Guillaume Paradin 69372 Lyon cedex 08, France.

Phone: +33 472 11 07 75

Fax:+33 478 11 07 64

E-Mail: gerard.lina@chu-lyon.fr

T. Perpoint · T. Ferry

Service de Maladies infectieuses et tropicales, hôpital de la Croix Rousse, 103 Grande Rue de la Croix-Rousse 69317 Lyon cedex 04, France

I. Mohammedi

Service de Réanimation médicale, pavillon N, hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval 69437 Lyon cedex 03, France

Abstract

Background *Staphylococcus aureus* superantigenic toxins are responsible for menstrual and non menstrual toxic shock syndrome (TSS).

Methods We compared the clinical and biological characteristics of 21 cases of menstrual TSS (MTSS) with 34 cases of non menstrual TSS (NMTSS) diagnosed in France from December 2003 to June 2006. All 55 *S. aureus* isolates had been spontaneously referred to the French National Staphylococcal Reference Center, where they were screened for superantigenic toxin gene sequences.

Results Most of the patients had previously been in good health. The most striking differences between MTSS and NMTSS were the higher frequency in NMTSS of neurological disorders (p=0.028), of *S. aureus* isolation by blood culture (50% versus 0% in MTSS), and the higher mortality rate in NMTSS (22% versus 0% in MTSS). No clinical or bacteriological factors predictive of vital outcome were identified. The *tst* and *sea* genes were less frequent in isolates causing NMTSS than in those causing MTSS (p<0.001 and 0.051, respectively).

Conclusions Higher mortality was observed in NMTSS than in MTSS, suggesting that NMTSS requires more aggressive therapy, comprising systematic rapid wound debridement, antistaphylococcal agents including an antitoxin antibiotics, and intravenous immunoglobulin.

Introduction

Staphylococcus aureus causes a variety of infectious diseases, ranging from superficial skin infections to severe, toxin-mediated systemic infections [1, 2]. Toxic shock syndrome (TSS) has been linked to toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), and also to staphylococcal enterotoxins (SE) such as SEB, SEC and, to a lesser extent, SEA and SED [3, 4]. All these staphylococcal toxins act as superantigens, leading to massive release of proinflammatory cytokines, that are thought to be responsible for the clinical manifestations of TSS [3, 5, 6].

TSS is characterized by sudden onset of fever, cutaneous signs (rash followed by desquamation), hypotension and multisystem involvement [6, 7]. It is fatal in less than 5% of cases [8]. Most reported cases correspond to menstrual TSS (MTSS) and involve young, healthy menstruating women especially those using tampons [9]. TSS can also occur without relation to menstruation, like initially described in children with *S. aureus* mucosal colonization or focal infection [10]. Unlike patients with MTSS, patients with non menstrual TSS (NMTSS) form a heterogeneous group with a wide age range, various comorbidities, and different sites and types of *S. aureus* infection [11]. While the incidence of MTSS fell after changes were made to tampon absorbency and chemical composition, the frequency of NMTSS seems to remain stable since 1985 [4, 12].

Each year the French National Staphylococcal Reference Center collects about 40 *S. aureus* strains recovered from patients with suspected TSS throughout France. The objective of this study was to compare the bio-clinical characteristics and outcome of MTSS and NMTSS.

Materials and methods

Collected data

We prospectively collected cases of suspected staphylococcal TSS diagnosed in France between December 2003 and June 2006. All the corresponding *S. aureus* isolates were spontaneously referred by hospital or private laboratories to the French National Staphylococcal Reference Center for toxin detection. Information was collected on a standard form completed by the referring clinician or biologist, together with the medical files and telephone contact with the referring clinicians.

TSS was defined according to CDC diagnostic criteria (http://www.cdc.gov/epo/dphsi/casedef/toxicsscurrent.htm). Both confirmed and probable cases of TSS were included. A case of TSS was considered menstrual if symptoms onset occurred within three days of the beginning or end of menses; all other cases were considered non menstrual [8].

The following data were recorded in each case: age, sex, comorbidity, clinical manifestations included in the CDC case definition of TSS, the depth and location of the primary focal infection, tampon use in MTSS, community or nosocomial origin, and postoperative occurrence. Biological data included the results of blood culture and the methicillin sensitivity and toxin gene profile of isolates. Information on treatment and outcome was also collected.

Microbiological studies

All *S. aureus* isolates were tested for toxin production at the French National Staphylococcal Reference Center. Gene sequences encoding superantigenic toxins (TSST-1, SEA, SEB, SEC, SED, SEH, SEK, SEL, SEM and SEO) were detected by

using polymerase chain reaction (PCR)-based methods [13]. The *mec*A gene coding for methicillin resistance was also detected by PCR [14].

Statistical analysis

All data were analyzed with SPSS software version 12.0 (SPSS Inc, Chicago). Descriptive statistics were reported as means, standard deviation (SD) and medians for quantitative variables, and as frequencies and percentages for qualitative variables. We first compared MTSS and NMTSS cases, and then survivors and non survivors of NMTSS. The log rank test was used to compare the age distributions of the patients between the two groups. Fisher's exact test was used to compare all other variables. *P* values below 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Among 100 patients with suspected staphylococcal TSS diagnosed in France from December 2003 to June 2006, 55 patients met the CDC case definition for confirmed (20 cases) or probable TSS (35 cases). The cases originated throughout France, and there was no seasonal or epidemic pattern (mean, 1.77 ± 1.36 cases per month; median, 1 case per month; range, 0 to 5 cases per month). There were 21 cases of MTSS (38%) and 34 cases of NMTSS (62%).

The demographic, clinical and biological characteristics and outcome of these 55 patients are summarized in Table 1. None of the patients with MTSS and only 29% of the patients with NMTSS had comorbidities, confirming that TSS mainly occurs in otherwise healthy subjects. Tampon use was reported in 19/21 cases of MTSS (90%). Female patients predominated in the NMTSS group (62%). Patients with NMTSS were older than patients with MTSS (log rank, p=0.008) and were significantly more likely to have comorbidities (p=0.039). Information on desquamation was often unavailable because of death or early discharge. Patients with MTSS were more likely than patients with NMTSS to have digestive symptoms and mucosal hyperemia (p=0.009 and 0.024, respectively). Neurological disorders were more frequent in patients with NMTSS (p=0.028). Eight of the 34 cases of NMTSS (24%) occurred in hospital. NMTSS was postoperative in 7/34 cases (21%), occurring after slipped-disc surgery (3 cases), inguinal hernia surgery, hip replacement, heart surgery and breast cancer excision (one case each). Blood culture yielded *S. aureus* in 17 cases of NMTSS (50%) and in no cases of MTSS (p<0.001). Methicillin resistance was only detected among NMTSS isolates (12%, four community-acquired cases). Genes encoding staphylococcal superantigens were screened for in all 55 *S. aureus* isolates. The *tst* gene (encoding TSST-1) was

detected in 20/21 MTSS isolates (95%) and in 16/34 NMTSS isolates (47%) (p<0.001). The *sea* gene was also more frequent in MTSS isolates (p=0.051). Both genes (*tst* and *sea*) were detected in 15/21 MTSS isolates (71%) and in 10/34 NMTSS isolates (30%). The *egc* locus, harboring the *sem* and *seo* genes, was more frequent in MTSS isolates than in NMTSS isolates (p=0.029). Genes encoding others staphylococcal enterotoxins (e.g. *seb*, *sec* or *sed*) were more frequent in NMTSS than in MTSS, but the difference was not statistically different. No superantigenic toxin genes were detected in one isolate (from a patient with probable TSS). No significant correlation was detected between toxin gene profile versus neurological symptoms or positive blood culture (Table 2).

Most of the primary focal *S. aureus* infections in NMTSS patients were trivial. For instance, a 26-year-old man developed signs of TSS 36 hours after inguinal hernia surgery; the surgical scar showed no signs of inflammation or infection, but a slight serous exudate that yielded *S. aureus* in culture was found on reopening the wound 3 days after initial surgery. Four patients (12%) had *S. aureus* bacteremia of unknown origin, whereas the others had focal or various other infections. The focal infections were usually superficial and involved the skin or mucosa (22/34 cases, 65%), while the remainder were deep-seated [bones or joints, 3 cases (9%); lung or heart, 2 cases each (6%); gall bladder, 1 case (3%)].

Seven patients with NMTSS died (22%), rapidly after symptom onset (median, 3 days; range, 1-17 days, Table 3). Two of these cases were post-operative. Patients who died had been treated more aggressively than survivors (more frequent vasopressive therapy and mechanical ventilation) but none had received clindamycin, linezolid or intravenous immunoglobulin (IVIg). When comparing the group of non survivors with that of all survivors, neurological symptoms and positive

S. aureus blood culture were significantly more frequent in the non survivor group (data not shown). However, when limiting the comparison to the NMTSS group, no clinical or bacteriological factor predictive of fatal outcome was identified (data not shown). The only significant association was between the presence of the *sed* gene and death (p=0.041) (Table 2), but again this association was not more significant when restricting the comparison to the NMTSS group. Methicillin resistance was not associated with outcome (it was detected in one of the seven strains in the NMTSS non survivors and in three of the 25 isolates in the NMTSS survivors).

Discussion

S. aureus could be responsible for menstrual and non menstrual TSS. To compare their clinical and biological characteristics, we have collected during a 30-month period 21 cases of MTSS and 34 cases of NMTSS. Menstrual TSS continues to occur in France as elsewhere despite less frequent use of high-absorbency tampons and changes in tampon chemical composition [4], albeit infrequently. Menstrual cases, by definition, affect young women. It is noteworthy that female also predominated in the NMTSS group (62%) and NMTSS tended to affect young subjects (median, 33 years), but the patients' ages ranged from 0 to 84 years in this series.

In a review of 130 cases of NMTSS, Reingold et al. reported that TSS can result from innocuous or unapparent cutaneous *S. aureus* infections [15]. Likewise, Bartlett et al. described 13 cases of postoperative NMTSS, among which focal signs of surgical wound infection were minimal or absent in 11 cases [16]. It may be explained by the fact that most strains causing TSS produce very small quantities of most exoproteins but large amounts of toxins such as TSST-1 [17, 18]. *In vivo*, these strains can cause local infections that are remarkably apurulent but potentially fatal owing to their superantigen expression [11, 15, 16, 18, 19]. It is therefore crucial for all physicians to be aware of the possibility of occult focal infections in patients with symptoms of TSS, particularly in the postoperative period.

Different characteristics between MTSS and NMTSS were observed. In NMTSS, blood culture was frequently positive with *S. aureus* (50%) but not in MTSS (0% in MTSS). Additionally, neurological disorders were significantly more frequent in NMTSS than in MTSS, as previously reported by Kain et al. [11]. We recently showed that TSST-1 can affect the brain, by inducing both an intracerebral increase

in PGE2, and direct caspase-dependent neuronal death [20]. Higher frequency of neurological disorders in NMTSS might be explained by a higher pro-inflammatory response during NMTSS which combines sepsis and toxemia. It could be also due to difference of toxin involved in NMTSS and MTSS because we observed heterogeneous distribution of toxins between the two forms. The *tst* (encoding TSST-1) and *sea* genes were more frequent in MTSS isolates than in NMTSS isolates (95% versus 47% and 71% versus 41%, respectively) as also observed by Kain et al. [11]. We recently showed that inflammatory properties of staphylococcal superantigens differ from each other [21]. Non -TSST-1 and -SEA staphylococcal superantigens (e.g. SEB, SEC and SED) may be more neurotoxic.

The most striking difference between MTSS and NMTSS was the higher mortality rate associated with NMTSS (22%), whereas no deaths occurred among patients with MTSS. The overall case/fatality ratio in our study is higher than that reported elsewhere. We were not able to recognize any factor predictive for mortality in the NMTSS patient group when comparing toxin gene content, neurological involvement, *S. aureus* bacteremia and methicillin resistance. In our series, NMTSS and MTSS *S. aureus* isolates presented different patterns of toxin production. Despite *S. aureus* toxin gene profiles of fatal cases were all different, there was a significant association between the presence of the *sed* gene and death (p=0.041). However, comparing NMTSS survivors and NMTSS non survivors, this association was not significant. To our knowledge, the severity of SED-related infections has never been specifically studied. In 1982, Reingold et al. reported 12 deaths (9.2%) among 130 patients with NMTSS [15]. Between 1987 and 1996, the overall case/fatality ratio in the United States was 4.1% (3% for MTSS, and 5% for NMTSS) and was significantly higher in

NMTSS [8]. In 1993, Kain et al. also reported higher morbidity and mortality associated with NMTSS (12.5% mortality, versus 4.8% in MTSS) [8].

The passive method of TSS case recruitment used in this study may have influenced our findings. Indeed, given the lack of active surveillance in France, it is likely that only more severe cases of TSS of both NTSS and NMTSS were reported to the French National Staphylococcal Reference Center. Hence, the mortality rate may be higher than in the general population of patients with TSS. However, it does not explain the differences of fatality observed between the two groups. This is the first estimate of the mortality rate of TSS in Europe, as all other published data originate from the United States [8, 15] or Canada [11]. Alternatively, this high mortality rate of NMTSS could reflect increasing *S. aureus* virulence. *S. aureus* blood culture was positive in 50% of our NMTSS cases and in 0% of MTSS cases. Bacteremia could partially explain the severity of NMTSS as stated for neurological symptom, possibly thus combination of superantigenic toxins and *S. aureus* pyogenicity. Bacterial proliferation jointed with toxin release, might provoke a composite form of shock, borderline between septic shock and TSS and potentially more severe than TSS itself [22]. We found no predictors of vital outcome among patients with NMTSS, although treatment was more aggressive in fatal cases owing to the greater clinical severity. Antistaphylococcal agents (β-lactamase-resistant antibiotics) are recommended to eradicate the focus of toxin-producing staphylococci, to treat or prevent bacteremia, and to significantly reduce the recurrence rate [7, 23]. Moreover, as in NMTSS the toxins are released from a focal site of infection, surgical debridement may be warranted. Clindamycin and linezolid could be used to inhibit toxin production [24, 25], as it reduces TSST-1 synthesis by 90% [26]. Patients who develop TSS have little or no immunity to TSST-1 or enterotoxins. Experimental

studies have shown that antibodies which neutralize TSST-1 are clinically effective [27, 28]. IVIg contains neutralizing antibodies against staphylococcal virulence factors, including toxins such as TSST-1 [29, 30]. It is speculated that routine administration of antitoxinic antibiotics and IVIg to patients with TSS could improve their outcome as it is for streptococcal TSS [3, 31-33]. Surprisingly, it has been rarely prescribed in this series, and never to patients who died.

In conclusion, the most striking finding of this study is the high mortality rate of non menstrual TSS (22%) compared to menstrual TSS (0%). More aggressive treatment, including rapid wound debridement (whatever the degree of local inflammation); early administration of antistaphylococcal agents including an antitoxinic antibiotic such as clindamycin or linezolid; and IVIg administration could improve the vital prognosis of patients with non menstrual TSS.

Acknowlegment

We are grateful to all the clinicians and biologists who sent us clinical and biological information. We thank Christine Courtier, Christine Cardon, Céline Spinelli, Caroline Bouveyron, Martine Rougier, Annie Martra and Florence Couzon for their technical advices, and David Young for editorial guidance.

Financial support: none.

Potential conflicts of interest. All authors: no conflicts.

References

1. Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339:520-532
2. Stevens DL (1996) The toxic shock syndromes. Infect Dis Clin North Am 10:727-746
3. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol 55:77-104
4. Schlievert PM, Tripp TJ, Peterson ML (2004) Reemergence of staphylococcal toxic shock syndrome in Minneapolis-St. Paul, Minnesota, during the 2000-2003 surveillance period. J Clin Microbiol 42:2875-2876
5. Holtfreter S, Broker BM (2005) Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 53:13-27
6. Centers for Disease Control and Prevention (1980) Toxic-shock syndrome-United States. Morbid Mortal Weekly Rep 29:229-230
7. Chesney PJ, Bergdoll MS, Davis JP, Vergeront JM (1984) The disease spectrum, epidemiology, and etiology of toxic-shock syndrome. Annu Rev Microbiol 38:315-338
8. Hajjeh RA, Reingold A, Weil A, Shutt K, Schuchat A, Perkins BA (1999) Toxic shock syndrome in the United States: surveillance update, 1979 1996. Emerg Infect Dis 5:807-810
9. Shands KN, Schmid GP, Dan BB, Blum D, Guidotti RJ, Hargrett NT, Anderson RL, Hill DL, Broome CV, Band JD, Fraser DW (1980) Toxic-shock syndrome in menstruating women: association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and clinical features in 52 cases. N Engl J Med 303:1436-1442
10. Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T (1978) Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. Lancet 2:1116-1118

11. Kain KC, Schulzer M, Chow AW (1993) Clinical spectrum of nonmenstrual toxic shock syndrome (TSS): comparison with menstrual TSS by multivariate discriminant analyses. Clin Infect Dis 16:100-106

12. Broome CV (1989) Epidemiology of toxic shock syndrome in the United States: overview. Rev Infect Dis 11 Suppl 1:S14-21

13. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun 70:631-641

14. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 29:2240-2244

15. Reingold AL, Hargrett NT, Dan BB, Shands KN, Strickland BY, Broome CV (1982) Nonmenstrual toxic shock syndrome: a review of 130 cases. Ann Intern Med 96:871-874

16. Bartlett P, Reingold AL, Graham DR, Dan BB, Selinger DS, Tank GW, Wichterman KA (1982) Toxic shock syndrome associated with surgical wound infections. Jama 247:1448-1450

17. Schlievert PM, Osterholm MT, Kelly JA, Nishimura RD (1982) Toxin and enzyme characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from patients with and without toxic shock syndrome. Ann Intern Med 96:937-940

18. Vojtov N, Ross HF, Novick RP (2002) Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. Proc Natl Acad Sci U S A 99:10102-10107

19. Bresler MJ (1983) Toxic shock syndrome due to occult postoperative wound infection. West J Med 1983;139:710-713

20. Batisson M, Strazielle N, Hejmadi M, Thomas D, Ghersi-Egea JF, Etienne J, Vandenesch F, Lina G (2006) Toxic shock syndrome toxin-1 challenges the neuroprotective functions of the choroidal epithelium and induces neurotoxicity. J Infect Dis 194:341-349

21. Dauwalder O, Thomas D, Ferry T, Debard AL, Badiou C, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Monneret G (2006) Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. J Leukoc Biol 80:753-758

22. Sriskandan S, Cohen J (1999) Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. Infect Dis Clin North Am 13:397-412

23. Davis JP, Chesney PJ, Wand PJ, LaVenture M (1980) Toxic-shock syndrome: epidemiologic features, recurrence, risk factors, and prevention. N Engl J Med 303:1429-1435

24. Gemmell CG, Peterson PK, Schmeling D, Kim Y, Mathews J, Wannamaker L, Quie PG (1981) Potentiation of opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* following growth in the presence of clindamycin. J Clin Invest 67:1249-1256

25. Stevens DL, Maier KA, Mitten JE (1987) Effect of antibiotics on toxin production and viability of *Clostridium perfringens*. Antimicrob Agents Chemother 31:213-218

26. Parsonnet J, Modern PA, Giacobbe K (1994) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on production of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). In: 32nd Meeting of Infectious Disease Society of America. Abstract no. 29

27. Bonventre PF, Thompson MR, Adinolfi LE, Gillis ZA, Parsonnet J (1988) Neutralization of toxic shock syndrome toxin-1 by monoclonal antibodies in vitro and in vivo. Infect Immun 56:135-141

28. Melish ME, Frogner KS, Hirata SA, Murata MS (1987) Human gamma globulin therapy in experimental toxic shock syndrome (TSS). In: Program and Abstracts of the American Society of Microbiology. Abstract no. B194

29. Chesney PJ, Crass BA, Polyak MB, Wand PJ, Warner TF, Vergeront JM, Davis JP, Tofte RW, Chesney RW, Bergdoll MS (1982) Toxic shock syndrome: management and long-term sequelae. Ann Intern Med 96:847-851

30. Gauduchon V, Cozon G, Vandenesch F, Genestier AL, Eyssade N, Peyrol S, Etienne J, Lina G (2004) Neutralization of Staphylococcus aureus Panton Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro. J Infect Dis 189:346-53.

31. Kaul R, McGeer A, Norrby-Teglund A, Kotb M, Schwartz B, O'Rourke K, Talbot J, Low DE (1999) Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome--a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group. Clin Infect Dis 28:800-807

32. Darenberg J, Ihendyane N, Sjolin J, Aufwerber E, Haidl S, Follin P, Andersson J, Norrby-Teglund A (2003) Intravenous immunoglobulin G therapy in streptococcal toxic shock syndrome: a European randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Clin Infect Dis 37:333-340

33. Hong-Geller E, Gupta G (2003) Therapeutic approaches to superantigen-based diseases: a review. J Mol Recognit 16:91-101

Table 1 Demographic, clinical and biological characteristics and vital outcome of 55 patients with TSS

	Menstrual TSS, n=21 (%)	Non menstrual TSS, n=34 (%)	*p* [a]
Age in years mean+/-SD	20.7 +/- 8.7	32.4 +/- 24.9	
median	19	33	
range	10-47	0-84 [b]	0.008
Sex ratio F/M	21/0	21/13	
Comorbidity	1/20 (5)	10/34 (29)	0.039
CDC diagnostic criteria			
confirmed cases	8/21 (38)	12/34 (35)	NS
probable cases	13/21 (62)	22/34 (65)	NS
1. fever	21/21 (100)	33/34 (97)	NS
2. rash	21/21 (100)	32/33 (97)	NS
3. desquamation	10/13 (77)	14/20 (70)	NS
4. hypotension	19/21 (90)	33/34 (97)	NS
5. ≥3/7 organ involvement	21/21 (100)	32/33 (97)	NS
digestive	21/21 (100)	25/34 (74)	0.009
muscular	15/21 (71)	19/34 (56)	NS
mucosal	16/21 (76)	14/33 (42)	0.024
renal	17/21 (81)	23/33 (70)	NS
hepatic	8/21 (38)	21/33 (64)	NS
hematologic	11/21 (52)	25/33 (76)	NS
neurologic	6/21 (29)	20/33 (61)	0.028
Methicillin-resistant *S. aureus*	0/21 (0)	4/34 (12)	NS
S. aureus positive blood culture	0/21 (0)	17/34 (50)	<0.001
S. aureus toxin gene profile			
tst	20/21 (95) [c]	16/34 (47)	<0.001
sea	15/21 (71) [d]	14/34 (41)	0.051
seb	0/21 (0)	2/34 (6)	NS
sec	1/21 (5)	9/34 (26)	NS

sed	1/21 (5)	6/34 (18)	NS
seh	2/21 (10)	3/34 (9)	NS
sek	0/21 (0)	3/34 (9)	NS
sel	1/21 (5)	9/34 (26)	NS
sem	19/21 (90)	21/34 (62)	0.029
seo	19/21 (90)	21/34 (62)	0.029
Mortality	0/21 (0)	7/32 (22)	0.034

[a] *p* values are for MTSS vs NMTSS (Fisher's exact or log rank tests)

[b] one patient developed TSS on his first day of life, after maternofoetal transmission

[c] in one *tst*-negative probable case of MTSS associated with thigh cellulitis, *sec*, *sel*, *sem* and *seo* were detected

[d] all these *sea*-positive strains were *tst*-positive

Table 2. Correlation between staphylococcal toxin genes versus neurological manifestations, bacteremia and mortality in 55 patients with TSS

	Staphylococcal toxin genes detected									*p*
	tst	*sea*	*seb*	*sec*	*sed*	*seh*	*sek*	*sel*	*sem*, *seo*	
All TSS cases n=55	36	29	2	10	7	5	3	10	40	NS
Neurological involvement n=26	15	14	1	6	2	4	3	6	18	NS
S. aureus bacteremia n=17	6	5	2	5	5	2	2	5	10	NS
Death n=7	5	3	1	2	3 [a]	1	1	2	5	NS except for *sed*

[a] significant association with Fisher's exact test ($p<0.05$)

Table 3. Description of the seven fatal cases of NMTSS

Sex/age (in years)	Comorbidity	*S. aureus* infection before TSS	Hospital origin	*S. aureus* blood cultures	MRSA	*S. aureus* toxin gene	Day of death [a]
M/52	hypertension	pneumonia	No	positive	no	*sed*	D3
F/41	no	sciatica on NSAIDs 24 h before TSS onset	No	positive	no	*tst, sec,seh,sel, sem, seo*	D4
F/42	no	non-suppurative surgical wound	Yes slipped-disc surgery 3 days before TSS onset	negative	no	*tst, sea, sem, seo*	D2
F/9	immunosuppressive treatment for renal transplantation	Toe inflammation	No	negative	no	*tst, sem, seo*	D14
F/4	congenital cardiac malformation (IVC)	suppurative surgical wound and mediastinitis	Yes cardiac surgery (IVC) 7 days before TSS onset	positive	no	*sea, sed*	D17
F/1,4	no	burns 3 days before TSS onset	no	negative	no	*tst, sea, sem, seo*	D0
M/59	No	shoulder arthritis on NSAIDs 3 days before TSS onset	no	positive	yes	*tst, sec, sed, sel, sem, seo*	D3

NSAIDs: non steroid antiinflammmatory drug, IVC: interventricular communication. [a] DO: onset of TSS symptom

IV. 2. 2. Deuxième publication :

"Comparative prevalence of superantigen genes in Staphylococcus aureus isolates causing sepsis with and without septic shock"

Tristan Ferry, Damien Thomas, Anne-Laure Genestier, Michèle Bes, Gerard Lina, François Vandenesch, Jerome Etienne

Clinical Infectious Diseases 2005;41:771-7.

Ce travail a obtenu le Prix Junior au cours du XXXIII^{ème} congrès de la Société de Réanimation de Langue Française, le 21 janvier 2005 à Paris.

Nous avons réalisé une étude cas-témoin en comparant la distribution des gènes codant les exotoxines superantigéniques chez les isolats de *S. aureus* responsables de bactériémie, avec ou sans choc septique, chez des patients hospitalisés à l'Hôpital Edouard Herriot en 2003, dont le but était d'identifier les exotoxines superantigéniques potentiellement impliquées dans le choc septique à *S. aureus*.

L'étude de la prévalence des gènes codant les exotoxines superantigéniques chez 80 patients a montré que la présence d'au moins un gène était élevée (86.2%). En incluant dans l'analyse des isolats issus du CNR et responsables d'infections suppuratives non bactériémiques ou de colonisation, la prévalence de *sea* augmentait significativement avec « la gravité de l'infection » (8%, colonisation ; 16,8%, infections suppuratives non bactériémiques ; 34 ,4%, bactériémie sans choc ; 47,4%, bactériémie avec choc ; p<0.001) alors que la prévalence de l'*egc* diminuait (respectivement 68%, 53,4% , 50,8% et 26,3% ; p=0.009).

Ainsi, SEA pourrait avoir un rôle spécifique dans la physiopathologie du choc septique à *S. aureus* en majorant la réponse pro-inflammatoire Th-1. A l'inverse, l'intégration de l'*egc* et/ou la production des exotoxines superantigéniques de l'*egc* (SEG, SEI, SE*l*M, SE*l*N et SE*l*O) à bas niveau pourrait limiter la capacité des souches *egc* positives à induire un état de choc, par exemple en induisant une réponse Th-2 qui pourrait s'opposer à la réponse Th-1 excessive observée au cours du choc septique. Une analyse *in vitro* des propriétés inflammatoires de SEA et des exotoxines superantigéniques de l'*egc* ainsi qu'une étude *in vivo* visant à démontrer qu'il existe une production de SEA au cours du choc septique, pourrait confirmer ces hypothèses. L'utilisation de nouvelles thérapeutiques inhibant l'action des exotoxines superantigéniques et notamment de SEA pourrait limiter la sévérité du choc septique à *S. aureus*.

Comparative Prevalence of Superantigen Genes in *Staphylococcus aureus* Isolates Causing Sepsis With and Without Septic Shock

Tristan Ferry, Damien Thomas, Anne-Laure Genestier, Michèle Bes, Gerard Lina, François Vandenesch, and Jerome Etienne

Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM, Lyon, France

Background. *Staphylococcus aureus* superantigens are associated with the pathogenesis of toxic shock syndrome, but their involvement in septic shock is unknown.

Methods. We compared the distribution of 11 superantigen genes in *S. aureus* blood culture isolates obtained from patients with sepsis who did and did not have septic shock (19 and 61 patients, respectively), as well as from patients with suppurative infections (101 patients) and patients with colonization (25 patients).

Results. The prevalence of the enterotoxin A gene *(sea)* increased significantly with the severity of infection ($P < .001$), whereas the prevalence of the enterotoxin gene cluster *(egc)* decreased significantly ($P = .009$).

Conclusion. Enterotoxin A (SEA) might play a key role in *sea*-positive *S. aureus* sepsis by triggering overexpression of inflammatory mediators associated with shock. Novel treatments targeting superantigens, especially the *sea* gene, might be beneficial in the treatment of *S. aureus* sepsis.

Staphylococcus aureus causes both suppurative and toxin-mediated diseases [1]. *S. aureus* infection can be lethal in the case of septic shock, which is associated with signs of infection, hypotension, acute organ dysfunction, and positive blood culture results [2]. Septic shock due to gram-positive or gram-negative bacteria is the most common cause of death in medical and surgical intensive care units in industrialized countries, with a mortality rate of 40%–60%. Genetic susceptibilities to both sepsis and death due to sepsis have been increasingly recognized [3]. *S. aureus* can also be associated with another type of shock, staphylococcal toxic shock syndrome (STSS). STSS has a relatively low mortality rate (<3%) [4, 5]. Like septic shock, it is associated with rapid onset of fever, hypotension, and organ failure, but it is also associated with a diffuse macular rash. STSS can also be associated with localized infections [4, 5]. Between 1979 and 2000, the incidence of septic shock increased by an average of 8.7% per year in the United States [6], whereas the incidence of STSS remained low. Between 1998 and 2001, only 40–50 cases of STSS were diagnosed per year in France (population, 60 million) [7].

S. aureus virulence determinants include adhesions and toxins [8]. Some *S. aureus* toxins, such as toxic shock syndrome toxin–1 (TSST-1) and enterotoxins, have superantigenic properties. Superantigens bypass normal antigen presentation and have strong T cell mitogenic activity by binding to a specific variable region of the T cell antigen receptor–β-chain [9]. This leads to a massive release of proinflammatory T-helper cell type 1 (Th1) cytokines, such as TNF–α, IL-6, and IFN-γ. This disproportionate proinflammatory activity is responsible for the physiopathology of STSS [4, 5]. Th1 cytokines are also involved in septic shock, but the systemic host's response is mainly macrophage dependent [10]. Systemic reactions to superantigens may also contribute to the severity of *S. aureus* sepsis [11]. Genes encoding superantigens are not only present in *S. aureus* strains associated with STSS, but also in ~70% of nasal carriage strains [12–14]. The specific prevalence and distribution of different *S. aureus* superantigens in blood culture isolates obtained from patients with septic shock is unknown.

Received 14 November 2004; accepted 10 May 2005; electronically published 4 August 2005.

Reprints or correspondence: Tristan Ferry, Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France (tristan.ferry@univ-lyon1.fr).

Clinical Infectious Diseases 2005; 41:771–7

© 2005 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

1058-4838/2005/4106-0001$15.00

We conducted a case-control study to determine the distribution of superantigen genes among *S. aureus* blood culture isolates obtained from patients with sepsis, with or without septic shock, compared with the distribution among isolates obtained from patients with nonbacteremic suppurative diseases and patients with colonization.

PATIENTS AND METHODS

Definition. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis, severe sepsis, and septic shock were defined according to the criteria of the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine Conference [15]. SIRS was defined by the presence of ⩾2 of the following manifestations: body temperature, >38°C or <36°C; heart rate, >90 beats per min; tachypnea (respiratory rate, >20 breaths per min; or hyperventilation, indicated by a $Paco_2$ level <32 mm Hg); and abnormal WBC count (i.e., >12,000 cells per mm^3, <4000 cells per mm^3, or >10% of immature neutrophils). Sepsis was defined by the presence of SIRS associated with infection, and severe sepsis was defined as sepsis associated with transient hypotension, organ dysfunction, or hypoperfusion. Septic shock was defined as sepsis-induced hypotension despite adequate fluid resuscitation, with hypoperfusion or organ dysfunction. STSS was defined as described elsewhere [4, 5]. Infections were considered to be hospital-acquired if they occurred 48 h after admission in a patient with no evidence of infection on admission. Community-acquired infections were considered to be health care–related if the patient had a recent history of hospitalization or another risk factor for infection by a methicillin-resistant strain of *S. aureus* (MRSA) of hospital origin [16]. All other infections were considered to have been community-acquired.

Selection of case patients and control patients. We enrolled adults with bacteremia diagnosed at Edouard Herriot Hospital (Lyon, France), a 1100-bed, inner-city university hospital offering medical and surgical acute care services. Patients were eligible if they had an episode of SIRS and ⩾1 *S. aureus*–positive blood culture result. Patients were not eligible if they also had hemorrhagic shock, initial cardiogenic shock, or ⩾1 blood culture yielding a species other than *S. aureus*. A case patient was defined as a patient with *S. aureus* sepsis with septic shock, and a control patient was defined as a patient with *S. aureus* sepsis without shock.

Data collection. All patients were recruited in 2003. Thirty-one patients were recruited from intensive care units, and 49 patients were recruited from other units. Data collection was performed after recruitment. To obtain an adequate ratio of 1 case patient to 3 or 4 control patients, we limited inclusion of patients from medical and surgical units to a period of 7 months.

Clinical data. The following clinical data were recorded on the day that a positive blood culture result was obtained: age, sex, comorbidity (hematologic disorders, current malignancy, diabetes mellitus, HIV infection, and cirrhosis), receipt of chronic steroid therapy (>1 month), receipt of other current immunosuppressive therapies, length of hospital stay, site of infection, central temperature, pulse, blood pressure, and respiratory rate.

Microbiological data. *S. aureus* was identified by standard microbiological methods, including Gram staining, use of the Phoenix Automated Microbiology System (BD Biosciences), and production of coagulase (bioMérieux), thermostable DNase, catalase, and clumping factor (Pastorex Staph-plus; Bio-Rad). Genomic DNA was extracted from staphylococci grown in brain-heart infusion broth and was used as a template for amplification with primers from Eurogentec (Seraing) in a TechGene thermal cycler (Edvodek). The quality of the DNA extracts and the absence of PCR inhibitors were confirmed by *gyrA* amplification. The accessory gene regulator *(agr)* allele group (1–4), 10 staphylococcal enterotoxin genes *(sea, seb, sec, sed, see, seh, sek, sel, sem*, and *seo)*, the *tst* gene (encoding TSST-1), and the *mecA* gene (encoding methicillin resistance) were detected by multiplex PCR, as has been described elsewhere [12, 17]. Because the *sed* and *sej* genes are located on the same mobile genetic element, *sed*-positive isolates were also considered to have been *sej* positive. Because *seg, sei, sem, sen,* and *seo* genes belong to the enterotoxin gene cluster *(egc)*, isolates that were positive for *sem* and *seo* genes were also considered to be positive for the *egc* gene. All PCR products were analyzed by electrophoresis through ethidium bromide–stained 1% agarose gel.

Comparative analyses. Data for patients with SIRS and *S. aureus* bacteremia were compared with data from the National Reference Center for Staphylococci (Lyon, France) concerning 126 *S. aureus* isolates collected from Lyon hospitals between January 2003 and February 2004: 101 isolates were obtained from patients with suppurative diseases (35 isolates were obtained from patients with collected abscess, 28 were obtained from patients with impetigo and cutaneous lesions with signs of impetiginization or infection, 12 were obtained from patients with bone or joint infection, 7 were obtained from patients with pneumonia, 7 were obtained from patients with finger pulp infection, 4 were obtained from patients with furuncles, and 8 were obtained from patients with other diseases, such as meningitis, inflammatory adenopathy, and mastoiditis); 25 isolates were obtained from patients with colonization. To minimize the overrepresentation of certain genes caused by clonal spread (e.g., an epidemic caused by a MRSA clone), only 1 toxin gene profile from each clinical environment was used for comparison with other environments.

Data analysis. Statistical analyses were performed with SPSS software (SPSS). Differences between groups were tested

Table 1. Demographic and clinical characteristics of 80 patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infection.

Characteristic	Case patients with septic shock (n = 19)	Control patients without septic shock (n = 61)	P
Age			NS
Mean years ± SD	66.6 ± 17.5	60.7 ± 18.2	…
Range, years	25–97	21–91	…
Male sex	12 (63.1)	42 (68.8)	.64
Ward			
Medicine	1 (5.2)	30 (49.1)	.001
Surgery	2 (10.5)	14 (22.9)	.24
Intensive care	16 (84)	17 (27.8)	<.001
Mean no. of positive blood culture results ± SD	3 ± 1.9	2.9 ± 1.8	NS
Source of bacteremia			
Vascular catheter	4 (21.1)	18 (29.6)	.47
Bone or joint	0 (0)	11 (18)	.046
Skin and soft tissue	0 (0)	9 (11.2)	.076
Lung	3 (14.3)	5 (8.2)	.33
Cardiac valve	4 (21.1)	1 (1.6)	.002
Other[a]	2 (9.5)	4 (6.6)	.57
Unknown	6 (31.6)	13 (21.3)	.36
Hospital-acquired infection	11 (57.9)	36 (59)	.93
Health care–related infection	4 (21)	22 (36)	.22
Community-acquired infection	4 (21)	3 (4.9)	.03
MRSA bacteremia	8 (42.1)	23 (37.7)	.73
Comorbidity or immunodeficiency	8 (42.1)	32 (52.4)	.43
28-day mortality	16 (84)[b]	6 (11.3)	.01

NOTE. Data are no. (%) of patients, unless indicated otherwise. MRSA, methicillin-resistant *S. aureus;* NS, not significant.

[a] Urinary tract, vascular prosthesis and intra-abdominal abscess.

[b] OR, 48.9; 95% CI, 11–217.7; $P < .01$.

with the χ^2 test and Fisher's exact test for categorical variables and with Student's t test for continuous data. A trend test was used to analyze the severity of infection (colonization, suppurative disease, sepsis without shock, and sepsis with shock). P values <.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Demographic and clinical characteristics. Eighty patients were enrolled in the study. They comprised 19 case patients with septic shock and 61 control patients with sepsis without shock. Eleven patients (including 5 patients with polymicrobial blood culture results, 2 with cardiogenic shock, 1 with hemorrhagic shock, and 3 who were not hospitalized at the Edouard Herriot hospital) were subsequently excluded. The demographic and clinical characteristics of the case patients and control patients are shown in table 1; there were no significant differences regarding age, comorbidity, or immunodeficiency. Most infections were hospital-acquired or health care–related (15 [78.9%] of 19 episodes among case patients and 58 [95.1%] of 61 episodes among control patients). The 28-day mortality rate was significantly higher among case patients than among control patients (OR, 48.9; 95% CI, 11–217.7; $P < .01$). Otherwise, no patient included in this study met diagnostic criteria for STSS.

Prevalence of genes encoding superantigens and methicillin resistance. Sixty-seven (83.7%) of the 80 *S. aureus* isolates harbored ⩾1 superantigen gene (table 2), comprising 15 (78.9%) of 19 isolates obtained from case patients and 52 (85.2%) of 61 isolates obtained from control patients. The most prevalent superantigen genes (detected in 45% of all isolates) were the *sem* and *seo* genes; the *sea* gene was detected in 37.5% of isolates, and the *sed* gene was detected in 22.5% of isolates. The *mecA* gene was detected in 31 isolates (38.8%). One or more superantigen genes were detected in 39 (79.6%) of 49 methicillin-susceptible (MSSA) isolates and in 28 (90.3%) of 31 MRSA isolates.

Relation to shock. The prevalence of superantigen genes did not differ between isolates obtained from case patients and

Table 2. *Staphylococcus aureus* superantigen gene detection in 80 bloodstream isolates.

Gene	No. (%) of *S. aureus* isolates obtained from patients with sepsis			
	Without septic shock (n = 61)	With septic shock (n = 19)	Total (n = 80)	P
sea	21 (34.4)	9 (47.4)	30 (37.5)	.309
seb	5 (8.2)	0 (0)	5 (6.25)	.197
sec	8 (13.1)	3 (15.8)	11 (13.7)	.768
sed, sej	14 (23)	4 (21.1)	18 (22.5)	.863
see	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND
seh	3 (4.9)	1 (5.3)	4 (5)	.952
sek	2 (3.3)	1 (5.3)	3 (3.7)	.691
sel	8 (13.1)	3 (15.8)	11 (13.7)	.768
egc	31 (50.8)	5 (26.3)	36 (45)	.055
tst	6 (9.8)	1 (5.3)	7 (8.7)	.768

NOTE. Isolates that tested positive for the *egc* gene were positive for both *sem* and *seo* genes, except 1 isolate causing sepsis without septic shock that was positive for the *sem* gene only. ND, not done.

control patients (table 2). However, septic shock tended to be associated with a higher prevalence of the *sea* gene (47.4% in case patients and 34.4% in control patients; OR, 1.7; 95% CI, 0.6–4.87; $P = .31$) and with a lower prevalence of the *egc* gene (26.3% among case patients, and 50.8% among control patients; OR, 0.34; 95% CI, 0.11–1.08; $P = .055$).

Comparison with National Reference Center isolates. When the national reference center isolates were included in the analysis, the prevalence of the *sea* gene increased significantly with the severity of infection (figure 1), from 8% among isolates obtained from patients with colonization to 16.8% among isolates obtained from patients with suppurative diseases, 34.4% among isolates obtained from patients with sepsis without shock, and 47.4% among isolates obtained from patients with sepsis and shock ($P < .001$). Conversely, the prevalence of the *egc* gene decreased significantly with the severity of infection, from 68% among isolates obtained from colonization sites to 53.4% among isolates obtained from patients with suppurative diseases, 50.8% among isolates obtained from patients with sepsis without shock, and 26.3% among isolates obtained from patients with sepsis and shock ($P = .009$). When isolates obtained from colonized patients, patients with suppurative diseases, and patients with sepsis were combined for analysis, the prevalence of the *sea* gene was significantly higher ($P < .02$) and the prevalence of the *egc* gene was significantly lower ($P < .03$) in patients with septic shock (table 3).

To minimize the bias due to clonal spread (e.g., an epidemic caused by a MRSA clone), the profile in question was only counted once if >1 identical 10-gene profile was detected in a given clinical category. Thus, 127 of 206 isolates were excluded, and the analysis was performed on the 79 remaining isolates (table 4). Of these, 11 isolates (instead of 19 isolates) were obtained from patients with septic shock. For the other situations, the number of studied isolates decreased to 68 isolates, instead of 187 isolates. The prevalence of the *sea* gene was still higher and the prevalence of the *egc* gene still lower in patients with septic shock, but not significantly ($P = .46$ and $P = .19$, respectively).

DISCUSSION

The involvement of gram-positive bacteria in life-threatening sepsis has been increasing steadily for several decades, but the

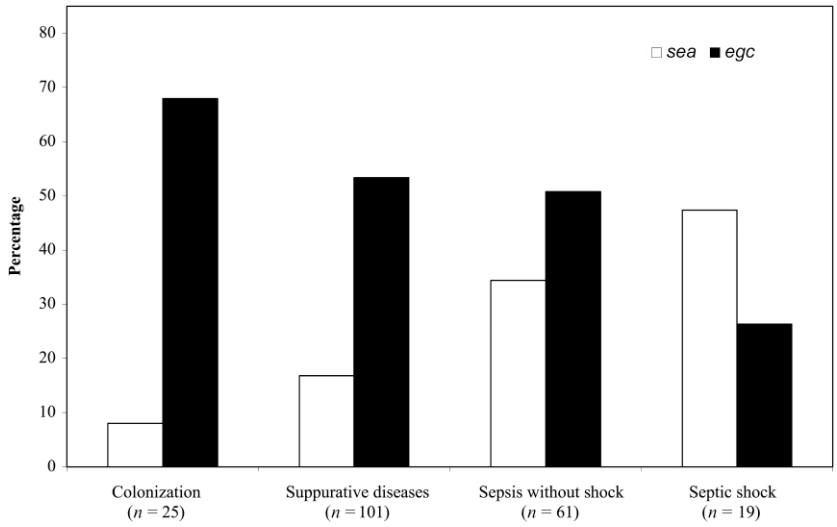


Figure 1. Prevalence of *sea* and *egc* genes in isolates of *S. aureus* obtained from patients with colonization and from patients with infections of different severities. The prevalence of the *sea* gene increased significantly with the severity of infection ($P < .001$), and the prevalence of the *egc* gene decreased significantly ($P = .009$).

Table 3. *sea* and *egc* genes detected in *Staphylococcus aureus* isolates obtained from patients with septic shock and patients with other clinical situations.

Gene	Source of isolates: Patients with septic shock[a] (n = 19)	Source of isolates: Patients with other situations[b] (n = 187)	OR (95% CI)	P
sea	9 (47.4)	40 (21.4)	3.3 (1.26–8.7)	<.02
egc	5 (26.3)	102 (54.5)	0.3 (0.10–0.86)	<.03

NOTE. Data are no. (%) of isolates, unless indicated otherwise.

[a] Including 8 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates.

[b] Including 25 isolates obtained from colonization sites (3 MRSA isolates), 101 isolates obtained from patients with suppurative diseases (36 MRSA isolates), and 61 isolates obtained from patients with sepsis without shock (23 MRSA isolates).

implication of different virulence factors remains incompletely understood [6]. *S. aureus* is a frequently involved bacterium and does not contain lipopolysaccharide (LPS), a potent mediator of sepsis due to gram-negative bacteria, but it can produce a range of proinflammatory molecules: cell-wall components, such as peptidoglycans and lipoteichoid acid, and exotoxins, such as superantigens. Data obtained from animal models have demonstrated that superantigenic *S. aureus* toxins and LPS very efficiently synergyze in the induction of a lethal shock. Thus, a 2-hit model of septic shock has been suggested by Bannan et al. [18]. First, a bacterial cell-wall component (peptidoglycans, lipoteichoid acid, or LPS from a coinfection) stimulates the innate immune response through activation of monocytes and macrophages, and, second, a superantigen or other T cell stimulant amplifies an inflammatory response through the adaptive immune system [18, 19]. This mechanism has not been demonstrated in human cases of septic shock, and the capacity of *S. aureus* isolates involved in these cases to produce different superantigenic toxins has not been analyzed.

In the present study, we determined the presence of genetic loci for 10 different superantigens in *S. aureus* isolated from bloodstream infections in 19 case patients with septic shock and 61 control patients without shock. Overall, 86.2% of all isolates contained at least 1 superantigen gene, a prevalence similar to that reported by Becker et al. [13, 20] in previous surveys (73% and 80% in 219 and 429 blood culture isolates, respectively). The overall prevalence of superantigen genes did not differ between isolates from patients with septic shock (78.9%) and septic patients without shock (85.2%). On analysis of individual superantigen gene loci and after including isolates from other clinical conditions in the analysis, we found that the presence of the *sea* gene was significantly correlated with severity of infection, whereas the presence of the *egc* gene was negatively correlated.

Peacock et al. [14] found that the *sea* gene was significantly more common in invasive isolates, but not after omitting the epidemic MRSA-16 clone, which is highly prevalent in the United Kingdom. In our experience, the association of the genetic profile with the 10 superantigen genes, the *agr* locus, and the *mecA* gene adequately represents the genetic background [21]. To minimize the influence of clonal spread, we subsequently eliminated all but one of each isolate with an identical genetic profile, which limited the number of MRSA isolates. The association of the *sea* gene with clinical severity persisted, but the prevalence of the *sea* gene was no more significantly higher in patients with septic shock (table 4). A linkage disequilibrium between the *sea* gene and ⩾1 other virulence determinant located elsewhere in the genome of clonal staphylococcal strains (Peacock's "hitchhiker effect") is possible, but a specific role of SEA protein in septic shock cannot be excluded as SEB that may promote abscess and soft-tissue infection in an injection drug user [22]. First, SEA may synergize with bacterial cell-wall components and trigger the host inflammation response. Second, a simultaneous expression of invasive exoproteins (that favor bacterial spread to adjacent tissues) could coexist with production of SEA, because SEA lacks the cross-repressive activity of other superantigens, such as TSST-1 and SEB [23, 24]. *S. aureus* strains that produce SEA might have powerful advantages for inducing shock, and the spread of *sea*-positive MRSA clones could also contribute to the 75% increase in the attack rate of septic shock observed among patients in French intensive care units from 1993 and 2003 [25]. Eight cases of septic shock in our study were infected by MRSA strains, of which 7 carried the *sea* gene. Earlier studies of the presence of the *sea* gene in *S. aureus* isolates obtained from blood or other specimens from patients with invasive disease did not separate cases of septic shock for analysis [13, 14, 20]. For example, Becker et al. [13] reported the presence of the *sea* gene in only 17.4% of *S. aureus* blood isolates, without analyzing shock as a category. The power of our study was optimized by the inclusion of 3 controls for each case of septic

Table 4. *sea* and *egc* genes detected in *Staphylococcus aureus* isolates obtained from patients with septic shock and patients with other clinical situations after exclusion of isolates with identical toxin gene profiles.

Gene	Source of isolates: Patients with septic shock[a] (n = 11)	Source of isolates: Patients with other situations[b] (n = 68)	OR (95% CI)	P
sea	4 (36.4)	16 (23.5)	1.86 (0.48–7.17)	.46
egc	4 (36.4)	42 (61.8)	0.35 (0.09–1.33)	.19

NOTE. Data are no. (%) of isolates, unless indicated otherwise.

[a] Including 3 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates.

[b] Including 14 isolates obtained from colonization sites (2 MRSA isolates), 31 isolates obtained from patients with suppurative diseases (9 MRSA isolates), and 23 isolates obtained from patients with sepsis without shock (8 MRSA isolates).

shock, whereas 9 of 10 patients with *S. aureus* bacteremia usually do not develop septic shock (T. Ferry, unpublished data).

In contrast to the *sea* gene, the *egc* locus, which is located in the *S. aureus* pathogenicity island 3, was negatively correlated with the severity of infection. This locus includes an operon containing 5 newly described superantigen genes, *seg, sei, sem, sen,* and *seo* [12, 26]. This unique superantigen nursery is expressed in the early exponential-growth phase, whereas most other exoproteins, including enterotoxins, are expressed postexponentially [12, 27]. The *egc* locus is highly prevalent in clinical strains of *S. aureus,* especially in carriage strains (67% according to Peacock et al. [14]) and may reduce pathogenicity in several ways. The mobile genetic element that carries the *egc* locus might, on insertion, inactivate a crucial sequence or cause the loss of another mobile genetic element carrying virulence genes [28]. Alternatively, the *egc* toxins may themselves have a protective effect through their intrinsic properties and the kinetic level of their production. Each member of the *egc* locus stimulates human T lymphocytes in vitro, and each has a distinct pattern of Vβ activation. Together, they can activate most human lymphocytes [12], but they seem to be produced in lesser quantities and to have a lower immunogenic response than do other enterotoxins. A minority of *S. aureus* strains carrying *seg* and *sei* genes produce detectable SEG and SEI proteins in vitro [29]. SEM, SEN, and SEO have no emetic activity in animal models [29, 30], and *egc* products rarely elicit strong antibody responses [12, 27]. A recent study also showed that functional T-helper cell differentiation could be influenced by the superantigen concentration. In an in vitro purified human $CD4^+$–T cell model, high concentrations of TSST-1 generated a Th1 profile and lower concentrations generated a T helper–2 (Th2) profile [31]. Therefore, in the course of *egc*-positive *S. aureus* infection, early low-level *egc* toxin production might induce an early and mild Th2 response that could counteract the Th1 response and thereby limit the excessive release of Th1 cytokines that leads to shock.

In conclusion, this study confirms that most *S. aureus* strains that cause sepsis, with or without shock, harbor $\geqslant$1 gene encoding a superantigen. We also show that the presence of the *sea* gene was significantly correlated with the severity of infection. During *sea*-positive *S. aureus* sepsis, the SEA protein could trigger overexpression of inflammatory mediators that favor the onset of shock. Conversely, the presence of the *egc* locus was negatively correlated with the severity of infection. The integration of the *S. aureus* pathogenicity island 3 or early low-level production of *egc*-encoded toxins may exert a moderating effect, perhaps through stimulation of a Th2 response. However, molecular analysis of strains does not ascertain the in vivo production of superantigens. A study of the T cell Vβ repertoire of patients with septic shock would confirm this hypothesis. If so, therapies targeting the production of superantigens, particularly SEA, might help to limit the severity of *S. aureus* septic shock. In this respect, it is noteworthy that the new antibacterial agent linezolid (active even against MRSA strains) reduces in a concentration-dependent manner SEA secretion in vitro [32].

Acknowledgments

We thank Christine Gardon, Christine Courtier, and Céline Spinelli (Centre National de Référence des staphylocoques) for their technical support; Muriel Rabilloud (Unité de Biostatistique et d'Informatique Médicale) for statistical analysis; and David Young for editing.

Financial support. Pfizer and the "Société de Réanimation de Langue Française."

Potential conflicts of interest. T.F. has recently received research funding from Pfizer. All other authors: no conflicts.

References

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med **1998**; 339: 520–32.
2. Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. Lancet **1998**; 351:1501–5.
3. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. Chest **2003**; 124:1103–15.
4. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol **2001**; 55: 77–104.
5. Stevens DL. The toxic shock syndromes. Infect Dis Clin North Am **1996**; 10:727–46.
6. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med **2003**; 348:1546–54.
7. Jarraud S, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. The epidemiology of toxemic infections caused by *Staphylococcus aureus* in an intensive care setting. Ann Fr Anesth Reanim **2002**; 21:370–4.
8. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Rev **2000**; 13:16–34.
9. Llewelyn M, Cohen J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. Lancet Infect Dis **2002**; 2:156–62.
10. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest **1997**; 112:235–43.
11. Holtfreter S, Broker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? Arch Immunol Ther Exp **2005**; 53:13–27.
12. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, et al. *egc*, A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus.* J Immunol **2001**; 166:669–77.
13. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. J Clin Microbiol **2003**; 41:1434–9.
14. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, et al. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus.* Infect Immun **2002**; 70:4987–96.
15. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest **1992**; 101: 1644–55.
16. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. Clin Infect Dis **2003**; 36:131–9.
17. Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J, Lina G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. J Clin Microbiol **1999**; 37:2446–9.
18. Bannan J, Visvanathan K, Zabriskie JB. Structure and function of strep-

tococcal and staphylococcal superantigens in septic shock. Infect Dis Clin North Am **1999**; 13:387–96, ix.
19. Horn DL, Morrison DC, Opal SM, Silverstein R, Visvanathan K, Zabriskie JB. What are the microbial components implicated in the pathogenesis of sepsis? Report on a symposium. Clin Infect Dis **2000**; 31: 851–8.
20. Becker K, Friedrich AW, Peters G, von Eiff C. Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SElM, SElO, and SElN. Mol Nutr Food Res **2004**; 48:488–95.
21. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect Immun **2002**; 70:631–41.
22. Monk AB, Curtis S, Paul J, Enright MC. Genetic analysis of *Staphylococcus aureus* from intravenous drug user lesions. J Med Microbiol **2004**; 53:223–7.
23. Vojtov N, Ross HF, Novick RP. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. Proc Natl Acad Sci USA **2002**; 99: 10102–7.
24. Novick RP. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid **2003**; 49:93–105.
25. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. Intensive Care Med **2004**; 30:580–8.
26. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infect **2001**; 3:585–94.
27. Holtfreter S, Bauer K, Thomas D, et al. *egc*-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. Infect Immun **2004**; 72:4061–71.
28. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3: implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. J Biol Chem **2002**;277:13138–47.
29. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. J Clin Microbiol **2002**; 40:857–62.
30. Hu DL, Omoe K, Shimoda Y, Nakane A, Shinagawa K. Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). Infect Immun **2003**; 71:567–70.
31. Brandt K, van der Bosch J, Fliegert R, Gehring S. TSST-1 induces Th1 or Th2 differentiation in naive CD4+ T cells in a dose- and APC-dependent manner. Scand J Immunol **2002**; 56:572–9.
32. Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, et al. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:546–444.

IV. 2. 3. Troisième publication :

"Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock"

Olivier Dauwalder, Damien Thomas, Tristan Ferry, Anne-Lise Debard, Cédric Badiou, François Vandenesch, Jerome Etiennne, Gerard Lina, Guillaume Monneret

Journal of Leukocyte Biology 2006;80:753-8.

Le but de ce travail était d'analyser et de comparer l'activité inflammatoire (pro-inflammatoire Th-1 et anti-inflammatoire Th-2) *in vitro* de SEA et de SEG, qui est une des exotoxines superantigéniques de l'*egc*, dans un modèle de culture cellulaire de PBMCs.

Les concentrations de TNF-alpha (reflétant la réponse Th-1) dans les surnageants de cultures cellulaires après 48 et 72 h d'incubation étaient statistiquement supérieures en présence de SEA par rapport à celles obtenues avec SEG. Les données obtenues avec les dosages d'IL-10 (reflétant la réponse Th-2) n'ont pas montré de différences significatives entre SEA et SEG. Le ratio TNF-alpha / IL-10 (évaluant la balance pro- versus anti-inflammatoire) évoluait de façon dose-dépendante, particulièrement avec SEA. Les dosages de MIP-1alpha (chimiokine spécifique de la réponse Th-1) ont montré que la concentration de MIP-1alpha augmentait significativement de manière dose dépendante, et ce, seulement pour SEA (SEG, à forte dose, n'induisait qu'une faible augmentation, non significative, de MIP-1alpha après 72h de culture). Par contre, nous n'avons pas observé de sécrétion de TARC (chimiokine spécifique de la réponse Th-2) avec aucune des toxines quelle que soit la durée d'incubation. Le ratio MIP-1alpha / TARC évoluait selon un profil dose-dépendant avec SEA et était par ailleurs également significativement augmenté avec SEG.

Ainsi, SEA et SEG induisent une réponse pro-inflammatoire en orientant la réponse immunitaire vers le versant Th1. Toutefois, la réponse pro-inflammatoire de SEA était bien supérieure à celle de SEG. Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, le lien épidémiologique observé entre présence du gène codant SEA et choc septique.

Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock

Olivier Dauwalder,* Damien Thomas,* Tristan Ferry,* Anne-Lise Debard,† Cédric Badiou,* François Vandenesch,* Jerome Etienne,* Gerard Lina,* and Guillaume Monneret,*,‡,[1]

*Université Claude Bernard, INSERM E230, IFR-62, Faculté de Médecine Laennec, Lyon, France; and †Hospices Civils de Lyon, CH Lyon-Sud, and ‡Hôpital Neurologique, Laboratoire d'Immunologie, Lyon, France

Abstract: The severity of *Staphylococcus aureus* sepsis is positively associated with staphylococcal enterotoxin A (SEA) and negatively associated with the enterotoxin gene cluster (*egc*), which encodes five staphylococcal enterotoxins [1]. We postulated that the variable, clinical severity of *S. aureus* sepsis might be a result of differences in the inflammatory properties of staphylococcal superantigens. We therefore compared the inflammatory properties of SEA with those of staphylococcal entérotoxin G (SEG), a member of the five *egc* superantigens. We found that SEA and SEG had similar superantigenic properties, as they induced CD69 expression on T lymphocytes and selective expansion of Vβ subpopulations. Contrary to SEG, however, SEA induced a strong proinflammatory/Th1 response, including TNF-α and MIP-1α production. These results suggest that the association of SEA with the severity of *S. aureus* septic shock, characterized by a deleterious, inflammatory cascade, may be explained partly by the specific proinflammatory properties of this superantigen. *J. Leukoc. Biol.* 80: 753–758; 2006.

Key Words: *superantigens · bacterial · cytokines · chemokines* · Staphylococcus aureus

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is a versatile and potent human pathogen [2, 3]. *S. aureus* infections can be subdivided schematically into suppurative diseases such as soft-tissue infections, abscesses and sepsis, and toxin-mediated syndromes such as the toxic shock syndrome (TSS) [2]. TSS toxin 1 (TSST-1) has been linked to menstrual TSS and in conjunction with staphylococcal enterotoxin B (SEB), SEC, to nonmenstrual TSS [4, 5]. All of these staphylococcal toxins act as superantigens (SAGs), which directly cross-link certain TCR Vβ domains with conserved structures in MHC Class II molecules [6]. These interactions trigger a strong Th1 proinflammatory response and activate large subpopulations of T lymphocytes. Clinical manifestations of TSS include fever, arterial hypotension, cutaneous signs (rash and then desquamation), and multiorgan failure [4, 7].

SAG genes are not restricted to *S. aureus* strains associated with toxin-mediated diseases. In a recent study, Peacock et al. [8] found that the *sea* gene was significantly more prevalent in invasive *S. aureus* isolates recovered by blood culture than in noninvasive isolates. Likewise, we have previously reported that *sea* is associated with more severe *S. aureus* infections and especially, septic shock. In constrast to *sea*, the presence of other superantigenic enterotoxin genes (*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, and *selo*) forming the enterotoxin gene cluster (*egc*) correlates positively with colonization and negatively with the gravity of infection [1, 9, 10]. Several studies have shown that the *egc* locus is frequent in *S. aureus* colonization isolates [11–13]. For instance, 56% of nasal isolates analyzed by Becker et al. [12] harbored the *seg* and *sei* genes. These data suggest that differences in the proinflammatory potential of SAG enterotoxins might explain the variable severity of *S. aureus* sepsis. For example, contrary to SEG and SEI, SEA might trigger a proinflammatory/Th1 cascade responsible for shock. Septic shock, which is mainly caused by *S. aureus*, profoundly disturbs immune homeostasis by inducing a potent initial systemic inflammatory response, which is rapidly followed by an anti-inflammatory process [14]. The pro-/anti-inflammatory balance and the Th1/Th2 ratio are now used to investigate host immunoinflammatory status during septic shock [15, 16].

The aim of this study was to compare the effects of SEA and SEG on inflammatory mediator release by human mononuclear cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

SEA was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). SEG was produced by molecular techniques. Briefly, the *seg* DNA sequence was introduced into *S. aureus* plasmid pLUG345 with his-Tag (pLUG274::$agr1\text{-}_{sa}$ nt1819–1475; P3 promotor to start codon)::*Stu*I::*Bam*HI cloning sites::linked to nt 1095–751

[1] Correspondence: Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Neurologique, 59 bd Pinel, 69677 Bron Cedex, France. E-mail: guillaume.monneret@chu-lyon.fr

Received March 31, 2006; revised June 6, 2006; accepted June 13, 2006; doi: 10.1189/jlb.0306232.

*rna*III (transcription terminator) [17]. The resulting plasmid was transformed in *S. aureus* RN6390, a strain normally producing no superantigens. Recombinant SEG was purified with NiNTA columns. The purity of SEG and SEA preparation was assessed by SDS-PAGE (**Fig. 1**). The *Limulus* amebocyte lysate assay (BioWhittaker, Walkersville, MD) showed that the endotoxin content of the SEA and SEG preparations was, respectively, <0.05 and <0.5 endotoxin units/ml.

S. aureus strains ATCC 13566 (*sea*+, *seb*+) and RN4220 were used as positive and negative controls for superantigen production, respectively [18].

Flow cytometry

CD69 assay

As described previously, we assessed T cell activation upon SAG challenge by measuring surface CD69 expression [19]. Briefly, whole blood was incubated with SEG or SEA (100 ng/mL) in Eagle's minimum essential medium containing 5% heat-inactivated FCS (Gibco Invitrogen, Paisley, UK) for 24 h at 37°C in humidified air with 5% CO_2. Culture medium and PHA (20 μg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. After ammonium chloride erythrocyte lysis, leukocytes were incubated with a mixture of anti-CD3 conjugated to cyanin-5-PE (Dako, Glostrup, Denmark) and anti-CD69 conjugated to PE (Beckman Coulter, Miami, FL). The cells were then analyzed with a FACScan® flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), and the results were expressed as the percentage of CD3+ lymphocytes expressing CD69.

Analysis of T cell Vβ repertoires

PBMC were cultured in RPMI-1640 medium with 5% heat-inactivated FCS, 20 mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldricht), 100 IU/ml penicillin G, and 100 μg/ml streptomycin (Sigma-Aldricht) at a density of 2×10^5 cells per mL. Cells were stimulated with SEA (250 ng/mL), SEG (250 ng/mL), or RPMI 1640 (negative control) and were then cultured for 9 days with increasing concentrations of recombinant human IL-2 (up to 100 U/ml, Eurobio, Courtaboeuf, France). To determine specific TCR Vβ profiles, we used the IO Test Beta Mark® (Beckman Coulter). Briefly, the kit comprises eight vials, marked A–H, each containing three Vβ families tagged to PE, FITC, or both. The kit was used as recommended by the manufacturer. Vβ profiles were assessed by flow cytometry.

Cytokine and chemokine assays

Whole blood was collected from healthy volunteer laboratory staff, who denied recent anti-inflammatory drug intake. PBMC were extracted by differential gradient centrifugation over endotoxin-free Ficoll-Paque Plus® (Amersham Biosciences, UK) and washed three times in Ca- and Mg-free PBS. Cell viability was measured with the trypan blue exclusion test. Cells were used at a density of 5×10^5 PBMC/ml.

TNF-α, IL-10, MIP-1α, thymus and activation-regulated chemokine (TARC), and IFN-γ levels were measured in culture supernatants with ELISA kits (Biosource, Nivelles, Belgium, for cytokine assays and R&D Systems, Minneapolis, MN, for chemokine assays). The detection limits were 4 pg/ml for TNF-α, 0.2 IU/ml for IFN-γ, 5 pg/ml for IL-10, 10 pg/ml for MIP-1α, and 7 pg/ml for TARC. The ELISA plates were read at 450 nm with a Dynatech (Alexandria, VA) plate-reader.

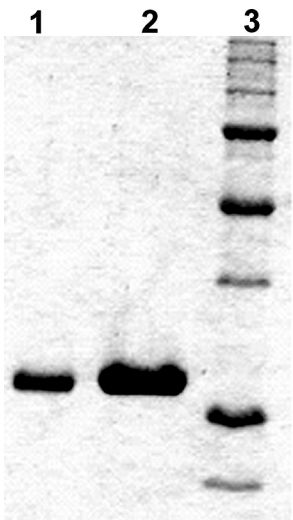


Fig. 1. Analysis of toxin preparations SEG and SEA (50 μg/mL) on a 15% SDS-PAGE gel. Lane 1, SEG; lane 2, SEA; lane 3, molecular weight marker.

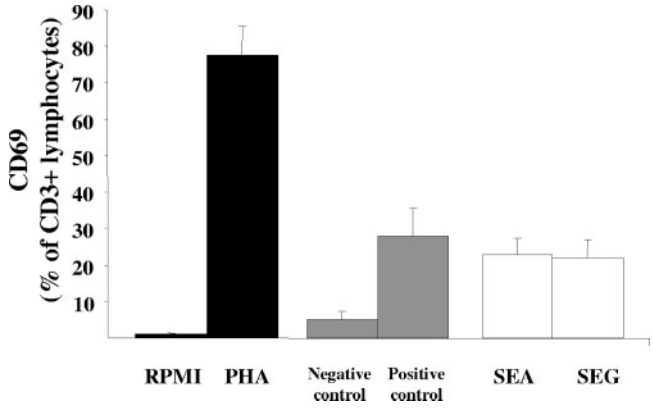


Fig. 2. CD69 expression on T lymphocytes upon superantigen challenge. CD69 expression was measured on T lymphocytes (CD3+) after 24 h of incubation in whole blood with RPMI-1640 culture medium, PHA, positive control (ATCC 13566 strain), negative control (RN4220 strain), SEA 100 ng/ml, or SEG 100 ng/ml. Results are mean ± SD (n=3).

Statistical analysis

Statistical analyses were done with Stat View® software Version 5 for Windows® (SAS Institute, Carry, NC). Cytokine and chemokine values were expressed as means ± SEM and were subsequently analyzed for significance (P<0.05) with the nonparametric Mann-Whitney U-test. The correlation between TNF-α and MIP-1α levels was tested with Spearman's test.

RESULTS

Superantigenic properties

Induction of CD 69 expression

SEA and SEG rapidly induced CD69 large expression on T cells (**Fig. 2**). Levels were similar with the two toxins (23% and 22%, respectively) and also with a SEA- and SEB-containing, filtered culture supernatant of *S. aureus* strain ATCC 13566, used as positive control (28%).

Vβ repertoires

As previously reported [20], among the 24 Vβ subsets tested, we observed massive selective expansion of Vβ 9 and Vβ 22 subpopulations upon SEA stimulation and Vβ 13.2 and Vβ 14 subpopulations upon SEG stimulation (**Fig. 3**).

Together, these data demonstrated the superantigenic properties of the SEA and SEG preparations.

Pro-/anti-inflammatory responses

We compared the pro-/anti-inflammatory properties of SEA and SEG by measuring the release of TNF-α (a proinflammatory cytokine) and IL-10 (an anti-inflammatory cytokine) by PBMC after 24, 48, and 72 h of incubation. At 24 h, cytokine release was similar to negative control values (data not shown). At 48 and 72 h, we observed concentration-dependent TNF-α production in response to SEA (from 1 to 100 ng/ml), whereas SEG induced only weak TNF-α release at 100 ng/ml (**Table**

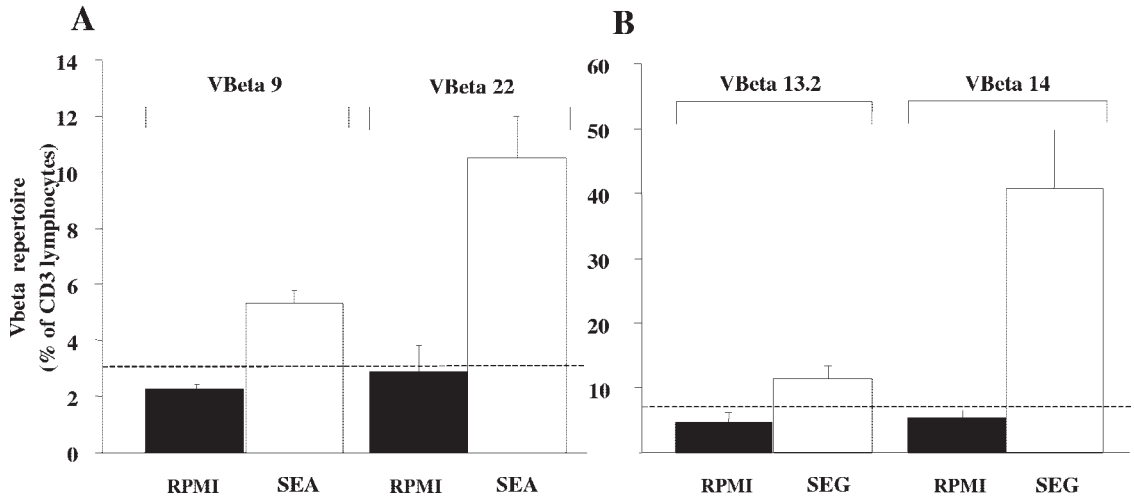


Fig. 3. Expansion of Vβ subsets in response to SEA and SEG. Vβ repertoires were assessed after 9 days of incubation of PBMC with SEA or SEG (250 ng/ml). Results are given for the main classes known to be increased in response to SEA (9 and 22) and SEG (13.2 and 14). Results are mean ± SD (n=3). Control values were provided by manufacturer and are represented by the dotted line.

1). Neither toxin induced IL-10 production (Table 1). Consequently, SEA was associated with a significantly higher, proinflammatory behavior than SEG (Table 1).

Th1/Th2 responses

We then compared the effects of SEA and SEG on the Th1/Th2 ratio by measuring MIP-1α (CCL-3, a Th1 chemokine) and TARC (CCL-17, a Th2 chemokine) in 48 h and 72 h PBMC culture supernatants. At 48 h, we observed concentration-dependent MIP-1α production in response to SEA, whereas SEG induced only weak MIP-1α release at 100 ng/ml (**Table 2**). At 72 h, only SEA induced concentration-dependent MIP-1α production (Table 2). Neither toxin induced significant TARC production (Table 2). Consequently, SEA induced a significantly stronger Th1 response than SEG (Table 2). IFN-γ was just detectable after 48 h of culture with each toxin (SEA and SEG at 100 ng/ml; data not shown).

Correlation between proinflammatory and Th1 responses

When we pooled TNF-α and MIP-1α values obtained after 48 and 72 h of SEA challenge, we found a positive and highly significant correlation between levels of the two mediators (r=0.781, P<0.001), supporting concomitant induction of proinflammatory (TNF-α) and Th1 (MIP-1α) responses by SEA.

DISCUSSION

The main finding of this study is that the *S. aureus* superantigen SEA induces stronger proinflammatory and Th1 responses than SEG in PBMC from health volunteers. We also observed selective expansion of T cells bearing particular TCR Vβ regions, as reported previously [10, 19, 21]. These results

TABLE 1. TNF-α and IL-10 Release (Concentration and Ratio) in Response to Superantigens (n = 9)

Toxin	Incubation time (h)	Toxin concentrations (ng/mL)	TNF-α (pg/mL) Mean ± SEM	IL-10 (pg/mL) Mean ± SEM	Ratio TNF/IL-10 Mean ± SEM
Control	48	–	7.6 ± 1.0	8.4 ± 0.4	0.91 ± 0.11
SEA	48	1	56.2 ± 20.5	6.7 ± 0.5	8.25 ± 3.30*
		10	219.4 ± 106.3	7.0 ± 0.6	33.18 ± 15.11*
		100	385.3 ± 150.5	7.7 ± 0.3	47.41 ± 17.58*
SEG	48	1	14.3 ± 26.0	6.6 ± 0.6	2.40 ± 1.53
		10	6.5 ± 3.4	6.9 ± 0.4	1.00 ± 0.18
		100	21.4 ± 13.5	8.4 ± 0.7	2.54 ± 0.39
Control	72	–	6.9 ± 5.8	6.6 ± 0.3	1.06 ± 0.29
SEA	72	1	73.4 ± 25.0	8.7 ± 0.5	9.61 ± 3.68*
		10	266.6 ± 163.8	7.8 ± 0.5	29.93 ± 17.26*
		100	460.0 ± 140.9	8.2 ± 1.0	52.20 ± 12.85*
SEG	72	1	6.5 ± 4.1	8.2 ± 0.5	0.82 ± 0.18
		10	7.4 ± 4.6	7.2 ± 0.3	1.07 ± 0.23
		100	20.0 ± 11.6	7.6 ± 0.9	3.14 ± 0.75

* P < .05 for comparison between SEA and SEG regarding TNF/IL-10 ratio (Mann-Whitney U-test).

TABLE 2. MIP-1α and TARC Release (Concentration and Ratio) in Response to Superantigens

Toxins	Time (h)	Concentrations (ng/mL)	MIP-1α (pg/mL) Mean ± SEM	TARC (pg/mL) Mean ± SEM	MIP-1α/TARC Mean ± SEM
Control	48	–	17.6 ± 3.3	7.0 ± 0	2.18 ± 0.55
SEA	48	1	28.5 ± 12.7	14.7 ± 7.7	3.91 ± 1.86
		10	104.1 ± 76.0	12.6 ± 5.6	14.88 ± 10.85*
		100	171.3 ± 119.1	14.6 ± 7.6	24.32 ± 17.04
SEG	48	1	17.2 ± 2.7	10.5 ± 2.3	1.92 ± 0.50
		10	15.1 ± 2.1	10.0 ± 3.0	2.00 ± 0.39
		100	55.4 ± 27.7	7.0 ± 0	7.92 ± 3.95
Control	72	–	14.8 ± 1.9	9.6 ± 6.5	1.83 ± 0.33
SEA	72	1	27.6 ± 5.8	7.0 ± 0	3.95 ± 0.83
		10	153.0 ± 119.2	7.0 ± 0	21.86 ± 16.60*
		100	282.9 ± 127.1	7.0 ± 0	40.41 ± 18.15*
SEG	72	1	18.2 ± 2.2	7.0 ± 0	2.60 ± 0.32
		10	16.0 ± 2.2	7.0 ± 0	2.29 ± 0.32
		100	20.0 ± 3.2	7.0 ± 0.1	2.80 ± 0.43

$n = 8$ and $n = 7$ for SEA and SEG, respectively. * $P < .05$ for comparison between SEA and SEG regarding MIP/TARC ratio (Mann-Whitney U-test).

confirmed the functional properties of our toxin preparations [3, 19, 20, 22]. The inflammatory properties of SEA were in keeping with those observed by Krakauer and coworkers [7, 23–25] and Hale et al. [25] with SEB and TSST-1, both of which induced proinflammatory responses. Contrary to SEG, however, we found that SEA induced marked Th1 chemokine production. As Th2 cytokine production by cultured human cells is barely detectable, we studied Th1/Th2 responses in terms of chemokine production [26]. We studied Th1 chemokine responses by measuring MIP-1 α/CCL-3 [27–29] and Th2 chemokine responses by measuring TARC/CCL-17, a member of the CC family [30–32]. We found that SEA induced Th1 chemokine release (abundant MIP-1α and no TARC), as reported previously by Tessier et al. [33], Brandt et al. [34], and Gehring et al., using TSST-1 [34, 35]. These findings indicate that most *S. aureus* superantigens induce proinflammatory/Th1 responses. In contrast, we showed, for the first time, that SEG did not induce a proinflammatory response.

Based on their amino acid sequences, SAGs can be divided into four distinct groups [4]. SEA and SEG belong to different structural families. SEA belongs to one group, SEG and SEB to a second group, and TSST-1 to a third group. This phylogenetic classification, based on amino acid sequence homology, does not reflect the different pro-/anti-inflammatory behavior of SEA and SEG observed here.

The respective roles of monocytes and T lymphocytes in the inflammatory response to SAGs are controversial. Dinges et al. [36] showed that rabbit with profound T cell deficiency remained completely susceptible to TSST-1, indicating that lethal effects of superantigens can occur in the absence of T cells. SEB induced TNF-α production by isolated monocytes but not by nonmonocytic cells or purified T cells, suggesting that proinflammatory reactions do not require T cells [37]. On monocytes, SAGs mainly interact with MHC Class II molecules. SEA, contrary to SEG, possesses a cystein domain involved in high-affinity MHC Class II binding [38, 39]. SEA binds to two sites on Class II molecules, one with high-affinity and the other with low-affinity [26, 40]. In contrast, SEG appears to bind only the α chain of MHC Class II molecules with low-affinity [22]. These differences might in part account for the different inflammatory properties of *S. aureus* superantigens. Grossman et al. [41] showed that monocyte TNF-α production, in response to SEA and TSST-1, could be blocked significantly by anti-MHC Class II antibodies. TNF-α production by monocytes generally correlates with toxin binding to MHC Class II molecules. This was confirmed in experiments with "mutated toxins" such as F47-SEA, which lacks one of the MHC Class II-binding sites [42]. Wright and Chapes [43] proposed another mechanism of SAG action on monocytes. They showed that SEA could also interact with MHC Class I molecules on monocytic cells lacking MHC Class II expression and could induce marked cytokine release (notably, TNF-α and IL-6). This cross-linking of SEA and MHC Class I molecules offers an alternative solution to explain the differential, proinflammatory behavior of SAGs [43].

Several reports point to a major role of T lymphocytes in inducing proinflammatory responses. Marrack et al. [44] showed that pathological effects of SEB might result from massive T cell stimulation, and T cell-deficient mice being less susceptible to the toxic effects of SEB. Faulkner et al. [45] recently demonstrated that α/β TCR was critical for toxic shock lethality in HLA-DR1 transgenic mice. However, when we measured CD69 expression on CD3 cells, we observed no significant difference in T cell activation induced by SEA and SEG.

The difference in the pro-/anti-inflammatory properties of SEA and SEG observed here is in agreement with the results of several epidemiological studies. Ferry et al. [1] showed a higher prevalence of *S. aureus* strains harboring *sea* genes in septic patients with shock than in patients without shock. In contrast, the prevalence of *egc*-harboring strains, which produced SEG, was higher among strains causing suppurative infections than invasive diseases [1]. Ferry also observed a negative relationship between the *egc* cluster and clinical severity. Similarly, Peacock et al. [8], in an epidemiological study designed to identify links between *S. aureus* virulence factors and deep-seated infections, observed a high prevalence of *sea* and *sej* in invasive strains. Finally, Becker et al. [12]

studied the prevalence of genes encoding pyrogenic superantigenic toxins in blood and nasal *S. aureus* isolates and found that 73% of all isolates harbored superantigen toxin genes and that over 50% of these isolates were positive for *seg* and *sei*. However, they found no significant differences between the two types of sample.

Together, these results suggest that the association of SEA with the severity of *S. aureus* septic shock, characterized by a deleterious, inflammatory cascade, may be explained partly by the specific proinflammatory properties of this superantigen. This hypothesis now deserves to be investigated in vivo in animal models. It also remains to be shown whether SEG properties apply to other *egc* toxins.

In conclusion, we show that SEA is more proinflammatory than SEG. This might be a result of differences in monocyte binding. Our findings are in keeping with epidemiological data showing a higher prevalence of SEA in *S. aureus* strains associated with severe clinical syndromes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Fabienne Venet for her excellent advice and Florence Couzon for technical assistance. We also thank Professor Jacques Bienvenu and the immunology team of Lyon Sud (especially Carmen Fernandez and Marie-Claude Gutowski) for technical assistance with cytokine assays. G. L. and G. M. contributed equally to this work.

REFERENCES

1. Ferry, T., Thomas, D., Genestier, A. L., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J. (2005) Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. *Clin. Infect. Dis.* **41,** 771–777.
2. Lowy, F. D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339,** 520–532.
3. Holtfreter, S., Bauer, K., Thomas, D., Feig, C., Lorenz, V., Roschack, K., Friebe, E., Selleng, K., Lovenich, S., Greve, T., Greinacher, A., Panzig, B., Engelmann, S., Lina, G., Broker, B. M. (2004) *egc*-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect. Immun.* **72,** 4061–4071.
4. McCormick, J. K., Yarwood, J. M., Schlievert, P. M. (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu. Rev. Microbiol.* **55,** 77–104.
5. Schlievert, P. M., Tripp, T. J., Peterson, M. L. (2004) Reemergence of staphylococcal toxic shock syndrome in Minneapolis-St. Paul, Minnesota, during the 2000–2003 surveillance period. *J. Clin. Microbiol.* **42,** 2875–2876.
6. Marrack, P., Kappler, J. (1990) The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* **248,** 1066.
7. Krakauer, T. (2003) Measurement of proinflammatory cytokines and T-cell proliferative response in superantigen-activated human peripheral blood mononuclear cells. *Methods Mol. Biol.* **214,** 137–149.
8. Peacock, S. J., Moore, C. E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G., Day, N. P. (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70,** 4987–4996.
9. Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R. (2004) Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* **189,** 2334–2336.
10. Jarraud, S., Peyrat, M. A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G. (2001) *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **166,** 669–677.
11. Banks, M. C., Kamel, N. S., Zabriskie, J. B., Larone, D. H., Ursea, D., Posnett, D. N. (2003) *Staphylococcus aureus* express unique superantigens depending on the tissue source. *J. Infect. Dis.* **187,** 77–86.
12. Becker, K., Friedrich, A. W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., Von Eiff, C. (2003) Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41,** 1434–1439.
13. Becker, K., Friedrich, A. W., Peters, G., von Eiff, C. (2004) Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SElM, SElO, and SElN. *Mol. Nutr. Food Res.* **48,** 488–495.
14. Annane, D., Bellissant, E., Cavaillon, J. M. (2005) Septic shock. *Lancet* **365,** 63–78.
15. Hotchkiss, R. S., Karl, I. E. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* **348,** 138–150.
16. Munford, R. S., Pugin, J. (2001) The crucial role of systemic responses in the innate (non-adaptive) host defense. *J. Endotoxin Res.* **7,** 327–332.
17. Benito, Y., Kolb, F. A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J., Vandenesch, F. (2000) Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA* **6,** 668–679.
18. Jarraud, S., Cozon, G., Vandenesch, F., Bes, M., Etienne, J., Lina, G. (1999) Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J. Clin. Microbiol.* **37,** 2446–2449.
19. Lina, G., Cozon, G., Ferrandiz, J., Greenland, T., Vandenesch, F., Etienne, J. (1998) Detection of staphylococcal superantigenic toxins by a CD69-specific cytofluorimetric assay measuring T-cell activation. *J. Clin. Microbiol.* **36,** 1042–1045.
20. Holtfreter, S., Broker, B. M. (2005) Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **53,** 13–27.
21. Newton, D. W., Dohlsten, M., Olsson, C., Segren, S., Lundin, K. E., Lando, P. A., Kalland, T., Kotb, M. (1996) Mutations in the MHC class II binding domains of staphylococcal enterotoxin A differentially affect T cell receptor Vβ specificity. *J. Immunol.* **157,** 3988–3994.
22. Petersson, K., Forsberg, G., Walse, B. (2004) Interplay between superantigens and immunoreceptors. *Scand. J. Immunol.* **59,** 345–355.
23. Krakauer, T., Buckley, M. (2003) Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47,** 3630–3633.
24. Krakauer, T. (2004) Caspase inhibitors attenuate superantigen-induced inflammatory cytokines, chemokines, and T-cell proliferation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11,** 621–624.
25. Hale, M. L., Margolin, S. B., Krakauer, T., Roy, C. J., Stiles, B. G. (2002) Pirfenidone blocks the in vitro and in vivo effects of staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immun.* **70,** 2989–2994.
26. Redpath, S., Alam, S. M., Lin, C. M., O'Rourke, A. M., Gascoigne, N. R. (1999) Cutting edge: trimolecular interaction of TCR with MHC class II and bacterial superantigen shows a similar affinity to MHC:peptide ligands. *J. Immunol.* **163,** 6–10.
27. Rossi, D., Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **18,** 217–242.
28. Takahashi, H., Tashiro, T., Miyazaki, M., Kobayashi, M., Pollard, R. B., Suzuki, F. (2002) An essential role of macrophage inflammatory protein 1α/CCL3 on the expression of host's innate immunities against infectious complications. *J. Leukoc. Biol.* **72,** 1190–1197.
29. O'Grady, N. P., Tropea, M., Preas II, H. L., Reda, D., Vandivier, R. W., Banks, S. M., Suffredini, A. F. (1999) Detection of macrophage inflammatory protein (MIP)-1α and MIP-1β during experimental endotoxemia and human sepsis. *J. Infect. Dis.* **179,** 136–141.
30. Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Yoshie, O. (1997) The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J. Biol. Chem.* **272,** 15036–15042.
31. Chvatchko, Y., Hoogewerf, A. J., Meyer, A., Alouani, S., Juillard, P., Buser, R., Conquet, F., Proudfoot, A. E., Wells, T. N., Power, C. A. (2000) A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J. Exp. Med.* **191,** 1755–1764.
32. Sandoval-Lopez, G., Teran, L. M. (2001) TARC: novel mediator of allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy* **31,** 1809–1812.
33. Tessier, P. A., Naccache, P. H., Diener, K. R., Gladue, R. P., Neote, K. S., Clark-Lewis, I., McColl, S. R. (1998) Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. II. Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF-α. *J. Immunol.* **161,** 1204–1211.
34. Brandt, K., van der Bosch, J., Fliegert, R., Gehring, S. (2002) TSST-1 induces Th1 or Th2 differentiation in naive CD4+ T cells in a dose- and APC-dependent manner. *Scand. J. Immunol.* **56,** 572–579.

35. Gehring, S., Schlaak, M., van der Bosch, J. (1998) A new in vitro model for studying human T cell differentiation: T(H1)/T(H2) induction following activation by superantigens. *J. Immunol. Methods* **219,** 85–98.
36. Dinges, M. M., Gregerson, D. S., Tripp, T. J., McCormick, J. K., Schlievert, P. M. (2003) Effects of total body irradiation and cyclosporin A on the lethality of toxic shock syndrome toxin-1 in a rabbit model of toxic shock syndrome. *J. Infect. Dis.* **188,** 1142–1145.
37. Hopkins, P. A., Fraser, J. D., Pridmore, A. C., Russell, H. H., Read, R. C., Sriskandan, S. (2005) Superantigen recognition by HLA class II on monocytes up-regulates Toll-like receptor 4 and enhances proinflammatory responses to endotoxin. *Blood* **105,** 3655–3662.
38. Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., Wiley, D. C. (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364,** 33–39.
39. Tiedemann, R. E., Urban, R. J., Strominger, J. L., Fraser, J. D. (1995) Isolation of HLA-DR1. (staphylococcal enterotoxin A)$_2$ trimers in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92,** 12156–12159.
40. Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Rev.* **13,** 16–34.
41. Grossman, D., Cook, R. G., Sparrow, J. T., Mollick, J. A., Rich, R. R. (1990) Dissociation of the stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins for T cells and monocytes. *J. Exp. Med.* **172,** 1831–1841.
42. Thibodeau, J., Dohlsten, M., Cloutier, I., Lavoie, P. M., Bjork, P., Michel, F., Leveille, C., Mourad, W., Kalland, T., Sekaly, R. P. (1997) Molecular characterization and role in T cell activation of staphylococcal enterotoxin A binding to the HLA-DR α-chain. *J. Immunol.* **158,** 3698–3704.
43. Wright, A. D., Chapes, S. K. (1999) Cross-linking staphylococcal enterotoxin A bound to major histocompatibility complex class I is required for TNF-α secretion. *Cell. Immunol.* **197,** 129–135.
44. Marrack, P., Blackman, M., Kushnir, E., Kappler, J. (1990) The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *J. Exp. Med.* **171,** 455–464.
45. Faulkner, L., Cooper, A., Fantino, C., Altmann, D. M., Sriskandan, S. (2005) The mechanism of superantigen-mediated toxic shock: not a simple Th1 cytokine storm. *J. Immunol.* **175,** 6870–6877.

IV. 3. Deuxième partie : Caractérisation du clone SARM hospitalier prédominant en France et étude de ses facteurs de virulence

IV. 3. 1. Quatrième publication :

"Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone compared with that of other pandemic clones"

Tristan Ferry, Michele Bes, Olivier Dauwalder, Hélène Meugnier, Gérard Lina, Françoise Forey, François Vandenesch, Jerome Etienne

Journal of Clinical Microbiology 2006;44:2642-4.

Les objectifs de cette étude étaient de caractériser génétiquement le clone SARM hospitalier prédominant dans les services de réanimation de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon et de savoir si rétrospectivement ce clone avait déjà été détecté dans d'autres hôpitaux Français.

Nous avons collecté, caractérisé et comparé aux données du CNR des staphylocoques tous les SARM responsables de bactériémie dans plusieurs services de Réanimation de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon pendant une année. Le fond génétique des isolats étaient comparé par électrophorèse en champ pulsée, MLST, *spa typing* et par la caractérisation du locus *agr*. Les gènes codant les toxines (exotoxines superantigéniques, PVL, etc.) étaient recherchés. Dix-sept SARM ont été collectés dont 13 correspondaient à un clone dénommé clone Lyon, génétiquement relié au clone New-York clone V, mais distinct (CC8, ST8, positif pour le gène codant la toxine SEA). En comparant les données du type *agr* et du profil toxinique des SARM reçu au CNR, ce clone a été détecté dans de très nombreux hôpitaux Français et semble être le clone SARM hospitalier majoritaire en France. L'analyse du profil toxinique des clones SARM pandémiques à l'échelle mondiale a révélé que tous, à l'exception du clone Brésilien, possédaient le gène codant SEA (CC8 et CC30) et/ou l'*egc* (CC5, CC22, CC30). Certains clones possédant l'*egc*, possédaient également le gène codant TSST-1 (CC5 et CC30).

Le clone SARM prédominant à Lyon et prédominant vraisemblablement en France, dénommé clone Lyon, possède le gène codant SEA. La majorité des clones SARM pandémiques à l'échelle mondiale possède le gène codant SEA, et/ou l'*egc*. Ainsi, posséder le gène codant SEA, ou l'*egc*, pourrait être un avantage pour les clones SARM hospitaliers pandémiques en participant à leur virulence et/ou à leur dissémination.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2006, p. 2642–2644 Vol. 44, No. 7
0095-1137/06/$08.00+0 doi:10.1128/JCM.00430-06
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Toxin Gene Content of the Lyon Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone Compared with That of Other Pandemic Clones

Tristan Ferry,* Michèle Bes, Olivier Dauwalder, Hélène Meugnier, Gerard Lina, Françoise Forey, François Vandenesch, and Jerome Etienne

Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, IFR 62, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France

Received 27 February 2006/Returned for modification 5 April 2006/Accepted 23 April 2006

The methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Lyon clone, detected throughout France, contains the enterotoxin A gene (*sea*), like other pandemic clones of clonal complex 8 (CC8). The *egc* locus was detected in MRSA pandemic clones of CC5, CC22, and CC45, occasionally with the toxic shock syndrome toxin 1 gene. The representative strain of the EMRSA-16 clone (CC30) harbored both *sea* and the *egc* locus.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are spreading through hospitals worldwide and are the leading hospital-acquired pathogen (1, 2). Population genetics studies based on multilocus sequence typing (MLST) have shown that major MRSA clones have emerged from five clonal complexes (CCs): CC5, CC8, CC22, CC30, and CC45 (16). Within each CC, prevalent clones (the Archaic clone, the Iberian clone, and the German clone, for example) have been genetically characterized by their sequence type, their *spa* type, and their SCC*mec* cassette (13). In France, the

TABLE 1. Clonal complexes, *spa* types, and *spa* repeats of MRSA clones[a]

Clonal complex	Representative strain	Description of MRSA clone	*spa* type	*spa* repeats
CC8	HU25	Brazilian clone	t138	r08r16r02r25r17r24
	HU106	Hungarian clone	t538	r15r12r16r02r25r16r02r25r16r02r25r17r24
	PER34	Iberian clone	t051	r11r19r21r12r21r17r34r24r34r22r25
	COL	Archaic clone	t008	r11r19r12r21r17r34r24r34r22r25
	BK2529	New York clone V	t064	r11r19r12r05r17r34r24r34r22r25
	HT20040342	Lyon clone	t008	r11r19r12**r21**r17r34r24r34r22r25
	HT20040064	Lyon clone	t569	r11r19r12**r21**r17r34**r71**r34r22r25
	HT20040065	Lyon clone	t068	r11r19**r19**r12 — **r21**r17r34r24r34r22r25
	HT20040113	From present study	t540	r11r12r21r17r25
CC5	131/98	German clone	t001	r26r30r17r34r17r20r17r12r17r16
	HDE288	Pediatric clone	t311	r26r23r17r34r20r17r12r17r16
	N315	New York/Japan clone	t002	r26r23r17r34r17r20r17r12r17r16
	HT20030603	Newly described clone[b]	t002	r26r23r17r34r17r20r17r12r17r16
	HT20030063	Newly described clone	t539	r26r23r17r34r17 — — r12r17r16
CC22	16822/98	EMRSA-15	t032	r26r23r23r13r23r31r29r17r31r29r17r25r17r25r16r28
CC30	07924/95	EMRSA-16	t018	r15r12r16r02r16r02r25r17r24r24r24
CC45	1150/93	Berlin clone	t004	r09r02r16r13r13r17r34r16r34

[a] Strains shown in bold correspond to French isolates. Underlined *spa* types are those of pandemic MRSA strains used for comparison (New York clone V and New York/Japan clone). Bold repeats correspond to insertions, and dashed lines correspond to deletions of repeats in the *spa* type. The *spa* type differed slightly between Lyon clone isolates and the New York clone V isolate (there was a single variation between *spa* types t064 and t008, two variations between *spa* types t064 and t569, and three variations between *spa* types t064 and t068). Strain HT20040113 was not considered to belong to the Lyon clone, owing to multiple variations of the *spa* gene (deletion of five repeats).

[b] This clone was described in reference 3.

* Corresponding author. Mailing address: Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, IFR 62, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France. Phone: 33(0)-478-77-86-57. Fax: 33(0)-478-77-86-58. E-mail: tristan.ferry@univ-lyon1.fr.

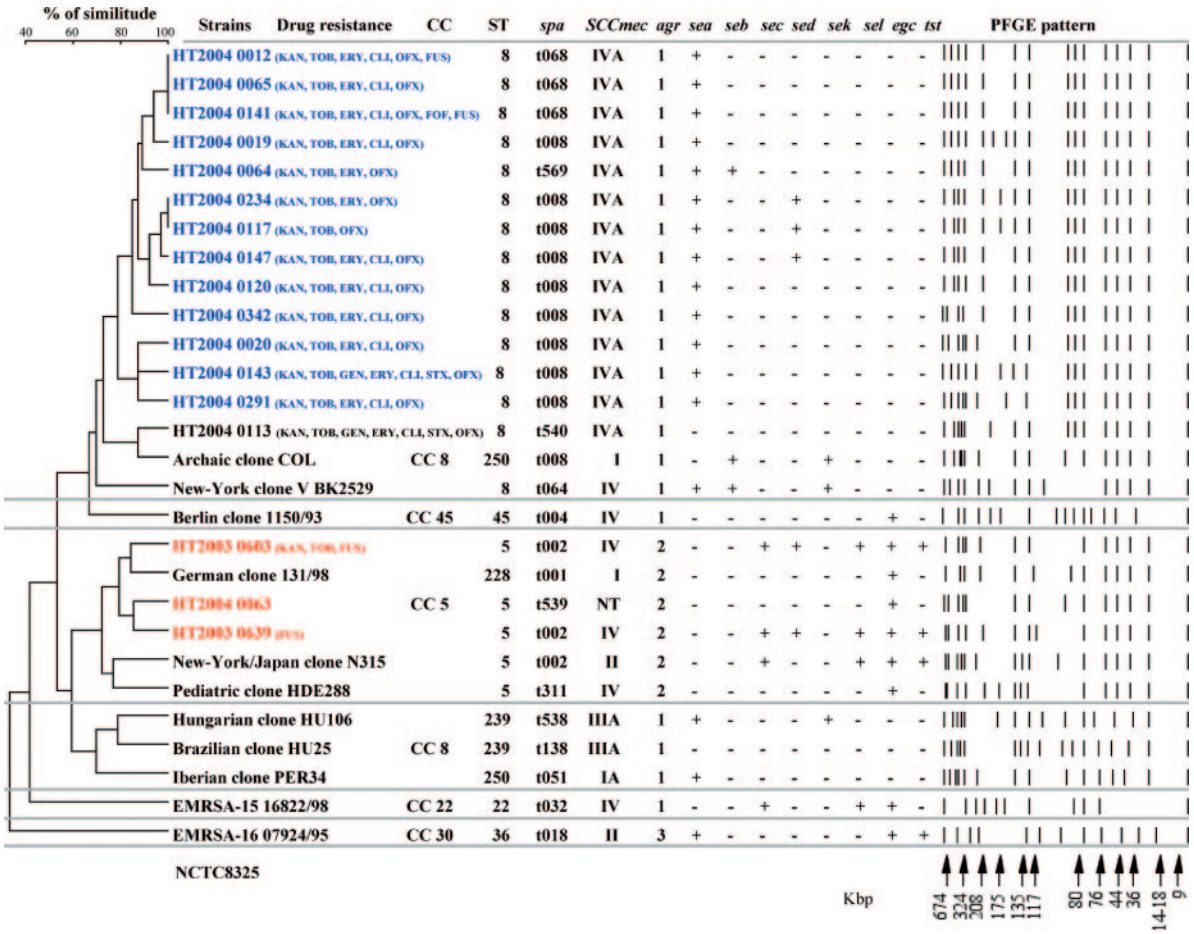


FIG. 1. Dendrogram constructed from the schematic representation of the pulsed-field gel electrophoresis types of pandemic MRSA clones and other MRSA isolates included in this study together with their genetic characteristics, such as ST, *spa* type, SCC*mec* type, *agr* allele group, and toxin gene content (*sea-sed*, staphylococcal enterotoxin A to D genes; *sel*, staphylococcal enterotoxin L gene; *egc*, enterotoxin gene cluster; *tst*, toxic shock syndrome toxin 1 gene). CCs were assigned according to the MLST database at http://www.mlst.net. Blue isolates correspond to the Lyon clone and red isolates to an emerging clone (3). Drug resistance is given in parentheses (KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; GEN, gentamicin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; OFX, ofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; FUS, fusidic acid; FOF, fosfomycin). NT, nontypeable. The fragment size (kb) of the reference strain NCTC8325 is indicated on the bottom line.

gentamicin-resistant Iberian clone was the major MRSA clone in the 1990s (11). Since 1992, French MRSA isolates have been increasingly susceptible to gentamicin, indicating a gradual decline of the Iberian clone (11).

MRSA clones have been characterized on the basis of several other characteristics. For instance, MRSA detected in Japan was shown to produce toxic shock syndrome toxin 1, a superantigenic toxin family member (7, 15). Moreover, Peacock et al. showed that the prevalence of the staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) was higher in invasive infections due to one of the MRSA clones (EMRSA-16) that predominate in the United Kingdom (14). Up to now, 18 superantigenic toxins have been described for *S. aureus* (7), but the distribution of the genes encoding superantigenic toxins is not known for all MRSA pandemic clones.

The aim of this study was to characterize the superantigenic gene content of the French and major pandemic MRSA clones. The study was conducted in three steps: (i) a local study characterizing MRSA isolates collected by blood culture in 2003 in intensive care units of Edouard Herriot Hospital in Lyon, France, permitting the recognition of the major MRSA clone; (ii) a nationwide study of the spread of the major clone identified in Lyon (designated the Lyon clone); (iii) a worldwide study comparing the characteristics and toxin gene content of the Lyon clone and the major pandemic MRSA clones.

All *S. aureus* isolates included in this study were identified by means of standard microbiological methods, and drug resistance was determined by using the Phoenix Automated Microbiology System (BD Biosciences). MRSA isolates were first genetically characterized by means of MLST as described by Enright et al. (4, 5). *spa* types were determined with the assistance of Ridom Staph Type software (Ridom GmbH, Würzburg, Germany [http://www.ridom.de/staphtype/]) (6). Pulsed-field gel electrophoresis patterns were prepared as previously described (17) and were digitized and analyzed with the Taxotron typing system (Institut Pasteur, France). The accessory gene regulator (*agr*) allele group (*1* to *4*), the presence of the *mecA* gene, and the toxin gene content were determined by multiplex PCR as previously described (8–10). The type of the staphylococcal chromosomal cassette

(SCC*mec*) was determined as described by Oliveira and de Lencastre (12).

In 2003, 17 MRSA blood isolates were collected at Edouard Herriot Hospital in Lyon, France. They belonged to a major lineage, designated sequence type 8 (ST8) (14 isolates), and a minor lineage, designated ST5 (3 isolates). Clone ST8, named the Lyon clone, included 13 of the 14 ST8 isolates. This clone shared ST8 within the CC8, *spa* type t008 or a minor variation of *spa* type t008 (t068 or t569, as shown in Table 1), *agr* allele type 1, the *sea* gene, the leucocidin *lukE-lukD* genes, the hemolysin *hlgv* gene, and the SCC*mec* type IVA cassette. The staphylococcal enterotoxin B and D genes (*seb* and *sed*) were not detected in all of the isolates. Almost all of the Lyon clone isolates were resistant to penicillin, oxacillin, kanamycin, tobramycin, erythromycin, and ofloxacin. One ST8 isolate (HT20040113) was not considered to belong to the Lyon clone, owing to the multiple variations of the *spa* type and to the absence of the *sea* gene (Table 1). Two of the three ST5 MRSA isolates contained the *tst* gene and corresponded to an emerging MRSA clone related to the New York/Japan (NY/J) clone (3).

Since our multiplex PCR method based on the detection of more than 15 virulence factor genes and the *agr* gene regulator reveals the genetic background of a given strain (9), we considered that hospital-acquired MRSA strains sharing the *agr-1*, *sea*, *lukE-lukD*, and *hlgv* genes potentially belonged to the Lyon clone. To evaluate the spread of the Lyon clone throughout France, we analyzed the 2001 to 2005 database of the French National Reference Center for staphylococci, excluding Panton-Valentine-leucocidin-positive MRSA isolates, which belong to community-acquired MRSA clones. We selected 320 Panton-Valentine-leucocidin-negative MRSA isolates, of which 165 (51.6%), from 20 French towns, matched the characteristics of the Lyon clone. Thirty-two of these isolates were fully characterized by MLST and *spa* typing. They were ST8 and had an SCC*mec* cassette of type IVA (except for two strains, which had an SCC*mec* cassette of type IV) and *spa* type t008, t024, t068, t121, t569 or t681 (all considered minor variants of the major *spa* type t008, differing by a single repeat [t024, t068, t121, and t681] or two repeats [t569]), confirming that they belonged to the Lyon clone. This suggests that the Lyon clone is present throughout France.

We then compared the characteristics of the Lyon clone with those of other pandemic MRSA clones (Fig. 1). The Lyon clone and New York clone V belonged to CC8, were ST8, and had an *agr* type 1 allele, a similar toxin gene profile, and related *spa* types. Other MRSA clones of CC8 had an *agr-1* allele. The *sea* gene was also detected in representatives of the Iberian and Hungarian clones. All representatives of MRSA clones belonging to CC5, CC22, and CC45 shared the enterotoxin gene cluster locus (*egc*) encoding five superantigenic enterotoxin genes (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, and *seo*) and occasionally the *tst* gene. The representative strain of the EMRSA-16 clone, which represents CC30, shared both the *sea* gene and the *egc* locus. The Brazilian clone was the only clone that lacked all of the tested superantigenic toxin genes. Note that all strains of the same CC had the same *agr* allele [*1*, *2*, or *3*].

In conclusion, the Lyon clone is detected all over France and is related to other pandemic MRSA clones that share the *sea* gene. With the exception of the Brazilian clone, all pandemic MRSA clones contain at least one gene encoding a superantigenic toxin. Superantigenic toxins could partly account for the virulence of hospital-acquired MRSA infections.

We thank H. de Lencastre, A. Tomasz, and J. Perry for kindly providing pandemic MRSA reference strains; Christine Gardon, Christine Courtier, and Céline Spinelli (Centre National de Référence des Staphylocoques) for their technical support; and David Young for editorial assistance.

REFERENCES

1. **Astiz, M. E., and E. C. Rackow.** 1998. Septic shock. Lancet **351:**1501–1505.
2. **Brun-Buisson, C., P. Meshaka, P. Pinton, and B. Vallet.** 2004. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. Intensive Care Med. **30:**580–588.
3. **Durand, G., M. Bes, H. Meugnier, M. C. Enright, F. Forey, N. Liassine, A. Wenger, K. Kikuchi, G. Lina, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2006. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxic shock syndrome 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J. Clin. Microbiol. **44:**847–853.
4. **Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **38:**1008–1015.
5. **Enright, M. C., and B. G. Spratt.** 1999. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol. **7:**482–487.
6. **Harmsen, D., H. Claus, W. Witte, J. Rothganger, D. Turnwald, and U. Vogel.** 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J. Clin. Microbiol. **41:**5442–5448.
7. **Holtfreter, S., and B. M. Broker.** 2005. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsaw) **53:**13–27.
8. **Jarraud, S., G. Cozon, F. Vandenesch, M. Bes, J. Etienne, and G. Lina.** 1999. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. J. Clin. Microbiol. **37:**2446–2449.
9. **Jarraud, S., C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, and F. Vandenesch.** 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect. Immun. **70:**631–641.
10. **Jarraud, S., M. A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougel, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville, and G. Lina.** 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J. Immunol. **166:**669–677.
11. **Lelièvre, H., G. Lina, M. K. Jones, C. Olive, F. Forey, M. Roussel-Delvallez, M. H. Nicolas-Chanoine, C. M. Bébéar, V. Jarlier, A. Andremont, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Emergence and spread in French hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamycin and other antibiotics. J. Clin. Microbiol. **37:**3452–3457.
12. **Oliveira, D. C., and H. de Lencastre.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **46:** 2155–2161.
13. **Oliveira, D. C., A. Tomasz, and H. de Lencastre.** 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect. Dis. **2:**180–189.
14. **Peacock, S. J., C. E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill, and N. P. Day.** 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. **70:** 4987–4996.
15. **Piao, C., T. Karasawa, K. Totsuka, T. Uchiyama, and K. Kikuchi.** 2005. Prospective surveillance of community-onset and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a university-affiliated hospital in Japan. Microbiol. Immunol. **49:**959–970.
16. **Robinson, D. A., and M. C. Enright.** 2003. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**3926–3934.
17. **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:**2233–2239.

IV. 3. 2. Cinquième publication :

"Virulence properties of MRSA Lyon clone isolates responsible for bloodstream infections"

Hatice Karauzum #, Tristan Ferry #, Gerard Lina, Sophie de Bentzmann, Francois Vandenesch, Regine Landmann, Jerome Etienne (# Contribution égale)

Article soumis le 6 mars 2007, en cours de révision depuis le 1er juin 2007.

Infection and Immunity

La plus grande virulence des SARM par rapport aux SASM est débattue dans la littérature. Le but de cette étude était d'analyser la virulence du clone Lyon, en s'affranchissant des facteurs confondants liés à l'hôte qui limitent considérablement l'interprétation des études cliniques.

Pour cela, nous avons comparé dans un modèle *in vitro* d'adhésion et dans un modèle animal de sepsis avec bactériémie chez la souris, la virulence du clone Lyon avec celle de SASM. Tous les isolats étaient responsables de bactériémies pendant la même période de temps (2003) et sur la même zone géographique (Hôpital Edouard Herriot). *In vitro*, les capacités d'adhésion des isolats représentatifs du clone Lyon étaient supérieures aux SASM alors que l'analyse des gènes codant les MSCRAMMs n'a pas montré de différence significative. *In vivo*, la mortalité induite par les isolats représentatifs du clone Lyon était significativement plus importante que celle induite par les SASM. Cette plus grande virulence pourrait être liée à la capsule de type 5 (les isolats représentatifs du clone Lyon possédaient une capsule de type 5 alors que 60% des SASM possèdent une capsule de type 8), à la production SEA (aucun des SASM ne possédait le gène codant SEA), et/ou à des meilleurs capacités de multiplication. Toutefois, les résultats obtenus avec les isolats représentant le clone Lyon étaient hétérogènes en termes de capacité d'adhésion (voir l'annexe I), en termes de mortalité induite chez la souris, en termes d'expression de la résistance à la méticicilline, et en termes de production d'alpha-toxine.

Le succès du clone Lyon pourrait être lié à une plus grande capacité d'adhésion par rapport aux SASM mais aussi à une plus grande virulence, dont l'origine est probablement multifactorielle.

Virulence properties of Lyon clone MRSA isolates responsible for bloodstream infections

Hatice Karauzum [1]# *, Tristan Ferry [2]#, Gerard Lina [2], Sophie de Bentzmann [3], Francois Vandenesch [2], Regine Landmann [1] and Jerome Etienne [2]

[1] Division of Infectious Diseases, Department of Research, University Hospital, Basel, Switzerland.

[2] INSERM U851, Université Lyon 1, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté de Médecine Laennec, Lyon F-69008 France.

[3] Unité Propre de Recherche 9027, Laboratoire d'Ingenierie des Systemes Macromoléculaires, Marseille, France.

# H.Karauzumand T.Ferry contributed equally to this study

Short title: Virulence properties of Lyon clone MRSA isolates

*corresponding author:

Hatice Karauezuem

Hebelstrasse 20, 4031 Basel

Department of Research, University Hospital Basel

E-mail: Hatice.Karauezuem@unibas.ch

Phone: 0041 (0) 61 265 23 66; Fax: 0041 (0) 61 265 23 50

Abstract

Studies of the comparative virulence of MRSA and MSSA strains causing human bacteremia are hampered by confounding factors. The Lyon clone of MRSA, a pandemic clone belonging to clonal complex 8, may have specific adhesive and virulence properties.

We compared the virulence properties of MRSA Lyon clone and MSSA isolates responsible for human bloodstream infections. Adhesive properties were determined by examining the adhesin gene content and adhesion to human airway epithelial cells (HAECs). In vitro growth rates and relative fitness were measured. Virulence properties were characterized *in vitro* by determining the capsular type, the toxin gene content and toxin production, and in vivo by measuring virulence in a murine sepsis model.

MRSA Lyon clone isolates exhibited more avid adhesion to HAECs and caused significantly higher mouse mortality than MSSA after infection with low inocula (< 2.4 x 10^7 CFU). Lyon clone isolates had heterogeneous virulence properties despite having the same genetic background. No specific virulence factor was found to be related to mortality in mice.

High adhesion and high virulence of the Lyon clone may contribute to its dissemination in France, but were not correlated with any intrinsic bacterial characteristics.

Introduction

Staphylococcus aureus causes a wide variety of community-acquired and healthcare-associated infections (20). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), first detected in 1961, arose through the acquisition of the SCC*mec* element bearing the *mec*A gene. Most MRSA strains associated with hospital-acquired infections belong to five lineages corresponding to five clonal complexes designated CC1, CC5, CC8, CC30 and CC45 (32) (29). We recently described and characterized the healthcare-associated MRSA clone predominating in French hospitals, and named it the Lyon clone. This clone belongs to clonal complex 8 and is responsible for significant morbidity and mortality among bacteremic patients in intensive care units (ICU) (12).

It is unclear whether or not SCC*mec* acquisition affects *S. aureus* virulence. The adhesive properties of *S. aureus* are associated with patient colonization, inter-human dissemination, and the first step of infection (20) (13). Dissemination is promoted by successful adhesion, as shown for the epidemic Brazilian clone (CC8), which exhibits more avid adhesion than non epidemic MRSA and MSSA isolates (1).

Acquisition of a resistance determinant can result in reduced fitness; for example, MRSA with high-level methicillin resistance show a drastic reduction in their initial growth rate *in vitro* relative to the parental MSSA strain (10). Studies of MRSA virulence in humans are impaired by confounding factors. Some clinical studies have shown higher morbidity and mortality in MRSA bacteremia than in MSSA bacteremia, while others have shown no such difference (5) (23) (37). Some reports mix data on pandemic MRSA clones with data on non epidemic MRSA strains, which differ in their virulence properties. Furthermore, the patients included in previous studies had a variety of underlying disorders directly affecting their outcome; in particular, MSSA

infections are most often community-acquired in patients without comorbidity, while they are usually healthcare-associated in patients with comorbidity. It is not known whether different MRSA isolates belonging to the same clone (i.e. having same genetic background) have identical virulence properties. Animal models are useful for such studies, as they allow host factors and treatment to be documented and controlled.

The aims of this study were: (1) to compare the virulence properties of MRSA isolates belonging to the Lyon clone with those of MSSA isolates; and (2) to determine whether all Lyon clone isolates have identical virulence. MRSA and MSSA were thus compared with respect to their in vitro characteristics, including their adhesive and growth properties and toxin production, and their virulence in a murine sepsis model.

Material and methods

Patients and *S. aureus* isolates. A survey of patients with *S. aureus* bloodstream infection was conducted from 1 January through 31 December 2003 in ICUs of Hôpital Edouard Herriot, a 1100-bed university hospital located in Lyon, France. Bloodstream infection and septic shock were defined as described elsewhere (4). *S. aureus* isolates were identified by means of standard microbiological methods, and the oxacillin MIC was determined by using E-test band strips (AB Biodisk, Solna, Sweden), the results being read after 24 and 48 hours of incubation. Population analysis profiles (PAPs) were determined as previously described (10). Capsular typing was based on serotyping and PCR as previously described (40) . Each isolate was genetically characterized by means of accessory gene regulator (*agr*) allele grouping (1-4), adhesin gene profiling (*fib*, *cna*, *fnbA*, *fnbB, clfA*, *clfB* and *bbp)*, toxin gene content (*tst*; staphylococcal enterotoxins *sea, seb, sec, sed, see, seh, sek, sel, sem, seo*; leukocidins *lukD-lukE*, *lukM, lukS*-PV*, lukF*-PV*; hlg*, and *hlgv*), multilocus sequence typing, and *spa* typing. MRSA isolates were also characterized by the type of SCC*mec* (18) (17) (11) (36) (28). MRSA belonging to the Lyon clone (*agr* 1 allele, positive for the *sea*, *lukE-lukD* and *hlgv* genes, ST8, *spa* type t008 or relatives) were selected as previously described (12). Delta-toxin production was determined in an agar plate assay testing synergy with a beta-toxin reference strain as previously described (33). Production of alpha-toxin was determined by incubating the strains overnight on sheep blood agar plates at 37°C. Superantigen expression was measured by using the RIDASCREEN SET A, B, C, D and E (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

Determination of adhesive properties. The adhesion of MRSA Lyon clone and MSSA isolates to human airway epithelial cells (HAECs) was determined as previously described (7). The number of adherent bacteria per cell was averaged for at least 30 cells per strain.

Doubling time. The bacterial doubling time was determined as previously described, with minor modifications (10). Overnight cultures were diluted 1:100 in 5 ml of BHI medium and grown on for 3 h at 37°C with shaking (180 rpm). These cultures were seeded at 1:100 dilution and a 1:4 culture-to-flask ratio, then incubated at 37°C and 180 rpm for 4 h. Optical density (OD) was measured every 30 min for 4 h. Values were converted into $\log_2$ values and the doubling time was calculated as the reciprocal of the slope.

Relative fitness of MRSA isolates. Relative fitness was determined as previously described (3) with minor modifications. Briefly, strains were pre-cultured on blood agar at 37°C aerobically overnight. Each strain was then grown aerobically at 37°C in tryptic soy broth (TSB) for 6 h to reach an OD_{600nm} of 1.5. Mixed growth competition assays were performed with study isolates and the strain 8325-4, a derivative of NCTC 8325 cured from prophages (27), by inoculating 10^6 CFU of each strain in 10 ml of TSB and by monitoring growth at 37°C for 18 h with shaking. CFU were counted at the beginning and end of the incubation period by plating serial dilutions on TS agar plates. Control strain 8325-4 and MRSA colonies were distinguished by their white and yellow color, respectively. The number of generations (*G*) of the competing strains was calculated with the formula (log *B* – log *A*)/log2, where *A* and *B* are the number of CFU per ml at the beginning and end of the culture period,

respectively. The relative fitness of the MRSA strains was determined as $G_{strain}/G_{8325\text{-}4}$. The experiments were performed in quadruplicate.

Animal model

Intravenous challenge. Mice were kept in specific-pathogen-free conditions in the Animal House of the Department of Research, University Hospital Basel. All experiments conformed to Swiss veterinary law.

Each bacterial strain was grown freshly from frozen stock cultures (-70°C) prepared using the Microbank system (Pro Lab Microbank Bacterial Preservation System Green, Basel, CH). One cryoculture bead per strain was incubated in 1 ml of brain-heart infusion (BHI) broth (BBL Becton Dickinson, Maryland) for 7 h at 37°C. Cultures were then diluted 1:100 in 5 ml of BHI and incubated overnight at 37°C. The bacteria were then centrifuged at 4000 *g* for 10 min, and the pellet was washed twice and resuspended in pyrogen-free 0.9% NaCl before use.

Female C57Bl/6 mice 6-8 weeks old were inoculated with $2x10^6$ - $4x10^8$ CFU via the caudal vein. In order to evaluate the influence of the size of the inoculum, mice were injected with a low ($2x10^6$ - $2.4x10^7$ CFU) and a high (>$2.4x10^7$ - $4x10^8$ CFU) inoculum. The volume of the inoculum was 200 µl. Control mice were injected with 200 µl of 0.9% saline.

The mice were monitored for eight days. Weight changes, clinical severity and vital outcome were determined 1, 2, 5 and 8 days after infection. Clinical severity was assessed by using the following scoring system: 0 = normal activity, 1 = trembling, convulsion, 2 = piloerection, decreased activity, 3 = constrained movements, strongly decreased activity, 4 = no movement. The mice were killed by intraperitoneal injection of 100 mg/kg pentobarbital (Abbott Laboratories) when they reached a score of 4.

Surviving mice were sacrificed on day 8 after infection and the bacterial load in blood and organs was determined. Blood was taken by cardiac puncture and plated in several dilutions on BHI agar plates; CFU were counted after overnight incubation at 37°C. The kidneys, knees and brain were weighed, homogenized with a Polytron PT 1200C (Kinematica AG Littau, Switzerland) in 1 ml pyrogen-free 0.9% saline and plated at several dilutions on BHI agar plates. CFU were determined after overnight incubation at 37°C.

Data analysis. Data were analyzed with SPSS and Graph Pad Prism 4 software. Categorical data were analyzed with Fisher's exact test. Continuous variables were compared by using the Mann-Whitney U test. *P* values < 0.05 were considered to denote statistical significance. Survival differences between mice challenged with MRSA and MSSA were analyzed with the Kaplan-Meier method and the log-rank test.

Results

Clinical data and bacterial isolates

During the survey, 36 patients were diagnosed with *S. aureus* bloodstream infections. Nineteen cases were due to MSSA; 10 of these 19 patients had septic shock at admission, and 11 died before day 28. Genetic analysis of the 19 MSSA isolates revealed that they had heterogeneous genetic backgrounds, reflected by diverse sequence types (ST1, ST5, ST8, ST15, ST25, ST34, ST45, ST97, ST217, ST463, ST464 and ST465). The other 17 cases were due to MRSA, of which 13 belonged to the Lyon clone and were included in the study. Seven of the 13 patients had septic shock at admission and five died before day 28**.**

Comparative adhesive properties of MRSA Lyon clone and MSSA isolates

As the MRSA Lyon clone is epidemic, we postulated that its dissemination might be related to specific adhesive properties. We therefore screened the isolates for adhesin genes and measured their adherence to cultured airway epithelial cells. Adhesion, expressed as CFU/epithelial cell, was more homogeneous among MSSA isolates than among MRSA isolates, and MRSA isolates were significantly more adherent than MSSA isolates (*P* = 0.0015, Fig.1; median MRSA- (IRQ) = 68.75 (44.65- 95.88) and median MSSA- (IRQ) = 34.80 (21.80- 48.00)). MRSA isolates were all positive for *eno*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *fnbA* and *fnbB*. MSSA isolates were all positive for *eno*, *clfA*, *clfB* and *fnbB*, and some were positive for other adhesin genes (details not shown). Hence, despite their similar adhesin gene profiles, MRSA Lyon isolates adhered more efficiently to HAECs than did MSSA isolates.

Comparative resistance and growth of MRSA Lyon clone and MSSA isolates

We then selected 10 MRSA Lyon isolates and 10 MSSA isolates for further analysis. As acquisition of drug resistance leads to slower growth in vitro (as shown for MRSA SCC*mec* type I (10)), we compared the resistance and growth of these MRSA and MSSA isolates *in vitro*. The Lyon clone isolates had a low level of resistance to oxacillin (MICs for the 10 isolates ranged from 1.5 to 32 µg/ml), while population analysis profiles showed heterogeneous resistance (50-250 µg/ml) (Table 1). The doubling times of MRSA and MSSA isolates, measured during the exponential growth phase, were not significantly different (31 min and 29 min, respectively; P = 0.075, Table 1). In a competition assay, based on the post-exponential growth ratio of MRSA (n = 9) and MSSA (n = 10) relative to strain 8325-4, MRSA were fitter than MSSA (P = 0.022, Table 1).

Comparative virulence of MRSA Lyon clone and MSSA isolates in a murine sepsis model

Ten MRSA Lyon clone isolates and 10 MSSA isolates were compared in the mouse sepsis model. Mice were infected with 10 MRSA and 10 MSSA using a low- (2 x 10^6 to 2.4 x 10^7 CFU) or a high-level inoculum (>2.4 x 10^7 to 4 x 10^8 CFU). The mortality rates associated with low-level MRSA and MSSA infection were significantly different: 22.92% (11/48) of mice were killed by MRSA, and 2.44% (1/41) by MSSA (P = 0.006; Fig. 2A). The difference was less marked among mice, challenged with high-level inocula of 10 MRSA and 10 MSSA: 47.73% (21/44) of mice were killed by MRSA, and 29.09% (16/55) by MSSA (P = 0.072; Fig. 2B). From a total of 188 mice (5-10 mice/group) 177 mice (94%) developed signs of infection.

Surviving mice were monitored for weight loss and disease severity for eight days. Both parameters were inoculum-dependent but neither differed between MRSA and MSSA. Weight loss reached a maximum of 13% of body weight five days after challenge with the low-level inocula and 25% eight days after challenge with the high-level inocula. After challenge with inocula ≤ 2.4 x 10^7 CFU, MRSA tended to induce more severe disease than MSSA (data not shown).

Bacterial load was determined in blood and organs of surviving mice after eight days of infection. No difference could be observed between mice infected with high or low inocula of MRSA and MSSA (data not shown).

Individual MRSA and MSSA isolates caused variable lethality. The variable virulence of MSSA isolates may have been due to their heterogeneous genetic background. No link was found between virulence factors and strain lethality (Fig. 3).

Virulence determinants of MRSA Lyon clone isolates

MRSA isolates with the same genetic background had variable lethality in the mouse model. Three of the 10 MRSA isolates tested were never fatal, two were fatal only at inocula > 2.4 x 10^7 CFU and five were fatal already at inocula ≤ 2.4 x 10^7 CFU (Fig. 3). To identify a possible relationship between MRSA virulence determinants and mouse lethality, we examined the mortality rates according to the capsular type, fitness, *agr* locus function (reflected by alpha and delta-toxin production), toxin-encoding genes, and toxin production *in vitro*. Despite their different virulence in mice, all 10 MRSA Lyon clone isolates expressed CP 5, shared the *agr* type 1 allele, were positive for the *sea* gene and produced SEA *in vitro*. All isolates were negative for *sec, sel, sep* and *egc.* All were positive for the *lukD*-*lukE* genes (Fig. 3) and negative for the *lukM* and *lukS*-PV-*lukF*-PV genes (data not shown). Isolates with delta-toxin activity produced alpha-toxin in vitro and were associated with a high mortality rate in mice. Two of the isolates inducing a high mortality rate without delta-toxin activity were positive for the *sed* gene and its protein (Fig. 3). No correlation was found between fitness *in vitro* and lethality in mice.

Discussion

In this study we found that, relative to non clonal MSSA isolates, MRSA isolates belonging to the Lyon clone (the main clonal population of MRSA prevailing in a large French hospital) collectively exhibited more efficient adhesion to airway epithelial cells in vitro, higher growth rates in a competitive assay, and stronger virulence in a mouse sepsis model. Nevertheless the properties of each single MRSA Lyon clone isolate were variable.

The Lyon clone MRSA isolates showed a heterogeneous low level of resistance to oxacillin. Acquisition of the SCC*mec* type I element has previously been shown to slow the *S. aureus* doubling time in vitro (10). However, in the present study, we found that MRSA and MSSA isolates had similar doubling times, possibly indicating that a potential initial fitness burden (21) due to SCC*mec* acquisition was overcome by compensatory mutations, or that only clones retaining rapid growth survived (2) (22). When grown in competition with a reference strain, the MRSA isolates were fitter than the MSSA isolates, but no relationship was found between this relative fitness and lethality in the sepsis model.

The MRSA Lyon clone isolates adhered more efficiently than the MSSA isolates to HAECs. Similar results have been reported for the Brazilian clone (1). In addition, a Canadian epidemic MRSA clone was found to exhibit efficient fibronectin binding (30). In contrast, Vaudaux et al. found that introduction of the SCC*mec* element into MSSA reduced their adhesion to immobilized fibrinogen and fibronectin (39). Likewise, Savolainen et al. showed that the *pls* gene, which is a part of SCC*mec* type I, was associated with reduced adhesion to fibronectin-coated surfaces (34) and that PLS-expressing MRSA were more virulent than the isogenic *pls* knockout mutant in a murine model of septic arthritis (19). Our isolates, being SCCmec type IV, were *pls*-

negative. These studies, together with our observation that all the MRSA isolates and all but two MSSA isolates harbored the same six adhesin genes (out of nine tested), indicate that components other than ClfA, ClfB, FnbA and FnbB enhance the epithelial adherence of MRSA relative to MSSA. Even if SCC*mec* is not considered to be a pathogenicity island, as it does not contain genes associated with virulence (16), our results suggest that its presence may nonetheless enhance virulence.

In the sepsis model the MRSA Lyon clone isolates killed more mice than the MSSA isolates, especially when a “low-level” inoculum was used. This lethal effect of low doses may be an inherent virulence feature of MRSA. In contrast, Mizobuchi et al. compared the virulence of 13 highly resistant MRSA and 7 MSSA isolated from patients with various clinical syndromes (24) and found that MRSA were less virulent than MSSA; however, it is noteworthy that the strains were not genetically characterized. Peacock et al. found that a strain belonging to an epidemic MRSA clone showed similar lethality to three clinically significant MSSA strains after intraperitoneal or intravenous inoculation to mice (31).

Our comparative study of MRSA and MSSA infection in mice is undermined by the genetic heterogeneity of the MSSA isolates tested. Therefore the analysis of virulence factors contributing to mortality was focused on MRSA isolates, which had a homogeneous genetic background but a heterogeneous outcome: some isolates being lethal for mice some not.

Capsular polysaccharides also contribute to staphylococcal virulence. Most clinical *S. aureus* isolates have serotype 5 (CP5) or serotype 8 (CP8) capsules. By comparing the biological activities of isogenic mutants with CP5, CP8 or no capsule in a mouse model, Watts et al. showed that CP5-positive strains were more virulent than both CP8-positive strains and CP-negative strains (42). We found no correlation

between CP5 and mouse lethality. Among the MRSA tested here, all of which were CP5-positive, three strains were non lethal for mice.

When interpreting our mouse lethality data it is important to remember that mice are susceptible to certain virulence determinants (hemolysin, leukocidin, etc.), but are less susceptible than men to superantigenic toxins. Mouse susceptibility to these toxins can be enhanced by D-galactosamine administration (8) (35). We had previously assumed that SEA was involved in the pathogenesis of *S. aureus* septic shock, as we had found that *sea* was more frequent in blood isolates from patients with septic shock than from patients without septic shock (13). However, all 10 Lyon clone isolates tested here harbored the *sea* gene and produced SEA *in vitro*, but three isolates were non lethal for mice, suggesting that SEA is not a major MRSA virulence factor. In contrast, Nilsson et al. demonstrated that vaccination with genetically modified SEA lacking superantigenic properties conferred protection in a non sensitized mouse model of sepsis induced by an *S. aureus* strain expressing *sea* in vitro (26). The *sea* gene has been detected in several pandemic MRSA clones (CC8 and CC30) (12). Recently, Diep et al. demonstrated that horizontal transfer of virulence genes such as *sea* was epidemiologically associated with the emergence of new virulent strains of both hospital- and community-acquired MRSA (9).

Five of the 10 MRSA isolates tested here produced alpha-toxin and harbored genes encoding gamma-toxin and lukED leukocidin. Alpha-toxin has been shown to cause epithelial damage in a model of corneal and tracheal staphylococcal infection (6) (14). In addition, in a rat model of heart failure, alpha-toxin provoked coronary vasoconstriction and cardiodepression, both of which can occur in the course of sepsis (15). Gamma-toxin had a pro-inflammatory effect in a rabbit endophthalmitis model (38). However, only alpha- and gamma-toxin jointly promoted *S. aureus*

virulence in a septic arthritis model (25). *LukED* genes, which are highly prevalent in clinical *S. aureus* isolates, were detected significantly more frequently in isolates responsible for bacteremia (41). Thus, toxins may play an important role in local infection, whereas there is no firm evidence that alpha toxin, gamma-toxin or *lukED* is directly involved in septic shock.

Agr was not functional in five of our MRSA isolates, as shown by their failure to produce alpha-toxin in vitro. This *agr* dysfunction, associated with the loss of alpha-toxin production, has already been reported for the epidemic MRSA clone in Canada (30). Our five isolates were all *lukED*-positive and two were lethal in mice. Only these two isolates were positive for *sed* and expressed SED *in vitro*. *Sed* is usually associated with *sej* on the same plasmid. Whereas *sed* is regulated by the *agr* system, *sej* is not and isolates with a dysfunctional *agr* gene may produce SEJ in vivo (43). Moreover, production of multiple superantigenic toxins could enhance virulence by synergistic superantigenic activities (8). In our model, SEJ could be co-produced with SEA (which is not regulated by *agr* either), possibly contributing to the lethality of isolates with *agr* dysfunction.

In conclusion, we demonstrated that MRSA lyon clone isolates had higher adhesive properties *in vitro* and higher virulence properties than MSSA in a sepsis model *in vivo*. This global difference may be due to an overexpression of particular MSCRAMMs, the expression of the capsular type 5, a production of SEA and a higher growth property. However, we observed among MRSA isolates belonging to the Lyon clone a heterogenous expression of methicillin resistance, heterogeneous adhesive properties and heterogeneous production of alpha-toxin that limit the interpretation of the involvement of a single virulence factor in sepsis.

Acknowledgements

This work was supported by Swiss National Foundation grant 40-4940-106295/1 to R.L. We thank Michele Bes, Christine Courtier, Christine Gardon, Lys Mayor, Zarko Rajacic, Martine Rougier and Isabelle Verdier for technical assistance, and David Young for editorial assistance.

References:

1. **Amaral, M. M., L. R. Coelho, R. P. Flores, R. R. Souza, M. C. Silva-Carvalho, L. A. Teixeira, B. T. Ferreira-Carvalho, and A. M. Figueiredo.** 2005. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. J Infect Dis **192:**801-810.
2. **Andersson, D. I., and B. R. Levin.** 1999. The biological cost of antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol **2:**489-493.
3. **Besier, S., A. Ludwig, V. Brade, and T. A. Wichelhaus.** 2005. Compensatory adaptation to the loss of biological fitness associated with acquisition of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother **49:**1426-1431.
4. **Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, and W. J. Sibbald.** 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest **101:**1644-1655.
5. **Cosgrove, S. E., G. Sakoulas, E. N. Perencevich, M. J. Schwaber, A. W. Karchmer, and Y. Carmeli.** 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis **36:**53-59.
6. **Dajcs, J. J., B. A. Thibodeaux, D. O. Girgis, and R. J. O'Callaghan.** 2002. Corneal virulence of *Staphylococcus aureus* in an experimental model of keratitis. DNA Cell Biol **21:**375-382.

7. **de Bentzmann, S., A. Tristan, J. Etienne, N. Brousse, F. Vandenesch, and G. Lina.** 2004. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. J Infect Dis **190:**1506-1515.

8. **De Boer, M. L., W. W. Kum, L. T. Pang, and A. W. Chow.** 1999. Co-production of staphylococcal enterotoxin A with toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) enhances TSST-1 mediated mortality in a D-galactosamine sensitized mouse model of lethal shock. Microb Pathog **27:**61-70.

9. **Diep, B. A., H. A. Carleton, R. F. Chang, G. F. Sensabaugh, and F. Perdreau-Remington.** 2006. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis **193:**1495-1503.

10. **Ender, M., N. McCallum, R. Adhikari, and B. Berger-Bachi.** 2004. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother **48:**2295-2297.

11. **Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol **38:**1008-1015.

12. **Ferry, T., M. Bes, O. Dauwalder, H. Meugnier, G. Lina, F. Forey, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2006. Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones. J Clin Microbiol **44:**2642-2644.

13. **Ferry, T., T. Perpoint, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2005. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. Curr Infect Dis Rep **7:**420-428.

14. **Girgis, D. O., G. D. Sloop, J. M. Reed, and R. J. O'Callaghan.** 2005. Effects of toxin production in a murine model of *Staphylococcus aureus* keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci **46:**2064-2070.

15. **Grandel, U., U. Sibelius, J. Schrickel, D. Schmidt, M. Buerke, L. Fink, E. Bournelis, M. Heep, K. Mayer, R. M. Bohle, W. Seeger, and F. Grimminger.** 2001. Biosynthesis of constitutive nitric oxide synthase-derived nitric oxide attenuates coronary vasoconstriction and myocardial depression in a model of septic heart failure induced by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Crit Care Med **29:**1-7.

16. **Hiramatsu, K., Y. Katayama, H. Yuzawa, and T. Ito.** 2002. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol **292:**67-74.

17. **Jarraud, S., C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, and F. Vandenesch.** 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect Immun **70:**631-641.

18. **Jarraud, S., M. A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougel, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville, and G. Lina.** 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol **166:**669-677.

19. **Josefsson, E., K. Juuti, M. Bokarewa, and P. Kuusela.** 2005. The surface protein Pls of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in septic arthritis. Infect Immun **73:**2812-2817.

20. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med **339:**520-532.

21. **Maisnier-Patin, S., and D. I. Andersson.** 2004. Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. Res Microbiol **155:**360-369.

22. **McCallum, N., H. Karauzum, R. Getzmann, M. Bischoff, P. Majcherczyk, B. Berger-Bachi, and R. Landmann.** 2006. *In vivo* survival of teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* and fitness cost of teicoplanin resistance. Antimicrob Agents Chemother **50:**2352-2360.

23. **Melzer, M., S. J. Eykyn, W. R. Gransden, and S. Chinn.** 2003. Is methicillin-resistant Staphylococcus aureus more virulent than methicillin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteremia. Clin Infect Dis **37:**1453-1460.

24. **Mizobuchi, S., J. Minami, F. Jin, O. Matsushita, and A. Okabe.** 1994. Comparison of the virulence of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus.* Microbiol Immunol **38:**599-605.

25. **Nilsson, I. M., O. Hartford, T. Foster, and A. Tarkowski.** 1999. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. Infect Immun **67:**1045-1049.

26. **Nilsson, I. M., M. Verdrengh, R. G. Ulrich, S. Bavari, and A. Tarkowski.** 1999. Protection against Staphylococcus aureus sepsis by vaccination with

recombinant staphylococcal enterotoxin A devoid of superantigenicity. J Infect Dis **180:**1370-1373.

27. **Novick, R.** 1967. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. Virology **33:**155-166.

28. **Oliveira, D. C., and H. de Lencastre.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother **46:**2155-2161.

29. **Oliveira, D. C., A. Tomasz, and H. de Lencastre.** 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis **2:**180-189.

30. **Papakyriacou, H., D. Vaz, A. Simor, M. Louie, and M. J. McGavin.** 2000. Molecular analysis of the accessory gene regulator (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis **181:**990-1000.

31. **Peacock, J. E., Jr., D. R. Moorman, R. P. Wenzel, and G. L. Mandell.** 1981. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: microbiologic characteristics, antimicrobial susceptibilities, and assessment of virulence of an epidemic strain. J Infect Dis **144:**575-582.

32. **Robinson, D. A., and M. C. Enright.** 2004. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect **10:**92-97.

33. **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:**1492-1502.

34. **Savolainen, K., L. Paulin, B. Westerlund-Wikstrom, T. J. Foster, T. K. Korhonen, and P. Kuusela.** 2001. Expression of *pls*, a gene closely associated with the mecA gene of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, prevents bacterial adhesion in vitro. Infect Immun **69:**3013-3020.

35. **Schwan, W. R., M. H. Langhorne, H. D. Ritchie, and C. K. Stover.** 2003. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. FEMS Immunol Med Microbiol **38:**23-28.

36. **Shopsin, B., M. Gomez, S. O. Montgomery, D. H. Smith, M. Waddington, D. E. Dodge, D. A. Bost, M. Riehman, S. Naidich, and B. N. Kreiswirth.** 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol **37:**3556-3563.

37. **Soriano, A., J. A. Martinez, J. Mensa, F. Marco, M. Almela, A. Moreno-Martinez, F. Sanchez, I. Munoz, M. T. Jimenez de Anta, and E. Soriano.** 2000. Pathogenic significance of methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis **30:**368-373.

38. **Supersac, G., Y. Piemont, M. Kubina, G. Prevost, and T. J. Foster.** 1998. Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a hlg-deficient mutant of Staphylococcus aureus. Microb Pathog **24:**241-251.

39. **Vaudaux, P. E., V. Monzillo, P. Francois, D. P. Lew, T. J. Foster, and B. Berger-Bachi.** 1998. Introduction of the *mec* element (methicillin resistance) into *Staphylococcus aureus* alters *in vitro* functional activities of fibrinogen and fibronectin adhesins. Antimicrob Agents Chemother **42:**564-570.

40. **Verdier, I., G. Durand, M. Bes, K. L. Taylor, G. Lina, F. Vandenesch, A. I. Fattom, and J. Etienne.** 2007. Identification of the Capsular Polysaccharides in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates by PCR and Agglutination Tests. J Clin Microbiol **45:**725-729.

41. **von Eiff, C., A. W. Friedrich, G. Peters, and K. Becker.** 2004. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis **49:**157-162.

42. **Watts, A., D. Ke, Q. Wang, A. Pillay, A. Nicholson-Weller, and J. C. Lee.** 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. Infect Immun **73:**3502-3511.

43. **Zhang, S., J. J. Iandolo, and G. C. Stewart.** 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiol Lett **168:**227-233.

Table 1. Oxacillin MICs and growth properties of MRSA Lyon clone and MSSA isolates

	Isolates	Oxacillin MIC (µg/ml) [a]	Highest concentration of oxacillin (µg/ml) allowing MRSA growth [b]	Doubling time (min)	Relative Fitness [c] ± SD
MRSA Lyon clone	HT20040012	32	50	40	1.34 ± 0.02
	HT20040019	32	100	35	1.63 ± 0.1
	HT20040020	12	100	31	3.24 ± 0.6
	HT20040064	6	100	46	1.19 ± 0.1
	HT20040065	16	50	25	1.43 ± 0.06
	HT20040342	16	100	28	5.3 ± 0.9
	HT20040141	8	100	29	0.78 ± 0.02
	HT20040143	1.5	100	31	1.18 ± 0.03
	HT20040234	4	250	51	ND
	HT20040291	24	50	30	1.01 ± 0.08
MSSA	HT20040014	0.38		26	0.97 ± 0.08
	HT20040017	0.75		31	1 ± 0.06
	HT20040112	0.75		28	1.03 ± 0.01
	HT20040115	0.75		28	0.67 ± 0.01
	HT20040118	0.25		23	1.23 ± 0.07
	HT20040121	0.19		29	1.14 ± 0.06
	HT20040122	0.38		30	1.1 ± 0.18
	HT20040145	0.38		31	0.83 ± 0.04
	HT20040058	0.5		29	1.14 ± 0.06
	HT20040146	0.25		37	1.03 ± 0.01

[a] Oxacillin MICs determined by the E-test

[b] Oxacillin MICs determined by the population analysis profile method. Concentrations are shown at which growth was still detectable

[c] relative fitness determined in a competitive growth assay with reference strain 8325-4 (SD, standard deviation)

Fig.1

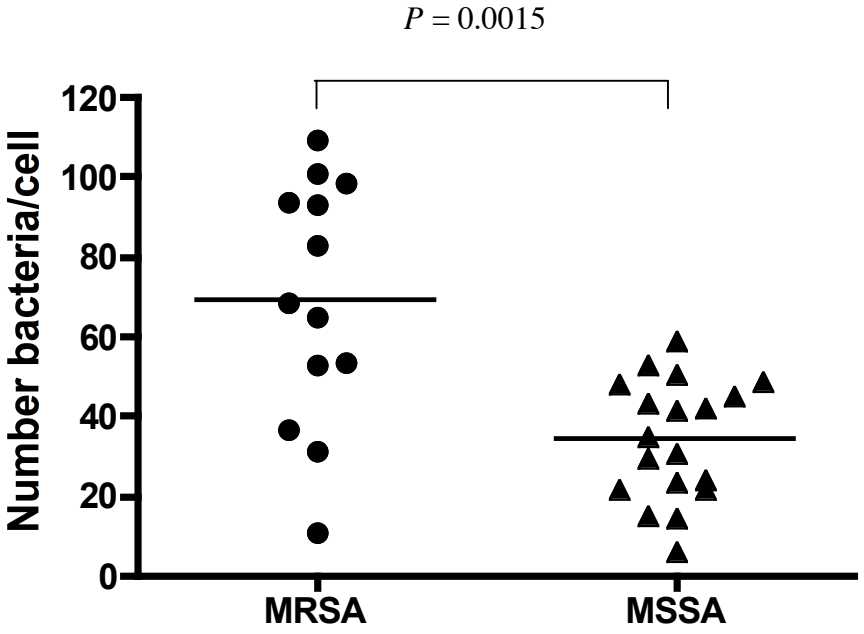


Fig.2 A

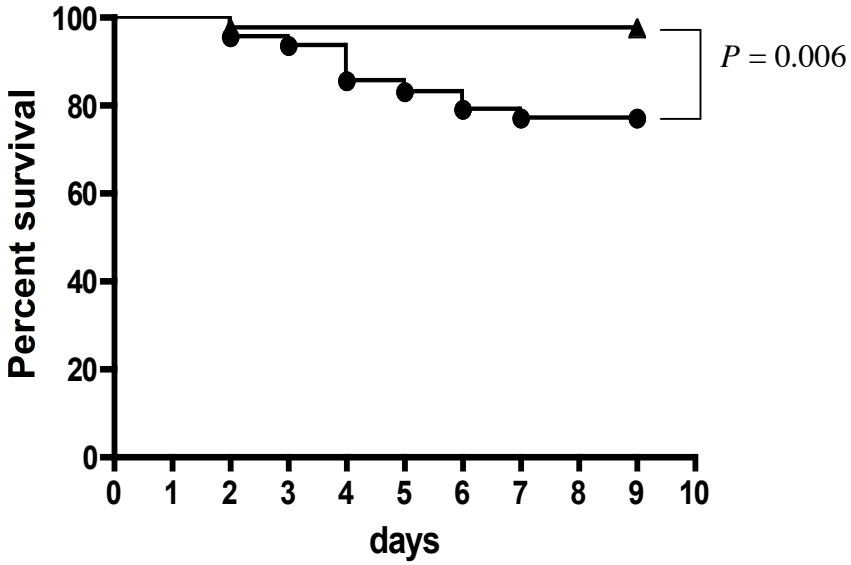

Percent survival
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
days
P = 0.006

Fig.2 B

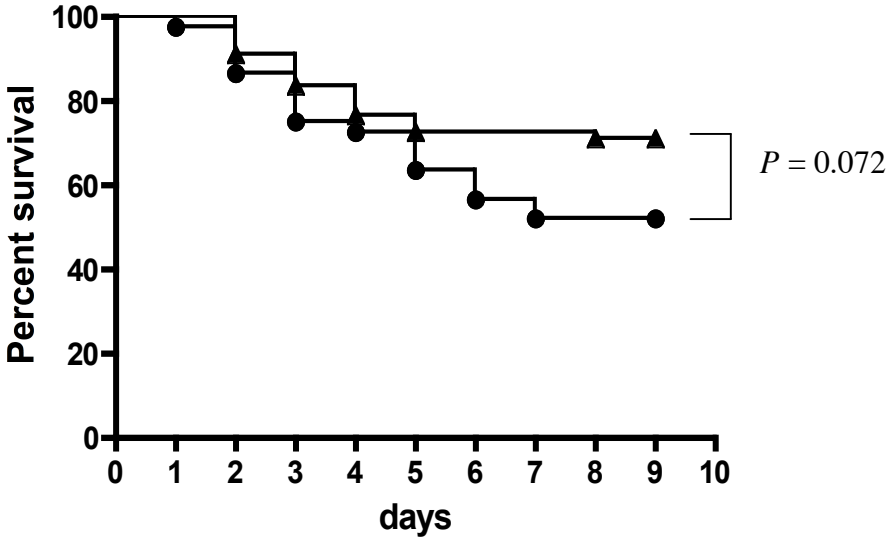
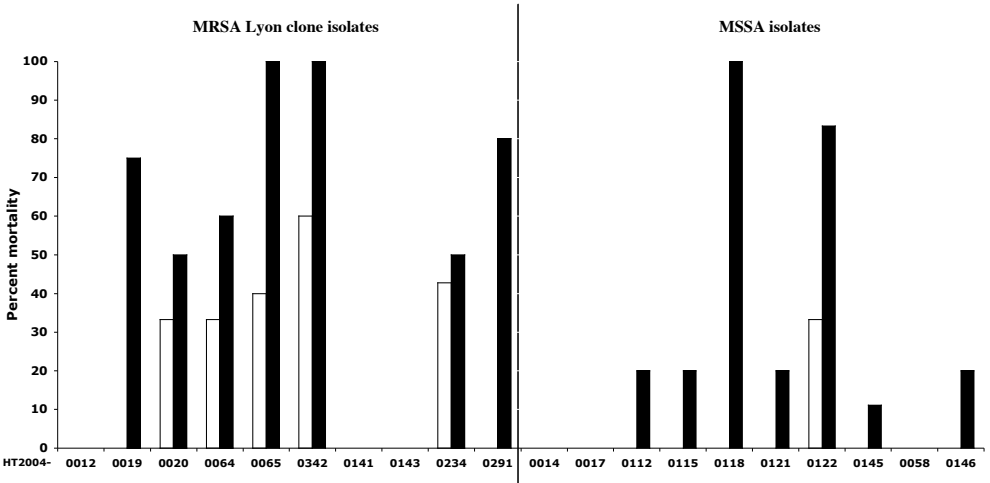

Percent survival
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
days
P = 0.072

Fig.3



HT2004-	0012	0019	0020	0064	0065	0342	0141	0143	0234	0291	0014	0017	0112	0115	0118	0121	0122	0145	0058	0146
Capsular type	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	8	8	8	5	5	8	5	8	5	8
***agr* type**	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2
***sea* / Production of SEA**	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
***sec* / Production of SEC**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
***sed* / Production of SED**	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
sel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
sep	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
egc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
lukED	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Delta-toxin activity	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Production of alpha-toxin	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Relative fitness	1.34	1.63	3.24	1.19	1.43	5.3	0.78	1.18	ND	1.01	0.97	1	1.03	0.67	1.23	1.14	1.1	0.83	1.14	1.03

Legends:

Figure 1. Adhesion of 13 MRSA isolates (●; IRQ = 68.75 (44.65-95.88)) compared to 19 MSSA (▲; IRQ = 34.80 (21.80-48.00)) on human airway epithelial cells (Mann-Whitney U Test, *P* =0.0015).

Figure 2. Percentage survival of mice infected with MRSA and MSSA

A) Survival of 48 and 41mice infected with low inocula (2 x10^6 to 2.4 x 10^7 CFU) of 10 MRSA isolates (**-●-**) and 10 MSSA isolates (**-▲-**) respectively (Log-rank test in Kaplan-Meier analysis, *P* = 0.006). 4 to 5 mice were infected with each strain.

B) Survival of 44 and 55 mice infected with high inocula (2 x10^6 to 2.4 x 10^7 CFU) of 10 MRSA isolates (**-●-**) and 10 MSSA isolates (**-▲-**) respectively (Log-rank test in Kaplan-Meier analysis, *P* = 0.072). 4 to 6 mice were infected with each strain.

Figure 3. Percentage lethality of MRSA Lyon clone and MSSA isolates in the mouse model of sepsis, with analysis of putative virulence factors of each isolate. White bars correspond to the percentage mortality rate among mice infected with the lowest inoculum (from 2 x10^6 to 2.40 x 10^7 CFU) and black bars correspond to the percentage mortality among mice infected with the highest inoculum (from > 2.40 x 10^7 to 4 x10^8 CFU).

IV. 4. Troisième partie : Mise en évidence d'une production d'exotoxine superantigénique *in vivo*

IV. 4. 1. Sixième publication :

"Detection of superantigenic toxin Vbeta T cell signatures during menstrual and non-menstrual staphylococcal toxic shock syndrome but not during S. aureus septic shock"

Tristan Ferry, Damien Thomas, Thomas Perpoint, Gerard Lina, Alain Lepape, Guillaume Monneret, Ismaël Mohammedi, Christian Chidiac, Dominique Peyramond, François Vandenesch, and Jerome Etienne

Article soumis 25 juillet 2007.

Journal of Infectious Diseases

La présence d'un gène codant une exotoxine superantigénique ne préjuge pas de sa production *in vitro*, et la production *in vitro* d'une exotoxine superantigénique ne préjuge pas de sa production *in vivo*.

Cette étude prospective réalisée en 2006 avait pour but de mettre en évidence une production d'exotoxine superantigénique *in vivo* au cours du CTS et au cours du choc septique à *S. aureus*. Pour cela, le premier objectif était de déterminer la signature Vbeta discriminante des exotoxines superantigéniques *in vitro*. Les isolats responsables de CTS et de chocs septiques produisaient des exotoxines superantigéniques *in vitro* et nous avons pu déterminer la signature discriminante de chacune d'entre elles afin de rechercher si celles-ci étaient produites *in vivo*. Au cours de trois CTS menstruels et de deux CTS non-menstruels, nous avons pu respectivement détecter la signature Vbeta discriminante de TSST-1 (Vbeta 2) et de SEB (Vbeta 3, Vbeta 14, Vbeta 17). Au cours de neuf chocs septiques à *S. aureus* (dont deux étaient liés au clone Lyon), aucune production d'exotoxine superantigénique n'a pu être mise en évidence, et ceci pourrait être lié à l'apoptose et/ou à l'anergie des lymphocytes T qui survient au cours du choc septique.

La mise en evidence d'une signature Vbeta discriminante précocement au cours d'un CTS (mais aussi au cours du choc toxique streptococcique, voir annexe II) permet de confirmer le diagnostic, permet de determiner quelle exotoxine est en cause, et permet de faciliter l'introduction des thérapeutiques antitoxiniques comme la clindamycine, le linézolide ou les immunoglobulines polyvalentes. Des investigations complémentaires sont necessaries pour démontrer l'implication des exotoxines superantigéniques au cours du choc septique à *S. aureus*.

Detection of superantigenic toxin Vbeta T cell signatures during menstrual and non-menstrual staphylococcal toxic shock syndrome but not during *S. aureus* septic shock

Tristan Ferry[1, 2, 3], Damien Thomas[1, 2], Thomas Perpoint[1, 2, 3], Gerard Lina[1,2], Alain Lepape[4], Guillaume Monneret[1,2,5], Ismaël Mohammedi[6], Christian Chidiac[3], Dominique Peyramond[3], François Vandenesch[1, 2], and Jerome Etienne[1, 2]

[1] INSERM U851, Lyon, F-69008 France

[2] Université Lyon 1, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté de Médecine Laennec, Lyon, F-69008 France.

[3] Department of Infectious and Tropical Diseases, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

[4] Surgical Intensive Care Unit, Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

[5] Immunology Laboratory, Hopital Neurologique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

[6] Department of Emergency and Medical Intensive Care, Edouard Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

Running Title: Staphylococcal septic and toxic shock

Abstract word count: 186 words

Text word count: 3289 words

Footnote page

(1) The authors contributing to this study state that they do not have any commercial or other association that might pose a conflict of interest.

(2) This study was supported by Pfizer Independent Grant 2005-0786.

(3) A small part of this study (results for five patients) has been presented at the 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 31 March - 3 April 2007, Munich, Germany (Abstract number O102).

(4) Corresponding author:

Tristan Ferry, MD

INSERM U851, Pathogénie des Staphylocoques, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France.

Phone: 33(0)-478-77-86-57; Fax: 33(0)-478-77-86-58

E-Mail: tristan.ferry@univ-lyon1.fr

Abstract

Background. Most clinical *S. aureus* isolates harbor genes encoding superantigenic toxins that bind the Vbeta domain of T cells, but little information is available on superantigenic toxin production during staphylococcal toxic shock syndrome (TSS) and septic shock.

Methods. We prospectively studied 14 patients with staphylococcal TSS or septic shock. We first determined the toxin gene profile of each isolate, and then used flow cytometry to identify the discriminant superantigenic toxin Vbeta signatures (DVbS*) in vitro*. Finally, we attempted to identify superantigenic toxin DVbS in the patients' blood.

Results. In vitro, the DVbS were as follows: TSST-1: Vbeta 2; SEA: Vbeta 9, 22; SEB: Vbeta 3, 14, 17; SED: Vbeta 1, 8; *egc*: Vbeta 5.3, 7.1, 9, 23; and SE*I*K: Vbeta 5.1. The DVbS of TSST-1 and SEB were detected in patients with menstrual and non-menstrual TSS, respectively, whereas no Vbeta signature was detected during septic shock.

Conclusion. Detection of a superantigenic toxin DVbS may help to show which toxin is produced during staphylococcal TSS and thus confirm the diagnosis. In contrast, this approach failed to demonstrate superantigenic toxin involvement in septic shock.

Key words: Superantigen, Vbeta signature, *S. aureus*, Toxic shock syndrome, Septic shock

Introduction

S. aureus produces a wild range of toxins that interact with the immune system. Superantigenic toxins (toxic shock syndrome toxin-1 [TSST-1] and staphylococcal enterotoxins [SEA, SEB, etc.]) potently activate immune cells [1, 2]. These molecules bypass normal antigen presentation by cross-linking major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presentating cells to the Vbeta domain of the T-cell receptor [1, 2]. In this way, each superantigenic toxin selectively stimulates and expands one or several Vbeta subsets, thereby producing a Vbeta signature for each superantigenic toxin [2-4]. Except the Vbeta 2, which is specific to TSST-1, a given Vbeta subset may be expanded by different superantigenic toxins, and the discriminant Vbeta signature (DVbS) of each superantigenic toxin (i.e. the combination of Vbeta subsets specific to a given superantigenic toxin) is unknown [2-4]. The massive T cell activation mediated by superantigenic toxins leads to uncontrolled release of proinflammatory cytokines, which are responsible for clinical manifestations of toxin-mediated diseases such as toxic shock syndrome (TSS) [2, 5].

TSST-1 was identified in the 1980s as the toxin responsible for menstrual TSS, while both TSST-1 and enterotoxins are involved in non-menstrual TSS [6, 7]. For many years the identification of superantigenic toxins involved in TSS was mainly based on the isolate's toxin production or toxin gene content [6, 8-10]. However, superantigenic toxins are also produced by *S. aureus* isolates from patients without TSS [11]. This includes patients with septic shock, adding to the controversy surrounding the involvement of superantigenic toxins in the pathogenesis of *S. aureus* septic shock [12].

It was recently shown that the *in vivo* Vbeta signature of superantigenic toxins can be used to confirm the diagnosis of TSS [13, 14]. Indeed, expansion of Vbeta 2 T cells, which correspond to TSST-1 superantigenic activity, has been detected in patients with TSS [13-15]. Selective expansion of Vbeta T cells has not yet been examined in patients with enterotoxin-associated non-menstrual TSS or in patients with *S. aureus* septic shock.

The purpose of this study was to detect *in vivo* production of superantigenic toxins early after onset of staphylococcal TSS and septic shock. We attempted to identify superantigenic toxin DVbS in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of each patient prospectively enrolled after the determination of: (1) the toxin gene profile of each isolate, and (2) the DVbS obtained *in vitro* by flow cytometry with the culture supernatant of the corresponding *S. aureus* isolate.

Materials and methods

Study design

Patients with *S. aureus* TSS or septic shock were prospectively enrolled in Lyon, France, from 1 January 2006 through 31 December 2006 in one of the following wards, totaling 80 beds: Department of Infectious and Tropical Diseases and Medical and Surgical Intensive Care Units (ICU) of Croix-Rousse Hospital; Emergency Department and Medical Intensive Care and Surgical Intensive Care Units of the Department of Anaesthesia and Critical Care of Edouard Herriot Hospital; and the Surgical ICU of Lyon-Sud Hospital. The study was approved by the local ethics committee.

Definitions

Septic shock was defined using the criteria of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Conference. *S. aureus* TSS was defined using Centers for Disease Control (CDC) criteria [16, 17].

Patients and clinical data

The following data were recorded for all patients: demographic characteristics (age, sex), underlying disorders associated with impaired cellular immunity (hematological immunosuppressive disease, ongoing malignancy, HIV infection, cirrhosis, etc.) and current corticosteroid therapy (> 1 month) or other immunosuppressive therapy. Therapy with antimicrobials and intravenous immunoglobulin (IVIG) was recorded. The 28-day mortality rate was determined.

Microbiological investigations

S. aureus isolated from vaginal swabs and other sites of infection were identified by means of standard microbiological methods, including Gram-staining and the Phoenix Automated Microbiology System (BD Biosciences, USA). Each *S. aureus* isolate was tested for production of coagulase (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), catalase and clumping factor (Pastorex® Staph-plus, Bio-Rad, USA).

Genomic DNA was extracted from all isolates for PCR amplification of genes encoding superantigenic toxins such as TSST-1, SEA, SEB, SEC, SED (strains positive for the gene encoding SED were also considered positive for the gene encoding SEJ, as they are located on the same plasmid), SEH, SE*l*K, SE*l*L, SE*l*M, SE*l*O (strains positive for genes encoding SE*l*M and SE*l*O were also considered to be positive for SEG, SEI and SEN, as they belong to the same operon known as the enterotoxin gene cluster, *egc*), and the SE*l*P, SE*l*Q, SE*l*R genes [4, 18]. The *mec*A gene coding for methicillin resistance was also detected by PCR [10].

Flow cytometry

In vitro determination of the DVbS of individual superantigenic toxins

Twenty-four-hour culture supernatants of each clinical isolate grown at 37°C with vigorous shaking in RMPI medium supplemented with 5% of fetal bovine serum were filtered (0.20 µm, Minisart®, Sartorius, VivaSciences, Hannover, Germany) and used to stimulate PBMC ($2x10^6$/ml) purified from two healthy donors by Ficoll gradient density sedimentation (PANCOLL, PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). After two days of incubation the cells were washed twice in PBS (PBS, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) and resuspended in fresh culture medium consisting of RPMI

1640 medium (Gibco, Invitrogen Corporation) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, Invitrogen Corporation), 20 mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml streptomycin, and 100 µg/ml penicillin (Gibco-Invitrogen Corporation) in 24-well plates (Falcon®, Becton-Dickinson, USA) for nine days. The medium was changed every three days. After 11 days of culture, PBMC were labeled with anti-CD3 and anti-Vbeta antibodies (24 Vbeta are quantified in the IO Test Beta Mark, Immunotech, Beckman Coulter) according to the supplier's instructions. The Vbeta repertoire was determined by flow cytometry (FACScan; Becton Dickinson) and the multiparameter data files were analyzed with the Cellquest program (Becton Dickinson). To assign the DVbS of a given superantigenic toxin, we compared, using the Kruskal Wallis non-parametric test, the percentage of each Vbeta subset, obtained for all isolates, in the presence and absence of each superantigenic toxin gene. A difference was considered statistically significant when the *p* value was <0.05. Finally, by combining all the results, a single Vbeta subset or a combination of Vebta subsets was considered to be the DVbS of the corresponding toxin. These results were compared with published data.

Determination of the Vbeta repertoire in patients with staphylococcal toxic or septic shock and detection of a superantigenic toxin DVbS in blood

The Vbeta repertoire of each patient was determined as early as possible during the first 10 days after symptom onset. PBMC from the patients were purified by Ficoll density gradient sedimentation and immediately labeled with anti-CD3 and anti-Vbeta antibodies to determine the Vbeta repertoire, as described above. When possible, the Vbeta repertoire of each patient was controlled a week or more later in order to

detect changes in the Vbeta pattern with time. Control values for each Vbeta were obtained with samples from 39 healthy donors. For each Vbeta, a positivity cutoff for Vbeta expansion *in vivo* was established as the mean plus two standard deviations of the values obtained for the same Vbeta in the controls.

Results

Clinical characteristics

Fourteen patients were enrolled in this study, five with *S. aureus* TSS (three menstrual and two non-menstrual cases) and nine with *S. aureus* septic shock. Their demographic characteristics and medical history are reported in table 1. Patients with TSS were young (mean 30 years, range 18 to 63 years) and had no history of immunosuppression; only one patient had transient lymphopenia (case n°5), and all survived at day 28. Patients with septic shock were older (mean 61 years, range 35 to 85 years), lymphopenia was present in all eight patients tested, and four patients (44%) had a medical history of cellular immunosuppression. Five (56%) of these patients died before day 28. Except for patients 1 and 2 (who had only postural hypotension), all the patients required ICU admission and vaso-active drug therapy (e.g. norepinephrine) after fluid resuscitation.

Microbiological findings

Among the patients with menstrual TSS, one received antimicrobial therapy before swabbing and *S. aureus* was not recovered in this case. The two available isolates responsible for menstrual TSS were positive for the *tst* gene and for the *egc* locus. Among the patients with non-menstrual TSS, *S. aureus* grew in culture from the surgical wound but the strain isolated from patient 5 was lost before the toxin gene profile could be determined. The only available isolate responsible for non-menstrual TSS possessed the *sea*, *seb* and *sed* genes. Among the nine isolates responsible for septic shock, five harbored the *sea* gene (plus *sed*, *selr*, *selk* or *selq* in four cases) and two were positive only for the *egc* locus. One isolate was negative for all the

superantigenic toxin genes tested. Among the 12 *S. aureus* isolates, four were positive for the *mec*A gene (three *mec*A-positive isolates corresponded to the predominant hospital-acquired methicillin-resistant *S. aureus* clone in France), and these four isolates were responsible for septic shock.

In vitro determination of the Vbeta signature of each superantigenic toxin and interpretation of the results

Based on Vbeta signatures described in the literature, we tried to determine the DVbS of each superantigenic toxin [3, 4, 15, 19-29]. To determine which Vbeta subset was significantly expanded in the presence of each superantigenic toxin gene, we compared the Vbeta subset obtained with an isolate positive for a given superantigenic toxin (for example harboring the *sea* gene) with the results obtained for the isolates negative for this toxin. Hence, the DVbS of TSST-1 was Vbeta 2, while it was Vbeta 9 and 22 for SEA, Vbeta 3, 14 and 17 for SEB and Vbeta 1 and 8 for SED (Table 2). The DVbS of superantigenic toxins encoded by the *egc* locus was Vbeta 5.3, 7.1, 9, 23. *Selk* and *selq*, which were always jointly present in our isolates, were significantly associated with Vbeta subset 5.1. By contrast with the other toxins, no specific Vbeta T cell expansion was found in response to strains positive for SE*l*R.

Detection of a superantigenic toxin DVbS in peripheral blood

We then determined the Vbeta repertoire in PBMC from each patient with *S. aureus* TSS or septic shock (Table 3, Figure 1). A Vbeta 2 T cell expansion was observed in the three patients with menstrual TSS, even when the corresponding strains showed *in vitro* expansion of not only Vbeta 2 but also other Vbeta subsets corresponding to the production of SEA and *egc*-encoded superantigenic toxins. In patient 2, the

percentage of the Vbeta 2 subset was initially below two standard deviations but rose 2-fold within nine days (Figure 1). As this case fully corresponded to the case definition, we considered that 2-fold expansion of a Vbeta subset, even if the final value was below two standard deviations, could result from superantigenic toxin activation.

In the two non-menstrual TSS cases, we detected the SEB DVbS. Vbeta 3, 14 and 17 were expanded above two standard deviations in patient 4 (Figure 1). In patient 5, the Vbeta 14 subset was expanded above two standard deviations and the Vbeta 3 and Vbeta 17 subsets increased 2.5- and 1.6-fold, respectively, within seven days, whereas no other Vbeta subsets increased (Figure 1). The isolate that produced SEB in patient 4 also produced SEA and SED *in vitro*, as the Vbeta subset corresponding to the DVbS of these toxins was expanded.

No Vbeta expansion was observed in six of the nine cases of septic shock (Table 3, Figure 1). In the other three cases of septic shock, one showed Vbeta 2 and Vbeta 3 expansion, another Vbeta 14 expansion and the last Vbeta 8 expansion. By contrast to the cases of TSS, none of these expansions corresponded to the results obtained with the corresponding isolates *in vitro*.

Discussion

We examined the *in vivo* production of superantigenic toxins during human staphylococcal TSS and *S. aureus* septic shock. We first tried to determine the DVbS of each superantigenic toxin *in vitro* before detecting anomalies in the Vbeta T cell repertoire induced by the corresponding isolate. Nearly all the cases of TSS were associated with specific Vbeta expension, whereas no specific T cell modifications were found in patients with septic shock, despite the presence of superantigenic toxin genes in the corresponding isolates, and their expression *in vitro*.

As most *S. aureus* clinical isolates responsible for TSS and septic shock harbor two or more superantigen-encoding genes [9, 12], it was first necessary to determine the precise DVbS corresponding to each toxin. TSST-1 is known to activate only the Vbeta 2 subset *in vitro* [3, 15]. A Vbeta signature has been documented of most enterotoxins *in vitro*, but the situation is not very straightforward, as: (1) a given Vbeta subset may be part of the Vbeta signature of different enterotoxins; (2) most enterotoxins are associated with the expansion of multiple Vbeta subsets; (3) some Vbeta subsets are considered as major or minor components of the Vbeta signature of a given enterotoxin; (4) discriminant combinations of Vbeta subsets (i.e. the DVbS) are not known for each enterotoxin [2, 3]. To our knowledge, this is the first study to determine the DVbS of superantigenic toxins of clinical *S. aureus* isolates. For example, we found that Vbeta 9 and 22 composed the DVbS of SEA (whereas the literature reports possible expansion of 13 different Vbeta subsets, table 2), and that Vbeta 3, 14 and 17 composed the DVbS of SEB (whereas the literature reports possible expansion of eight different Vbeta subsets, table 2) [3, 22, 24]. Determining the DVbS by analyzing the T cell Vbeta repertoire in a patient's blood may thus be a

rapid (a few hours) and reliable way of detecting *in vivo* production of superantigenic toxins, thereby guiding the use of anti-toxin agents (antibiotics to block toxin production, or IVIG to block toxin activity *in vitro*) [30]. At present, identification of superantigenic toxins is mainly based on detection of the corresponding gene [9]. However, most clinical *S. aureus* isolates responsible for TSS and septic shock harbor at least one gene encoding a superantigenic toxin, if one includes newly described enterotoxins such as those encoded by the *egc* locus [9, 11, 12].

Biological data are needed for early diagnosis of TSS, as the full CDC case definition of “definite” TSS includes desquamation, that may occur weeks after symptom onset [2, 5]. It has been proposed to include other biological criteria such as the absence of acute-phase antibodies against TSST-1 to facilitate early diagnosis of TSS [31]. We observed specific Vbeta 2 expansion in our three patients with menstrual TSS, confirming previous case reports. We are confident that this specific T cell expansion reflected a pathogenic role of TSST-1, as: (1) only TSST-1 is responsible for menstrual TSS; (2) the isolates harbored the gene encoding TSST-1; (3) we observed Vbeta 2 expansion in the patient’s blood and also *in vitro* with the culture supernatant; (4) TSST-1 is the only superantigenic toxin known to target the Vbeta 2 subset. In patient 2, who had recurrent TSS, Vbeta 2 expansion was mild. The Vbeta 2 subset was below two standard deviations, but it doubled in nine days. This could be the result of Vbeta 2-positive T cell anergy. Indeed, immunologic tolerance and anergy towards a Vbeta targeted by a superantigenic toxin have been described in animal models repeatedly challenged with the same superantigenic toxin, and also in humans after a first episode of neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease, another TSST-1-associated disease [32, 33]. Vbeta 3, 14 and 17 expansion was observed in our two cases of non-menstrual TSS. In at least one case (patient

4), we are also confident that specific T cell expansion revealed SEB intoxication, as: (1) few enterotoxins (only SEB and SEC) can induce concomitant expansion of Vbeta 3, 14 and 17 [3]; (2) the isolate harbored the gene encoding SEB; (3) we observed Vbeta 3, 14 and 17 expansion in the patient's blood and demonstrated that these subsets corresponded to the SEB DVbS *in vitro*. In the second non-menstrual case (patient 5), we were unable to clearly demonstrate the involvement of SEB because the isolate was lost before toxin gene analysis and culture supernatant assay. However, the patient fulfilled all the criteria for TSS (including desquamation) and, 15 days after symptom onset, we detected Vbeta 14 expansion associated Vbeta 3 and Vbeta 17 expansion, corresponding to the SEB DVbS. It is noteworthy that this patient with TSS developed profound lymphopenia early in the disease and that normal values returned by the time the SEB DVbS was detected. Lympopenia is not frequently reported during TSS. In the early stage of the disease, transient depletion has been described before T cell expansion, possibly owing to mobilization from peripheral blood and accumulation in lymph nodes or the spleen [33].

During septic shock, several lines of evidence suggest that superantigenic toxins and other virulence factors may act in concert, resulting in overlap between toxic shock and septic shock in a type of "mixed shock" [34]. First, we have previously shown that the presence of the *sea* gene correlates with the onset of septic shock during *S. aureus* infection [12]. Second, vaccination with modified SEA, SEC or TSST-1 lacking superantigenic properties confers protection in animal models of sepsis induced by *S. aureus* strains producing SEA, SEC or TSST-1 *in vitro* [35-37]. We did not detect any DVbS in patients with septic shock, supporting the hypothesis that superantigenic toxins are not produced *in vivo* during septic shock. The slight Vbeta expansion observed during septic shock did not correspond to what was observed *in*

vitro with the corresponding isolates. Our results indicate either that superantigenic toxin is not produced during *S. aureus* septic shock, or that superantigenic toxin production occurs without expansion of targeted T cells. The latter possibility could be explained by T cell apoptosis and/or anergy [38]. Apoptosis is an early event during septic shock, rapidly leading to profound lymphopenia [39]. All our septic shock patients (but only one TSS patient) had lymphopenia, and four of them also had impaired cellular immunity due to underlying illnesses or immunosuppressive therapy. We also detected mild “expansion” of Vbeta 2-positive T cells in a patient infected by a strain that did not produce TSST-1. This might be due to lymphopenia resulting from differential apoptosis among the 24 major Vbeta subsets. As a consequence, during septic shock, T cell Vbeta expansion in response to superantigenic toxins might be limited by apoptosis and/or by anergy, possibly explaining why it is difficult to demonstrate superantigen involvement in this setting.

One limitation of our study is the small number of patients, and especially patients with TSS. However, TSS is rare in France, with only one case per million inhabitants per year. Also, we did not use markers of T cell activation such as CD45RO used in NTED or in some TSS cases associated with TSST-1 production [14, 33]. Activation of an expanded Vbeta subset may provide arguments for superantigen production and may be useful for distinguishing expansion due to superantigen toxins from relative expansion due to age-related changes in the T cell repertoire or to proliferative disorders such as myeloma, myelodysplasic syndromes and T-cell lymphoproliferation [40, 41]. However, we sampled each patient several times in order to detect short-term variations in a Vbeta subset that may provide information about a putative stimulation and expansion of a Vbeta subset. In a previous study, Kamel et al. failed to demonstrate a clear-cut correlation between *in vivo* and *in vitro*

results in patients with multiple myeloma and non-menstrual toxic shock or septic shock [42].

In conclusion, analysis of the Vbeta T cell repertoire is useful for detecting the superantigenic toxin DVbS *in vivo*. This may help to confirm the diagnosis of TSS and hasten the administration of anti-toxin therapy. Further investigations (analyzing apoptosis of putative targeted Vbeta subsets for instence) are required to demonstrate *in vivo* production of superantigenic toxins during *S. aureus* septic shock.

Acknowledgments

This study was supported by Pfizer Independent Grant 2005-0786. We thank all the physicians who participated in the study: Matthieu Closon, Jean-Pierre Perdrix and Jean-Michel Grozel from the Surgical Intensive Care Unit in Lyon-Sud Hospital; Marc Saint-Denis, Laurent Argaud and Olivier Martin from the Department of Emergency and Medical Intensive Care in Edouard Herriot Hospital; Christian Guillaume, Bernard Allaouchiche, Monique Bret, Thomas Rimmele, Marc Bertin-Maghit and Sylvie Tissot from the Department of Anaesthesia and Critical Care in Edouard Herriot Hospital; Patricia Branche and Serge Duperret from the Surgical Intensive Care Unit in Croix-Rousse Hospital; Thomas Fassier, Jean-Christophe Richard, Gaël Bourdin, Michel Badet and Frédérique Bayle from the Medical Intensive Care Unit in Croix-Rousse Hospital. We thank Elodie Descloux, Olivier Dauwalder, Michele Bes, Christine Courtier, Christine Gardon, Céline Spinelli, Caroline Bouveyron, Martine Rougier, Annie Martra, Monique Chomarat, Géraldine Durand, Carine Crampe and Grégoire Cozon. We also thank Cédric Badiou for technical assistance and David Young for editorial assistance.

References

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med **1998**;339:520-32.
2. McCormick JK, Yarwood JM and Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol **2001**;55:77-104.
3. Holtfreter S, Broker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? Arch Immunol Ther Exp **2005**;53:13-27.
4. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, et al. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol **2001**;166:669-77.
5. Stevens DL. The toxic shock syndromes. Infect Dis Clin North Am **1996**;10:727-46.
6. Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of staphylococcal enterotoxins in nonmenstrual toxic shock syndrome. J Clin Microbiol **1986**;23:1138-9.
7. Schlievert PM, Shands KN, Dan BB, Schmid GP and Nishimura RD. Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome. J Infect Dis **1981**;143:509-16.
8. Andrews MM, Parent EM, Barry M and Parsonnet J. Recurrent nonmenstrual toxic shock syndrome: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis **2001**;32:1470-9.
9. Descloux E, Perpoint T, Ferry T, et al. One in five mortality in non menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **2007**; Accepted, in revision.
10. Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J and Lina G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. J Clin Microbiol **1999**;37:2446-9.

11. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G and Von Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. J Clin Microbiol **2003**;41:1434-9.
12. Ferry T, Thomas D, Genestier AL, et al. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. Clin Infect Dis **2005**;41:771-7.
13. Matsuda Y, Kato H, Yamada R, et al. Early and definitive diagnosis of toxic shock syndrome by detection of marked expansion of T-cell-receptor VBeta2-positive T cells. Emerg Infect Dis **2003**;9:387-9.
14. Ohashi R, Takaya J, Tsuji S, et al. Prognostic usefulness of lymphocyte V beta receptor determination in toxic shock syndrome. Eur J Pediatr **2005**;164:703-4.
15. Choi Y, Lafferty JA, Clements JR, et al. Selective expansion of T cells expressing V beta 2 in toxic shock syndrome. J Exp Med **1990**;172:981-4.
16. Bone RC, Sibbald WJ and Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. Chest **1992**;101:1481-3.
17. Reingold AL, Hargrett NT, Shands KN, et al. Toxic shock syndrome surveillance in the United States, 1980 to 1981. Ann Intern Med **1982**;96:875-80.
18. Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, et al. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect Immun **2006**;74:4724-34.
19. Deringer JR, Ely RJ, Monday SR, Stauffacher CV and Bohach GA. Vbeta-dependent stimulation of bovine and human T cells by host-specific staphylococcal enterotoxins. Infect Immun **1997**;65:4048-54.

20. Hudson KR, Robinson H and Fraser JD. Two adjacent residues in staphylococcal enterotoxins A and E determine T cell receptor V beta specificity. J Exp Med **1993**;177:175-84.

21. Lamphear JG, Mollick JA, Reda KB and Rich RR. Residues near the amino and carboxyl termini of staphylococcal enterotoxin E independently mediate TCR V beta-specific interactions. J Immunol **1996**;156:2178-85.

22. Lavoie PM, Dumont AR, McGrath H, Kernaleguen AE and Sekaly RP. Delayed expansion of a restricted T cell repertoire by low-density TCR ligands. Int Immunol **2005**;17:931-41.

23. Li Y, Zhu X, Huang Y and Xiong H. Mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxin D to the T cell receptor Vbeta chain and major histocompatibility complex class II. Immunol Lett **2006**;105:55-60.

24. Llewelyn M, Sriskandan S, Terrazzini N, Cohen J and Altmann DM. The TCR Vbeta signature of bacterial superantigens spreads with stimulus strength. Int Immunol **2006**;18:1433-41.

25. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, et al. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. Infect Immun **2005**;73:5540-6.

26. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, et al. Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. Infect Immun **2004**;72:3664-7.

27. Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DY, Gutierrez JA, Bohach GA and Schlievert PM. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. Infect Immun **2003**;71:2916-9.

28. Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP and schlievert PM. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect Immun **2001**;69:360-6.

29. Orwin PM, Leung DY, Tripp TJ, et al. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. Biochemistry **2002**;41:14033-40.

30. MacIsaac C, Curtis N, Cade J and Visvanathan K. Rapid analysis of the Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in whole blood. J Immunol Methods **2003**;283:9-15.

31. Reduced incidence of menstrual toxic shock syndrome: United-States, 1980-1990. **1990**;39:421-3.

32. Rellahan BL, Jones LA, Kruisbeek AM, Fry AM and Matis LA. *In vivo* induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. J Exp Med **1990**;172:1091-100.

33. Takahashi N. Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease (NTED). Pediatr Int **2003**;45:233-7.

34. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F and Etienne J. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. Curr Infect Dis Rep **2005**;7:420-8.

35. Hu DL, Omoe K, Narita K, Cui JC, Shinagawa K and Nakane A. Intranasal vaccination with a double mutant of staphylococcal enterotoxin C provides protection against *Staphylococcus aureus* infection. Microbes Infect **2006**;8:2841-8.

36. Hu DL, Omoe K, Sasaki S, et al. Vaccination with nontoxic mutant toxic shock syndrome toxin 1 protects against *Staphylococcus aureus* infection. J Infect Dis **2003**;188:743-52.

37. Nilsson IM, Verdrengh M, Ulrich RG, Bavari S and Tarkowski A. Protection against *Staphylococcus aureus* sepsis by vaccination with recombinant

staphylococcal enterotoxin A devoid of superantigenicity. J Infect Dis **1999**;180:1370-3.

38. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med **2003**;348:138-50.
39. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. Shock **2002**;18:487-94.
40. Morice WG, Kimlinger T, Katzmann JA, et al. Flow cytometric assessment of TCR-Vbeta expression in the evaluation of peripheral blood involvement by T-cell lymphoproliferative disorders: a comparison with conventional T-cell immunophenotyping and molecular genetic techniques. Am J Clin Pathol **2004**;121:373-83.
41. Wack A, Cossarizza A, Heltai S, et al. Age-related modifications of the human alphabeta T cell repertoire due to different clonal expansions in the CD4+ and CD8+ subsets. Int Immunol **1998**;10:1281-8.
42. Kamel NS, Banks MC, Dosik A, Ursea D, Yarilina AA and Posnett DN. Lack of muco-cutaneous signs of toxic shock syndrome when T cells are absent: *S. aureus* shock in immunodeficient adults with multiple myeloma. Clin Exp Immunol **2002**;128:131-9.

Patient N°	Age, sex	Clinical diagnosis	Cellular immuno suppression	Lymphocyte (G/L)	Type of infection	Site of isolation	ICU admission	Surgery for drainage	Antibiotics	IVIG	Day-28 mortality
1	20, F	mTSS	No	4.53	-	- [a]	No	No	Clindamycin, Oxacillin	No	No
2	24, F	Recurrent mTSS	No	3.26	-	Vagina	No	No	Clindamycin, Oxacillin	No	No
3	18, F	mTSS	No	2.36	-	Vagina	Yes	No	Clindamycin, Cloxacillin	No	No
4	26, M	nmTSS	No	2.08	Surgical site infection	Surgical site	Yes	Yes	Clindamycin, Teicoplanin	Yes[b]	No
5	63, M	nmTSS	No	0.46	Surgical site infection	Surgical site	Yes	Yes	Oxacilline, Gentamicin, Clindamycin[b]	No	No
6	48, F	septic shock	Chemotherapy	0.2	Nosocomial pneumonia	Blood	Yes	No	Vancomycin, Gentamicin	No	Yes
7	53, M	septic shock	No	0.85	Endocarditis	Blood	Yes	No	Oxacillin, Gentamicin	No	Yes
8	35, M	septic shock	No	1.41	Endocarditis	Blood	Yes	No	Oxacillin, Gentamicin	No	No
9	62, F	septic shock	Corticosteroids	0.2	Catheter infection	Blood	Yes	No	Teicoplanin, Gentamicin	No	No
10	70, M	septic shock	Alcohol cirrhosis	1.25	Catheter infection	Blood	Yes	No	Vancomycin	No	Yes
11	61, M	septic shock	No	0.64	Intraabdominal infection	Blood	Yes	Yes	Linezolid, Gentamicin	No	No
12	78, M	septic shock	No	NA	Endocarditis	Blood	Yes	No	Cloxacillin, Gentamicin	No	Yes
13	85, F	septic shock	No	0.83	Osteoarthritis	Blood	Yes	No	Cloxacillin, Gentamicin	No	Yes
14	60, M	septic shock	Alcoholic cirrhosis	1.12	Pneumonia	Blood	Yes	No	Vancomycin, Gentamycin	No	No

Table 1. Clinical and biological data, treatment and outcome of the 14 patients with *S. aureus* TSS or septic shock.

NOTE. NA, not available; ICU, intensive care unit; IVIG, intravenous immunoglobulin.

[a] No *S. aureus* isolated from vaginal swab or blood.

[b] Introduced after Vbeta analysis revealed *in vivo* production of superantigenic toxin (patient 4 had persistent fever and remained in shock despite clindamycin and teicoplanin, and patient 5 had persistent fever despite oxacillin and gentamycin).

Toxins	Vbeta signature in the literature	Ref.	Genes[a]	Discriminant expanded Vbeta subets composing each discriminant Vbeta signature													
				Vb 1	Vb 2	Vb 3	Vb 5.1	Vb 5.2	Vb 5.3	Vb 7.1	Vb 7.2	Vb 8	Vb 9	Vb 14	Vb 17	Vb 22	Vb 23
TSST-1	2	[3, 15]	*tst*	-	**<0.001**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SEA	1, 5.1, 5.2, 5.3, 6.4, 7.2, 8, 9, 16, 18, 21.3, 22, 23	[3, 22, 24]	*sea*	-	-	-	-	-	-	**-**	-	-	**0.004**	-	-	**0.02**	-
SEB	3, 6.4, 12, 13.2, 14, 15, 17, 20	[3, 15, 24]	*seb*	-	-	**0.04**	-	-	-	-	-	-	-	**0.02**	**0.02**	-	-
SEC	3, 6.4, 12, 13.2, 14, 15, 17, 20	[3, 19]	-														-
SED	1, 5.3, 6.9, 7.4, 8, 12	[3, 23]	*sed*	**<0.001**	-	-	-	-	-	-	-	**<0.001**	-	-	-	-	-
SEJ	ND		-														
SEE	5.1, 6.3, 6.4, 6.7, 6.9, 8, 16, 18, 21.3	[3, 20, 21]	-														
egc			*egc*[b]	-	-	-	-	-	**0.04**	**0.007**	-	-	**0.005**	-	-	**-**	**0.049**
SEG	3, 12, 13.1, 13.2, 13.6, 14, 15	[3, 4]		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SEI	1, 5.1, 5.2, 5.3, 6, 23	[3, 4]		-	-	-	-	-	0.04[c]	-	-	-	-	-	-	-	-
SE/M	5.1, 5.2, 5.3, 6, 18, 21.3, 23	[3, 4]		-	-	-	-	-	0.04[c]	-	-	-	-	-	-	-	0.049[f]
SE/N	5.1, 5.2, 5.3, 9	[3, 4]		-	-	-	-	-	0.04[c]	-	-	-	0.005[e]	-	-	-	-
SE/O	5.1, 7.1	[3, 4]		-	-	-	-	-	-	0.007[d]	-	-	-	-	-	-	-
SE/P	5.1, 6, 8, 16, 18, 21.3	[25]		-													
SE/K	5.1, 5.2, 6.7	[3, 28]	*selk*	-	-	-	**<0.001**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE/Q	2, 5.1, 5.2, 6.7, 21.3	[3, 29]	*selq*	-	-	-	**<0.001**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE/L	5.1, 5.2, 6.7, 7, 9, 16, 22	[3, 27]	-														
SE/R	3, 11, 12, 13.2, 14	[3, 26]	*selr*	0.002[g]	-	-	-	-	-	-	0.017[g]	0.004[g]	-	-	-	-	-

Table 2. *In vitro* determination of the discriminant Vbeta signature (among the 24 major human Vbeta subsets) of each superantigenic toxin (in bold) produced in culture supernatants by the 12 *S. aureus* isolates of this study with PBMC from two healthy donors.

NOTE. Ref, References; Vb, Vbeta; ND, not determined.

[a] genes encoding superantigenic toxins detected in the 12 isolates from this study.

[b] after exclusion of two isolates both positive for the *egc* locus and *tst*.

[c] Vbeta subset significantly associated with the *egc* locus included in the Vbeta signature of SE*/*I, SE*/*M, Se*/*N.

[d] Vbeta subset significantly associated with the *egc* locus corresponding to the Vbeta signature of SE*/*O.

[e] Vbeta subset significantly associated with the *egc* locus included in the Vbeta signature of SE*/*N.

[f] Vbeta subset significantly associated with the *egc* locus included in the Vbeta signature of SE*/*M.

[g] not considered to be a Vbeta subset significantly associated with SE*/*R as the two isolates positive for *selr* were also positive for *sea* (Vbeta 9 and 22 were expanded, but not significantly, and even if Vbeta 7.2 was not significantly associated with the DVbS of SEA in our study, this is one of the Vbeta subsets targeted by SEA) and *sed* genes.

Patient N°	Clinical data		Microbiological data		Flow cytometry investigation	
	Clinical diagnosis	CDC Criteria of TSS	*mec*A	Toxin gene profile	Vbeta expansion[a] detected in the patient's blood	*in vivo* detection of superantigenic toxin
1	mTSS	Yes (probable[b])	ND	ND	**Vb 2**	TSST-1
2	recurrent mTSS	Yes (confirmed)	No	*tst, egc*	Vb 2	TSST-1
3	mTSS	Yes (probable[b])	No	*tst, sea, egc*	**Vb 2**	TSST-1
4	nmTSS	Yes (confirmed)	No	*Sea, seb, sed*	**Vb 3, Vb 14, Vb 17**	SEB
5	nmTSS	Yes (confirmed)	ND	ND	Vb 3, **Vb 14**, Vb 17	SEB
6	septic shock	No	Yes[c]	*sea, sed*	None[d]	-
7	septic shock	No	No	*egc*	**Vb 2, Vb 3,** Vb 5.1[e]	-
8	septic shock	No	No	None	None	-
9	septic shock	No	Yes[c]	*Sea, sed, selr*	None[c]	-
10	septic shock	No	Yes[c]	*Sea, sed, selr*	None	-
11	septic shock	No	Yes	*egc*	**Vb 14**[f]	-
12	septic shock	No	No	*sea, selk, selq*	None[d]	-
13	septic shock	No	No	*sea*	**Vb 8**[g]	-
14	septic shock	No	No	*egc*	None	-

Table 3. *In vivo* production of superantigenic toxins according to the Vbeta signature defined *in vitro*.

NOTE. ND, not done; DVbS, discriminant Vbeta signature; Vb, Vbeta.

[a] Vbeta subsets expanded more than two standard deviation are shown in bold; Vbeta subsets with a value below two standard deviations but with a more than 1.5-fold variation between two time points are not shown in bold; Vbeta subsets composing a detected DVbS are underlined.

[b] the diagnosis of TSS could not be confirmed, as the patient was lost to follow-up after discharge (two weeks after admission) and no information was available on desquamation.

[c] corresponding to the predominant MRSA clone detected in France and described elsewhere.

[d] The T cell Vbeta repertoire was determine once, at the onset of symptoms.

[e] mild expansion of Vbeta 2-positive T cells (17.7%, without *tst* gene detection) and mild expansion of Vbeta 3-positive T cells (just above two standard deviations, without expansion of Vbeta 14 and 17 and without detection of the *seb* gene) were detected. The value of Vbeta 5.1 was below two standard deviations but fell 1.6-fold between the two time points (without detection of the *selk* gene).

[f] The value of Vbeta 14 increased above two standard deviations (8.5%) between day 7 (7.02%) and day 14 (10.5%) and remained mildly elevated (11.5%) on day 28 (without expansion of Vbeta 3 or 17 and without detection of the *seb* gene).

[g] The value of Vbeta 8 increased above two standard deviations (5.3%) between day 1 (5%) and day 11 (6.73%) (without expansion of Vbeta 1 and without detection of the *sed* gene).

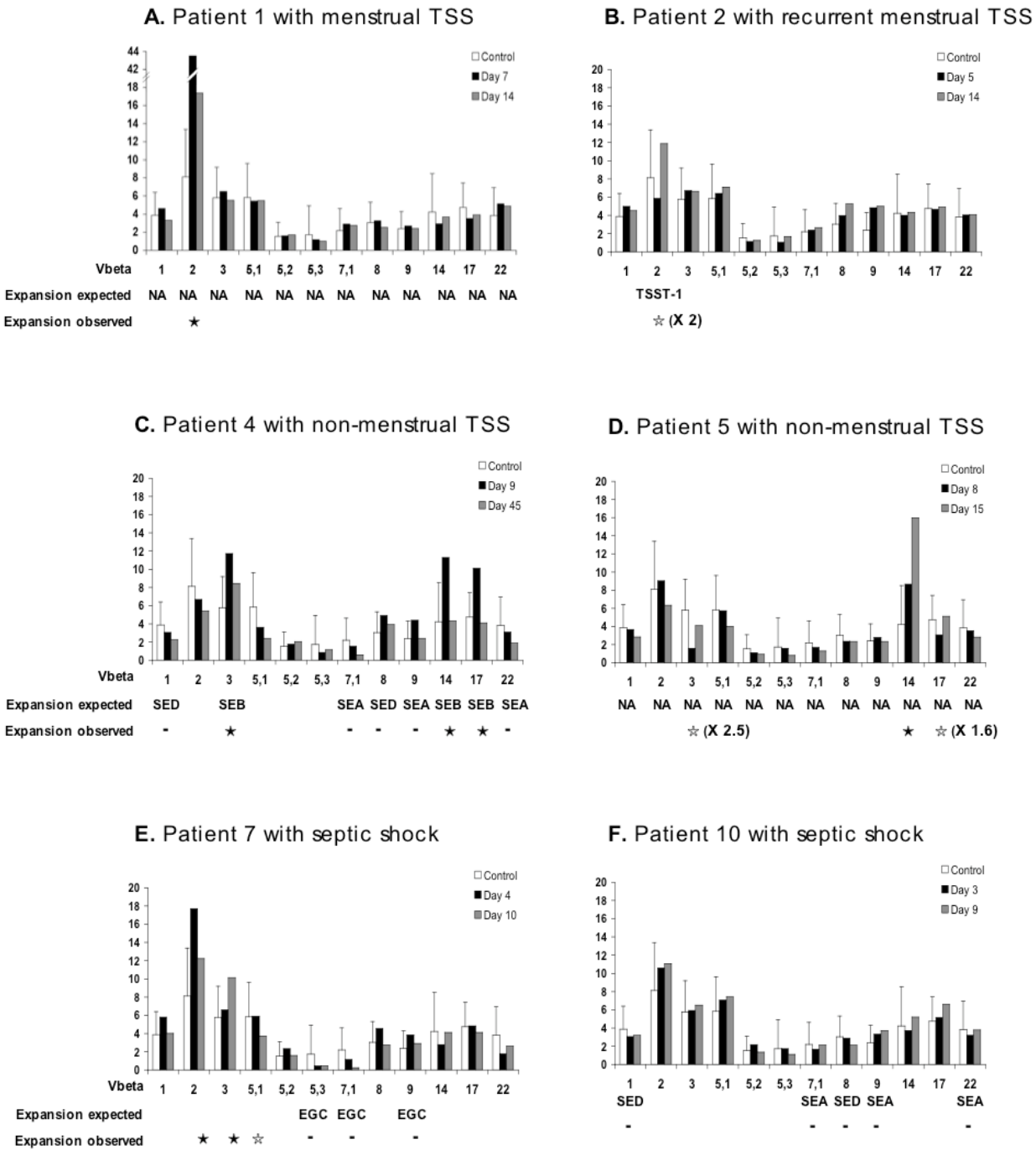


Figure 1. Vbeta repertoire of two patients with menstrual TSS, two patients with non-menstrual TSS, and two patients with septic shock, revealing a superantigenic toxin Vbeta signature during TSS (except for recurrent TSS) but not during septic shock.

NOTE. ★ Vbeta expansion above two standard deviations; ☆ Vbeta expansion below two standard deviations, but with a more than 1.5-fold variation of a Vbeta subset between two time points.

IV. 4. 2. Septième publication :

"Early diagnosis of staphylococcal toxic shock syndrome secondary to pharyngitis by detection of the TSST-1 Vbeta signature in peripheral blood of a 12-year-old boy"

Tristan Ferry, Damien Thomas, Jean-Christophe Bouchut, Gérard Lina, Maryline Vasselon-Raina, Olivier Dauwalder, Yves Gillet, Yves, François Vandenesch, Daniel Floret, Jerome Etienne

Article soumis le 25 juillet 2007.

The Pediatric Infectious Disease Journal

Cet article rapporte un cas de CTS non-menstruel lié à la production de TSST-1 chez un enfant de 12 ans qui présentait une angine dont l'origine pouvait être staphylococcique ou streptococcique.

Le diagnostic de CTS lié à la production de TSST-1 a pu être réalisé précocement grâce à la mise en évidence d'une déplétion des lymphocytes T exprimant le Vbéta 2 (seulement 4,1% des lymphocytes T du patients exprimaient le Vbeta 2 à la prise en charge, alors que la valeur chez des sujets sains est de 8,3% ± 2,4) suivie très rapidement 48 heures plus tard par leur expansion (52,3% des lymphocytes T exprimaient le Vbeta 2). L'analyse complète du répertoire Vbeta du patient n'a pas mis en évidence d'autre expansion (notamment des Vbeta 1, Vbeta 5.1, Vbeta 12, Vbeta 14, Vbeta 15, Vbeta 8 qui peuvent être le cible des exotoxines superantigéniques streptococciques, voir annexe II), confirmant l'implication de TSST-1 et confirmant ainsi l'origine staphylococcique du choc toxique. Les hémocultures sont restées stériles et la souche de *S. aureus* isolée de la gorge de l'enfant possédait le gène codant TSST-1. L'enfant a été traité par l'association amoxicilline-acide clavulanique, clindamycine et immunoglobulines polyvalentes. Les desquamations, rendant le diagnostic certain selon les critères du CDC, sont apparues une semaine après l'admission.

L'expansion Vbeta spécifique en réponse à la stimulation d'une exotoxine superantigénique peut-être précédée à la phase aiguë par une déplétion transitoire. Il est nécessaire de répéter de manière rapprochée l'analyse du répertoire Vbeta des patients présentant un CTS afin de détecter une expansion Vbeta caractéristique.

Early diagnosis of staphylococcal toxic shock syndrome secondary to pharyngitis by detection of the TSST-1 Vbeta signature in peripheral blood of a 12-year-old boy

Ferry, Tristan MD*; Thomas, Damien PhD*; Bouchut, Jean-Christophe MD+; Lina, Gérard MD, PhD*; Vasselon-Raina, Maryline MD+; Dauwalder, Olivier DPharm*; Gillet, Yves MD++; Vandenesch, François MD, PhD*; Floret, Daniel MD++; and Etienne, Jerome MD, PhD*.

* INSERM U851, Lyon, F-69008 France; Université Lyon 1, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté de Médecine Laennec, Lyon F-69008 France.

+ Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier de Valence, Valence, France.

++ Service d'Urgence et de Réanimation Pédiatriques, Université Lyon 1, Hôpital Edouard-Herriot, Lyon, France.

Corresponding Author:

Tristan Ferry, MD

INSERM U851, Pathogénie des Staphylocoques, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France. Phone: +33(0)-478-77-86-57; Fax: +33(0)-478-77-86-58

E-Mail: tristan.ferry@univ-lyon1.fr

Key words: *S. aureus*, pharyngitis, toxic shock syndrome, TSST-1, Vbeta 2.

Abbreviated title: Vbeta signature of TSST-1 during staphylococcal TSS

Running head title: Vbeta signature during staphylococcal TSS

Word count: 1375 words

Abstract

We report the case of a 12-year-old boy who developed staphylococcal toxic shock syndrome secondary to *S. aureus* pharyngitis. The diagnosis was rapidly confirmed by detecting the Vbeta signature of the toxic shock syndrome toxin-1 in peripheral blood, based on transient T cell depletion rapidly followed by massive expansion of Vbeta 2-positive T cells.

Introduction

Toxic shock syndrome (TSS) is a toxin-mediated disease due to *in vivo* production of staphylococcal or streptococcal superantigenic toxins; these include TSST-1 and enterotoxin in the case of *S. aureus*, and streptococcal pyrogenic exotoxins [SpeA, SpeB, SpeC] with *S. pyogenes*.[1] Each superantigenic toxin selectively stimulates T cells expressing a particular Vbeta subset and has a Vbeta signature *in vitro*.[2]

Differential diagnosis of non-menstrual staphylococcal TSS, streptococcal TSS and other infectious diseases can be difficult.[1] We report a case of non-menstrual staphylococcal TSS secondary to pharyngitis, in which the diagnosis was rapidly confirmed by detection of the TSST-1 Vbeta signature in peripheral blood.

Case Report

A 12-year-old boy was admitted in the evening of 30 January 2007 with a three-day history of gastroenteritis, recent-onset throat pain and lethargy. There was no relevant familial or personal history. On admission the temperature was 36.5°C, the blood pressure 68/32 mm Hg and the pulse rate 130 bpm. The extremities were cold and he was clearly dehydrated. Neurological examination revealed obnubilation, without headache, stiff neck nor focal signs. The throat and tonsils were red, associated with a strawberry tongue and small palpable lymph nodes in the neck. He had severe vomiting and liquid diarrhea but no abdominal pain or tenderness. The serum creatinine and urea were 6 and 44.8 mg/dL, respectively, corresponding to an endogenous creatinine clearance of 18.7 ml/min/1.73 m^2, the white cell count was 12 800/mm^3, the platelet count was normal, the hemoglobin was 13.9 g/L and the C-reactive protein level was elevated (215 mg/L). Lumbar puncture was not done. As septic shock was suspected, 2 g of ceftriaxone was injected intravenously. As the patient was anuric and had persistent hypotension despite fluid resuscitation (40 ml/kg), he was given a continuous infusion of norepinephrine before being transferred to the intensive care unit. Rapidly, the blood pressure rose to 110/70 mm Hg, the temperature increased to 38.8°C and he developed erythoderma predominating on the face and trunk. Additional laboratory studies showed lactic acidosis (pH 7.29; lactic acid, 7 mmol/L), hypocalcemia (1.6 mmol/L; normal, 2.15 to 2.55 mmol/L), elevated creatinine phosphokinase (4244 units/L; normal, 30 to 190 units/L) and mildly elevated aspartate amino-transferase. The thrombin time was prolonged (19.5 seconds; normal, 12.5 to 14.9 seconds) and the platelet count fell to 79 000/mm^3, without hypofibrinogenemia (fibrinogen 6.6 g/L; normal, 1.8 to 4 g/L). The white cell count fell to 7 500/mm^3 with severe lymphopenia (200 cells/mm^3;

normal, 1 500 to 4 000 cells/mm^3). Blood samples and throat swabs were obtained. A rapid strep test was negative but streptococcal or staphylococcal toxic shock was nonetheless suspected, and ceftriaxone was remplaced by amoxicillin-clavulanic acid (4.5 g of amoxycillin per day) and clindamycin (1.5 g per day), and intravenous immunoglubulin (2 g/kg in two days) was added. The Vbeta repertoire was determined in the morning of 31 January. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient density sedimentation (PANCOLL, PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) and stained with antibodies to CD3 and to 24 T cell receptor Vbeta elements (including Vbeta 2) with the IO Test Beta Mark© kit (IM 3497, Immunotech, Beckman Coulter) and flow cytometry (FACScan; Becton Dickinson) as previously described.[4] The Vbeta repertoire, obtained 12 hours after hospital admission, showed an abnormally low rate of Vbeta 2-positive T cells (4.1%; normal, 8.3% ± 2.4). Two days after admission, norepinephrine infusion was stopped, his symptoms subsided and his renal function improved. The lymphocyte count increased to 1 800/mm^3 and repeat Vbeta analysis revealed massive expansion of Vbeta 2-positive T cells (52.3% of T cells were positive for the Vbeta 2 subset, whereas the percentage positive for other Vbeta elements remained normal). A throat swab culture yielded methicillin-susceptible *S. aureus*, while culture of a nose swab and blood samples was negative. Stool culture identified no enteric bacterial pathogens. The erythroderma gradually faded, leaving persistent scarlatiniform lesions on the arms and legs that desquamated eight days after hospital admission, thus fulfilling all the diagnostic criteria for staphylococcal TSS (Figure 2). The *S. aureus* isolate harbored the genes encoding TSST-1, SEA and the *egc* locus. He remained fatigued for one month, and the desquamation disappeared in mid-April.

Three months after symptom onset the percentage of Vbeta 2-positive T cells had fallen to 12.2% and nose and throat swab cultures were negative for *S. aureus*.

Discussion

This patient's initial clinical manifestations were compatible with septic shock and hypovolemia due to an enteric pathogen. The diagnosis of TSS was proposed when a rash appeared a few hours after the onset of shock, especially in view of the ongoing pharyngitis. The Vbeta signature of TSST-1 was detected in peripheral blood shortly after admission (initial T cell depletion followed by expansion of Vbeta 2-positive T cells alone), confirming the diagnosis of staphylococcal TSS. Desquamation occurred in the convalescent phase, completing the diagnostic criteria.

Group A streptococci (GAS) are the most common bacterial cause of pharyngitis, an infection that mainly affects children aged from 5 to 15 years.[3] Most patients with streptococcal TSS present with cellulitis or severe soft-tissue infections such as necrotizing fasciitis.[1, 3] However, cases of streptococcal TSS have been reported in children with no skin or soft-tissue infection but with a recent history of pharyngitis.[5] Rapid GAS antigen detection was negative in our patient, but this does not rule out streptococcal TSS secondary to "strep throat".[5] Definite diagnosis of streptococcal TSS is based on non specific clinical and biological signs and on GAS culture from a sterile site such as blood, which takes 48 hours.[1]

In non-menstrual staphylococcal TSS in children and adults, the source of infection is often recognizable and usually consists of a minor skin or soft-tissue infection such as infection of varicella vesicles, felons, a traumatic skin lesion or a surgical wound.[1, 6] Staphylococcal pharyngitis is an infrequent source of TSS and has rarely been identified as a source of superantigenic toxin production.[7] Definite diagnosis of staphylococcal TSS is based on desquamation, which may occur many weeks after onset of shock.[1] Our patient met four of the six criteria of the case definition on

admission and five at the time of Vbeta repertoire analysis (probable TSS, figure 1); desquamation occurred one week after admission, completing the TSS case definition.

Each superantigenic toxin has a Vbeta signature *in vitro*, and detection of this signature *in vivo* in the acute phase of the disease may be useful for directing the diagnosis towards staphylococcal or streptococcal TSS. By targeting the Vbeta 2 subset only, TSST-1 induces expansion of Vbeta 2-positive T cells.[2] This phenomenon has been observed in adults with menstrual and non-menstrual TSS and in newborns with neonatal TSS-like exanthematous disease (NTED), a form without shock.[8, 9] Transient depletion of Vbeta 2-positive T cells, before their massive expansion, has been described during the course of NTED but not during TSS.[9] The depletion of Vbeta 2-positive T cells in our patient was concomitant with shock and lymphopenia. It could result from mobilization and accumulation of T cells (mainly Vbeta 2-positive T cells) from peripheral blood to lymph nodes or the spleen, and/or from downregulation of TCR molecules binding the Vbeta 2 subset soon after T cell activation.

Our patient's *S. aureus* isolate was positive for the genes encoding TSST-1 and SEA and also for the *egc* locus. TSST-1 was the only toxin involved in the disease process, as only the Vbeta signature of TSST-1 was detected. Unlike enterotoxins, TSST-1 is known to cross mucosae -- in this case the pharyngeal mucosa.[1] TSST-1 is the only staphylococcal superantigenic toxin that targets the Vbeta 2 subset, whereas many streptococcal superantigenic toxins target not only the Vbeta 2 subset but also other Vbeta subsets such as Vbeta 12, 14, 15 (SpeA), Vbeta 8 (SpeB) and Vbeta 1, 5.1 (SpeC).[10] As a result, in clinical settings compatible with staphylococcal

or streptococcal TSS, analysis of 24 Vbeta subsets with the IO Test Beta Mark© kit can facilitate the diagnosis of staphylococcal TSS mediated by TSST-1.

Analysis of the T cell Vbeta repertoire in whole blood may thus be a rapid and reliable way of showing *in vivo* superantigenic toxin production. Early diagnosis of staphylococcal TSS permits early treatment with clindamycin (which inhibits toxin production *in vitro*) and/or with intravenous immunoglobulin (which blocks superantigenic activity *in vitro*), particularly when patients develop severe form of TSS.[1]

Acknowledgments

We thank Docteur Magali Geoffroi for patient care; Christine Gardon, Christine Courtier, Céline Spinelli, Caroline Bouveyron and Cédric Badiou for technical assistance; and David Young for editorial assistance.

References

1. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:77 -104

2. Holtfreter S, Broker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? *Arch Immunol Ther Exp*. 2005;53:13 -27

3. Martin JM, Green M. Group A streptococcus. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2006;17:140 -8.

4. MacIsaac C, Curtis N, Cade J, Visvanathan K. Rapid analysis of the Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in whole blood. *J Immunol Methods*. 2003;283:9 -15.

5. Chapnick EK, Gradon JD, Lutwick LI, et al. Streptococcal toxic shock syndrome due to noninvasive pharyngitis. *Clin Infect Dis*. 1992;14:1074 -7.

6. Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Staphylococcal and streptococcal pediatric toxic syndrome from 1998 to 2000. Data from the National Center for Staphylococcal Toxemia. *Arch Pediatr*. 2001;8:769s -775s.

7. Hirsch B, Stair T, Horowitz BZ, Brooks C. Toxic shock syndrome from staphylococcal pharyngitis. *Ear Nose Throat J*. 1984;63: 494 -7.

8. Matsuda Y, Kato H, Yamada R, et al. Early and definitive diagnosis of toxic shock syndrome by detection of marked expansion of T-cell-receptor VBeta2-positive T cells. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:387 -9.

9. Kato H, Takahashi N, Arimura Y, Imanishi K, Nishida H, Uchiyama T. The percentage of superantigen-reactive T cells in peripheral blood significantly decreases before massively increasing in patients with neonatal TSS-like exanthematous disease in the early acute phase. *J Infect Chemother*. 2002;8:111 -4.

10. Tomai MA, Schlievert PM, Kotb M. Distinct T-cell receptor V beta gene usage by human T lymphocytes stimulated with the streptococcal pyrogenic exotoxins and pep M5 protein. *Infect Immun*. 1992;60:701 -5.

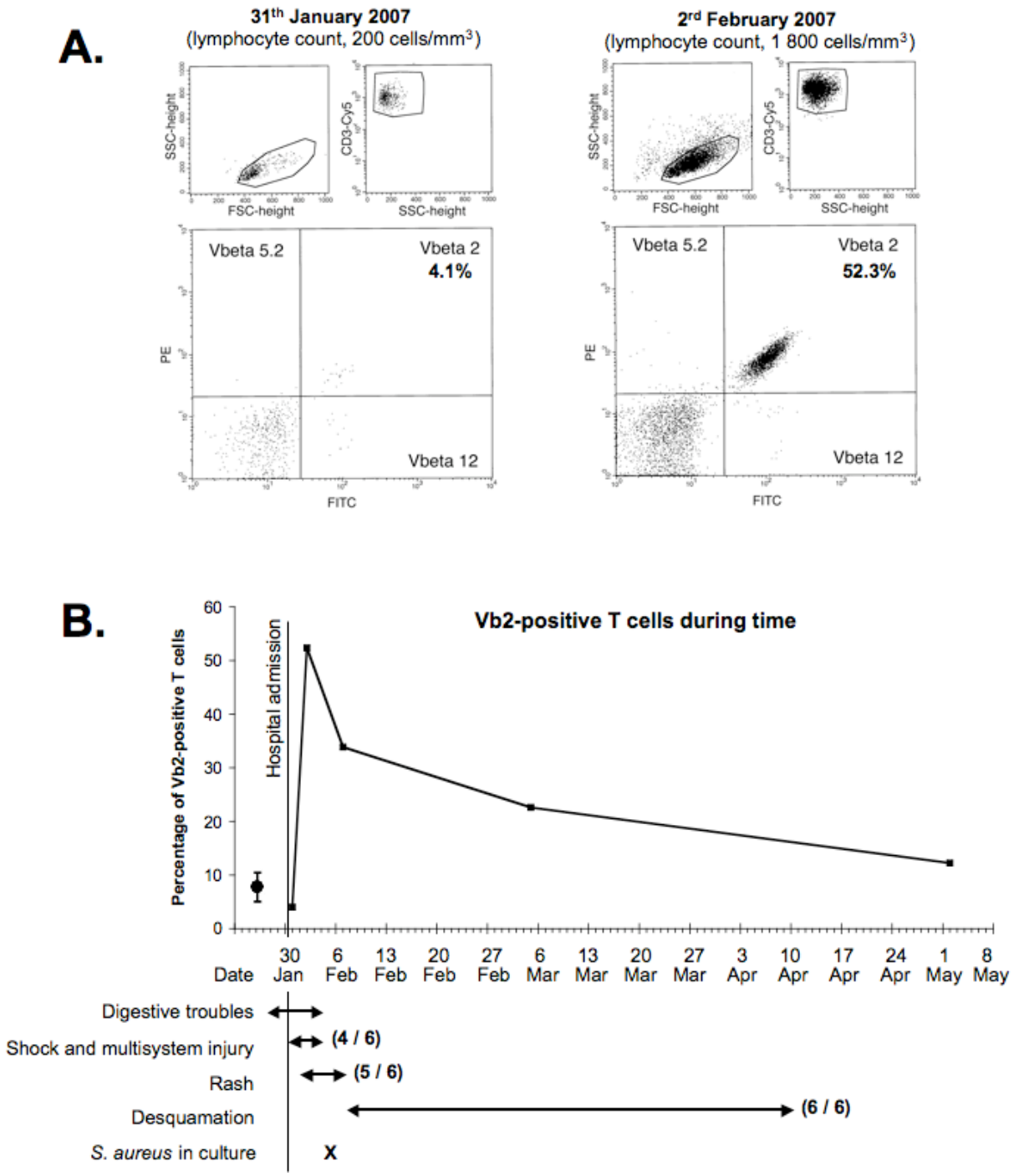


Figure 1. *Panel A*, dot plot of PBMC (upper left quadrants) sampled on 31 January and 2 February to determine the percentage of T cells (labelled with Cy5; upper right quadrants) positive for Vbeta 5.2 (labelled with PE), Vbeta 2 (labelled with PE and FITC) and Vbeta 12 (labelled with FITC) with the IO Test Beta Mark® Kit (lower quadrants) at the onset of shock and two days later. *Panel B*, kinetics of Vbeta 2-

positive T cells. The cumulative number of diagnostic criteria for definite staphylococcal TSS is shown in brackets. ● indicates the mean percentage (± 2SD) of Vbeta 2-positive T cells.

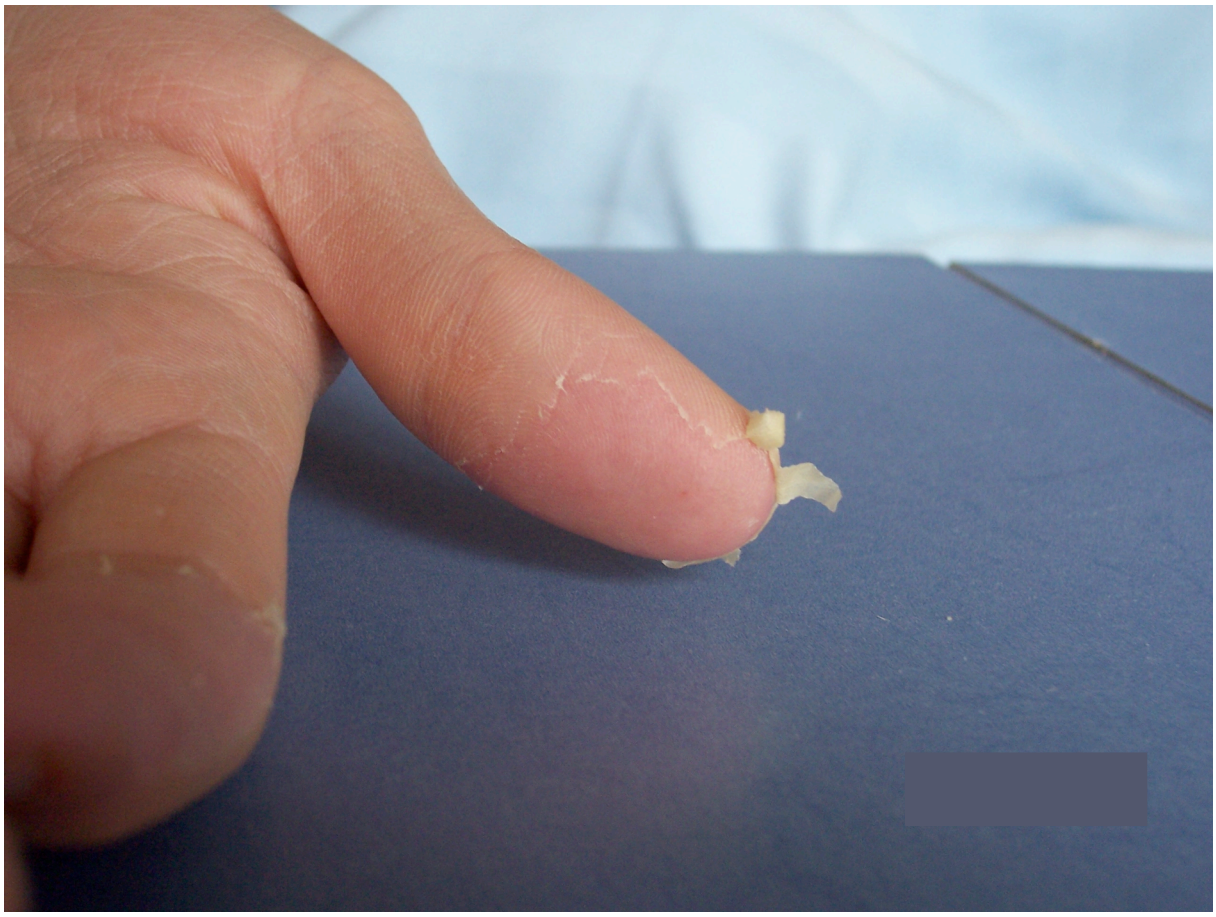


Figure 1. Desquamation of the fingers of the left hand.

V. Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes focalisé sur l'implication des exotoxines superantigéniques dans le CTS et le choc septique à *S. aureus*. Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude épidémiologique sur le CTS et avons pu démontrer que le CTS non-menstruel, comparé au CTS mentruel, touchait une population plus agée, ayant plus de co-morbidités, chez qui la fréquence des hémocultures positives ainsi que la mortalité, étaient plus élevées. Nous avons secondairement démontré qu'il était possible de mettre en évidence *in vivo* non seulement une production de TSST-1 au cours de CTS menstruels mais aussi une production de TSST-1 ou de SEB au cours de CTS non-menstruels. A termes, grâce à la généralisation de la technique utilisée et grâce à l'utilisation des signatures Vbeta discriminantes de chacune des exotoxines superantigéniques que nous avons définis *in vitro*, l'implication dans le CTS des 19 autres exotoxines superantigéniques répertoriées à ce jour, pourra être précisée. Ensuite, ceci pourrait conduire à la réalisation d'essais cliniques, visant à démontrer l'intérêt des thérapeutiques anti-toxiniques, et la mise en évidence d'une signature Vbeta *in vivo* pourra être un outil pour sélectionner les patients. Enfin, si les thérapeutiques anti-toxiniques montrent un bénéfice lorsqu'ils sont introduits précocément au cours de la maladie, la mise en évidence d'une signature Vbeta *in vivo* pourra faciliter leur introduction en pratique clinique. Enfin, si nos résultats sont confirmés par une plus large série, la mise en évidence d'une signature Vbeta *in vivo* pourra être intégrée aux critères diagnostiques de CTS du CDC, qui se base actuellement uniquement sur des critères cliniques et biologiques précoces non spécifiques et sur l'apparition d'une la desquamation qui survient généralement plusieurs semaines après l'épisode initial.

Concernant l'implication des exotoxines superantigéniques dans le choc septique, nous avons démontré qu'il existait un lien épidémiologique entre la présence du gène codant SEA et l'apparition d'un choc septique alors que la présence de l'*egc* semblait avoir plutôt un rôle « protecteur ». Nous avons également caractérisé génétiquement le clone SARM prédominant dans les hôpitaux de Lyon (et probablement en France) et celui-ci possède le gène codant SEA alors que la majorité des clones SARM pandémiques mondiaux possèdent soit le gène codant SEA, soit l'*egc*. Cette dichotomie pourrait simplement refléter des fonds génétiques particulièrement adaptés pour persister et disséminer dans les hôpitaux, mais SEA et la présence de l'*egc* peuvent aussi conférer un avantage en termes de virulence et/ou d'adhésion aux SARM hospitaliers (à l'instar de la PVL qui accroît la virulence des SARM communautaires). L'association du gène codant SEA et le choc septique pourrait également simplement refléter le fait que le clone Lyon prédomine dans les services de réanimation de Lyon, ou sont pris en charge les patients souffrant de choc septique. En effet, il existe possiblement un biais de sélection « lié à la clonalité », puisque la prévalence du clone Lyon est vraisemblablement plus importante dans les services de réanimation (qui prend en charge des patients ayant une bactériémie à *S. aureus* avec choc septique), par rapport aux services médico-chirurgicaux (qui prend en charge des patients ayant une bactériémie à *S. aureus* sans choc septique) ou les services d'urgences (qui prend en charge des patients ayant une infection suppurative à *S. aureus*, sans bactériémie ni choc septique). Toutefois, ceci pourrait être lié à un effet propre de SEA. En effet, nous avons démontré qu'il existait de réelles différences dans la capacité à induire une réponse pro-inflammatoire entre SEA et une des toxines de l'*egc*, SEG. La réponse inflammatoire de type Th-1 induite par SEA *in vitro* était significativement plus importante que celle induite par SEG.

Nous avons démontré dans un modèle animal que la virulence du clone Lyon était plus grande que celles de SASM, alors que la plus grande virulence des SARM en général, par rapport aux SASM, est largement controversée dans la littérature. La majorité des études cliniques comparant la mortalité induite par les SARM versus celle induite par des SASM (dans diverses situations cliniques comme les bactériémies, les PAVM, etc.) sont d'interprétation difficile, du fait de facteurs confondant lié à l'hôte. En effet, les patients infectés par les SARM sont généralement plus agés que ceux infectés par des SASM, ont plus de co-morbidités, et le traitement de ces deux types d'infections est différents, car il fait appel principalement aux glycopeptides dans un cas, et aux beta-lactamines dans l'autre cas, alors que le pouvoir bactéricide de ces deux classes d'antibiotique est différent. Un facteur confondant supplémentaire pourrait provenir des SARM, puisque chacun des clones SARM pandémiques pourrait avoir des caractéristiques propres en termes d'adhésion et/ou de virulence. Ainsi, « mélanger » un clone SARM prédominant avec des SARM minoritaires de moindre virulence pour analyser la gravité d'une situation clinique donnée, pourrait également induire un biais dans les études cliniques. Il a été démontré que le clone Brézilien, qui ne possède pas de gène codant une exotoxine superantigénique, avait une plus grande capacité que des SARM minoritaires, à adhérer et à s'internaliser dans des cellules non-phagocytaires, ainsi qu'à produire du biofilm. Ainsi, le clone Brézilien paraît particulièrement mieux adapté que des SARM minoritaires pour survivre et persister chez son hôte. La meilleure connaissance des caractéristiques propres à chacun des clones SARM hospitaliers pandémiques pourrait permettre de mieux comprendre les éléments qui ont favorisé leur succès, pourrait permettre d'identifier les facteurs de virulence que chacun d'entre-eux exprime majoritairement en pathologie humaine, et

pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le clone Lyon semble lui avoir développé ses capacités d'adhésion, notamment au collagène de type I, et semble particulièrement virulent dans un modèle animal de choc septique. SEA pourrait participer à cette plus grande virulence, qui semblait d'origine multifactorielle dans notre modèle. Chez l'homme, nous n'avons pas pu mettre en évidence une production de SEA chez deux patients qui présentait un choc septique lié à une infection par le clone Lyon. Toutefois, ces deux isolats produisaient SEA *in vitro*, puisque la signature Vbeta de SEA était détectable lorsque les surnageants de culture bactérienne, contenant les toxines produites par ces isolats (et donc SEA), étaient mises en contact avec des PBMCs de sujets sains cultivés *in vitro*. Désormais, des investigations complémentaires sont nécessaires pour mettre en évidence une production d'exotoxine superantigénique au cours du choc septique à *S. aureus*, et plus particulièrement de SEA, lorsque le clone Lyon est en cause. Ceci pourrait aboutir à une transformation de nos méthodes thérapeutique. En effet, à ce jour, la mortalité du choc septique à *S. aureus* reste élevée et aucun des traitement couramment utilisés dans cette pathologie, ne bloque la production de ces toxines.

VI. Références

Adem, P. V., C. P. Montgomery, et al. (2005). "*Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children." N Engl J Med **353**(12): 1245-51.

Amaral, M. M., L. R. Coelho, et al. (2005). "The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells." J Infect Dis **192**(5): 801-10.

Andrews, M. M., E. M. Parent, et al. (2001). "Recurrent nonmenstrual toxic shock syndrome: clinical manifestations, diagnosis, and treatment." Clin Infect Dis **32**(10): 1470-9.

Annane, D., P. Aegerter, et al. (2003). "Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network." Am J Respir Crit Care Med **168**(2): 165-72.

Annane, D., E. Bellissant, et al. (2005). "Septic shock." Lancet **365**(9453): 63-78.

Arciola, C. R., L. Baldassarri, et al. (2001). "Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections." J Clin Microbiol **39**(6): 2151-6.

Arciola, C. R., S. Collamati, et al. (2001). "A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprosthesis infections." Diagn Mol Pathol **10**(2): 130-7.

Arnold, S. R., D. Elias, et al. (2006). "Changing patterns of acute hematogenous osteomyelitis and septic arthritis: emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." J Pediatr Orthop **26**(6): 703-8.

Bahrain, M., M. Vasiliades, et al. (2006). "Five cases of bacterial endocarditis after furunculosis and the ongoing saga of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections." Scand J Infect Dis **38**(8): 702-7.

Bartell, P. F., T. E. Orr, et al. (1968). "Experimental infection of mice with *Staphylococcus aureus*: evidence against alpha toxin and the terminal size of the bacterial population as determinants of lethality." J Infect Dis **118**(5): 481-90.

Bayles, K. W., C. A. Wesson, et al. (1998). "Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells." Infect Immun **66**(1): 336-42.

Becker, K., A. W. Friedrich, et al. (2003). "Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens." J Clin Microbiol **41**(4): 1434-9.

Bohin, B., Y. Gillet, et al. (2007). "Pediatric bone and joint infections due to Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*." Pediatr Infec Dis J **In press**.

Boibieux, A., X. Brechignac, et al. (1998). "208 infections ostéo-articulaires : 4 ans de suivi. ." RICAI

Bone, R. C., W. J. Sibbald, et al. (1992). "The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure." Chest **101**(6): 1481-3.

CDC (1990). "Reduced incidence of menstrual toxic shock syndrome: United-States, 1980-1990." **39**: 421-3.

CDC (March 2006). "CDC and Prevention Experts' Meeting on Minimizing the Impact of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Community." http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/CAMRSA_ExpMtgStrategies.pdf.

Chavakis, T., K. Wiechmann, et al. (2005). "*Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems." Thromb Haemost **94**(2): 278-85.

Chesney, P. J., S. L. Slama, et al. (1981). "Outpatient diagnosis and management of toxic-shock syndrome." N Engl J Med **304**(23): 1426.

Choi, Y., J. A. Lafferty, et al. (1990). "Selective expansion of T cells expressing V beta 2 in toxic shock syndrome." J Exp Med **172**(3): 981-4.

Clement S., Vaudaux P. et al. (2005). "Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis." J Infect Dis. **192**(6):1023-8.

Cleven, B. E., M. Palka-Santini, et al. (2006). "Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray." J Clin Microbiol **44**(7): 2389-97.

Colque-Navarro, P., B. Soderquist, et al. (1998). "Antibody response in *Staphylococcus aureus* septicaemia--a prospective study." J Med Microbiol **47**(3): 217-25.

Combes, A., C. E. Luyt, et al. (2007). "Early predictors for infection recurrence and death in patients with ventilator-associated pneumonia." Crit Care Med **35**(1): 146-54.

Combes, A., C. E. Luyt, et al. (2004). "Impact of methicillin resistance on outcome of *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia." Am J Respir Crit Care Med **170**(7): 786-92.

Cook, D. N., D. S. Pisetsky, et al. (2004). "Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease." Nat Immunol **5**(10): 975-9.

Corne, P., H. Marchandin, et al. (2005). "Molecular evidence that nasal carriage of *Staphylococcus aureus* plays a role in respiratory tract infections of critically ill patients." J Clin Microbiol **43**(7): 3491-3.

Cosgrove, S. E., Y. Qi, et al. (2005). "The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges." Infect Control Hosp Epidemiol **26**(2): 166-74.

Cribier, B., G. Prevost, et al. (1992). "*Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study." Dermatology **185**(3): 175-80.

Darenberg, J., N. Ihendyane, et al. (2003). "Intravenous immunoglobulin G therapy in streptococcal toxic shock syndrome: a European randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Clin Infect Dis **37**(3): 333-40.

Darenberg, J., B. Soderquist, et al. (2004). "Differences in potency of intravenous polyspecific immunoglobulin G against streptococcal and staphylococcal superantigens: implications for therapy of toxic shock syndrome." Clin Infect Dis **38**(6): 836-42.

Darouiche, R. O. (2006). "Spinal epidural abscess." N Engl J Med **355**(19): 2012-20.

de Bentzmann, S., A. Tristan, et al. (2004). "*Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin." J Infect Dis **190**(8): 1506-15.

Del Giudice, P., V. Blanc, et al. (2006). "Emergence of two populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquired skin infections." Br J Dermatol **154**(1): 118-24.

Deringer, J. R., R. J. Ely, et al. (1997). "Vbeta-dependent stimulation of bovine and human T cells by host-specific staphylococcal enterotoxins." Infect Immun **65**(10): 4048-54.

Diep, B. A., S. R. Gill, et al. (2006). "Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Lancet **367**(9512): 731-9.

Dinges, M. M., P. M. Orwin, et al. (2000). "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*." Clin Microbiol Rev **13**(1): 16-34, table of contents.

Dohin, B., Y. Gillet, et al. (2001). "Pediatric bone and joint infections due to Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*." Pediatr Infec Dis J: In press.

Dufour, P., Y. Gillet, et al. (2002). "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin." Clin Infect Dis **35**(7): 819-24.

Dufour, P., S. Jarraud, et al. (2000). "Polymorphisme du système de régulation des exoprotéines chez *Staphylococcus aureus*." Med Mal Inf **30**: 739-44.

Dumitrescu, O., S. Boisset, et al. (2007). "Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin." Antimicrob Agents Chemother **51**(4): 1515-9.

Durand, G., M. Bes, et al. (2006). "Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France." J Clin Microbiol **44**(3): 847-53.

Edgeworth, J. D., G. Yadegarfar, et al. (2007). "An outbreak in an intensive care unit of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 239 associated with an increased rate of vascular access device-related bacteremia." Clin Infect Dis **44**(4): 493-501.

Enright, M. C. and B. G. Spratt (1999). "Multilocus sequence typing." Trends Microbiol **7**(12): 482-7.

Essmann, F., H. Bantel, et al. (2003). "*Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation." Cell Death Differ **10**(11): 1260-72.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2005. Bilthoven, R. O. A. a. h. r. n. e. l. E. t.-p.

Foster, T. J. and M. Hook (1998). "Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*." Trends Microbiol **6**(12): 484-8.

Fowler, V. G., Jr., A. Justice, et al. (2005). "Risk factors for hematogenous complications of intravascular catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteremia." Clin Infect Dis **40**(5): 695-703.

Fowler, V. G., Jr., J. M. Miro, et al. (2005). "*Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress." Jama **293**(24): 3012-21.

Fowler, V. G., Jr., G. Sakoulas, et al. (2004). "Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level *in vitro* resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein." J Infect Dis **190**(6): 1140-9.

Fowler, V. G., Jr., L. L. Sanders, et al. (1998). "Outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia according to compliance with recommendations of infectious diseases specialists: experience with 244 patients." Clin Infect Dis **27**(3): 478-86.

Fukuyama, M., K. Miwa, et al. (2005). "Mixed bacterial infection model of sepsis in rabbits and its application to evaluate superantigen-adsorbing device." Blood Purif **23**(2): 119-27.

Garzoni, C., P. Francois, et al. (2007). "A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells." BMC Genomics **8**: 171.

Gauduchon, V., G. Cozon, et al. (2004). "Neutralization of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin *in vitro*." J Infect Dis **189**(2): 346-53.

Gelfand, M. S., K. O. Cleveland, et al. (2006). "Pathological fracture in acute osteomyelitis of long bones secondary to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: two cases and review of the literature." Am J Med Sci **332**(6): 357-60.

Genestier, A. L., M. C. Michallet, et al. (2005). "*Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils." J Clin Invest **115**(11): 3117-27.

Gillet, Y., P. Vanhems, et al. (2007). "Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin." Clin Infect Dis **45**(3): 315-21.

Gomez, J., E. Garcia-Vazquez, et al. (2007). "Predictors of mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia: the role of empiric antibiotic therapy." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **26**(4): 239-45.

Gomez, M. I., A. Lee, et al. (2004). "*Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1." Nat Med **10**(8): 842-8.

Gonzalez, B. E., G. Martinez-Aguilar, et al. (2005). "Severe Staphylococcal sepsis in adolescents in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Pediatrics **115**(3): 642-8.

Gonzalez, B. E., A. M. Rueda, et al. (2006). "Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococccus aureus* as the cause of healthcare-associated infection." Infect Control Hosp Epidemiol **27**(10): 1051-6.

Gonzalez, B. E., J. Teruya, et al. (2006). "Venous thrombosis associated with staphylococcal osteomyelitis in children." Pediatrics **117**(5): 1673-9.

Gorenstein, A., E. Gross, et al. (2000). "The pivotal role of deep vein thrombophlebitis in the development of acute disseminated staphylococcal disease in children." Pediatrics **106**(6): E87.

Grohs, P., M. D. Kitzis, et al. (2003). "In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **47**(1): 418-20.

Grundmann, H., M. Aires-de-Sousa, et al. (2006). "Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat." Lancet **368**(9538): 874-85.

Hajjeh, R. A., A. Reingold, et al. (1999). "Toxic shock syndrome in the United States: surveillance update, 1979 1996." Emerg Infect Dis **5**(6): 807-10.

Hall, A. E., P. J. Domanski, et al. (2003). "Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM protein clumping factor A." Infect Immun **71**(12): 6864-70.

Harmsen, D., H. Claus, et al. (2003). "Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management." J Clin Microbiol **41**(12): 5442-8.

Haslinger, B., K. Strangfeld, et al. (2003). "*Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway." Cell Microbiol **5**(10): 729-41.

Herman, A., G. Croteau, et al. (1990). "HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells." J Exp Med **172**(3): 709-17.

Herwaldt, L. A. (2003). "*Staphylococcus aureus* nasal carriage and surgical-site infections." Surgery **134**(5 Suppl): S2-9.

Hieber, J. P., A. J. Nelson, et al. (1977). "Acute disseminated staphylococcal disease in childhood." Am J Dis Child **131**(2): 181-5.

Hiramatsu, K., L. Cui, et al. (2001). "The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Trends Microbiol **9**(10): 486-93.

Hoen, B. (2002). "Special issues in the management of infective endocarditis caused by gram-positive cocci." Infect Dis Clin North Am **16**(2): 437-52, xi.

Holtfreter, S. and B. M. Broker (2005). "Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis?" Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **53**(1): 13-27.

Holtfreter, S., K. Roschack, et al. (2006). "*Staphylococcus aureus* carriers neutralize superantigens by antibodies specific for their colonizing strain: a potential explanation for their improved prognosis in severe sepsis." J Infect Dis **193**(9): 1275-8.

Hospitalière, S. F. d. H. (Paris - 5 mars 2004). "Conférence de consensus - Gestion pré-opératoire du risque infectieux." http://www.sfhh.net/telechargement/cc_risqueinfectieux_long.pdf.

Howe, R. A., A. Monk, et al. (2004). "Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages." Emerg Infect Dis **10**(5): 855-7.

Hudson, K. R., H. Robinson, et al. (1993). "Two adjacent residues in staphylococcal enterotoxins A and E determine T cell receptor V beta specificity." J Exp Med **177**(1): 175-84.

Hudson, M. C., W. K. Ramp, et al. (1999). "*Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials." FEMS Microbiol Lett **173**(2): 279-84.

Imamura, T., S. Tanase, et al. (2005). "Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus*." J Exp Med **201**(10): 1669-76.

Issartel, B., A. Tristan, et al. (2005). "Frequent carriage of Panton-Valentine leucocidin genes by *Staphylococcus aureus* isolates from surgically drained abscesses." J Clin Microbiol **43**(7): 3203-7.

Ito, T., X. X. Ma, et al. (2004). "Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*." Antimicrob Agents Chemother **48**(7): 2637-51.

Ito, T., K. Okuma, et al. (2003). "Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC." Drug Resist Updat **6**(1): 41-52.

Jarraud, S., C. Mougel, et al. (2002). "Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease." Infect Immun **70**(2): 631-41.

Jarraud, S., M. A. Peyrat, et al. (2001). "*egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*." J Immunol **166**(1): 669-77.

Johansson, A., J. I. Flock, et al. (2001). "Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis." Clin Orthop Relat Res(382): 241-6.

Kahl, B. C. and G. Peters (2007). "Microbiology. Mayhem in the lung." Science **315**(5815): 1082-3.

Kaul, R., A. McGeer, et al. (1999). "Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome--a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group." Clin Infect Dis **28**(4): 800-7.

Khatib, R., L. B. Johnson, et al. (2006). "Persistence in *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence, characteristics of patients and outcome." Scand J Infect Dis **38**(1): 7-14.

Kielian, T., A. Cheung, et al. (2001). "Diminished virulence of an alpha-toxin mutant of *Staphylococcus aureus* in experimental brain abscesses." Infect Immun **69**(11): 6902-11.

Kielian, T., A. Haney, et al. (2005). "Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess." Infect Immun **73**(11): 7428-35.

Kohro, S., H. Imaizumi, et al. (2004). "Reductions in levels of bacterial superantigens/cannabinoids by plasma exchange in a patient with severe toxic shock syndrome." Anaesth Intensive Care **32**(4): 588-91.

Kollef, M. H., J. Rello, et al. (2004). "Clinical cure and survival in Gram-positive ventilator-associated pneumonia: retrospective analysis of two double-blind studies comparing linezolid with vancomycin." Intensive Care Med **30**(3): 388-94.

Kollef, M. H., A. Shorr, et al. (2005). "Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia." Chest **128**(6): 3854-62.

Kravitz, G. R., D. J. Dries, et al. (2005). "Purpura fulminans due to *Staphylococcus aureus*." Clin Infect Dis **40**(7): 941-7.

Kuroda, M., T. Ohta, et al. (2001). "Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Lancet **357**(9264): 1225-40.

Labandeira-Rey, M., F. Couzon, et al. (2007). "*Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia." Science **315**(5815): 1130-3.

Ladhani, S. (2001). "Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome." Clin Microbiol Infect **7**(6): 301-7.

Lamphear, J. G., J. A. Mollick, et al. (1996). "Residues near the amino and carboxyl termini of staphylococcal enterotoxin E independently mediate TCR V beta-specific interactions." J Immunol **156**(6): 2178-85.

Laurent, F., H. Lelievre, et al. (2001). "Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals." J Antimicrob Chemother **47**(3): 277-83.

Lavoie, P. M., A. R. Dumont, et al. (2005). "Delayed expansion of a restricted T cell repertoire by low-density TCR ligands." Int Immunol **17**(7): 931-41.

Lee, Y. T., T. D. Chou, et al. (2005). "Rapidly progressive necrotizing fasciitis caused by *Staphylococcus aureus*." J Microbiol Immunol Infect **38**(5): 361-4.

Leemans, J. C., M. Heikens, et al. (2003). "Lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* synergistically induce neutrophil influx into the lungs of mice." Clin Diagn Lab Immunol **10**(5): 950-3.

Lepape, A. (2005). "Is there any microbiologically-based specificity of the management of catheter related infections?." Ann Fr Anesth Reanim **24**(3): 298-301.

Lescure, F. X., G. Locher, et al. (2006). "community-acquired infection with healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of home nursing care." Infect Control Hosp Epidemiol **27**(11): 1213-8.

Lesens, O., E. Brannigan, et al. (2006). "Impact of the use of aminoglycosides in combination antibiotic therapy on septic shock and mortality due to *Staphylococcus aureus* bacteremia." Eur J Intern Med **17**(4): 276-80.

Lesens, O., C. Methlin, et al. (2003). "Role of comorbidity in mortality related to *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective study using the Charlson weighted index of comorbidity." Infect Control Hosp Epidemiol **24**(12): 890-6.

Lew, D. P. and F. A. Waldvogel (2004). "Osteomyelitis." Lancet **364**(9431): 369-79.

Lewis, J. S., 2nd and J. H. Jorgensen (2005). "Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned?" Clin Infect Dis **40**(2): 280-5.

Liassine, N., R. Auckenthaler, et al. (2004). "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes." J Clin Microbiol **42**(2): 825-8.

Lina, G., Y. Piemont, et al. (1999). "Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia." Clin Infect Dis **29**(5): 1128-32.

Llewelyn, M., S. Sriskandan, et al. (2006). "The TCR Vbeta signature of bacterial superantigens spreads with stimulus strength." Int Immunol **18**(10): 1433-41.

Lorenz, E., J. P. Mira, et al. (2000). "A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection." Infect Immun **68**(11): 6398-401.

Lowy, F. D. (1998). "*Staphylococcus aureus* infections." N Engl J Med **339**(8): 520-32.

Lyell, A. (1989). "Alexander Ogston, micrococci, and Joseph Lister." J Am Acad Dermatol **20**(2 Pt 1): 302-10.

Marra, A. R., M. B. Edmond, et al. (2006). "Time to blood culture positivity as a predictor of clinical outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection." J Clin Microbiol **44**(4): 1342-6.

Martin, G. S., D. M. Mannino, et al. (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." N Engl J Med **348**(16): 1546-54.

Martinez-Aguilar, G., A. Avalos-Mishaan, et al. (2004). "Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children." Pediatr Infect Dis J **23**(8): 701-6.

Martinez-Aguilar, G., W. A. Hammerman, et al. (2003). "Clindamycin treatment of invasive infections caused by community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in children." Pediatr Infect Dis J **22**(7): 593-8.

Matsuda, Y., H. Kato, et al. (2003). "Early and definitive diagnosis of toxic shock syndrome by detection of marked expansion of T-cell-receptor VBeta2-positive T cells." Emerg Infect Dis **9**(3): 387-9.

McCormick, J. K., J. M. Yarwood, et al. (2001). "Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update." Annu Rev Microbiol **55**: 77-104.

McElroy, M. C., H. R. Harty, et al. (1999). "Alpha-toxin damages the air-blood barrier of the lung in a rat model of *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia." Infect Immun **67**(10): 5541-4.

Miles, G., L. Jayasinghe, et al. (2006). "Assembly of the Bi-component leukocidin pore examined by truncation mutagenesis." J Biol Chem **281**(4): 2205-14.

Miller, L. G., F. Perdreau-Remington, et al. (2005). "Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles." N Engl J Med **352**(14): 1445-53.

Miro, J. M., I. Anguera, et al. (2005). "*Staphylococcus aureus* native valve infective endocarditis: report of 566 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database." Clin Infect Dis **41**(4): 507-14.

Mishaan, A. M., E. O. Mason, Jr., et al. (2005). "Emergence of a predominant clone of community-acquired *Staphylococcus aureus* among children in Houston, Texas." Pediatr Infect Dis J **24**(3): 201-6.

Mockenhaupt, M., M. Idzko, et al. (2005). "Epidemiology of staphylococcal scalded skin syndrome in Germany." J Invest Dermatol **124**(4): 700-3.

Mongodin, E., O. Bajolet, et al. (2002). "Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium." Infect Immun **70**(2): 620-30.

Moore, C. E., S. Segal, et al. (2004). "Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*." Clin Diagn Lab Immunol **11**(6): 1194-7.

Moran, G. J., A. Krishnadasan, et al. (2006). "Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department." N Engl J Med **355**(7): 666-74.

Moreillon, P., J. M. Entenza, et al. (1995). "Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis." Infect Immun **63**(12): 4738-43.

Moreillon, P. and Y. A. Que (2004). "Infective endocarditis." Lancet **363**(9403): 139-49.

Morgan, W. R., M. D. Caldwell, et al. (2007). "Necrotizing fasciitis due to a methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolate harboring an enterotoxin gene cluster." J Clin Microbiol **45**(2): 668-71.

Murray, R. J. (2005). "Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease." Intern Med J **35 Suppl 2**: S106-19.

Mylotte, J. M., C. McDermott, et al. (1987). "Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia." Rev Infect Dis **9**(5): 891-907.

Nilsson, I. M., M. Verdrengh, et al. (1999). "Protection against *Staphylococcus aureus* sepsis by vaccination with recombinant staphylococcal enterotoxin A devoid of superantigenicity." J Infect Dis **180**(4): 1370-3.

Novick, R. P. (2003). "Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*." Plasmid **49**(2): 93-105.

Okuma, K., K. Iwakawa, et al. (2002). "Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community." J Clin Microbiol **40**(11): 4289-94.

Oliveira, D. C. and H. de Lencastre (2002). "Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **46**(7): 2155-61.

Oliveira, D. C., A. Tomasz, et al. (2002). "Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Lancet Infect Dis **2**(3): 180-9.

Omoe, K., K. Imanishi, et al. (2005). "Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P." Infect Immun **73**(9): 5540-6.

Omoe, K., K. Imanishi, et al. (2004). "Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R." Infect Immun **72**(6): 3664-7.

Orwin, P. M., J. R. Fitzgerald, et al. (2003). "Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L." Infect Immun **71**(5): 2916-9.

Orwin, P. M., D. Y. Leung, et al. (2002). "Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins." Biochemistry **41**(47): 14033-40.

Palmqvist, N., T. Foster, et al. (2005). "Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation." J Infect Dis **191**(5): 791-8.

Palmqvist, N., T. Foster, et al. (2002). "Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death." Microb Pathog **33**(5): 239-49.

Pannaraj, P. S., K. G. Hulten, et al. (2006). "Infective pyomyositis and myositis in children in the era of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection." Clin Infect Dis **43**(8): 953-60.

Paule, S. M., A. C. Pasquariello, et al. (2005). "Real-time PCR can rapidly detect methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive blood culture bottles." Am J Clin Pathol **124**(3): 404-7.

Peacock, S. J., C. E. Moore, et al. (2002). "Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*." Infect Immun **70**(9): 4987-96.

Pedersen, M., T. L. Benfield, et al. (2006). "Haematogenous *Staphylococcus aureus* meningitis. A 10-year nationwide study of 96 consecutive cases." BMC Infect Dis **6**: 49.

Perez-Roth, E., F. Lorenzo-Diaz, et al. (2004). "Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital." J Clin Microbiol **42**(10): 4649-56.

Pfaller, M. A. and L. A. Herwaldt (1988). "Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci." Clin Microbiol Rev **1**(3): 281-99.

Plouin-Gaudon I., Clement S. et al. (2006). “Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis.” Rhinology. **44**(4):249-54.

Proctor, R. A., C. von Eiff, et al. (2006). "Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections." Nat Rev Microbiol **4**(4): 295-305.

Proft, T. and J. D. Fraser (2003). "Bacterial superantigens." Clin Exp Immunol **133**(3): 299-306.

Que, Y. A., J. A. Haefliger, et al. (2005). "Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis." J Exp Med **201**(10): 1627-35.

RAISIN (2005). "Surveillance des infections du site opératoire en France en 2001 et 2002." Institut de Veille sanitaire: http://www.invs.sante.fr/publications/2005/iso_raisin_2001_2003/iso_raisin_2003.pdf.

Robinson, D. A. and M. C. Enright (2003). "Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **47**(12): 3926-34.

Robinson, D. A. and M. C. Enright (2004). "Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Clin Microbiol Infect **10**(2): 92-7.

Roghmann, M., K. L. Taylor, et al. (2005). "Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia." J Hosp Infect **59**(1): 27-32.

Rutar, T., H. F. Chambers, et al. (2006). "Ophthalmic manifestations of infections caused by the USA300 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Ophthalmology **113**(8): 1455-62.

Salgado, C. D., B. M. Farr, et al. (2003). "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors." Clin Infect Dis **36**(2): 131-9.

Salliot, C., V. Zeller, et al. (2006). "Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* infections: report of 4 French cases." Scand J Infect Dis **38**(3): 192-5.

Sawai, T., K. Tomono, et al. (1997). "Role of coagulase in a murine model of hematogenous pulmonary infection induced by intravenous injection of *Staphylococcus aureus* enmeshed in agar beads." Infect Immun **65**(2): 466-71.

Sendi, P., M. Rohrbach, et al. (2006). "*Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection." Clin Infect Dis **43**(8): 961-7.

Seybold, U., E. V. Kourbatova, et al. (2006). "Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections." Clin Infect Dis **42**(5): 647-56.

Shanks, R. M., N. P. Donegan, et al. (2005). "Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation." Infect Immun **73**(8): 4596-606.

Shinefield, H., S. Black, et al. (2002). "Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis." N Engl J Med **346**(7): 491-6.

Shore, A., A. S. Rossney, et al. (2005). "Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 2070-83.

Sibelius, U., U. Grandel, et al. (2000). "Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation." Circulation **101**(1): 78-85.

Siberry, G. K., T. Tekle, et al. (2003). "Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance *in vitro*." Clin Infect Dis **37**(9): 1257-60.

Sinha, B., P. P. Francois, et al. (1999). "Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1." Cell Microbiol **1**(2): 101-17.

Skinner, D. and C. Keefer (1941). "Significance of Bacteremia Caused by *Staphylococcus Aureus*." Arch Intern Med **68**: 851-75.

Soriano, A., J. A. Martinez, et al. (2000). "Pathogenic significance of methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia." Clin Infect Dis **30**(2): 368-73.

Soussy, J. (2007). "Recommandations 2007." Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Sriskandan, S., M. Ferguson, et al. (2006). "Human intravenous immunoglobulin for experimental streptococcal toxic shock: bacterial clearance and modulation of inflammation." J Antimicrob Chemother **58**(1): 117-24.

Stanley, J. R. and M. Amagai (2006). "Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome." N Engl J Med **355**(17): 1800-10.

Stegmayr, B., S. Bjorck, et al. (1992). "Septic shock induced by group A streptococcal infection: clinical and therapeutic aspects." Scand J Infect Dis **24**(5): 589-97.

Stevens, D. L. (1996). "The toxic shock syndromes." Infect Dis Clin North Am **10**(4): 727-46.

Stevens, D. L., Y. Ma, et al. (2007). "Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." J Infect Dis **195**(2): 202-11.

Stevens, D. L., R. J. Wallace, et al. (2006). "Successful treatment of staphylococcal toxic shock syndrome with linezolid: a case report and *in vitro* evaluation of the production of toxic shock syndrome toxin type 1 in the presence of antibiotics." Clin Infect Dis **42**(5): 729-30.

Sutherland, A. M., K. R. Walley, et al. (2005). "Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults." Crit Care Med **33**(3): 638-44.

Takahashi, N. (2003). "Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease (NTED)." Pediatr Int **45**(2): 233-7.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, et al. (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." J Clin Microbiol **33**(9): 2233-9.

Texereau, J., J. D. Chiche, et al. (2005). "The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections." Clin Infect Dis **41 Suppl 7**: S408-15.

Thomas, D., S. Chou, et al. (2007). "Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins." Chem Immunol Allergy **93**: 24-41.

Thomas, D. Y., S. Jarraud, et al. (2006). "Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster." Infect Immun **74**(8): 4724-34.

Thomas, M. G., S. Peacock, et al. (1999). "Adhesion of *Staphylococcus aureus* to collagen is not a major virulence determinant for septic arthritis, osteomyelitis, or endocarditis." J Infect Dis **179**(1): 291-3.

Timsit, j. (2005). "Catheter-related infections: microbiology." Ann Fr Anesth Reanim **24**: 278-81.

Tristan, A., G. Durand, et al. (2005). "SARM : données épidémiologiques récentes et évolution de la résistance." Revue Francophone des Laboratoires **376**: 75-8.

Tung, H., B. Guss, et al. (2000). "A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family." Biochem J **345 Pt 3**: 611-9.

van der Mee-Marquet, N., C. Epinette, et al. (2007). "*Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections changed significantly in 2006." J Clin Microbiol **45**(3): 851-7.

Vandenesch, F., T. Naimi, et al. (2003). "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence." Emerg Infect Dis **9**(8): 978-84.

Verdier, I., G. Durand, et al. (2007). "Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests." J Clin Microbiol **45**(3): 725-9.

Vernachio, J., A. S. Bayer, et al. (2003). "Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in an experimental model of infective endocarditis." Antimicrob Agents Chemother **47**(11): 3400-6.

Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy-Cruchaudet, et al. (2004). "Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food." Lett Appl Microbiol **39**(6): 490-4.

Vieira-da-Motta, O., P. D. Ribeiro, et al. (2001). "RNAIII inhibiting peptide (RIP) inhibits *agr*-regulated toxin production." Peptides **22**(10): 1621-7.

von Eiff, C., K. Becker, et al. (2001). "Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group." N Engl J Med **344**(1): 11-6.

Walsh, T. R. and R. A. Howe (2002). "The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*." Annu Rev Microbiol **56**: 657-75.

Wang, A., E. Athan, et al. (2007). "Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis." Jama **297**(12): 1354-61.

Watts, A., D. Ke, et al. (2005). "*Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence." Infect Immun **73**(6): 3502-11.

Weems, J. J., Jr., J. P. Steinberg, et al. (2006). "Phase II, randomized, double-blind, multicenter study comparing the safety and pharmacokinetics of tefibazumab to placebo for treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2751-5.

Weisfelt, M., D. van de Beek, et al. (2007). "Nosocomial bacterial meningitis in adults: a prospective series of 50 cases." J Hosp Infect **66**(1): 71-8.

Wertheim, H. F., D. C. Melles, et al. (2005). "The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections." Lancet Infect Dis **5**(12): 751-62.

Yamaguchi, T., Y. Yokota, et al. (2002). "Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan." J Infect Dis **185**(10): 1511-6.

Yanagi, T., N. Kato, et al. (2007). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pyomyositis presenting with cellulitis-like symptoms." Clin Exp Dermatol **32**(4): 452-3.

Yarwood, J. M., D. J. Bartels, et al. (2004). "Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms." J Bacteriol **186**(6): 1838-50.

Zahar, J. R., C. Clec'h, et al. (2005). "Is methicillin resistance associated with a worse prognosis in *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia?" Clin Infect Dis **41**(9): 1224-31.

Zetola, N., J. S. Francis, et al. (2005). "Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat." Lancet Infect Dis **5**(5): 275-86.

Zhou, H., Z. Y. Xiong, et al. (2006). "An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model." Vaccine **24**(22): 4830-7.

ANNEXES

ANNEXE 1

Présentation orale

17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and 25th International Congress of Chemotherapy, Munich, Germany, 31 mars – 3 avril 2007

"Heteregeneous but higher adhesive properties of hospital-acquired MRSA Lyon clone isolates in comparison to MSSA isolates"

Tristan Ferry (orateur), Sophie de Bentzmann, Lys Mayor, Michele Bes, François Vandenesch, Jerome Etienne

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier l'adhésion in vitro du clone Lyon aux éléments de la matrice extracellulaire présents à la surface de cellules épithéliales des voies aériennes humaines (fibronectine et collagène de type I). L'hétérogénéité de l'adhésion du clone Lyon dans le modèle *in vitro* d'adhésion sur cellules épithéliales respiratoires humaines était associée à une plus grande adhésion au collagène de type I, alors que les isolats du clone Lyon ne possèdent pas le gène codant la protéine de liaison au collagène.

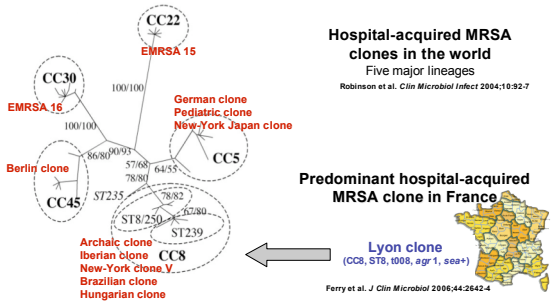
Heteregeneous but higher adhesive properties of hospital-acquired MRSA Lyon clone isolates in comparison to MSSA isolates

Tristan Ferry[1], Sophie de Bentzmann[2], Lys Mayor[1], Michele Bes[1], François Vandenesch[1], Jerome Etienne[1]

[1] INSERM U851, Lyon, F-69008 France; Université Lyon 1, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté de Médecine Laennec, Lyon F-69008 France.

[2] Unité Propre de Recherche 9027, Laboratoire d'Ingenierie des Systemes Macromoléculaires, Marseille, France.

Introduction



Hospital-acquired MRSA clones in the world
Five major lineages
Robinson et al. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:92-7

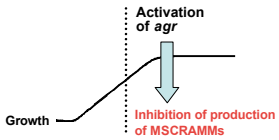
Predominant hospital-acquired MRSA clone in France

Lyon clone
(CC8, ST8, t008, *agr* 1, *sea*+)
Ferry et al. *J Clin Microbiol* 2006;44:2642-4

Success of MRSA pandemic clones and adhesion

Adhesion is mediated by adhesins called MSCRAMMs
(Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix molecules)

MSCRAMMs are negatively regulated by the *agr* system



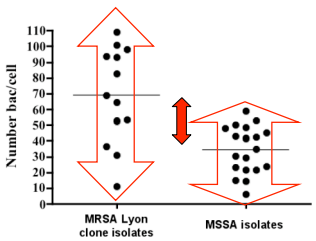
agr dysfunction could be a mechanism that promotes adhesion (epidemic MRSA clone in Canada)
Papakyriacou et al. *J Infect Dis* 2000;181:990-1000

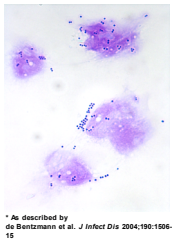
Collection of strains

Invasive isolates responsible for bloodstream infection in ICU patients collected during one year in the Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

	13 Lyon clone MRSA isolates	19 MSSA
Sequence Type (ST) determined by MLST	ST8	ST1, ST5, ST15, ST217, ST45, ST25, ST34, ST97, ST463, ST464, ST465, ST8

Adhesion of the 13 MRSA Lyon clone isolates compared to 19 MSSA *in vitro* on human airway epithelial cells (HAECs) *



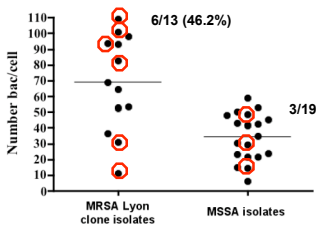


* As described by de Bentzmann et al. *J Infect Dis* 2004;190:1506-15

MRSA Lyon clone isolates have higher adhesive properties than MSSA isolates on HAECs (*P* = 0.0015)

Higher but more heterogeneous than MSSA isolates whereas each MRSA has the same genetic background (ST8)

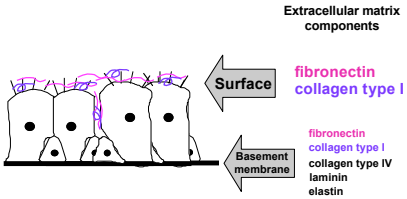
Detection of *agr* dysfunction among MRSA and MSSA isolates



***agr* dysfunction**
(Lack of delta-hemolysin expression)

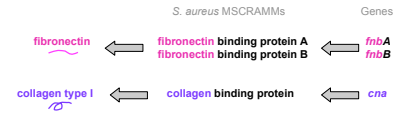
Adhesion of MRSA isolates on HAECs was independent of *agr* dysfunction

Hypothesis to explain the higher adhesion of MRSA in comparison with MSSA



Higher adhesion to fibronectin and/or collagen type I

Distribution of genes encoding fibronectin binding proteins and collagen binding protein in MRSA Lyon clone and MSSA isolates



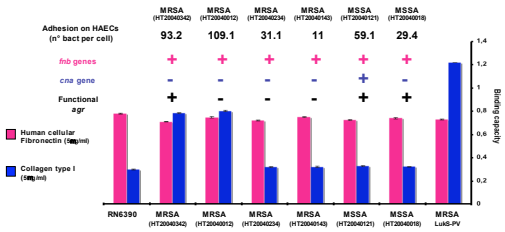
	fnbA (n, %)	*fnbB* (n, %)	*cna* (n, %)
MRSA Lyon clone isolates (n = 13)	13 (100)	13 (100)	0 (0)
MSSA isolates (n = 19)	17 (89)	19 (100)	4 (21)

Distribution of these genes in MRSA Lyon clone and MSSA isolates was quite similar and did not explain their different adhesive behavior on HAECs

Binding capacity of MRSA and MSSA to fibronectin and collagen type I *

* As described by de Bentzmann et al. *J Infect Dis* 2004;190:1506-15

Binding capacity of MRSA and MSSA to fibronectin and collagen type I *



high adhesion to collagen type I of some MRSA isolates, independent of the *agr* system and not mediated by the collagen binding protein

* As described by de Bentzmann et al. *J Infect Dis* 2004;190:1506-15

Conclusion

Adhesive properties on HAECs of MRSA Lyon clone isolates :

- higher than that of MSSA isolates
- heterogeneous despite similar genetic background and similar adhesin gene profile
- may be due to higher adhesion to collagen type I which was independent of the *agr* system and not mediated by the collagen binding protein
- may partly explain the success of the MRSA Lyon clone in France

Acknowledgement to the team INSERM U851, especially Anne Tristan and Florence Couzon-Vincent for technical assistance

ANNEXE 2

Présentation orale

17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and 25th International Congress of Chemotherapy, Munich, Germany, 31 mars – 3 avril 2007

"Usefulness of analysis of the Vbeta repertoire of T cells for the early diagnosis of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndrome"

Damien Thomas, Tristan Ferry (orateur), Thomas Perpoint, Jean-Christophe Richard, Christian Guillaume, Bernard Allaouchiche, François Vandenesch, Dominique Peyramond, Jerome Etienne

L'objectif de ce travail était de mettre en évidence un production *in vivo* d'exotoxine superantigénique chez des patients ayant un CTS et un choc toxique streptococcique. Quatre patients ayant un CTS et deux patient ayant un choc toxique streptococcique ont été inclus. En analysant le répertoire Vbeta des patients au cours du temps nous avons détecté la signature Vbeta de TSST-1 au cours de trois CTS menstruels et de SEB au cours d'un CTS non-menstruel. Nous avons également détecté la signature Vbeta d'exotoxines superantigéniques streptococciques, mais dans un cas seulement, alors que les deux isolats de *S. pyogenes* avaient le même profil toxinique et produisaient les même exotoxines superantigéniques *in vitro*. L'absence de dtétection chez un des deux patients pourrait être liée à la présence d'une bactériémie avec choc septique et lymphopénie qui pourrait limiter *in vivo* l'expansion des lymphocytes T ciblés par les exotoxines superantigéniques.

Usefulness of analysis of the Vbeta repertoire of T cells for the early diagnosis of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndrome

Damien Thomas[1], Tristan Ferry[1, 2], Thomas Perpoint[2], Jean-Christophe Richard[3], Christian Guillaume[4], Bernard Allaouchiche[4], François Vandenesch[1], Dominique Peyramond[2], Jerome Etienne[1]

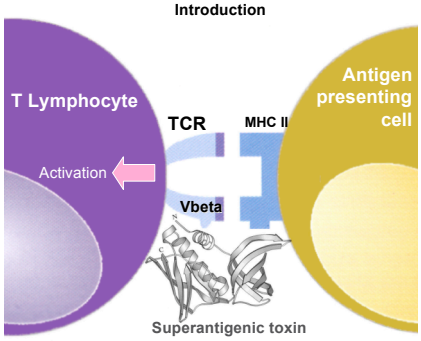
[1] INSERM U851, Lyon, F-69008 France; Université Lyon 1, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté de Médecine Laennec, Lyon F-69008 France.

[2] Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de la Croix Rousse, Hospices Civils de Lyon, 103 Grande-rue de la Croix-Rousse, 69317 Lyon Cedex 04, France.

[3] Service de Réanimation Médicale, Hôpital de la Croix Rousse, Hospices Civils de Lyon, 103 Grande-rue de la Croix-Rousse, 69317 Lyon Cedex 04, France.

[4] Département d'Anesthesie-Réanimation, pavillon G, Hopital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, place d'Arsonval, 69437 Lyon cedex 03, France.

Introduction



Physiopathology of staphylococcal and streptococcal TSS

Each superantigenic toxin binds one or more of the 24 different Vbeta

S. aureus

TSST-1 ⇨ Vbeta 2
SEA ⇨ Vbeta 7.2, 9, 22
SEB ⇨ Vbeta 3, 12, 14, 17
SEC …

S. pyogenes

SpeA ⇨ Vbeta 12, 14
SpeB ⇨ Vbeta 2, 8
SpeC ⇨ Vbeta 2
Ssa …

Vbeta-specific T Lymphocyte amplification

Vbeta-specific T Lymphocyte amplification

Production of pro-inflammatory cytokines responsible for clinical and biological signs of TSS

What could be the clinical impact of detecting *in vivo* production of superantigenic toxin?

Impact for the diagnosis

Diagnosis of TSS is sometimes difficult at the early stage of the disease
- aspecific clinical signs (compatible with other diagnosis)
- desquamation, which confirms the diagnosis of staphylococcal TSS, occurrs lately

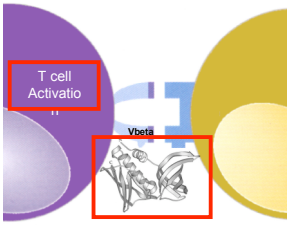
⇨ **Additional biological criteria are required for early diagnosis**

Impact for treatment

Introduction of anti-toxinic agents

How to detect *in vivo* production of superantigenic toxin?

Indirect detection
by analyzing the specific activation of T cells in blood



Direct detection of the toxin in biological liquids
not possible at the present time
(picomolar production of toxin)

Patients and methods

Six patients with staphylococcal or streptococcal TSS in 2006 (according to case definition)

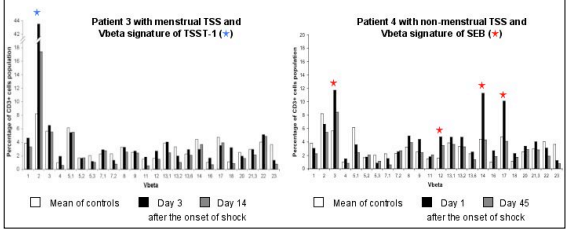
Determination of the Vbeta repertoire of T cells by flow cytometry in fresh peripheral blood mononuclear cells (IOTest® Beta Mark) at the onset of the disease and weeks later

Determination of the toxin gene profile of the corresponding isolate by multiplex PCR

A superantigenic toxin was considered to be involved in the disease when:
- The Vbeta signature of the toxin was detected in the patient's blood
- The gene encoding the toxin was detected in the corresponding isolate

The four patients with staphylococcal TSS

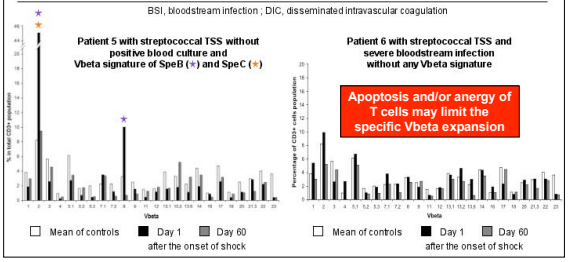
Patients	Age, sex	Clinical diagnosis	CDC Criteria of TSS	Site of isolation of the strain	Toxin gene profile	Superantigenic toxin signature detected *in vivo*
1	20, F	mTSS	Probable	-	-	TSST-1 (Vb 2)
2	24, F	mTSS	Confirmed	Vagina	*tst*, *egc*	TSST-1 (Vb 2)
3	18, F	mTSS	Confirmed	Vagina	*sea*, *tst*, *egc*	TSST-1 (Vb 2)
4	26, M	nmTSS	Confirmed	Surgical site	*sea*, *seb*, *sed*	SEB (Vb 3, 12, 14, 17)



The two patients with streptococcal TSS

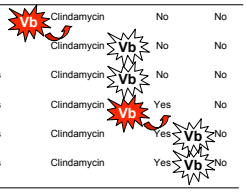
Patients	Age, sex	Clinical diagnosis	Criteria of TSS	Type of infection	Site of isolation of the strain	Toxin gene profile	Superantigenic toxin signature detected *in vivo*
5	37, F	TSS	Definite	Postpartal peritonitis	Vagina	*SpeB*, *SpeC*, *Ssa*	SpeB (Vb 2, 8) SpeC (Vb 2)
6	36, M	Septic shock	Definite	Severe BSI with DIC	Blood	*SpeB*, *SpeC*, *Ssa*	None

BSI, bloodstream infection ; DIC, disseminated intravascular coagulation



Treatment, outcome and impact of the Vbeta analysis

Patients	Bacteria	Diagnosis	Norepinephrine infusion after fluid rescucitation	Antibiotics with antitoxin effect	IVIg	Day-28 mortality
1	*S. aureus*	Menstrual TSS	No	Clindamycin	No	No
2		Menstrual TSS	No	Clindamycin	No	No
3		Menstrual TSS	Yes	Clindamycin	No	No
4		Non-menstrual TSS	Yes	Clindamycin	Yes	No
5	*S. pyogenes*	TSS without bloodstream infection	Yes	Clindamycin	Yes	No
6		TSS with bloodstream infection	Yes	Clindamycin	Yes	No



Identification of a superantigenic Vbeta signature may facilitate the early introduction of anti-toxinic agents

Conclusion

The analysis of the Vbeta repertoire in patients with staphylococcal and streptococcal TSS may:

- be a useful tool for the early diagnosis of TSS
  but may be false negative when bloodstream infection is associated
- determine which toxin has a biological effect *in vivo*
  i.e. *in vivo* production of a toxin in a susceptible host
- be included in the additional biological criteria of TSS
  Especially in staphylococcal TSS mediated by TSST-1
- facilitate the early introduction of anti-toxinic agents
  such as clindamycin, linezolid or intravenous immunoglobulins

Acknowledgements to all physicians who enrolled patients in this study

Rôle des exotoxines superantigéniques dans le choc toxique et le choc septique à *Staphylococcus aureus*

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

S. aureus peut produire de très nombreux facteurs de virulence. Les exotoxines superantigéniques sont responsables de la réponse pro-inflammatoire observée au cours du choc toxique staphylococcique et sont suspectées d'être impliquées dans le choc septique à *S. aureus*. En se fixant sur la partie variable Vbeta du récepteur T des lymphocytes T, ces toxines induisent une prolifération lymphocytaire T Vbeta dépendante et chacune de ces toxines a théoriquement une « signature Vbeta » spécifique.
Chez des patients présentant un choc toxique menstruel ou non-menstruel, nous avons respectivement retrouvé la signature des toxines TSST-1 ou SEB à la phase aiguë de la maladie, après avoir identifié *in vitro* la signature Vbeta des principales exotoxines superantigéniques. Au cours de bactériémies à *S. aureus*, les isolats responsables de choc septique possédaient plus fréquemment le gène codant la toxine SEA et le clone de *S. aureus* résistant à la méticilline prédominant en France (dénommé clone Lyon) possédait également ce gène. De plus, SEA a des propriétés pro-inflammatoires particulières que nous avons documentées *in vitro*. Cela renforcait l'hypothèse que SEA est impliqué dans le choc septique à *S. aureus*. Cependant, la signature Vbeta de SEA n'a pas été retrouvée chez des patients présentant un choc septique à *S. aureus* (sensible ou résistant à la méticilline) et dans un modèle animal de choc septique, le clone Lyon induisait certes une plus grande mortalité par rapport à des isolats sensibles à la méticilline, mais celle-ci n'était pas directement attribuable à SEA.
La mise en évidence *in vivo* de la signature Vbeta des exotoxines superantigéniques au cours du choc toxique staphylococcique permet de préciser quelle toxine est en cause, permet de faire le diagnostic plus précocement et facilite l'optimisation du traitement de cette pathologie. L'implication des exotoxines superantigéniques et notamment de SEA, dans le choc septique qui résulte de l'expression de multiples facteurs de virulence, reste incertaine.

TITRE EN ANGLAIS

Involvement of superantigenic toxins in the process of *staphylococcus aureus* toxic and septic shock

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

S. aureus can produce a wide range of virulence factors. Superantigenic toxins are responsible for a pro-inflammatory response during staphylococcal toxic shock syndrome (STSS) and are suspected to be involved in the process of *S. aureus* septic shock. These molecules bypass the normal antigen presentation by cross-linking the major histocompatibility complex class II molecules of antigen-presentating cells to the Vbeta domain of the T-cell receptor. By this way, each superantigenic toxin selectively stimulates and expands one or several Vbeta subsets producing a Vbeta signature.
We firstly showed in patients with menstrual and non-menstrual STSS due to the production of TSST-1 or SEB, that the Vbeta signature of the toxin could be detected in the Vbeta repertoire of patients at the early stage of the disease. Secondly, during *S. aureus* bacteremia, the prevalence of the gene encoding SEA was higher when septic shock occurred and the major meticillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clone in France, named "clone Lyon" harbored this gene. *in vitro*, SEA induced a strong pro-inflammatory response that may enhanced the pro-inflammatory cascade during septic shock. However, the Vbeta signature of SEA has not been detected in patients with *S. aureus* (including MRSA) septic shock infected with a stain that produced SEA *in vitro*. Finally, in an animal model of sepsis, Lyon clone MRSA isolates induced a higher rate of mortality than meticillin-susceptible isolates, but this was not directly attributable to SEA.
The detection of a production of superantigenic toxins *in vivo* may lead to an early diagnosis of STSS and may facilitate the introduction of anti-toxinic agents that may improve the prognosis. The involvement of superantigenic toxins and especially SEA, in the pathophysiology of *S. aureus* septic shock remained uncertain.

DISCIPLINE

BIOLOGIE HUMAINE (Domaine de la Microbiologie et des Maladies Infectieuses)

MOTS-CLÉS

S. aureus, exotoxine superantigénique, choc toxique staphylococcique, choc septique, clone SARM pandémique

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Unité INSERM U851, Equipe pathogénie des staphylocoques, Faculté Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08