



HAL
open science

Diversité moléculaire de souches *Staphylococcus aureus* méticillinorésistant isolées de patients atteints de mucoviscidose

Baptiste Lemaire

► To cite this version:

Baptiste Lemaire. Diversité moléculaire de souches *Staphylococcus aureus* méticillinorésistant isolées de patients atteints de mucoviscidose. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01871164

HAL Id: dumas-01871164

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01871164>

Submitted on 10 Sep 2018

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.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le Vendredi 7 septembre 2018

Par M. **Baptiste LEMAIRE**
Né le 15 juillet 1991 à Amiens

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**Diversité moléculaire de souches de *Staphylococcus aureus* méticillinorésistant
isolées de patients atteints de mucoviscidose**

----oOo----

JURY :

Président : Pr. Jean-Marc ROLAIN – PU-PH (Université d'Aix-Marseille & AP-HM)

Membres : Pr. Hélène MARCHANDIN (Directeur de thèse) – PU-PH (Université de Montpellier & CHU Nîmes)

Dr. Catherine DUNYACH-REMY (Directeur de thèse) – PH (CHU Nîmes)

Pr Jean-Philippe LAVIGNE – PU-PH (Université de Montpellier & CHU Nîmes)

Dr Raphael CHIRON – PH (CHU Montpellier)

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le Vendredi 7 septembre 2018

Par M. **Baptiste LEMAIRE**
Né le 15 juillet 1991 à Amiens

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**Diversité moléculaire de souches de *Staphylococcus aureus* méticillinorésistant
isolées de patients atteints de mucoviscidose**

----oOo----

JURY :

Président : Pr. Jean-Marc ROLAIN – PU-PH (Université d'Aix-Marseille & AP-HM)

Membres : Pr. Hélène MARCHANDIN (Directeur de thèse) – PU-PH (Université de Montpellier & CHU Nîmes)

Dr. Catherine DUNYACH-REMY (Directeur de thèse) – PH (CHU Nîmes)

Pr Jean-Philippe LAVIGNE – PU-PH (Université de Montpellier & CHU Nîmes)

Dr Raphael CHIRON – PH (CHU Montpellier)



27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD Mme
Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTO GAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMACHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Marc ROLAIN,

Merci de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

A Madame le Professeur Hélène MARCHANDIN,

Merci de me faire l'honneur de co-diriger cette thèse.

Vous avez su m'apprendre la rigueur scientifique nécessaire à l'écriture de ce manuscrit. Vos qualités professionnelles sont pour moi un exemple à suivre.

A Madame le Docteur Catherine DUNYACH-REMY,

Merci de me faire l'honneur de co-diriger cette thèse.

Vos compétences scientifiques et votre disponibilité ont été une aide majeure à la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Jean-Philippe LAVIGNE,

Merci de participer à mon jury de thèse, ainsi que pour la formation reçue lors des 6 mois passés dans votre service. Votre compétence m'inspire le plus grand respect. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Raphael CHIRON,

Merci pour votre précieuse aide dans la réalisation de ce travail, ainsi que pour votre grande disponibilité. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse.

A Fabien AUJOULAT,

Pour tes formations et les nombreux échanges de mails afin de dompter les logiciels nécessaires à la réalisation de cette thèse. Malgré tes très bonnes explications, mon incompetence m'aura quand même valu de nombreuses heures de galère !

Je dédie cette thèse :

A ma Maman et à Hervé,

Merci de m'avoir toujours soutenu malgré la distance.

Merci maman pour tout ce que tu as fait pour moi, c'est grâce à toi si j'en suis là aujourd'hui.

Tu as toujours été présente dans les moments de bonheur comme dans les moments de doute.

Je t'aime.

Merci Hervé de t'occuper aussi bien d'elle, elle le mérite.

A mon Papa,

Même si nous ne sommes pas très proches, merci pour l'éducation que tu m'as inculquée.

A Justine,

Cela fait maintenant plus de 8 ans que tu es à mes côtés. Merci pour tout ce que tu m'as, et que tu continues à m'apporter au quotidien. Tu es tous les jours avec moi malgré la distance qui nous sépare (pour le moment !)... en passant j'en profite pour remercier la SNCF sans qui tout cet amour ne serait pas possible.

Je t'aime ! Et je te félicite de supporter mon immaturité depuis tout ce temps, ça ne doit pas être facile ! Numéro 1 dans mon cœur baby <3

A Tic,

Je tiens à féliciter l'ensemble de ton œuvre. Tu as su m'inculquer les vraies valeurs de la vie.

Tu es un modèle de stabilité pour moi.

A La Boussole, Coquille, Guhn, Philippe Perd-Manteau et Valou,

Merci pour ces belles aventures que sont les soirées (et parfois les après-midis) avec vous. Je suis ravi d'être ami avec des gens respectables et classes tels que vous. Merci pour les vacances reposantes passées ensemble, ainsi que pour toutes ces années studieuses passées à Ômiens.

A Thibault,

Pour nos Fifa-Ricard, tes hurlements quand tu es saoul, et pour ta connerie de manière générale. Je pense avoir perdu environ 2 ans d'espérance de vie à cause de toi !

A Chloé,

Pour le ski à Gap, les colocs, et les stages passés ensemble (mention spéciale pour le soutien psychologique durant le stage de bio mol !). Courage, dans 1 mois tu seras docteur !

A Damien,

Le gardois ! Ou encore Monsieur Wikipédia, qui m'a appris que (presque) tous les départements sont traversés par un cours d'eau portant le même nom, ou encore que l'on peut écrire « nénuphar » ou « nénufar ». Ta culture excuse presque tes retards systématiques !

A Léa,

La chef de groupe qui organise notre vie sociale sur Marseille ! Merci pour les sorties bateaux, pour les randos calanques, et pour le stage de viro.

A Bobby, Clémence, Estelle, Florence, Guillaume, Jean-Sélim, Jordan, Julien, Loris, Maude, Maude, Maxence, Maxime, Nouredine, Pauline, Pierre, Rémi, Thomas, Toby et Tristan,

L'élite des professionnels de santé marseillais ! Merci pour ces belles années d'internat !!

A Alice, Amaelle, Baptiste, Breuleux et Juliette,

Merci pour les bons moments passés dans les différents stages de périph !

Mais aussi à tous les biologistes et techniciens qui m'ont formé.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Table des matières

<i>Liste des figures</i>	14
<i>Liste des tableaux</i>	15
<i>Liste des annexes</i>	16
<i>Liste des abréviations</i>	17
INTRODUCTION	19
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	22
<i>I. Le SARM en France</i>	22
1) Apparition de la résistance à la méticilline	22
2) Méthodes de typage	24
3) Principaux clones et répartition géographique	31
4) Principaux profils de résistance	34
<i>II. Le SARM chez les patients atteints de mucoviscidose</i>	36
1) Généralités	36
2) Prévalence	37
3) Particularités du SARM par rapport au SASM	38
4) Acquisition et importance	39
5) Co-infection	41
6) Typage moléculaire et étude des liens épidémiologiques entre souches de SARM	42
7) Facteurs de virulence	44
8) Traitements antibiotiques	45
9) Cas particulier des fratries	46
<i>III. Persistance et évolution adaptative de Staphylococcus aureus au cours de la persistance chez les patients atteints de mucoviscidose</i>	47
1) Généralités	47
2) Modifications génotypiques	48
3) Variants à petites colonies (SCV)	48
4) Biofilm	49
5) Autres adaptations	51

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE	52
<i>I. Introduction</i>	<i>52</i>
<i>II. Matériels et méthodes</i>	<i>53</i>
1) Patients et échantillons	53
2) Souches bactériennes et analyses microbiologiques.....	54
3) Multi-Locus Sequence Typing (MLST).....	54
4) Production de biofilm.....	55
5) Analyse des données.....	56
<i>III. Résultats</i>	<i>57</i>
1) Population étudiée.....	57
2) Génotypes de SARM identifiés chez les patients du CRCM de Montpellier en 2016.....	62
3) Nouveaux génotypes.....	64
4) Répartition des génotypes de SARM isolés par patient, en 2016.....	65
5) Comparaison des résultats aux données de la base PubMLST	66
6) Lien avec les données cliniques et microbiologiques.....	67
7) Distance allélique entre les <i>sequence types</i> des souches de SARM étudiées.....	67
8) Étude longitudinale.....	68
9) Biofilm.....	69
<i>IV. Discussion</i>	<i>71</i>
1) Prévalence du SARM	71
2) Données cliniques	72
3) Épidémiologie moléculaire.....	73
4) Diversité intra-échantillon.....	75
5) Étude longitudinale.....	77
CONCLUSION.....	80
BIBLIOGRAPHIE.....	82
ANNEXES	95

Liste des figures

Figure 1 : Émergence des résistances du <i>S. aureus</i> selon Guillemot. (28).....	22
Figure 2 : Disposition des 7 gènes de ménage étudiés par MLST sur le chromosome de <i>S. aureus</i> (60).....	25
Figure 3 : Exemple de révélation de cupules de biopuce à ADN	28
Figure 4 : Évolution de souches de <i>S. aureus</i> en SARM et GISA selon Enright et al. (86).....	30
Figure 5 : Répartition française des clones de SARM responsables d'infections invasives.	34
Figure 6 : Schématisation des voies aériennes d'un patient atteint de mucoviscidose, d'après Flokesson et al. (93).....	36
Figure 7 : Répartition des bactéries isolées d'échantillons respiratoires en France (mucoviscidose) et évolution entre 2006 et 2016 (3)	38
Figure 8 : Bactéries cliniquement importantes chez les patients atteints de mucoviscidose, par classe d'âge (3).....	39
Figure 9 : Répartition des STs de SARM dans 9 centres de mucoviscidose en Italie (48).....	43
Figure 10 : Interprétation du Biofilm Ring Test®	56
Figure 11 : Répartition des types de séquences mis en évidence chez les souches de SARM isolés de patients du CRCM de Montpellier en 2016, en prenant en compte l'ensemble des isolats (n=54).....	64
Figure 12 : Répartition des patients du CRCM de Montpellier selon les types de séquences mis en évidence chez les souches de SARM isolées de leur échantillon respiratoire en 2016, après dédoublement des isolats de même ST présent dans un échantillon (n=27).....	65
Figure 13 : Répartition des patients du CRCM de Montpellier selon les complexes clonaux mis en évidence chez les souches de SARM isolées de leur échantillon respiratoire en 2016, après dédoublement des isolats de même CC présent dans un échantillon (n=27).....	66
Figure 14 : Arbre de recouvrement minimum des types de séquences identifiés dans notre étude et représentation des complexes clonaux.....	68
Figure 15 : Histogrammes représentant l'évolution du BFI de 9 souches de SARM de 2 patients atteints de mucoviscidose, après 1h et 5h d'incubation	70

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractérisation des types de SCCmec selon Liu et al. (84).....	29
Tableau 2 : Caractéristiques des principaux clones de SARM isolés en France (39,87)	31
Tableau 3 : Principaux clones de SARM nosocomiaux mondiaux selon Deurenberg et al. (88)	32
Tableau 4 : Profils de résistances généralement observés pour les souches les plus fréquemment isolées d'infections invasives en France.	35
Tableau 5 : Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques de souches de SARM isolées de 14 patients atteints de mucoviscidose (échantillons respiratoires) et de 20 patients non atteints (hémocultures)	50
Tableau 6 : Amorces utilisées et tailles des amplicons attendues pour chaque gène du schéma MLST de <i>S. aureus</i>	55
Tableau 7 : Données descriptives des 27 patients inclus dans l'étude.....	57
Tableau 8 : Comparaison des paramètres cliniques des patients de notre étude par rapport à l'ensemble des patients suivis au CRCM de Montpellier	58
Tableau 9 : Données cliniques et comorbidités des 27 patients étudiés	59
Tableau 10 : Données descriptives de la colonisation du tractus respiratoire des 27 patients de notre étude	60
Tableau 11 : Données descriptives des 4 patients colonisés chroniquement à SARM de longue date inclus dans l'étude	61
Tableau 12 : Résultat de typage par MLST des 68 isolats de SARM des 27 patients de notre étude.....	63
Tableau 13 : Caractéristiques des nouveaux types de sequences (STs) de SARM isolés.	64
Tableau 14 : Analyse longitudinale des sequence types de SARM chez les patients de notre étude colonisés de longue date	69
Tableau 15 : Comparaison des clones de SARM identifiés de patients atteints de mucoviscidose au CRCM de Montpellier et en Europe, par CC.....	75

Liste des annexes

- Annexe 1** : Caractérisation de souches françaises de SARM par comparaison avec les grands clones épidémiques mondiaux, selon Reverdy et al. (89).....95
- Annexe 2** : STs et profils alléliques des souches de SARM isolées au CRCM de Montpellier ..96
- Annexe 3** : Données cliniques et microbiologiques complètes des patients de notre étude .97
- Annexe 4** : BFI après 1h et 5h des 9 souches de SARM étudiées par le Biofilm Ring Test®99

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
<i>agr</i>	Accessory gene regulator
<i>arcC</i>	Carbamate kinase
<i>aroE</i>	Shikimate déshydrogénase
BFI	Index de formation de biofilm
BHI	Bouillon Cœur-cervelle
CC	Complexe clonal
<i>ccr</i>	Cassette chromosome recombinases
CF	Mucoviscidose
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CRCM	Centre de ressource et de compétence de la mucoviscidose
DID	Diabète insulino-dépendant
eBURST	Based Upon Related Sequence Types
<i>egc</i>	enterotoxin gene cluster
GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides
<i>glpF</i>	Glycérol kinase
<i>gmk</i>	Guanylate kinase
IPE	Insuffisance pancréatique exocrine
LBA	Liquide de lavage broncho-alvéolaire
LPV	Leucocidine de Panton Valentine
MBIC	Concentration minimale inhibitrice du biofilm
MIC	Concentration minimale inhibitrice
MLST	Multi-locus sequence typing
NR	Non renseigné
pb	Paire de bases
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
PCR	Polymerase chain reaction
PLP	Protéine liant la pénicilline
PMN	Polynucléaires neutrophiles
PNAG	Poly-N-acetyl- β -(1-6)-glucosamine
<i>pta</i>	Phosphatase acétyltransférase
SA-SCV	<i>Staphylococcus aureus</i> variants à petites colonies
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
SCV	Variants à petites colonies
SEA	Entérotoxine A
SLV	Single locus variant
<i>spa</i>	Gène de la protéine A
SrrAB	Staphylococcal respiratory response AB
ST	<i>Sequence type</i>

<i>tpi</i>	Triosephosphate isomérase
TSST-1	Toxine du choc toxique staphylococcique
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
VNTR	Variable number of tandem repeats
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine
<i>yqiL</i>	Acétyl coenzyme A étyltransférase

INTRODUCTION

La mucoviscidose est une maladie génétique à transmission autosomique récessive. Cette pathologie est causée par la mutation du gène codant pour la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) qui permet, entre autres, le passage d'ions chlorures à travers les membranes cellulaires. Cette protéine est présente dans de nombreux organes comme le pancréas, le foie, l'intestin, les canaux déférents, ou encore les poumons. (1,2) La principale mutation présentée par les patients atteints de mucoviscidose en France est la F508del, identifiée chez 83,5% des 6800 patients français. (3)

La modification de la protéine CFTR va notamment entraîner la production d'une sueur riche en chlore et, au niveau pulmonaire, provoquer une modification de la clairance mucociliaire, avec formation d'un mucus pulmonaire plus épais favorisant une stase bactérienne. (4) Ces modifications facilitent la colonisation et les infections pulmonaires bactériennes par rapport à des patients sains. (5) Cette propension aux infections s'explique également par des modifications de sécrétions de cytokines au niveau pulmonaire, entraînant une moindre réponse immunitaire. (6,7)

Bien que ce soit l'atteinte pulmonaire qui conditionne en général le pronostic vital, d'autres symptômes vont également apparaître comme des troubles digestifs, pancréatiques, endocriniens, ou encore une stérilité (principalement masculine). Il existe des différences d'âge d'apparition des premiers symptômes, ainsi que de rapidité et de sévérité de l'évolution clinique, pouvant être expliquées par les nombreux types de mutations pouvant exister au niveau du gène *cftr*, mais également par une variabilité inter-individuelle du taux de CFTR et par un polymorphisme d'autres gènes. (5,8,9) Des variations phénotypiques sont également mises en évidence au sein de fratries, possédant pourtant une même mutation génétique. (10,11)

Il existe donc plusieurs facteurs favorisant la présence et la persistance bactérienne au sein des poumons de patients atteints de mucoviscidose. Ainsi, ces malades sont fréquemment colonisés par des bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* ou encore *Stenotrophomonas maltophilia*, et ce, dès les premiers mois de la vie. (3,12) Certaines de ces bactéries peuvent être multi-résistantes et ainsi poser des problèmes thérapeutiques, comme dans le cas pour le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM).

Ces bactéries peuvent être présentes de façon sporadique, intermittente ou chronique. Dans le cas de *P. aeruginosa*, il existe plusieurs définitions de la colonisation chronique. La plus utilisée actuellement est celle de *Lee et al.*, selon laquelle un patient est considéré comme colonisé chronique à *P. aeruginosa* lorsque cette bactérie a été isolée plus de 50% des mois de l'année précédente (lorsqu'il y a eu analyse d'échantillons respiratoires durant ces mois). Quand cette bactérie a été isolée l'année précédente mais que ce taux n'atteint pas les 50%, la colonisation est considérée comme intermittente. (13) Il existe une seconde définition selon laquelle la colonisation est considérée comme chronique lorsque cette bactérie est présente dans l'arbre bronchique pendant au moins 6 mois, attesté par au moins 3 cultures positives à au moins 1 mois d'intervalle sans signes directs (signes cliniques) ou indirects (anticorps spécifiques) d'infection. (14)

Il n'existe en revanche pas de définition de la colonisation chronique à *S. aureus*. Plusieurs études estiment qu'environ un tiers des patients atteints de mucoviscidose chez qui un SARM est isolé au niveau respiratoire, n'est colonisé que de façon transitoire. (15,16)

Ces portages asymptomatiques peuvent, dans certaines conditions, évoluer en infection avec exacerbation pulmonaire. (17)

P. aeruginosa est la bactérie la plus fréquemment isolée des échantillons respiratoires des patients adultes atteints de mucoviscidose, alors que *S. aureus* colonise majoritairement les enfants. (3) De par son important éventail de facteurs de virulence et ses résistances naturelles et acquises aux antibiotiques, l'intérêt clinique envers *P. aeruginosa* est majeur, notamment chez des patients fragiles comme ceux atteints de mucoviscidose. (18,19)

Staphylococcus aureus est une bactérie qui peut être commensale ou pathogène opportuniste. Son principal habitat est l'homme mais la bactérie peut également être isolée chez les animaux. *S. aureus* est notamment présent au niveau nasal de façon chronique chez environ 20% de la population générale, ce taux pouvant atteindre 66% chez les patients atteints de mucoviscidose non traités récemment par antibiotiques. (9,20–22)

Cette bactérie est capable de produire un éventail important de facteurs de virulence, comme des toxines ou des molécules d'adhésion, ainsi que d'acquérir des gènes de résistances aux antibiotiques compliquant son éradication. L'ensemble de ces paramètres fait de *S. aureus* un agent responsable d'une importante diversité d'infections, allant de la furonculose bénigne aux pneumonies nécrosantes. (23)

De plus, l'augmentation importante de souches de SARM est un problème de santé publique. Alors que les SARM hospitaliers sont fréquemment responsables d'infections associées aux soins, il existe également des SARM dits communautaires tout aussi virulents et généralement producteurs de toxines comme la leucocidine de Pantone-Valentine (LPV). (24) Ainsi, depuis 2001, ces SARM communautaires sont responsables d'environ 19 000 décès en milieu hospitalier par an aux États-Unis. (25)

Étant donné la fréquence et le rôle pathogène important de *Pseudomonas aeruginosa*, cette bactérie a fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de la mucoviscidose. Le *S. aureus*, et plus particulièrement le SARM, est en revanche moins étudié dans la littérature scientifique, bien que les infections chroniques dues à cette bactérie multi-résistante sont associées à une mortalité plus élevée chez cette population de malades. (26,27)

Le SARM est une bactérie cliniquement importante de par son pouvoir pathogène, ses nombreuses résistances aux antibiotiques et sa forte prévalence mondiale. Certaines populations de patients sont plus particulièrement touchées par cette bactérie multi-résistante, c'est notamment le cas des patients atteints de mucoviscidose. Devant ce constat, cette étude a pour but d'obtenir des données épidémiologiques détaillées concernant le SARM chez les patients atteints de mucoviscidose en France.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le SARM en France

1) Apparition de la résistance à la méticilline

Le *S. aureus* a successivement développé des résistances vis-à-vis des différents traitements antibiotiques, depuis la production de pénicillinase lors de l'introduction de la pénicilline G, jusqu'à l'émergence de résistances aux glycopeptides (**Figure 1**). (28)

Il a été plus récemment décrit des résistances au linézolide, molécule commercialisée depuis le début des années 2000 pour son activité antibactérienne vis-à-vis des cocci à Gram positif, et utilisée en alternative aux glycopeptides pour traiter des infections impliquant des souches de sensibilité diminuée ou résistantes aux glycopeptides. Le premier cas décrit de résistance à cet antibiotique date de 2001, soit un an seulement après l'introduction de cette molécule aux États-Unis. (29–31)

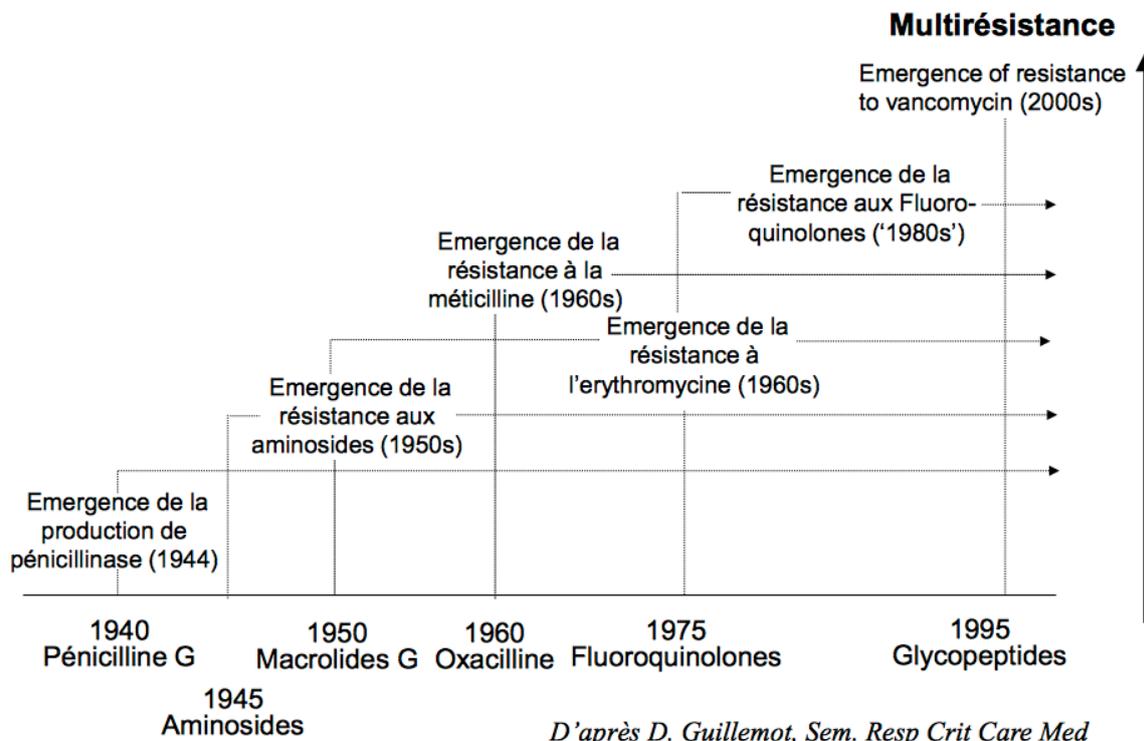


Figure 1 : Émergence des résistances du *S. aureus* selon Guillemot. (28)

La méticilline a été utilisée à partir de 1959 afin de traiter les infections par *S. aureus* pénicillinorésistants. A partir de 1961, des résistances à cet antibiotique ont commencé à être décrites, tout d'abord en Grande-Bretagne, puis dans toute l'Europe, et enfin en Asie, Australie, États-Unis et Afrique. (32) La méticillinorésistance apparaît suite à l'acquisition du gène *mecA*, codant pour une protéine liant la pénicilline (PLP) non affine pour la méticilline (PLP2a). Ce gène *mecA* est porté par une cassette appelée « staphylococcal cassette chromosome *mec* » (SCC*mec*), dont plusieurs types ont été décrits. Les principales SCC*mec* sont de type I, II, III, et IV, elles diffèrent par leur composition génétique et leur taille. (33)

Il a été mis en évidence en 2011 un nouveau gène dérivant de *mecA* porté par la cassette SCC*mec*, le gène *mecC* codant pour la PLP2c. Initialement isolé chez les animaux, la prévalence des souches de SARM hébergeant le gène *mecC* reste faible chez l'homme, bien que ces souches aient déjà été mises en cause dans des infections graves. (34–36) L'expression de la résistance à la méticilline *in vitro* pouvant être plus faible qu'avec le gène *mecA* et les systèmes de polymérase chain reaction (PCR) actuels habituellement utilisés en laboratoire de diagnostic permettant, pour la plupart de détecter uniquement le gène *mecA*, la détection de ces souches est difficile. (37)

Les SARM sont résistants à la totalité des β -lactamines à l'exception de la ceftaroline et du ceftobiprole qui conservent généralement une activité sur cette bactérie, bien que des résistances aient été décrites. (38) Alors que les SARM communautaires (SCC*mec*IV) restent généralement sensibles aux autres classes d'antibiotiques, les SARM nosocomiaux (SCC*mec*I, SCC*mec*II et SCC*mec*III) ont fréquemment des résistances associées à l'ensemble des aminosides ainsi qu'aux fluoroquinolones, tout en restant sensibles aux glycopeptides comme la vancomycine et la téicoplanine. (39–41) Les SARM porteurs du gène *mecC* (SCC*mec*XI) sont, quant à eux, sensibles aux autres classes d'antibiotiques. (37)

Toutefois, la description de souches de SARM de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides (GISA) ainsi que de souches résistantes à la vancomycine (VRSA) pose un problème majeur de santé publique en raison du faible nombre d'antibiotiques restant actifs sur ces souches. Ces bactéries multi-résistantes peuvent ainsi être responsable d'échecs thérapeutiques. (42–46)

2) Méthodes de typage

L'importante prévalence des infections à *S. aureus* impose la réalisation d'analyses à visée épidémiologique. Ces investigations doivent répondre à plusieurs critères, tels que la reproductibilité, le pouvoir discriminant, ou encore la facilité d'interprétation des résultats.

Historiquement, des méthodes phénotypiques telles que la lysotypie, le typage capsulaire à l'aide d'immunsérums ou encore l'antibiotypie étaient utilisées. Ces techniques ont progressivement disparu avec l'arrivée d'outils de typage moléculaire, plus fiables.

Les techniques de biologie moléculaire sont multiples, et le choix de la technique dépend du type d'étude réalisée. Ainsi, certaines études peuvent nécessiter un haut niveau de discrimination, afin de mettre en évidence des variations génétiques mineures. Dans d'autres cas, il est souhaitable de s'affranchir de ces variations mineures afin d'étudier les clones de *S. aureus* de façon plus large en utilisant des méthodes moins discriminantes.

Par exemple, lors d'une épidémie de SARM en service de soin intensif néonatal de l'hôpital de Cambridge en 2009, la technique de séquençage complet du génome (WGS) a été utilisée afin de mettre en évidence la clonalité des souches. (47) A l'échelle d'une région ou d'un pays, des études par MLVA ou MLST peuvent être réalisées afin d'observer les clones circulants. (48,49) Ces études de clonalité permettent également d'observer la répartition du SARM au niveau mondial, comme le montre l'étude de *DeLeo et al.* concernant les mouvements de souches de SARM communautaires entre les différents continents. (50)

a) *Électrophorèse en champ pulsé (ECP)*

Cette technique repose sur la séparation, par une technique d'électrophorèse à champs électriques complexes, de fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN). Ces fragments ont préalablement été obtenus, après extraction, par action d'une endonucléase à sites de coupure rares (comme *SmaI* par exemple). Le résultat obtenu après migration est nommé pulsotype. (51)

Très discriminante, cette technique constitue une méthode de référence pour l'étude d'épidémies locales. Elle peut également être utilisée pour comparer des souches de patients avec des souches environnementales. (52–54)

Sa résolution et sa répétabilité font que cette technique est fréquemment considérée comme étant un gold standard dans le génotypage de nombreuses espèces bactériennes d'intérêt clinique, dont le SARM. (54–56)

Bien qu'efficace, l'ECP reste une technique complexe, longue et chère à mettre en œuvre. (54) De plus, cette méthode étant comparative, elle ne s'applique que difficilement à des comparaisons inter-laboratoires. (51) Des efforts sont toutefois faits dans ce sens, notamment par le groupement européen HARMONY qui a mis au point un protocole standardisé d'ECP. (57)

b) Multi-locus sequence typing (MLST)

Cette technique est basée sur la détermination et la comparaison des allèles de 7 gènes de ménage de *S. aureus* impliqué dans le métabolisme de cette bactérie : *arcC* (carbamate kinase), *aroE* (shikimate déshydrogénase), *glpF* (glycérol kinase), *gmk* (guanylate kinase), *pta* (phosphate acétyltransférase), *tpi* (triosephosphate isomérase), et *yqiL* (acétyl coenzyme A acétyltransférase) (**Figure 2**). (58) Après une étape d'amplification par PCR, un séquençage des produits d'amplification est réalisé, et les séquences obtenues sont comparées à celles déjà connues répertoriées dans la base de données PubMLST (<https://pubmlst.org>). (59)

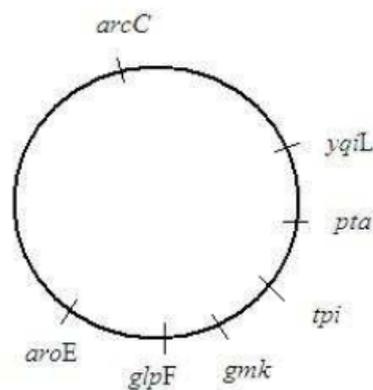


Figure 2 : Disposition des 7 gènes de ménage étudiés par MLST sur le chromosome de *S. aureus* (60)

Les allèles sont identifiés par un numéro, et l'association des 7 nombres correspondant aux 7 allèles des gènes de ménage déterminent un profil allélique appelé *sequence type* (ST). Ces STs peuvent ensuite être regroupés au sein d'un même complexe clonal (CC) s'ils possèdent 5 des 7 allèles identiques.

Il est possible de réaliser des représentations graphiques de ces résultats grâce à l'algorithme Based Upon Related Sequence Types (eBURST), permettant une analyse des relations phylogénique entre les souches étudiées. (61)

Cette technique à l'avantage d'être très efficace dans la comparaison et l'analyse épidémiologique, que ce soit au niveau régional ou mondial. Actuellement, cette technique est considérée comme étant la plus utile, la plus compréhensible, et la plus reproductible pour la réalisation d'études épidémiologiques moléculaires du SARM, en association avec les techniques de *spa* typing et de typage *SCCmec*. (54,62)

c) spa typing

Cette technique repose sur le séquençage de la région variable (dite région X) du gène de la protéine A (*spa*). Cette région est composée de séquences de 24 pb (dans la majorité des cas), répétées un nombre variable de fois. (63)

La séquence obtenue est comparée à une base de données afin d'obtenir un *spa*-type (t001, t002...). (64) L'algorithme Based Upon Related Pattern (BURP) permet l'analyse épidémiologique et phylogénique des données obtenues. (65,66)

La protéine A produite par ce gène *spa* a la particularité d'empêcher l'opsonophagocytose en agissant sur les immunoglobulines, facilitant l'échappement immunologique du *S. aureus*. (67,68)

Le typage *spa* est une méthode très discriminante, permettant une analyse des macrovariations, mais également des mutations ponctuelles. (69) Sa résolution est équivalente à la technique d'ECP. (54) L'association de cette technique avec la technique MLST et le typage *SCCmec* permet une bonne discrimination des différents clones de SARM. (54,62)

d) Multi-locus variable number of tandem repeats assay (MLVA)

Cette technique se base sur la variation naturelle du nombre de séquences d'ADN répétées en tandem (variable number of tandem repeats : VNTR) au niveau de loci du génome bactérien. Le nombre de ces répétitions étant différent entre plusieurs souches, cette technique permet la comparaison de plusieurs isolats afin de déterminer les liens épidémiologiques existant entre eux. (70)

De 8 à 16 loci vont être amplifiés par PCR, puis la taille des fragments d'ADN obtenus va être mesurée par électrophorèse capillaire. Un profil MLVA va ainsi être déterminé puis doit être comparé à une base de données. Or, et il s'agit des principaux inconvénients de cette technique, l'absence de base de données gratuite en ligne et une standardisation incomplète des bases de données payantes avec l'ensemble des protocoles sont un frein à l'utilisation de cette technique.

La technique MLVA est pourtant une technique simple et relativement rapide, dont les résultats sont comparables à l'ECP concernant la discrimination des différentes souches. (71)

Concernant le typage de souches de SARM, une étude de 2015 portant sur 20771 souches démontre un meilleur pouvoir discriminant par technique MLVA que par *spa* typing, et considère cette technique comme suffisante dans le suivi épidémiologique de cette bactérie. (72)

e) Biopuce à ADN

Cette technique repose sur l'amplification d'ADN marqué par des nucléotides associés à la biotine. Une hybridation a ensuite lieu avec des sondes déposées dans des cupules, chaque sonde étant spécifique d'un gène recherché. Cette technique permet la recherche simultanée de 336 gènes et variants (dans la dernière version commercialisée par la société Alere®), et peut ainsi être utilisée afin de rechercher les gènes de résistances aux antibiotiques ou encore les gènes des facteurs de virulence. (73–76)

Une reconnaissance automatique de chaque spot permet de définir une cartographie génétique de la souche étudiée (**Figure 3**).

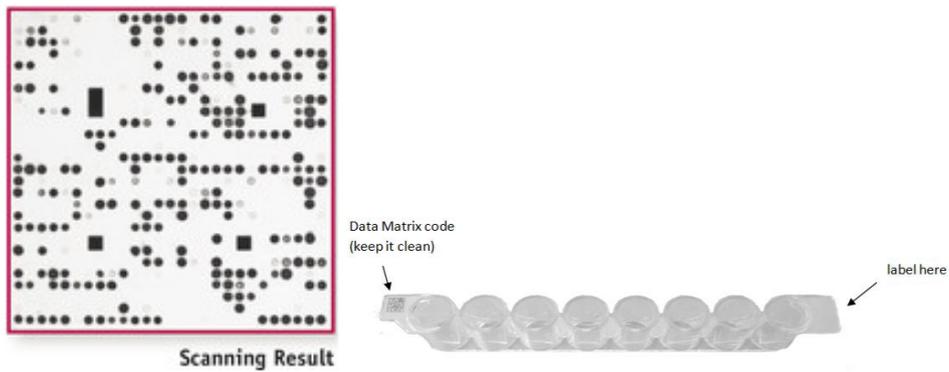


Figure 3 : Exemple de révélation de cupules de biopuce à ADN
 Pour chaque gène, il existe un seuil d'intensité déterminant la positivité

Bien que très efficace et peu chronophage par rapport à l'étude individuelle de chaque gène, cette technique ne permet pas la détermination de toutes les variations alléliques. De plus, le coût élevé de cette technique est un frein à son développement. (54,73)

Cette technique possède un meilleur pouvoir discriminant sur les souches de SARM que les techniques précédemment citées en raison du nombre important de gènes et de variants étudiés, ce qui en fait un outil de pointe pouvant être utilisé lors d'études épidémiologiques. (74)

f) Séquençage complet du génome (Whole Genome Sequencing - WGS)

Comme son nom l'indique, cette technique permet une analyse complète du génome bactérien. Des techniques de pyroséquençage ou de séquençage à haut débit sont réalisées, avec analyse finale par bioinformatique. (77–79)

Cette technique permet la détection des gènes présents sur le chromosome bactérien, mais il est également possible de mettre en évidence les variations alléliques, ce qui est un avantage non négligeable par rapport à la technique des biopuces à ADN. (80)

Bien que très efficace et permettant une étude épidémiologique précise, cette technique requiert néanmoins la présence de personnels formés aux analyses et logiciels de bioinformatique, l'interprétation des résultats étant très complexe. Le coût actuel de cette technique est également un frein à son développement.

La technique de WGS possède un pouvoir discriminant sur le MRSA nettement supérieur par rapport aux techniques MLVA et *spa* typing, et permet ainsi la réalisation d'études épidémiologiques plus approfondies. (81) Une étude danoise de 2014 a également démontré la possibilité de déterminer le *spa*-type grâce à la technique de WGS, avec une bonne fiabilité. (82)

g) Typage *SCCmec*

Une cassette *SCCmec* est principalement composée de la cassette chromosome recombinases (*ccr*) constituée de *ccrA* et *ccrB* codant pour des recombinaisons spécifiques de site, et du complexe *mec* constitué du gène *mec* et de ses régulateurs *mecR* et *mecI*. (54,83,84)

Il existe actuellement 11 *SCCmec*, de *SCCmecI* à *SCCmecXI*. Le type de cassette est défini par la combinaison du type de *ccr* (de 1 à 8) et du type de complexe *mec* (de A à E). Par exemple, un SARM possédant sur sa cassette *SCCmec* le *ccr 2* et le complexe *mecA* sera un SARM *SCCmecII* (**Tableau 1**). (84)

Types de <i>SCCmec</i>	Types de <i>ccr</i>	Types de complexes <i>mec</i>
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C1)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C1)	C1
VIII	4 (A4B4)	A
IX	1 (A1B1)	C2
X	7 (A1B6)	C1
XI	8 (A1B3)	E

Tableau 1 : Caractérisation des types de *SCCmec* selon Liu et al. (84)

La méthode la plus utilisée actuellement pour déterminer le type de *SCCmec* est la PCR multiplexe, technique utilisant simultanément plusieurs amorces et ayant l'avantage de la simplicité d'utilisation puisqu'une seule PCR permet la possible amplification de l'ensemble des gènes recherchés. (85)

Les SARM sont des SAMS ayant acquis un gène *mecA* ou *mecC* par le biais d'une cassette *SCCmec*. Des souches de ST identiques peuvent donc présenter des cassettes *SCCmec* différentes (**Figure 4**). (86)

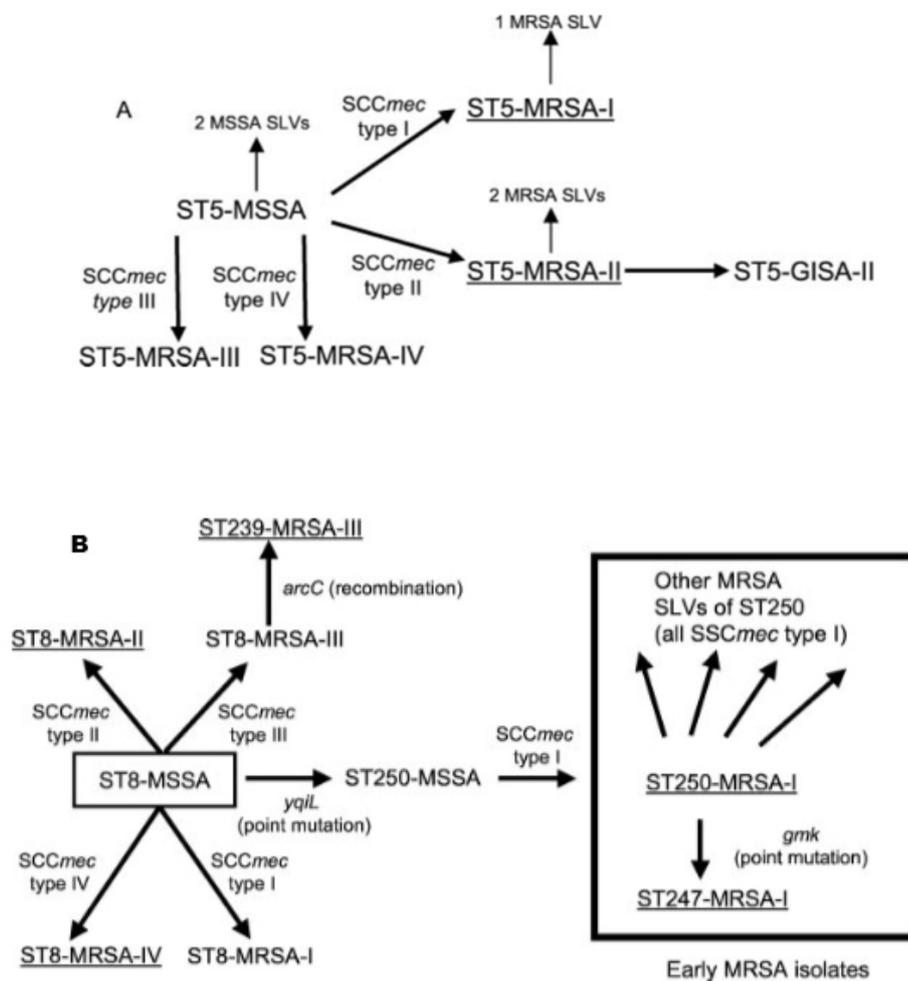


Figure 4 : Évolution de souches de *S. aureus* en SARM et GISA selon Enright et al. (86)

(A) Modèle du ST5. (B) Modèle du ST8.

SLV = single locus variant.

3) Principaux clones et répartition géographique

En France, plusieurs clones de SARM sont endémiques. Parmi eux, les principaux clones hospitaliers et communautaires sont respectivement le clone Lyon (également appelé clone V) et le clone LPV Européen (ST80-SCCmecIV). Les clones pédiatrique, ibérique, ou encore le clone Géraldine sont également décrits en France. Ces souches se différencient par leurs caractéristiques génétiques (**Tableaux 2 et 3**). (39,40)

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux clones de SARM isolés en France (39,87)

Dénomination du clone	Séquence type	Type <i>spa</i>	Type <i>agr</i>	Type de SCCmec	Gène de SEA	Gènes de l' <i>egc</i>	Gène de la TSST-1	Gènes de la LPV	Clones détectés en France	Principales résistances aux antibiotiques
Clone archaïque	250	8	1	I	-	-	-	-	Non	
Clone ibérique	250	51	1	I	+	-	-	-	Clone minoritaire hospitalier notamment des souches GISA	Kanamycine, tobramycine, gentamicine, ± macrolides, quinolones
Clone pédiatrique	5	311	2	IV	-	+	±	-	Clone minoritaire hospitalier et communautaire	Kanamycine, tobramycine, tétracyclines, acide fusidique
Clone Lyon	8	64	1	IV	+	-	-	-	Clone majoritaire hospitalier	Kanamycine, gentamicine, ± macrolides, quinolones
Clone Géraldine	5	2	2	I tronquée	-	NR	+	-	Clone minoritaire hospitalier et communautaire	Kanamycine, tobramycine, acide fusidique
Clone LPV 80-IV	80	40	3	IV	-	-	-	+	Clone majoritaire communautaire	Kanamycine, tétracyclines, acide fusidique

Abréviations : spa : gène de la protéines A ; agr : accessory gene regulator ; SCCmec : staphylococcal chromosomal cassette ; SEA : entérotoxine A ; TSST-1 : toxine du choc toxique staphylococcique ; LPV : leucocidine de Panton Valentine ; egc : enterotoxin gene cluster ; NR : non renseigné

Tableau 3 : Principaux clones de SARM nosocomiaux mondiaux selon Deurenberg et al. (88)

Clone	MLST profile	ST	CC	SCCmec	spa type ^a	Geographical spread ^b
Archaic	3-3-1-1-4-4-16	250	8	I	t008 , t009, t194	Ast, Den, Ger, Swi, Uga, UK, USA
Southern Germany	1-4-1-4-12-24-29	228	5	I	t001 , t023, t041, t188, t201	Bel, Den, Ger, Ita, Slo, Spa, Swi
UK EMRSA-3	1-4-1-4-12-1-10	5	5	I	t001 , t002 , t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Arg, Nor, Pol, Slo, UK
Iberian	3-3-1-12-4-4-16	247	8	I	t008 , t051 , t052, t054, t200	Bel, Cro, Cze, Den, Fin, Fra, Ger, Ita, Net, Pol, Por, Slo, Spa, Swe, Swi, UK, USA
Irish-1	3-3-1-1-4-4-3	8	8	II	t008 , t024, t064, t190, t206, t211	Ast, Ire, UK, USA
New York/Japan	1-4-1-4-12-1-10	5	5	II	t001 , t002 , t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Ast, Bel, Can, Den, Fin, Fra, Ger, Ire, Jap, Kor, Mex, Sin, Swe, Uru, UK, USA
UK EMRSA-16	2-2-2-2-3-3-2	36	36	II	t018 , t253, t418, t419	Ast, Bel, Can, Den, Fin, Gre, Ire, Mex, Nor, Spa, Swe, Swi, UK, USA
Brazilian/Hungarian	2-3-1-1-4-4-3	239	8	III	t030, t037 , t234, t387, t388	Alg, Arg, Ast, Aus, Bra, Chi, Chn, Cze, Fin, Ger, Gre, Ind, Ids, Kor, Mon, Net, Pol, Por, Sin, Slo, Spa, Sri, Swe, Tha, UK, Uru, USA, Vie
Berlin	10-14-8-6-10-3-2	45	45	IV	t004 , t015, t026, t031, t038, t050, t065, t204, t230, t390	Arm, Ast, Bel, Fin, Ger, Hun, Net, Nor, Spa, Swe, Swi, USA
Paediatric	1-4-1-4-12-1-10	5	5	IV	t001 , t002 , t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Alg, Arg, Ast, Bra, Col, Den, Fra, Kor, Nor, Pol, Por, Spa, Swe, Uru, UK, USA
UK EMRSA-2/-6	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV	t008 , t024, t064, t190, t206, t211	Ast, Bel, Fin, Fra, Ger, Ire, Net, Nor, Tai, UK, USA
UK EMRSA-15	7-6-1-5-8-8-6	22	22	IV	t005, t022, t032 , t223, t309, t310, t417, t420	Ast, Bel, Cze, Den, Ger, Ire, Kuw, NZ, Nor, Por, Sin, Spa, Swe, UK

^aspa types according to spa server (most prevalent spa type in bold).

^bAlg, Algeria; Arg, Argentina; Arm, Armenia; Ast, Australia; Aus, Austria; Bel, Belgium; Bra, Brazil; Can, Canada; Chi, Chile; Chn, China; Col, Colombia; Cro, Croatia; Cze, Czech Republic; Den, Denmark; Fin, Finland; Fra, France; Ger, Germany; Gre, Greece; Hun, Hungary; Ind, India; Ids, Indonesia; Ire, Ireland; Ita, Italy; Jap, Japan; Kor, Korea; Kuw, Kuwait; Mex, Mexico; Mon, Mongolia; Net, The Netherlands; NZ, New Zealand; Nor, Norway; Pol, Poland; Por, Portugal; Sin, Singapore; Slo, Slovenia; Sri, Sri Lanka; Spa, Spain; Swe, Sweden; Swi, Switzerland; Tai, Taiwan; Tha, Thailand; Uga, Uganda; Uru, Uruguay; Vie, Vietnam.

➤ Le clone Lyon (clone V)

Il s'agit d'un clone hospitalier appartenant au CC8, et possédant une cassette SCCmecIV. Il est très proche du clone ibérique (ST250) dont il ne diffère que par un seul allèle (mutation du gène *yqiL*) (**Figure 4B**). C'est actuellement le clone le plus fréquemment isolé en France. (40,86)

➤ Le clone LPV Européen

Il s'agit d'un clone communautaire, ST80-SCCmecIV et possédant le gène de la LPV. Ces souches sont principalement responsables d'infections superficielles cutanées, et peuvent donner lieu à des épidémies. (89)

➤ **Le clone ibérique**

Il s'agit d'un clone de ST250 dérivant du ST8, initialement isolé en Espagne. Bien que peu isolé en France actuellement, ces quelques souches présentent généralement des résistances aux glycopeptides (souches GISA). (86,90)

➤ **Les clones pédiatriques**

Le principal clone pédiatrique est de ST5, appartenant au CC5, et possédant la cassette *SCCmecIV*. Initialement décrit dans des hôpitaux pédiatriques au Portugal ; en France, il est principalement isolé dans la moitié ouest du pays. (40,91)

Il existe également une variante de ce clone pédiatrique possédant une cassette *SCCmecVI*. (92)

➤ **Le clone Géraldine**

Décrit pour la première fois en 2005, il s'agit d'un clone de ST5 possédant une cassette *SCCmecI* tronquée. Il représente 6,3% des souches de SARM isolées d'infections invasives en France. Ce clone se caractérise par son profil à la fois hospitalier et communautaire, sa propension à donner des infections chez l'enfant plutôt que chez l'adulte, ainsi que par la présence du gène de la toxine du choc toxique staphylococcique 1 (TSST-1). (40,87)

Ces différents clones sont regroupés au sein de familles appelées CC, dans lesquels ils sont associés à d'autres clones dont ils sont proches génétiquement (**Annexe 1**).

Les données détaillées sur la répartition géographique des clones de SARM en France sont rares. *Dauwalder et al.* ont toutefois étudié cette répartition en typant par MLST 111 SARM isolés d'infections invasives, provenant de 23 hôpitaux français. Le clone Lyon représente 70% des souches isolées au niveau national, les clones pédiatriques et le clone Géraldine sont mis en évidence à hauteur de 15,3% et 6,3% respectivement.

Il existe toutefois une disparité de répartition de ces clones à travers la France : alors que 95% des isolats appartiennent au clone Lyon dans le sud-est, seuls 57% des isolats appartiennent à ce clone dans le nord de la France. Il en est de même avec les clones pédiatriques absents dans le sud-est, mais auxquels appartiennent 29% des souches isolées dans la région sud-ouest (Figure 5). (40)

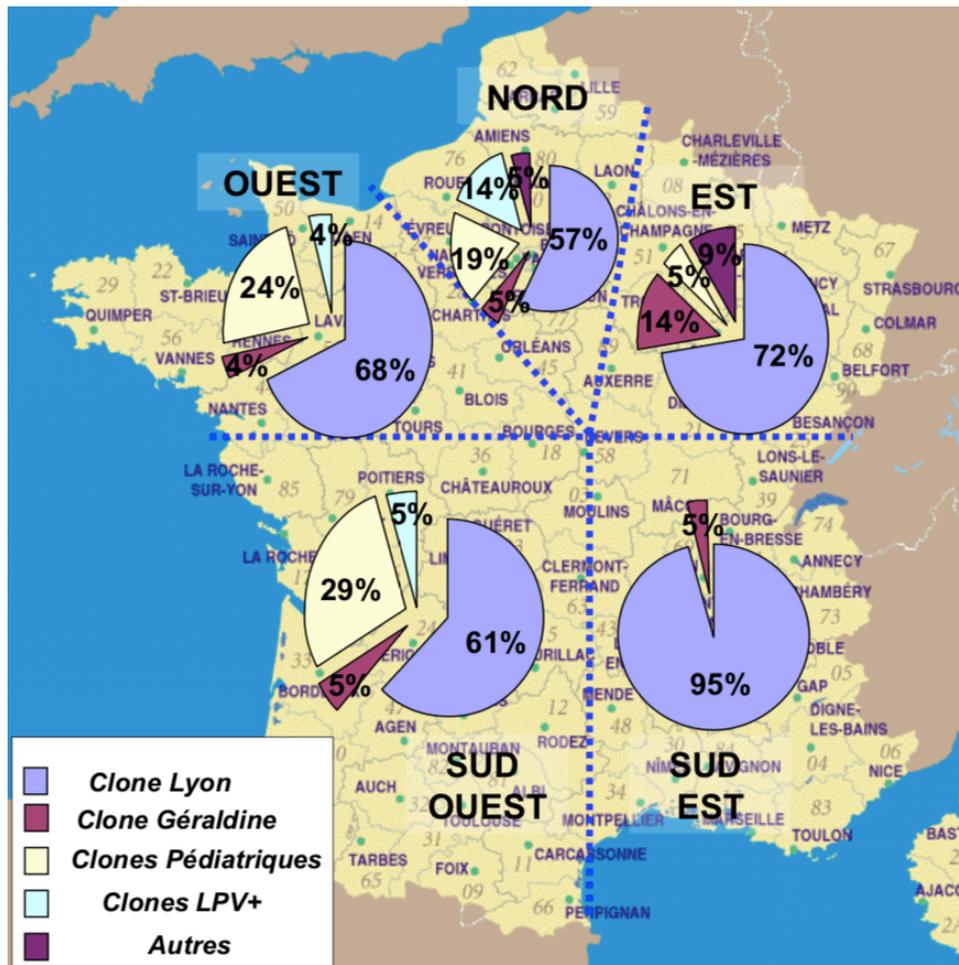


Figure 5 : Répartition française des clones de SARM responsables d'infections invasives. Les clones LPV+ regroupent le clone Européen et le clone Pacifique. (40)

4) Principaux profils de résistance

Ces clones diffèrent également de par leur profil de résistance aux antibiotiques. Alors que la majorité des clones isolés en France est sensible à la gentamicine, cette sensibilité varie pour les fluoroquinolones et l'acide fusidique (Tableau 4). (39–41)

Tableau 4 : Profils de résistances généralement observés pour les souches les plus fréquemment isolées d'infections invasives en France.

	Clone Lyon (n=79) (40)	Clones Pédiatriques (39–41)	Clone Géraldine (n=7) (40)	Clone Européen (n=4) (40)
Kanamycine	R (77%)	R	R (57%)	R (100%)
Tobramycine	R (77%)	R	R (57%)	S (100%)
Gentamicine	S (95%)	S	S (100%)	S (100%)
Fluoroquinolones	R (100%)	R	S (100%)	S (100%)
Acide fusidique	S (91%)	R	R (100%)	R (100%)

Les pourcentages entre parenthèses correspondent aux taux de souches exprimant ce profil dans les études, quand ce taux est connu.

Pour les clones pédiatriques, le profil de résistance a été obtenu à partir de données provenant de plusieurs études.

II. Le SARM chez les patients atteints de mucoviscidose

1) Généralités

Une colonisation bactérienne est fréquemment mise en évidence chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, le défaut de clairance mucociliaire des voies aériennes observé au cours de cette pathologie crée des opportunités pour la colonisation microbienne (**Figure 6**). De plus, il existe une destruction substantielle du poumon causée par une réaction immunitaire suite à l'accumulation de débris cellulaires et de mucus déshydraté, ainsi que par la présence de bactéries colonisant ces débris. (93) L'ensemble de ces événements entraîne des troubles respiratoires, objectivés par une baisse du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS). (94)

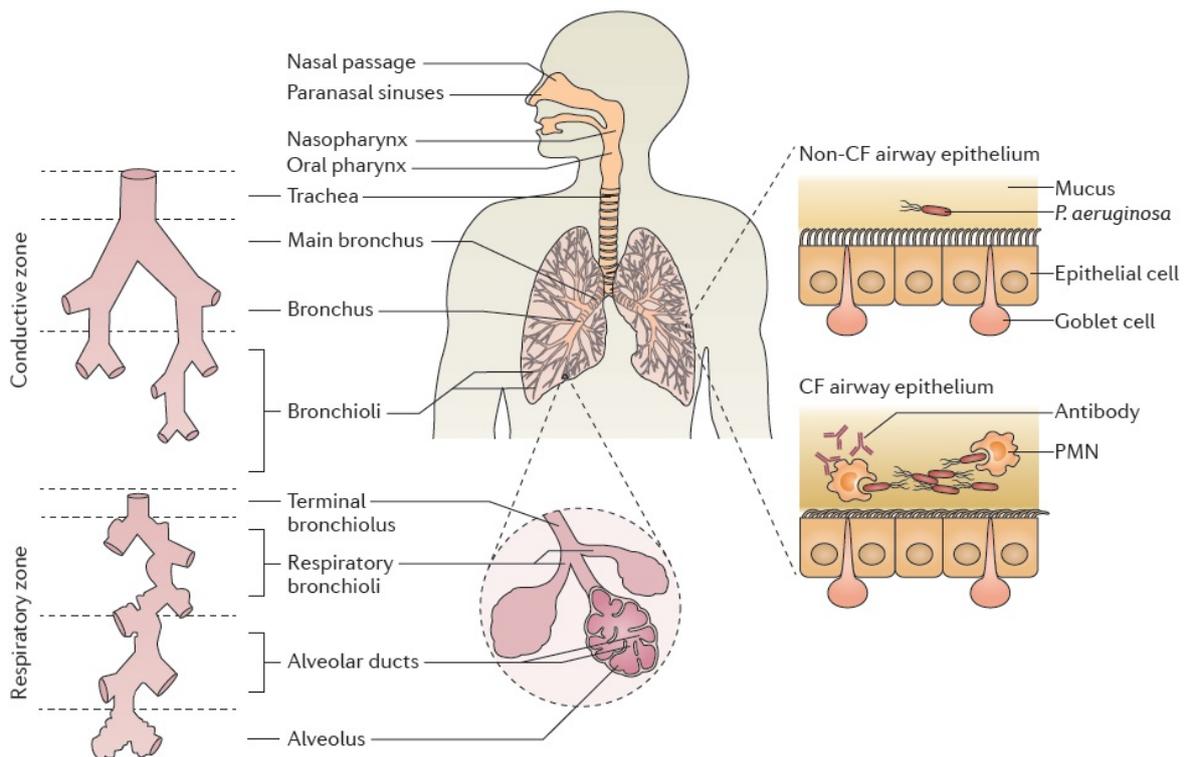


Figure 6 : Schématisation des voies aériennes d'un patient atteint de mucoviscidose, d'après Flokesson et al. (93)

PMN = polynucléaires neutrophiles

Les réponses immunitaires médiées par les polynucléaires neutrophiles et les anticorps conduisent à une altération épithéliale locale. Chez ces patients, le mucus des voies aériennes est un réservoir majeur pour les microorganismes, tout comme les sinus et les alvéoles dans une moindre mesure. (93,94)

2) Prévalence

En France, entre 7 et 10% des patients atteints de mucoviscidose sont porteurs de SARM au niveau pulmonaire. (3,9) Ce taux atteint près de 35% aux États-Unis, pays fortement touché par cette bactérie multi-résistante. (95–97)

Depuis une quinzaine d'année, il est observé dans certains pays comme l'Australie une diminution de prévalence de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline (SASM), SARM, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* et *Aspergillus* sp. chez les patients atteints de mucoviscidose. (98) Cette variation est à mettre en lien avec l'amélioration de la prise en charge de cette maladie permettant notamment un vieillissement de la population de malades, la prévalence des bactéries colonisant les voies respiratoires de ces patients ayant tendance à décroître après l'âge de 30 ans (**Figure 8**). (3) L'introduction de nouveaux antibiotiques comme le linézolide, ou encore l'utilisation de nouveaux protocoles d'éradication du SARM limitant l'utilisation de la clindamycine et des fluoroquinolones en raison de l'émergence des résistances, et les remplaçant par l'acide fusidique ou le sulfaméthoxazole-triméthoprimine ont également permis de limiter le portage pulmonaire de cette bactérie. (96,99) Cette tendance n'est toutefois pas observée partout dans le monde : il existe par exemple une augmentation de la prévalence du *S. aureus* aux États-Unis, et plus particulièrement de souches méticillinorésistantes. (97)

En France, la prévalence du SARM chez cette population de malades est passée de 10,0% en 2006 à 6,9% en 2016 (**Figure 7**). (3) Cette observation est à mettre en lien avec la diminution globale de la résistance à la méticilline en France observée depuis plusieurs années. (100)

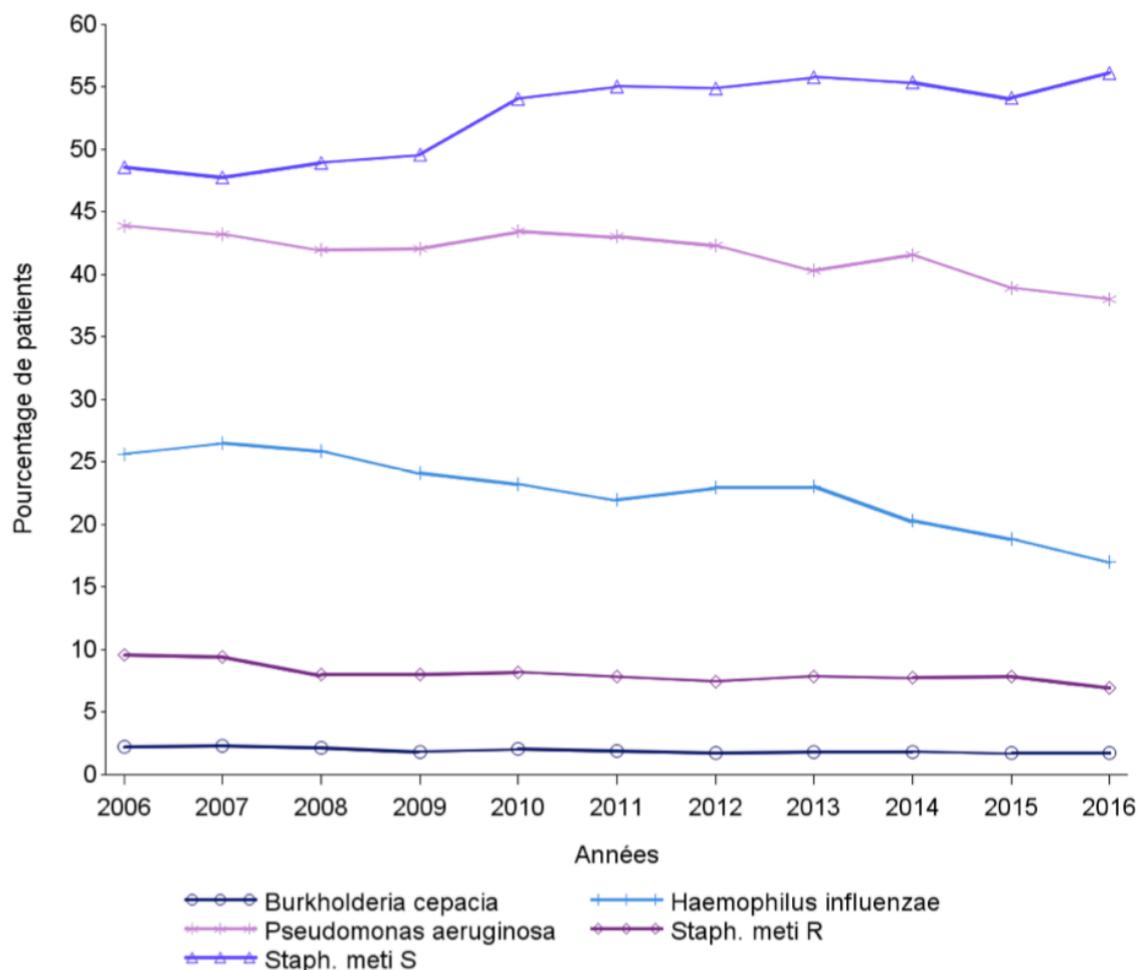


Figure 7 : Répartition des bactéries isolées d'échantillons respiratoires en France (mucoviscidose) et évolution entre 2006 et 2016 (3)

D'après les dernières recommandations françaises datant de 2002, il est recommandé un minimum de 4 consultations de suivi par an, avec analyse microbiologique d'échantillon respiratoire. (14)

3) Particularités du SARM par rapport au SASM

Bien que les SARM ne sont isolés que chez une minorité de patients atteints de mucoviscidose (6,9% en France en 2016), plusieurs études démontrent que la présence de ces bactéries entraîne plus de complications qu'en cas de portage de SASM. Ainsi, le SARM persiste plus longtemps dans les voies respiratoires, donne des atteintes pulmonaires plus sévères avec un déclin plus important du VEMS, et donne lieu à une plus forte utilisation d'antibiotiques. (101)

Chez les patients colonisés chroniquement par SARM, la mutation F508del est plus fréquemment mise en évidence, ainsi qu'une insuffisance pancréatique et des broncheectasies. Ces patients ont également des hospitalisations significativement plus fréquentes que les patients porteurs de SASM. (102) Enfin, la méticillinosensibilité de ces souches complique le traitement antibiotique, d'autant plus qu'il existe fréquemment des résistances associées à de nombreux antibiotiques comme la ciprofloxacine, la clindamycine, ou encore la tétracycline. (103–105)

4) Acquisition et importance

L'acquisition du *S. aureus* se produit précocement dans la vie de ces patients : l'âge moyen du premier échantillon contenant du *S. aureus* est de 12,4 mois, et environ la moitié des nourrissons de moins de 6 mois a un liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) qui contient cette bactérie. (6,18,106)

Le portage du *S. aureus* méticillinosensible est âge-dépendant, sa prévalence est maximale entre 10 et 20 ans. La prévalence du SARM est en revanche plus faible durant l'enfance, puis augmente pour atteindre un taux stable à partir de 15 à 20 ans (**Figure 8**). (3)

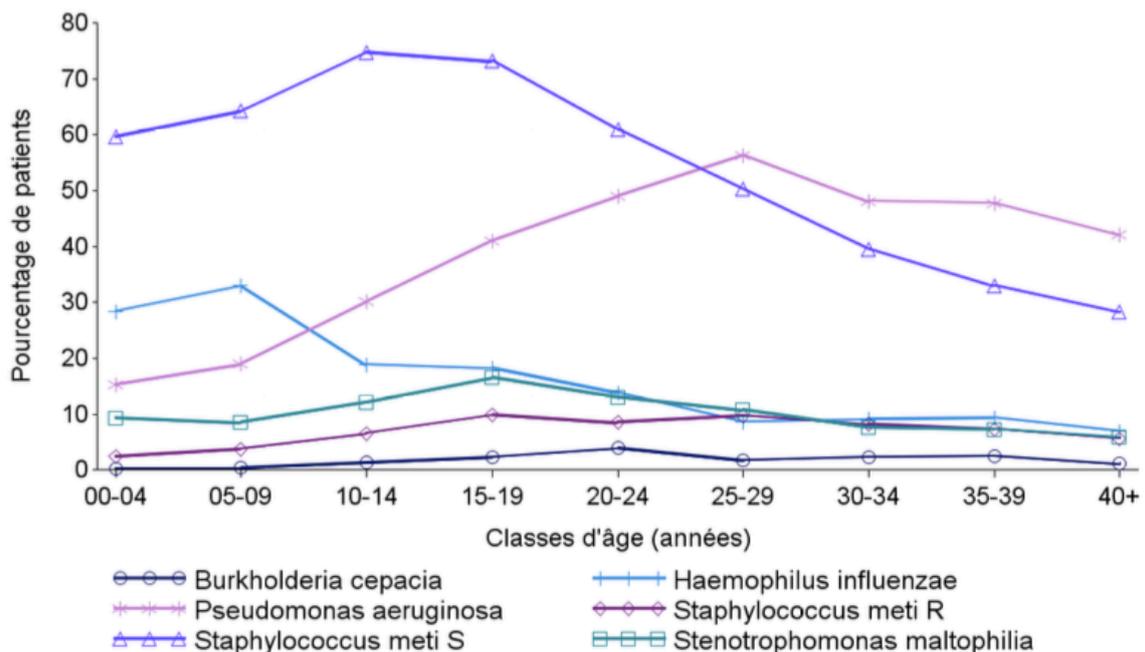


Figure 8 : Bactéries cliniquement importantes chez les patients atteints de mucoviscidose, par classe d'âge (3)

Plusieurs études se sont intéressées aux souches de *S. aureus* présentes au niveau nasopharyngé et pulmonaire simultanément. Après analyse d'échantillons issus de 36 patients par *spa* typing, Mainz *et al.* concluent à la présence d'un même génotype de *S. aureus* entre ces 2 zones dans 86% des cas. Il existerait donc des échanges de souches entre ces 2 compartiments, sans toutefois que ces études n'apportent de réponse quant au site principalement colonisé. (107,108)

Bien que l'acquisition du SARM en milieu hospitalier est favorisée par le manque d'hygiène des mains des personnels soignants, ainsi que par la pression de sélection antibiotique, d'autres facteurs sont présents chez cette population de malades. (109–111) Parmi ces facteurs, il y a notamment la durée d'hospitalisation ou encore la présence d'une infection chronique à *Aspergillus fumigatus*. Les antibiotiques les plus favorables à l'apparition de cette résistance à la méticilline sont la ciprofloxacine et les céphalosporines de troisième génération. (112,113)

Cette acquisition est particulièrement intéressante à étudier dans le cadre de familles ayant plusieurs membres atteints de mucoviscidose. Dans le cas de fratries par exemple, alors qu'il est observé un âge d'acquisition de *P. aeruginosa* identique entre les différents membres d'une même fratrie, une variation est observée dans le cas du *S. aureus*. Il a ainsi été montré une acquisition plus précoce chez le plus jeune de la fratrie quand l'ainé est déjà colonisé par cette bactérie, sans toutefois entraîner d'atteinte pulmonaire plus sévère. (114,115) L'étude de Harik *et al.* montre par technique d'ECP la présence de souche de SARM identiques dans la quasi-totalité des cas au sein de 11 fratries, suggérant une transmission intrafamiliale. (116)

Devant la forte prévalence de SARM SCCmecII chez les patients atteints de mucoviscidose aux États-Unis, Muhlebach *et al.* se sont intéressés aux facteurs de risque d'acquisition de ce SARM hospitalier. Ils ont ainsi pu montrer un lien avec une co-infection par *P. aeruginosa*, un nombre élevé de séjours hospitaliers, ainsi qu'une prise importante d'antibiotiques par voie inhalée. (117)

Plusieurs facteurs de risques de persistance de SARM ont été identifiés chez les patients atteints de mucoviscidose, comme l'insuffisance pancréatique, un nombre élevé d'hospitalisations par an, ou encore la présence d'une co-infection pulmonaire par *P. aeruginosa*. (118)

D'un point de vue immunologique, la persistance du SARM au niveau pulmonaire est fortement facilitée par la non efficacité des macrophages dans le cadre de la mucoviscidose. En effet, le déficit en CFTR dans ces macrophages entraîne une diminution de production de cytokines inflammatoires, ainsi qu'une augmentation du pH cytoplasmique et un moindre fonctionnement lysosomal. (119–122)

Les bactéries internalisées par les macrophages vont ainsi persister dans leur cytoplasme, ce qui les protège du système immunitaire et des antibiotiques. Ces macrophages n'étant pas aptes à éliminer les pathogènes, ils permettent une persistance bactérienne en jouant le rôle de réservoir pour les bactéries dont *S. aureus*, faisant le lit d'une infection chronique. (123)

5) Co-infection

La présence d'une co-infection pulmonaire n'est pas rare dans la mucoviscidose. *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont les pathogènes les plus fréquemment isolés dans les infections chroniques des voies aériennes chez ces patients, et ils sont fréquemment présents conjointement. (124,125)

La co-infection par ces deux bactéries est responsable d'un déclin plus rapide du VEMS, et est associée à un taux plus élevé de recours à des traitements antibiotiques administrés par voie intraveineuse qu'en cas d'infection par l'une de ces deux bactéries uniquement. (126)

Bien que difficile, l'étude des interactions entre bactéries a donc un intérêt certain, *a fortiori* dans le cadre de pathologies pulmonaires graves comme la mucoviscidose. Plusieurs études ont ainsi montré une forte pression du *P. aeruginosa* sur le *S. aureus*, allant de la sélection de variants à petites colonies (SCV) difficiles à détecter et à éradiquer, jusqu'à l'élimination du *S. aureus*. Cette activité anti-staphylococcique se fait par relargage de différents facteurs de virulence comme la protéase LasA ou encore la pyocyanine, sidérophore également responsable de lésions pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. (127–131) *P. aeruginosa* produit également une protéase LasB, responsable d'une inhibition de production de biofilm par *S. aureus*. (132)

Il existerait donc une compétition entre le *P. aeruginosa* et le *S. aureus* dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, compétition également mise en évidence entre différentes souches de *S. aureus*. En effet, *Kahl et al.* ont montré que la présence d'une souche de *S. aureus* empêche la colonisation par d'autres souches de cette même espèce. (133)

6) Typage moléculaire et étude des liens épidémiologiques entre souches de SARM

L'étude des cassettes *SCCmec* permet une première analyse de clonalité des SARM circulant chez les patients atteints de mucoviscidose. Ainsi, d'une façon générale, ce sont des SARM hospitaliers qui sont le plus souvent isolés chez ces patients, notamment aux États-Unis où plusieurs études mettent en évidence des taux de souches porteuses de la cassette *SCCmecII* allant de 65 à 89%. (96,117,134) En Italie, il s'agit de souches hospitalières *SCCmecI* dans 49 à 56% des cas selon les études, ainsi que des souches communautaires *SCCmecIV* dans 22 à 31% des cas. (48,135) Il n'existe pas d'étude de ce type réalisée en France, sur cette catégorie de malades.

D'autres études ont, quant à elles, utilisé une approche par MLST ou MLVA afin de génotyper les SARM de patients atteints de mucoviscidose. L'analyse des liens existant entre les souches a généralement été faite en classant les SARM en CC, ce qui permet de distinguer les grands clones tout en s'affranchissant des variations génétiques mineures. En France, il existe peu d'études sur le sujet. En analysant les données détaillées de 22 souches de SARM issues de l'étude de *Vu-Thien et al.*, nous observons une prédominance des CC5, CC45 et CC8 représentant respectivement 36%, 27% et 23% des isolats. (49) En Irlande du Nord, les CC5 et CC8 sont les plus fréquents, représentant respectivement 43 et 41% des souches isolées après analyse de 76 souches par MLVA et *spa* typing. (136) En Espagne, l'analyse de 200 souches par WGS met en évidence la présence de CC5 (20%), CC30 (17%) et CC45 (11%), le CC8 n'étant représenté qu'à hauteur de 6%. (137)

Une étude italienne de 2362 patients suivis dans 9 centres décrit les sous-populations de SARM circulants chez les patients atteints de mucoviscidose. La présence de SARM dans les échantillons respiratoires a été mise en évidence chez 178 patients (7,54%), et 98 souches provenant de ces patients ont été analysées par MLST. Le ST majoritaire est le ST5, représentant 37% (36/98) de l'ensemble des souches. Viennent ensuite les ST8 et ST228, représentant respectivement 30% (29/98) et 20% (20/98) des souches étudiées (**Figure 9**). (48)

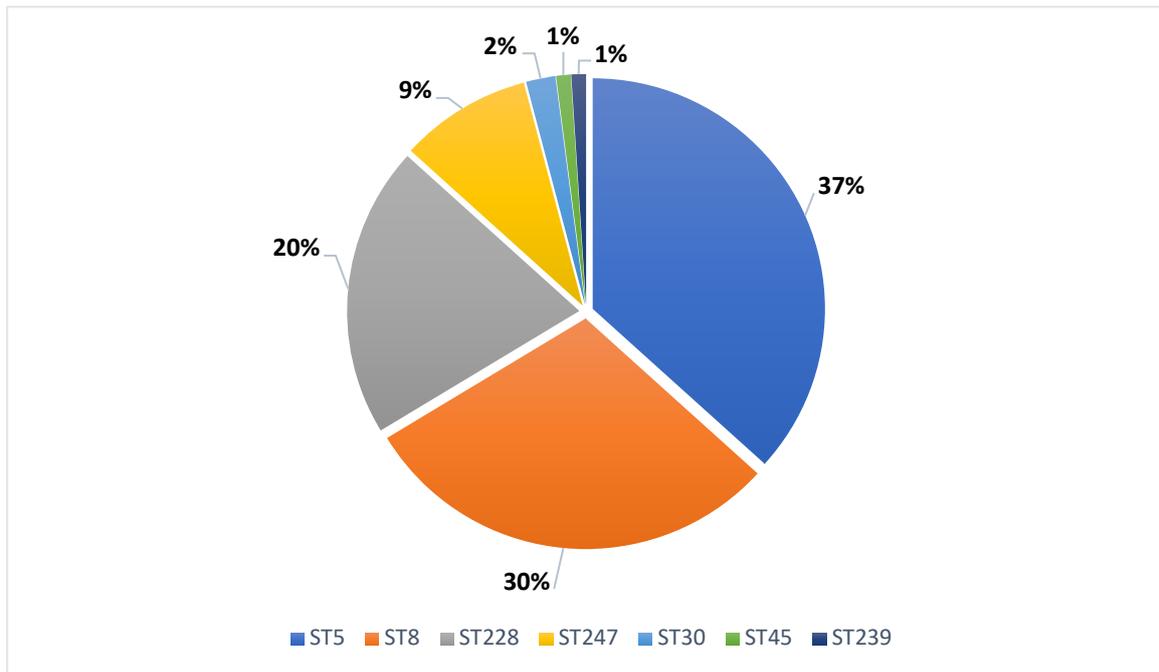


Figure 9 : Répartition des STs de SARM dans 9 centres de mucoviscidose en Italie (48)

Dans leur étude portant sur 15 patients atteints de mucoviscidose à Madrid (Espagne), *Molina et al.* ont analysés par MLST 67 isolats issus d'échantillons respiratoires. Les STs majoritaires sont les ST228 et ST235, représentant respectivement 65,7% (44/67) et 20,1% (14/67) de l'ensemble des souches. D'autres ST sont mis en évidence dans de plus faibles proportions : ST5 (7,5%), ST247 (4,5%), et ST72 (1,5%). (138)

Dans leur étude autrichienne, *Masoud-Landgraf et al.* ont analysés plusieurs souches de *S. aureus* dont 2 MRSA par *spa* typing, et ont déterminés que ces souches multi-résistantes appartenaient aux CC152 et au CC5. (139) Ce type d'études, dans lequel les SARM sont étudiés de façon anecdotique au sein d'un ensemble de *S. aureus* sont fréquentes, et témoignent du manque de données globale quant à cette bactérie multi-résistante.

7) Facteurs de virulence

La détermination des facteurs de virulence bactériens est importante pour prédire la gravité des infections, en particulier chez des patients fragiles comme ceux atteints de mucoviscidose.

S. aureus produit un large éventail de protéines toxiques, dont certaines ont été décrites comme jouant un rôle majeur lors d'infections à cette bactérie. C'est notamment le cas de la LPV (généralement associée à des infections cutanées ou des tissus mous récidivantes), de la TSST-1 (pouvant être responsable de choc toxique), des entérotoxines (responsables d'intoxications alimentaires), mais également des exfoliatines (responsables du syndrome de la peau ébouillantée et d'impétigo bulleux). (140–142)

Alors qu'en France le gène de la LPV est rarement mis en évidence dans les SARM pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose, des études démontrent une présence de cette leucocidine dans 10 à 40% des souches aux États-Unis. (9,134,136) La forte prévalence de cette toxine aux États-Unis est à mettre en lien avec l'importante présence des clones ST8 et ST30 producteurs de LPV dans cette région du monde. (50) Il n'a toutefois pas été observé de prévalence de SARM-LPV+ significativement supérieure chez les patients avec exacerbations pulmonaires, par rapport aux patients avec colonisation chronique dont l'état était stable. (96)

Le gène de la TSST-1 est mis en évidence dans près de 50% des souches de *S. aureus* nord-américain, sans que le rôle de cette toxine dans la pathogénicité de l'infection par SARM dans le poumon des patients atteints de mucoviscidose ne soit actuellement établi. (143)

De nombreux autres gènes codant des toxines peuvent par ailleurs être hébergés par *S. aureus*. (144) Parmi ces gènes, ceux codant les entérotoxines SEA et SED, et le gène *hlg* codant une hémolysine sont plus souvent présents dans le génome des *S. aureus* des patients atteints de mucoviscidose, par rapport aux patients non atteints. (143,145)

Il existe un gène appelé *accessory gene regulator (agr)* permettant de réguler la sécrétion de facteurs de virulence ainsi que les protéines de surfaces par la mise en jeu d'un mécanisme de « quorum sensing » régulant la production d'exoprotéines. Son rôle central dans la production de ces facteurs de virulence fait de ce gène un acteur fortement impliqué dans la gravité des infections humaines. (146,147)

8) Traitements antibiotiques

L'intérêt du traitement du SARM chez des patients porteurs asymptomatiques reste discuté. D'après les dernières recommandations françaises datant de 2002, il est suggéré de ne pas réaliser d'antibioprophylaxie primaire chez ces patients. Il est en revanche recommandé d'éradiquer un portage de SARM même asymptomatique, en raison de la possibilité d'aggravation de l'atteinte pulmonaire. (14) Le Centre de Référence de la Mucoviscidose (Lyon) (<https://www.centre-reference-muco-lyon.fr>) recommande un traitement par bi-antibiothérapie orale prolongée, associant rifampicine et acide fusidique pendant 3 mois, associée à de la mupirocine topique (nasale). (9)

En cas d'exacerbation, il est recommandé de traiter par pristinaamycine et rifampicine après vérification de la sensibilité de la souche par antibiogramme. Il n'existe pas de consensus quant à l'antibioprophylaxie secondaire. (14)

Actuellement, ce sont le linézolide ou les glycopeptides qui semblent être principalement utilisés dans le traitement des exacerbations chez les patients colonisés par SARM. (148,149) D'autres antibiotiques comme la clindamycine et la ciprofloxacine présentent un taux de résistance particulièrement élevé chez ces patients, et ne doivent donc plus être utilisés. (96)

De nombreuses études évaluent des associations d'antibiotiques, dans le but de déterminer la combinaison la plus efficace pour éradiquer le SARM pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Les taux d'éradication à la fin du traitement sont variables selon les associations testées :

- Rifampicine (6 mois) + acide fusidique (6 mois) + mupirocine nasale (5 jours) : 100% d'éradication (150)
- Rifampicine (6 mois) + acide fusidique (6 mois) : 73% d'éradication (99)
- Rifampicine (2 semaines) + sulfaméthoxazole-triméthoprime (2 semaines) + mupirocine nasale (1 semaine) : 80% d'éradication (151)
- Rifampicine (6 semaines) + acide fusidique (6 semaines) + vancomycine (5 jours) : 81% d'éradication (152)

Toutefois, il existe encore peu de données cliniques sur l'utilisation des nouvelles molécules comme le ceftobiprole ou la ceftaroline lors d'exacerbations pulmonaires chez ces patients. Il est possible que, dans les années à venir, ces nouvelles molécules surpassent celles utilisées actuellement. (148,149)

D'autres alternatives thérapeutiques sont actuellement en cours d'évaluation, c'est le cas par exemple de l'acide usnique. En plus de son activité anti-cancéreuse et fongicide, cette molécule issue du lichen possède des propriétés antibactériennes contre certaines bactéries multi-résistantes comme les entérocoques résistants à la vancomycine ou encore le SARM, en diminuant la synthèse du peptidoglycane et en atténuant les propriétés adhésives du biofilm produit par ces bactéries. (153,154)

Une autre option pourrait être l'utilisation de nano-antibiotiques. L'association de carbénicilline, de fer et d'une nanoparticule permet une meilleure pénétration du biofilm, et donne des résultats prometteurs contre le SARM, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. (155)

9) Cas particulier des fratries

Il existe des situations où plusieurs membres d'une même famille sont touchés par la mucoviscidose, comme dans le cas de fratries. Comme vu précédemment, la promiscuité entre ces malades n'est pas sans incidence sur leur microbiote pulmonaire. Il n'existe toutefois aucune étude détaillant l'évolution du portage du SARM chez des fratries.

Dans le cas du SASM, *Ankrum et al.* montrent par WGS qu'une même souche est présente chez les 2 membres d'une même fratrie dans la grande majorité des cas, et qu'elle persiste durant au moins 22 mois. Dans cette étude, seule 1 fratrie sur 13 était colonisée par 2 souches différentes, que les membres de cette fratrie se sont échangés à plusieurs reprises durant cette période. (156) En revanche, dans le cas du *P. aeruginosa*, il semble y avoir des changements de souches intrafamiliaux plus fréquents qu'avec le *S. aureus*, avec des clones isolés à tour de rôle chez un membre ou l'autre de la fratrie. (157)

III. Persistance et évolution adaptative de *Staphylococcus aureus* au cours de la persistance chez les patients atteints de mucoviscidose

1) Généralités

Au cours de la colonisation chronique, sont souvent observés des changements phénotypiques des colonies isolées des échantillons du tractus respiratoire, que ce soit au niveau du morphotype en culture, ou au niveau de la sensibilité aux antibiotiques. La question se pose de savoir s'il s'agit d'une même souche évoluant dans le temps, ou bien d'une succession de souches de génotypes différents ?

Dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose, plusieurs études montrent une persistance de *S. aureus* de même ST après 2 ans dans plus de 75% des cas, et après 10 ans dans 41% des cas. (49,158,159)

La persistance moyenne d'une même souche de *S. aureus* dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose est estimée à 8,25 ans. (158)

Les études analysant uniquement les SARM sont rares, mais sont en accord avec les observations faites pour l'ensemble des *S. aureus*. Dans leur étude portant sur 76 patients, utilisant les techniques de *spa* typing et MLVA, *Gilpin et al.* montrent une persistance d'un même ST de SARM dans 76,3% des cas après 2 ans. De leur côté, *Molina et al.* montrent cette persistance dans 67% des cas après 2 à 5 ans de colonisation, après analyse des échantillons de 77 patients par PFGE. (136,138)

Bien qu'il existe de nombreuses souches différentes de *S. aureus* pouvant être isolées, il ne semble pas y avoir de lien entre ST et évolution clinique chez les patients atteints de mucoviscidose. (158)

2) Modifications génotypiques

Du fait de la chronicité du portage du SARM chez certains patients atteints de mucoviscidose, il existe une adaptation à leur environnement par des modifications de leur patrimoine génétique. Ces modifications ont par exemple été mises en évidence dans l'étude sur 13 ans d'un patient colonisé à SARM, chez lequel le *spa*-type change à 6 reprises (souche de même ST et ayant un même type de *SCCmec* durant toute l'étude). (159)

Il a été montré que les *S. aureus* colonisant ces patients mutent significativement plus que chez un patient sain, pouvant donner lieu à l'apparition de SCV ou de résistances aux antibiotiques. (160,161)

Dans leur étude, *Vu-Thien et al.* ont étudié par MLVA et *spa* typing 278 souches de *S. aureus* provenant de 108 patients, isolées précocement et tardivement (jusqu'à 2 ans d'intervalle) au cours de la colonisation chronique à *S. aureus*. Ils ont observé dans la majorité des cas la persistance d'une même souche au cours du temps. D'autres patients pouvaient avoir plusieurs souches de CC différents simultanément : c'est notamment le cas d'un patient chez qui 4 CC différents ont été mis en évidence, mais 1 seul a été détecté plus d'une fois au cours de l'étude. (49) Cette observation est en adéquation avec l'étude de *Kahl et al.* suggérant une compétition entre *S. aureus* dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose. (133)

Chez d'autres patients, la présence de populations bactériennes diversifiées avec coexistence de plusieurs variants chez un même patient est observée, à travers la présence de plusieurs bandes suite à l'électrophorèse sur gel d'agarose des VNTRs. (49)

Les souches appartenant au CC8 se sont montrées être très stables à 2 ans. En revanche, les souches appartenant aux CC5 et CC45 avaient subi plus de mutations au cours de l'évolution, avec apparition de colonies variantes. (49)

3) Variants à petites colonies (SCV)

Il est observé l'apparition de variants à petites colonies de *S. aureus* (SA-SCV) dans le poumon de patients atteints de mucoviscidose dans un quart des cas de colonisation chronique. (158) Cette observation est à mettre en lien avec la pression de sélection exercée par *P. aeruginosa*, mais également par un traitement prolongé par sulfaméthoxazole-triméthoprime. (127,133,162)

Ces souches posent un problème important car leur croissance peut être plus lente (jusqu'à 72h) et l'aspect des colonies peut être atypique (aspect très fin, non hémolytique...), rendant ainsi leur détection plus compliquée au laboratoire, où il est estimé qu'environ 1% des *S. aureus* isolés sont des SCV. Elles produisent également moins de pigments et sont plus fréquemment intracellulaires, rendant leur détection d'autant plus difficile. (163)

D'une façon générale, les SA-SCV sont également plus souvent résistants aux antibiotiques comme le sulfaméthoxazole-triméthoprimine, les aminosides, la fosfomycine, ou encore la ciprofloxacine. Ils sont également associés à des recours plus fréquents à des antibiotiques par voie intraveineuse, ainsi qu'à une dégradation respiratoire plus importante objectivée par un VEMS plus bas. (162)

Il a également été montré que ces souches présentaient des taux de mutation plus importants. (160)

4) Biofilm

Les bactéries cherchent constamment à se mettre à l'abri d'un environnement hostile, et notamment du système immunitaire. Ainsi, l'un des mécanismes permettant cette protection au cours de la colonisation est la production de biofilm. Cette production est complexe, et dépend à la fois de caractéristiques génotypiques et phénotypiques. Ainsi, chez le *S. aureus*, le gène *ica* est au centre de ce mécanisme en produisant deux protéines : polysaccharide intercellular adhesin (PIA) et poly-N-acetyl- β -(1-6)-glucosamine (PNAG), nécessaires à la formation du biofilm. (127,164)

Une production accrue de biofilm peut exister dans certains cas de figures apparaissant au cours de la colonisation : i) il peut notamment exister une délétion au sein de l'opéron *ica*, permettant une production plus importante des protéines PIA/PNAG ; (165) ii) un deuxième cas de figure peut apparaître dans le cas particulier des patients atteints de mucoviscidose, chez lesquels la présence de mucus pulmonaire épais peut entraîner localement des conditions de microaérobiose ou d'anaérobiose. (166,167) Dans ce contexte d'anaérobiose, il existe un système à deux composants appelé « staphylococcal respiratory response AB » (SrrAB) qui va réguler l'expression de plusieurs gènes. Ce régulon va notamment entraîner une plus forte expression du gène *ica*, augmentant ainsi la production de biofilm et permettant une persistance du *S. aureus*. (168) A noter que ce système serait également responsable de variations de production de facteurs de virulence comme la TSST-1 ou la protéine A. (168–170)

Alors que le rôle du biofilm est largement étudié dans le cas de *P. aeruginosa*, il n'existe que peu d'études sur les *S. aureus* de patients atteints de mucoviscidose. (171) Une production plus importante de biofilm par cette bactérie est toutefois mise en évidence chez ces malades. (172)

La complexité de l'éradication du SARM dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose réside principalement dans l'isolement de ces bactéries au sein de biofilm. (173,174) Ainsi, comme le montrent *Molina et al.*, une même souche de SARM aura un profil de résistance différent selon qu'elle se trouve dans le poumon (et donc fréquemment protégée au sein de biofilm) ou dans le sang. Dans la majorité des cas, les concentrations minimales inhibitrices du biofilm (MBIC) étaient plus élevées que les concentrations minimales inhibitrices (MIC), notamment en prenant en compte la MBIC₉₀. En revanche, au vu des résultats des MIC₅₀ et MBIC₅₀, les isolats issus de patients atteints de mucoviscidose (mais pas ceux issus d'hémocultures) étaient plus sensibles à la clindamycine, l'érythromycine, l'azithromycine et la gentamicine en mode sessile qu'en mode planctonique (**Tableau 5**). Ces résultats suggèrent une forte activité des macrolides et des aminosides contre la formation de biofilm, comme déjà décrit dans le cas de *P. aeruginosa*. (138,175)

Tableau 5 : Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques de souches de SARM isolées de 14 patients atteints de mucoviscidose (échantillons respiratoires) et de 20 patients non atteints (hémocultures)

Antibiotic	Origin	MIC ₅₀	MBIC ₅₀	MIC ₉₀	MBIC ₉₀
Linezolid	CF	16	16	32	128
	blood	8	16	64	128
Clindamycin	CF	≥256	8	≥256	≥256
	blood	≤0.25	≤0.25	1	0.5
Erythromycin	CF	≥256	32	≥256	≥256
	blood	128	128	≥256	≥256
Azithromycin	CF	≥256	16	≥256	≥256
	blood	≥256	≥256	≥256	≥256
Daptomycin	CF	0.25	64	0.5	≥256
	blood	0.125	1	0.25	≥256
Levofloxacin	CF	16	4	64	≥256
	blood	16	64	128	128
Gentamicin	CF	≥256	16	≥256	≥256
	blood	4	16	64	64
Vancomycin	CF	2	2	4	≥256
	blood	2	16	4	≥256

MIC : concentration minimale inhibitrice ; MBIC : concentration minimale inhibitrice du biofilm (138)

5) Autres adaptations

Durant la phase de colonisation par les souches de SARM, il est également observé des modifications de production de toxines, de capsule, ainsi que des variations d'hémolyse et de résistances aux antibiotiques. (158)

Ces modifications restent néanmoins variables d'un individu à l'autre. Dans leur étude, *Hirschhausen et al.* ont étudiés les souches de *S. aureus* issues d'échantillons respiratoires de 29 patients, en analysant pour chacun d'entre eux 2 souches espacées d'au moins 5 ans, de même MLST et de *spa* type identiques ou proches. Ils mettent en évidence une diminution de l'expression capsulaire par 31% des souches, et une augmentation de cette production par 10% des souches. De même, 24% des souches produisent moins de toxines qu'initialement, contre 11% des souches qui ont vu cette production augmenter. Il existe également des variations de résistances aux antibiotiques ainsi que d'hémolyse, qui peuvent toutefois être liée à la transformation des souches en SCV. (158)

Cette adaptation bactérienne chez les patients atteints de mucoviscidose a également été étudiée dans le cas de colonisation à *P. aeruginosa*, *Achromobacter* sp. et *Burkholderia* sp.. Il en ressort sensiblement les mêmes conclusions, soit une modification du métabolisme, de la virulence et de la production de biofilm, l'apparition de résistances aux antibiotiques, l'augmentation de l'adhésion aux cellules épithéliales, ainsi qu'une réduction de la taille du génome. (93,176–178)

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Introduction

Du fait de l'immunodépression locale qu'elle provoque au niveau pulmonaire, la mucoviscidose est un terrain favorable à la colonisation bactérienne, ainsi qu'à la survenue d'infections respiratoires. (93,123) Bien que présent chez plus d'un patient sur deux, le portage pulmonaire chronique du *S. aureus* est peu étudié dans le cadre de cette pathologie. Le *P. aeruginosa*, de par la gravité des infections qu'il peut engendrer et sa multi-résistance naturelle et parfois acquise aux antibiotiques, fait l'objet de la majorité des publications scientifiques à ce jour. Plusieurs études suggèrent pourtant un rôle important du SARM, bactérie pouvant entraîner un déclin important du VEMS chez cette catégorie de patients. (101)

L'épidémiologie mondiale du SARM est variable, que ce soit d'un point de vue de la prévalence ou des clones circulants. Bien que la prévalence de cette bactérie multi-résistante soit élevée dans certaines régions du monde comme l'Amérique du Nord, l'Afrique ou encore l'Asie, elle est en recul en Europe depuis plusieurs années. (62) Il n'existe que peu d'études européennes portant sur les colonisations à SARM chez les patients atteints de mucoviscidose. En France, à notre connaissance, seule l'étude réalisée en 2010 par *Vu-Thien et al.* apporte des données quant à l'épidémiologie moléculaire de *S. aureus* au cours de la mucoviscidose. (49)

En plus de sa multi-résistance, cette bactérie est fréquemment productrice de biofilm, ce qui la rend plus difficile à éradiquer. (138) Il semble donc nécessaire d'étudier ce micro-organisme afin d'améliorer la prise en charge des patients colonisés par cette bactérie multi-résistante, que ce soit en amont ou lors d'épisodes d'exacerbations pouvant être extrêmement graves voire mortels.

Cette étude a plusieurs objectifs : 1) tout d'abord décrire l'épidémiologie moléculaire des clones de SARM isolés chez les patients colonisés suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) de Montpellier ; 2) puis dans un deuxième temps, étudier les souches issues d'échantillons respiratoires de certains de ces patients de façon longitudinale, afin d'évaluer s'il existe une perte, un changement ou une persistance de ces souches ; 3) pour finir, étudier la variation de production de biofilm de souches de même génotype isolées dans une fratrie afin de mettre en évidence ou non des modifications phénotypiques propres à l'adaptation à des hôtes différents.

II. Matériels et méthodes

Il s'agit d'une étude microbiologique et épidémiologique. Cette étude n'a pas vocation à être une étude d'impact.

1) Patients et échantillons

Tous les patients atteints de mucoviscidose suivis au CRCM de Montpellier (Hôpital Arnaud de Villeneuve, France) et ayant eu au moins une culture de SARM à partir des échantillons du tractus respiratoire (expectoration ou aspiration bronchique) analysés en 2016 ont été inclus dans cette étude.

Alors que les critères de colonisation chronique pour le *P. aeruginosa* sont bien définis, il n'existe pas de définition officielle de la colonisation chronique par *S. aureus* chez les patients atteints de mucoviscidose. (14) Plusieurs articles prennent comme définition la présence d'au moins 3 échantillons respiratoires consécutifs ayant montré une culture de SARM. (102,134)

Dans notre étude, nous avons également analysé la ou les souches de SARM les plus anciennement cultivées et conservées au sein du laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier pour chaque patient, ceci étant colonisé chroniquement et de longue date par SARM. Ces patients ont été sélectionnés sur la base des 2 critères suivants :

- colonisation chronique par SARM depuis plus de 3 ans
- échantillons respiratoires positifs à SARM au moins 3 fois par an durant cette période

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus pour le ou les isolats de 2016 (étude longitudinale).

En cas de présence de plusieurs morphotypes coloniaux de SARM en culture dans un même échantillon, chaque morphotype a été étudié individuellement afin de rechercher une colonisation par plusieurs clones distincts.

L'âge et le sexe des patients ont été recueillis. Les données cliniques recueillies sont les suivantes : présence d'insuffisance pancréatique exocrine, de diabète insulino-dépendant et VEMS le jour du prélèvement dont sont issues les souches analysées.

2) Souches bactériennes et analyses microbiologiques

Toutes les souches bactériennes isolées ont été identifiées comme étant des *Staphylococcus aureus* après culture sur gélose au sang ANC (bioMérieux®) et identification par spectrométrie de masse (Bruker®).

La sensibilité à la méticilline a été évaluée par antibiogramme en diffusion selon les recommandations du CA-SFM, avec si besoin recherche du gène *mecA* par PCR.

Ces souches ont été conservées congelées à -80°C.

3) Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

Les souches bactériennes ont été remises en culture sur gélose au sang TSS (bioMérieux®) et ont été incubées à 37 °C durant une nuit, puis l'ADN chromosomique a été extrait selon le protocole de *Predari et al.* (179) :

- Préparation d'une suspension bactérienne (1 ml) de densité optique 1 MacFarland
- Centrifugation à 10 000 tours/min pendant 10 min
- Élimination du surnageant et remise en suspension du culot de centrifugation par 111 µL de réactif de lyse (contenant du lysozyme (Sigma®) à la concentration de 8,33mg/ml et de la lysostaphine (Sigma®) à la concentration 41,67µg/ml)
- Incubation 1 h à 37 °C
- Ajout de 100 µL de mix de protéinase K (contenant de la protéinase K et du Tris)
- Incubation 1 h à 50 °C
- Incubation 10 min à 100 °C pour inhiber la protéinase K
- Incubation 10 min à -20 °C
- Centrifugation à 10 000 tours/min pendant 10 min
- Récupération du surnageant contenant l'ADN

L'analyse MLST a été réalisée selon *Enright et al.*, à l'exception de l'utilisation du primer arcCF2 (primer forward du gène *arcC*). (58,180) Une amplification par PCR a été réalisée puis contrôlée par migration sur gel afin de vérifier l'obtention d'amplicons de taille attendue. Un séquençage des 7 gènes de ménages par méthode de Sanger a été réalisée par la société GENEWIZ® (**Tableau 6**). (181)

Tableau 6 : Amorces utilisées et tailles des amplicons attendues pour chaque gène du schéma MLST de *S. aureus*

Gène	Sens	Séquence des amorces (de 5' à 3')	Taille d'amplicon attendue (pb)
<i>arcC</i>	up	CCT TTA TTT GAT TCA CCA GCG	456
	down	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG	
<i>aroE</i>	up	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC	456
	down	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC	
<i>glpF</i>	up	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C	465
	down	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC	
<i>gmk</i>	up	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC	417
	down	TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA	
<i>pta</i>	up	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG	474
	down	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA	
<i>tpi</i>	up	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA	402
	down	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC	
<i>yqiL</i>	up	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC	516
	down	CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC	

pb : paires de bases

4) Production de biofilm

La détermination de la cinétique de production de biofilm des souches de SARM a été réalisée par la technique du Biofilm Ring Test (Biofilm Control, St Beuzire, France) suivant les recommandations du fournisseur et comme décrit par *Chavant et al.* (182) Cette technique s'appuie sur la mesure du déplacement de microbilles magnétiques dans un puits de microplaque sous l'action d'un champ magnétique généré par un aimant placé sous le centre du puits. Les souches testées ont été repiquées sur boîte de pétri BHI (milieu cœur-cervelle) et ont été incubées durant 24 h à 37 °C. Un second repiquage réalisé à partir d'une seule colonie a été effectué sur ce même milieu suivi d'une incubation durant 24 h à 37 °C. Après dilution dans du bouillon BHI, 200 μ L de suspension bactérienne ont été déposées dans des plaques 96 puits en présence de billes magnétiques. Chaque suspension a été déposée en double, dans 2 puits. Les plaques ont été incubées durant 5h à 37°C, une lecture étant réalisée à 1h, 2h30 et 5h. Avant chaque lecture, les plaques ont été placées sur un block magnétique et disposées dans le lecteur.

Les images de chaque puits, avant et après aimantation, ont été analysées par le logiciel BFC Elements 2.0 (BioFilm Control) qui permet d'évaluer le Biofilm Formation Index (BFI). Un BFI supérieur à 7 correspond à une importante mobilité des billes et donc une absence de formation de biofilm alors qu'un BFI inférieur à 2 correspond à une immobilité des billes qui sont piégées en présence de biofilm (**Figure 10**).

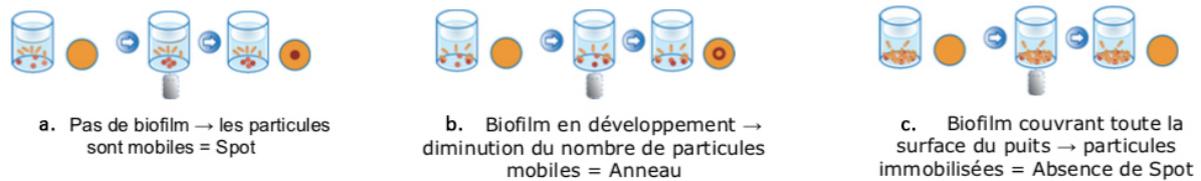


Figure 10 : Interprétation du Biofilm Ring Test®

5) Analyse des données

La détermination des STs de chaque souche à partir des séquences des 7 gènes domestiques du schéma MLST a été réalisée grâce à la base de données PubMLST (<https://pubmlst.org>). (59)

L'analyse des distances alléliques entre les différentes souches a été réalisée grâce au logiciel PHYLOViZ 2 utilisant l'algorithme Based Upon Related Sequence Types (eBURST). (61,183)

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Prism 7. Les comparaisons de prévalence du SARM, d'insuffisance pancréatique exocrine et de diabète insulino-dépendant ont été réalisées en utilisant un test binomial, en considérant un résultat comme significatif lorsque p était inférieur à 0,05. Les comparaisons d'âge et de VEMS ont été réalisées en utilisant un test de comparaison d'une moyenne observée à une moyenne de référence, la valeur seuil suivant une loi de Student (seuil de 0,05).

III. Résultats

1) Population étudiée

Le CRCM de Montpellier a suivi 212 patients atteints de mucoviscidose durant l'année 2016. 12,7% (27/212) de ces patients ont eu au moins 1 échantillon respiratoire positif à *S. aureus* méticillino-résistant, et ont été inclus dans notre étude.

Les 27 patients étaient insuffisants pancréatiques exocrines et 26% (7/27) étaient diabétiques insulino-dépendants. L'âge moyen de ces patients était de 26,3 ans [2-52] en 2016, l'âge médian de découverte de la mucoviscidose était de 5 mois, et le VEMS moyen de 53,9% [25-103] (**Tableau 7A**).

La mutation F508del était présente chez 92,6% des patients de notre étude, dans 48,2% des cas à l'état homozygote et dans 44,4% des cas à l'état hétérozygote (**Tableau 7B**).

Tableau 7 : Données descriptives des 27 patients inclus dans l'étude

A.	Age des patients (années)	Age de découverte de la mucoviscidose (mois)	VEMS (%)	VEMS mesuré (l/s)
Moyenne	26,3	28,9	53,9	1,8
Médiane	26	5	45	2
Écart-type	11,5	42,9	24,1	0,7

B.	F508del/F508del	F508del/autre	autre/autre
Nombre de patients	13	12	2
%	48,2	44,4	7,4

(A) Moyenne, médiane et écart-type de l'âge des patients en 2016, de l'âge de découverte de la mucoviscidose, du VEMS (%) et du VEMS mesuré (l/s)

(B) Mutations génétiques

Le VEMS moyen de nos patients colonisés par du SARM en 2016 était de 53,9%, soit un taux significativement plus bas ($p < 0,0001$) que la moyenne du VEMS de l'ensemble des patients suivis au CRCM de Montpellier qui était de 78,6%. (184) Les patients porteurs de SARM étaient également significativement plus âgés et plus souvent insuffisants pancréatiques exocrines (**Tableau 8**).

Les patients du CRCM de Montpellier (n=212) cités dans les analyses comparatives suivantes correspondent à l'ensemble des patients de ce CRCM, y compris les 27 patients de notre étude.

Tableau 8 : Comparaison des paramètres cliniques des patients de notre étude par rapport à l'ensemble des patients suivis au CRCM de Montpellier

	Age moyen (années)	IPE (% de patients)	DID (% de patients)	VEMS moyen (%)
Patients de notre étude (n=27)	26,3	100	25,9	53,9
Patients du CRCM de Montpellier (n=212)	20,2	81,6	12,7	78,6
Valeur de p	<u>0,0055</u>	<u>0,0041</u>	0,0729	<u>≤0,0001</u>

Valeurs de p soulignées : significatif au seuil de 0,05

IPE : insuffisance pancréatique exocrine ; DID : diabète insulino-dépendant ; VEMS : volume expiratoire maximal par seconde

Ces données détaillées sont présentées dans le **Tableau 9** (voir page ci-après).

Tableau 9 : Données cliniques et comorbidités des 27 patients étudiés

N° patient	Sexe	Age en 2016 (années)	Age de diagnostic	Mutation	IPE	DID	VEMS (%)	VEMS mesuré (l/s)
1	F	16	4 mois	F508del/F508del	oui	non	29	0,91
2	M	49	naissance	F508del/2184insA	oui	non	40	1,32
3	M	26	naissance	F508del/G542X	oui	non	45	1,94
4 *	F	24	4 ans	F508del/R553X	oui	non	77	1,82
5 *	F	20	2 mois	F508del/R553X	oui	non	42	1,14
6	F	11	1 mois	F508del/F508del	oui	non	96	2,63
7	M	34	naissance	F508del/F508del	oui	oui	36	1,27
8	M	32	3 ans	F508del/1811+1.6kbA->G	oui	non	89	3,27
9	F	14	1 an	F508del/R553X	oui	non	78	2,45
10	M	33	4 ans	F508del/1717-1G->A	oui	non	64	2,56
11 *	F	26	naissance	F508del/F508del	oui	oui	37	1,11
12	F	20	naissance	F508del/F508del	oui	non	59	1,98
13	F	35	5 mois	F508del/F508del	oui	non	103	2,84
14	M	23	5 mois	F508del/711+1G->T	oui	non	54	2,03
15	M	33	4 ans	F508del/R347P	oui	oui	26	1,04
16	F	17	4 ans	F508del/F508del	oui	non	100	3,40
17	M	25	7 ans	F508del/F508del	oui	non	37	1,56
18	F	52	naissance	F508del/I507del	oui	oui	25	0,56
19	M	20	2 mois	F508del/F508del	oui	oui	32	1,41
20	M	2	4 mois	F508del/F508del	oui	non	29	1,22
21	F	28	13 ans	F508del/R709X	oui	non	54	1,77
22	M	34	12 ans	F508del/R334W	oui	non	54	2,12
23 *	F	43	1 an	G542X/R792X	oui	oui	59	1,57
24	F	11	naissance	G542X/R1066C	oui	non	81	NR
25	M	30	5 ans	F508del/F508del	oui	non	39	1,72
26	F	33	5 ans	F508del/F508del	oui	oui	36	1,36
27	F	18	naissance	F508del/F508del	oui	non	35	1,30

* patients colonisés de longue date

M : homme ; F : femme ; IPE : insuffisance pancréatique exocrine ; DID : diabète insulino-dépendant ; VEMS : volume expiratoire maximal par seconde ; NR : non renseigné

1,9% (4/212) des patients du CRCM de Montpellier étaient colonisés chroniquement par SARM de longue date selon les critères définis dans notre étude, soit 14,8% (4/27) des patients étudiés. Il s'agit des patients 4, 5, 11 et 23 (**Tableau 10**).

Les 23 autres patients étaient colonisés par du SARM de façon sporadique, intermittente, ou chronique (sans toutefois rentrer dans la catégorie des patients colonisés chroniquement de longue date).

Ces données sont présentées dans le **Tableau 10** (voir page ci-après).

Tableau 10 : Données descriptives de la colonisation du tractus respiratoire des 27 patients de notre étude

N° patient	Echantillons positifs à SARM					Ensemble des échantillons respiratoires			Colonisation (autre que <i>S. aureus</i>)	
	Nombre d'échantillons	Nombre d'isolats	Premier échantillon positif	Dernier échantillon positif **	Delta (mois)	Date premier isolement de SARM connu	Nombre total d'échantillons analysés	Durée de suivi (mois)		Nombre moyen d'échantillons analysés par an
01	3	3	mars-09	avr-16	85	17/04/2002	60	119	6,1	<i>A. xylosoxidans</i>
02	7	16	nov-13	oct-16	35	30/03/2012	19	55	4,1	
03	1	3	juin-16	juin-16	0	28/09/2010	6	79	0,9	<i>P. aeruginosa</i>
04 *	31	88	août-11	oct-16	62	24/03/2007	63	127	6,0	<i>P. aeruginosa ; levure</i>
05 *	39	88	févr-10	oct-16	80	14/09/2004	69	130	6,4	<i>Aspergillus sp.</i>
06	1	1	juin-16	juin-16	0	09/01/2007	31	126	3,0	
07	3	5	janv-16	sept-16	8	28/08/2006	22	120	2,2	<i>P. aeruginosa ; levure</i>
08	10	22	nov-12	oct-16	47	18/11/2003	39	130	3,6	<i>P. aeruginosa ; Aspergillus sp.</i>
09	4	10	juil-14	sept-16	26	17/05/2013	32	126	3,0	<i>P. aeruginosa</i>
10	3	5	juil-14	nov-16	28	22/12/2008	20	107	2,2	<i>P. aeruginosa</i>
11 *	68	125	mai-12	déc-16	55	Non connue	71	84	10,1	<i>S. maltophilia</i>
12	17	44	mai-13	nov-16	42	2001	38	104	4,4	<i>P. aeruginosa</i>
13	10	16	nov-10	févr-16	63	Non connue	26	84	3,7	<i>P. aeruginosa</i>
14	2	7	mai-12	nov-16	54	Non connue	48	128	4,5	
15	1	2	juin-16	juin-16	0	Non connue	22	101	2,6	<i>P. aeruginosa ; M. abscessus</i>
16	4	5	sept-14	juil-16	22	27/09/2005	75	126	7,1	
17	4	5	oct-07	févr-16	100	Non connue	82	128	7,7	<i>P. aeruginosa</i>
18	12	38	févr-09	févr-16	84	12/07/2005	24	117	2,5	<i>A. xylosoxidans</i>
19	1	2	févr-16	févr-16	0	Non connue	81	129	7,5	<i>A. xylosoxidans</i>
20	6	14	mars-15	mai-16	14	02/09/2014	13	21	7,4	<i>P. mirabilis</i>
21	7	21	août-15	sept-16	13	Non connue	9	15	7,2	<i>S. maltophilia ; E. coli</i>
22	2	3	juin-15	févr-16	8	05/12/2007	20	118	2,0	<i>P. aeruginosa</i>
23 *	20	55	nov-10	sept-16	70	26/05/2004	72	128	6,8	<i>P. aeruginosa</i>
24	6	22	oct-15	sept-16	11	20/08/2015	9	18	6,0	
25	1	1	nov-16	nov-16	0	27/04/2005	14	126	1,3	<i>P. aeruginosa</i>
26	1	1	févr-16	févr-16	0	Non connue	30	124	2,9	<i>P. aeruginosa</i>
27	16	30	juil-11	oct-16	63	26/07/2005	35	127	3,3	<i>P. aeruginosa</i>

* patients colonisés de longue date

** dans la limite de notre étude s'arrêtant en décembre 2016

Les 4 patients colonisés chroniquement à SARM de longue date étaient âgés en moyenne de 28,3 ans [20-43] en 2016, avec un âge médian de découverte de la maladie de 7 mois, et un VEMS moyen de 73,3% [43-104] lors de l'analyse de l'échantillon ancien (**Tableaux 11A et 11B**).

Deux de ces patients sont de la même fratrie, il s'agit de 2 sœurs âgées respectivement de 20 et 24 ans en 2016 (patients 4 et 5).

Tableau 11 : Données descriptives des 4 patients colonisés chroniquement à SARM de longue date inclus dans l'étude

A.	Prélèvement ancien			Prélèvement de 2016	
	Année	VEMS (%)	VEMS (l/s)	VEMS (%)	VEMS (l/s)
Patient 4	2012	80	1,94	77	1,82
Patient 5	2010	104	2,21	42	1,14
Patient 11	2012	43	1,34	37	1,11
Patient 23	2011	66	1,85	59	1,57

B.	Age des patients en 2016 (années)	Age de découverte de la mucoviscidose (mois)	VEMS lors du prélèvement ancien (%)	VEMS mesuré lors du prélèvement ancien (l/s)
Moyenne	28,3	15,5	73,3	1,8
Médiane	25	7	73	2
Écart-type	10,1	22,3	25,6	0,4

Un total de 68 isolats a été cultivé à partir de 31 échantillons respiratoires de ces 27 patients (**Tableau 12**) :

- 54 isolats proviennent de 27 échantillons datant de 2016 (27 patients)
- 14 isolats proviennent de 4 échantillons datant de 2010, 2011 ou 2012 (4 des 27 patients précédents)

La majorité des patients (82,5%) était colonisée par d'autres microorganismes opportunistes que le SARM au moment du recueil des échantillons respiratoires (**Tableau 10**) :

- 55,6% (15/27) étaient colonisés par *P. aeruginosa*
- 11,1% (3/27) étaient colonisés par *Achromobacter xylosoxidans*
- 7,4% (2/27) étaient colonisés par une levure
- 7,4% (2/27) étaient colonisés par un champignon filamenteux (*Aspergillus* sp.)
- 18,5% (5/27) étaient colonisés par une autre bactérie (*S. maltophilia*, *Mycobacterium abscessus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*)

Seuls 5 patients étaient colonisés par deux microorganismes pathogènes opportunistes en plus du SARM :

- 2 patients avec *P. aeruginosa* + levures
- 1 patient avec *P. aeruginosa* + *Aspergillus* sp.
- 1 patient avec *P. aeruginosa* + *M. abscessus*
- 1 patient avec *S. marcescens* + *E. coli*

2) Génotypes de SARM identifiés chez les patients du CRCM de Montpellier en 2016

Les 54 isolats étudiés appartiennent à 8 STs. Plus de la moitié de ces isolats sont de ST5 (29/54), et près d'un tiers sont de ST8 (17/54). Les autres STs identifiés sont les ST30 (2/54), ST45 (1/54) et ST398 (1/54). 3 STs jusqu'alors inconnus sont également mis en évidence. Il s'agit des ST4780 (1/54), ST4781 (2/54) et ST4782 (1/54). Ces résultats sont présentés dans le **Tableau 12** et la **Figure 11**. Les profils alléliques et les STs identifiés dans notre étude sont détaillés en **Annexe 2**.

Tableau 12 : Résultat de typage par MLST des 68 isolats de SARM des 27 patients de notre étude

N° patient	Date du prélèvement	Nombre de morphotypes étudiés	Sequence type par morphotype **	Complexe clonal	Sequence type par patient
1	avr-16	1	4780	398	ST4780
2	oct-16	1	5	5	ST5
3	juin-16	1	5	5	ST5
4 *	nov-12	4	5	5	ST5
			5	5	
			5	5	
			5	5	
5 *	oct-16	2	5	5	ST5
			8	8	
6	févr-10	2	8	8	ST8
			8	8	
			5	5	
7	sept-16	1	5	5	ST5
			8	8	ST8
8	oct-16	3	8	8	
			8	8	
			8	8	ST8
9	sept-16	3	5	5	
			5	5	
			5	5	ST5
10	nov-16	2	5	5	ST5 et ST4782
			4782	5	
11 *	mai-12	3	5	5	
			5	5	ST5
			5	5	
			5	5	
12	déc-16	2	5	5	ST5 et ST45
			45	45	
			5	5	
13	nov-16	3	5	5	ST5
			5	5	
			5	5	
14	févr-16	2	8	8	ST8
			8	8	
15	avr-16	1	4781	5	ST5 et ST4781
			5	5	
			4781	5	
16	juin-16	2	5	5	
			5	5	
			5	5	
17	sept-16	4	5	5	
			45	45	
			5	5	
18	oct-16	3	5	5	
			5	5	
			5	5	
19	févr-16	2	8	8	
			8	8	
			5	5	ST5
20	mai-16	1	8	8	ST8
			8	8	
			5	5	
21	sept-16	4	5	5	
			5	5	
			5	5	ST5
22	févr-16	2	8	8	ST8
			8	8	
			8	8	
23 *	déc-11	5	8	8	
			8	8	
			8	8	
			8	8	
			8	8	ST8
24	sept-16	4	5	5	
			5	5	
			5	5	
			5	5	ST5
25	nov-16	1	5	5	ST5
26	févr-16	1	5	5	ST5
27	oct-16	1	8	8	ST8

* patients colonisés de longue date

** les lignes multiples pour un même échantillon indiquent les résultats obtenus pour chacun des morphotypes coloniaux analysés

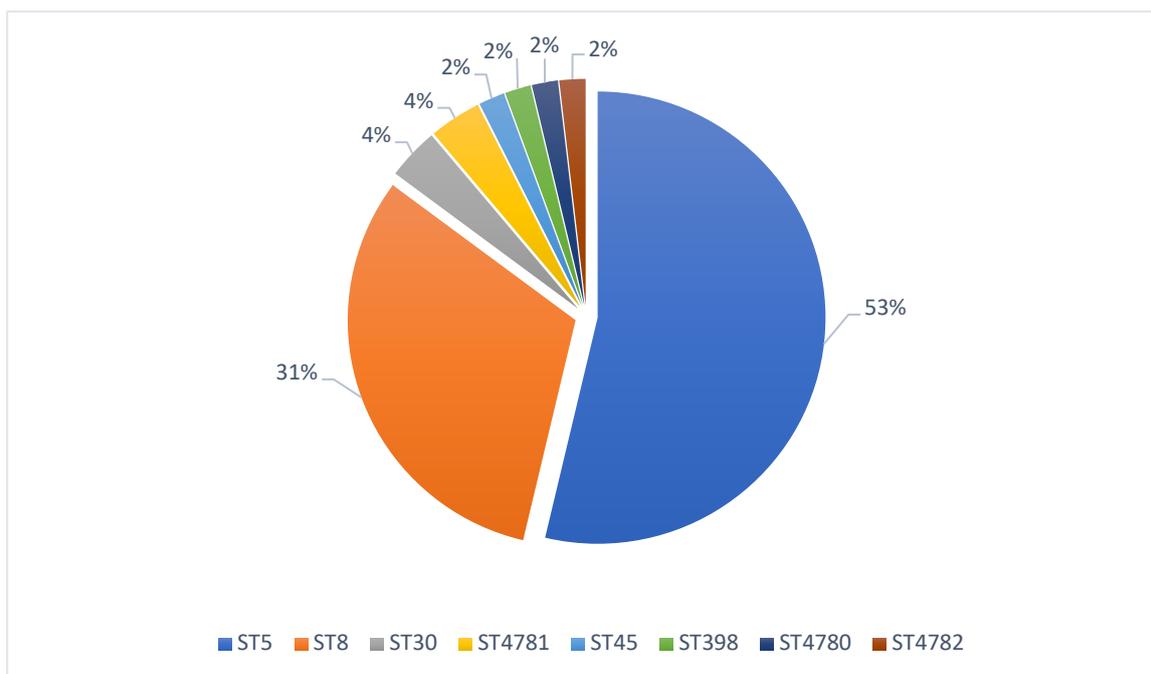


Figure 11 : Répartition des types de séquences mis en évidence chez les souches de SARM isolés de patients du CRCM de Montpellier en 2016, en prenant en compte l'ensemble des isolats (n=54).

3) Nouveaux génotypes

On note la présence de trois nouveaux STs : ST4780, ST4781 et ST4782, qui n'avaient jusqu'à présent jamais été décrits et que nous avons donc déposés dans la base de données PubMLST (<https://pubmlst.org>) (**Tableau 13**). (59)

Tableau 13 : Caractéristiques des nouveaux types de séquences (STs) de SARM isolés.

Sequence type	arcC	aroE	glpF	gmk	pta	tpi	yqiL	ST le plus proche	Mutation (position : bases)
4780	<u>563</u>	35	19	2	20	26	39	ST398	219 : T→A
4781	1	4	1	4	<u>589</u>	1	10	ST5	223 : T→A
4782	1	<u>713</u>	1	4	12	1	10	ST5	49 : C→T

Chiffres soulignés : nouveaux allèles.

Ces 3 nouveaux STs ne diffèrent d'un ST connu que par 1 seule mutation ponctuelle dans la séquence d'un des 7 gènes domestiques étudiés. Deux de ces nouveaux clones (ST4781 et ST4782) sont proches du ST5, qui est le clone majoritairement mis en évidence dans notre étude. Le troisième nouveau ST est proche du ST398 qui est un clone isolé chez un autre patient, sans qu'il n'y ait toutefois de lien familial entre ces deux malades.

4) Répartition des génotypes de SARM isolés par patient, en 2016

Comme vu précédemment, certaines cultures ont montré plusieurs morphotypes coloniaux, qui ont tous été étudiés. Ce cas de figure représentait 59% (16/27) des échantillons.

Pour la majorité (81%), les isolats avaient des STs identiques au sein d'un échantillon : 48% (13/27) des patients étaient colonisés uniquement par le clone ST5, 29% (8/27) par le clone ST8, et 3 patients étaient colonisés respectivement par les clones ST30, ST398 et ST4780.

Seuls 3 patients étaient simultanément colonisés par plusieurs génotypes de SARM, chacun d'entre eux étant colonisé par une souche de ST5 associée soit à une souche de ST45, de ST4781, ou de ST4782 (**Figure 12**).

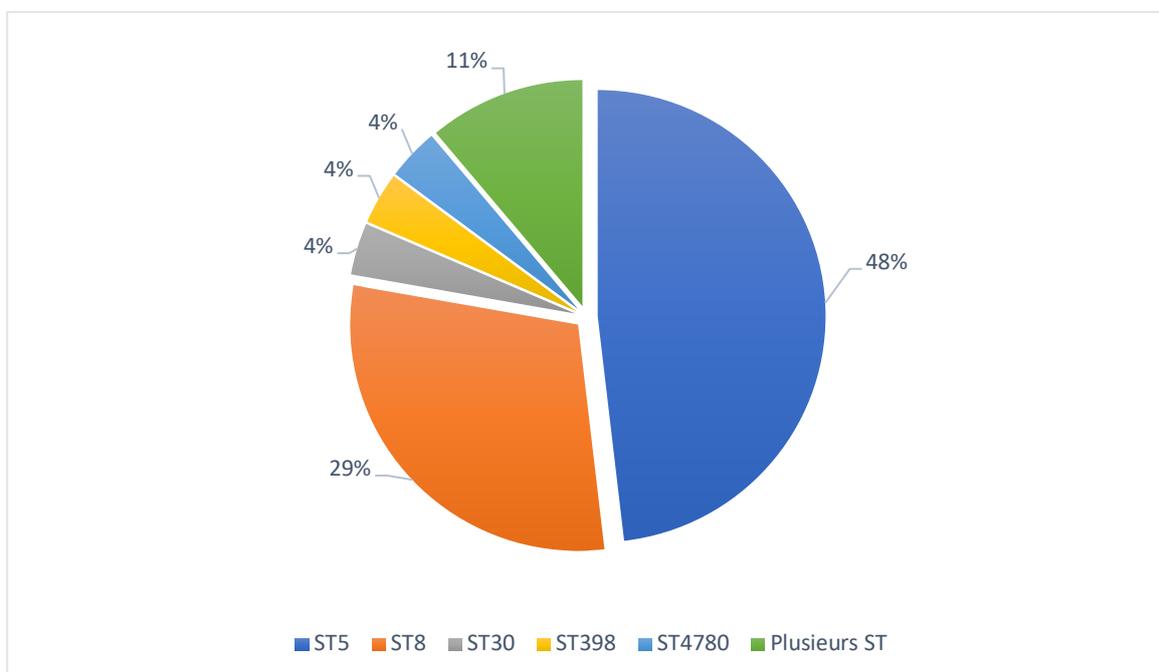


Figure 12 : Répartition des patients du CRCM de Montpellier selon les types de séquences mis en évidence chez les souches de SARM isolées de leur échantillon respiratoire en 2016, après dédoublement des isolats de même ST présent dans un échantillon (n=27).

L'analyse des résultats de MLST au niveau des complexe clonaux met en évidence que 55% (15/27) des patients sont colonisés par des souches appartenant au CC5, 30% (8/27) par des souches appartenant au CC8, 7% (2/27) par des souches appartenant au CC398, 4% (1/27) par des souches appartenant au CC30, et 4% (1/27) par des souches appartenant à divers autres complexes clonaux (**Figure 13**). (89,185)

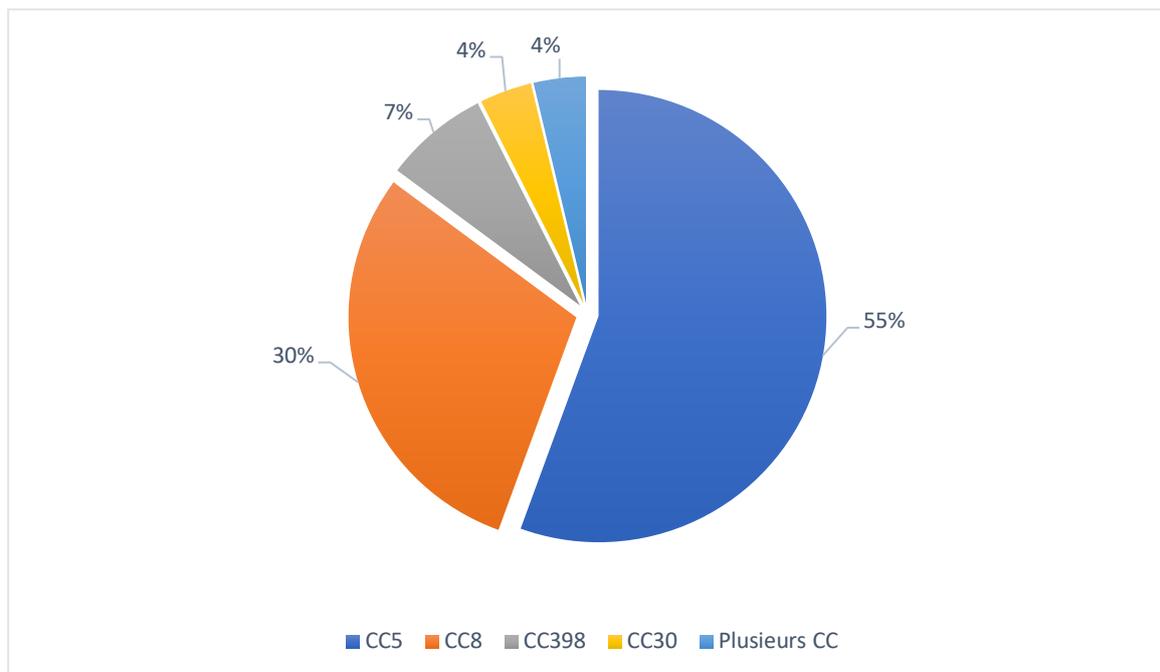


Figure 13 : Répartition des patients du CRCM de Montpellier selon les complexes clonaux mis en évidence chez les souches de SARM isolées de leur échantillon respiratoire en 2016, après dédoublement des isolats de même CC présent dans un échantillon (n=27)

5) Comparaison des résultats aux données de la base PubMLST

La base de données PubMLST (<https://pubmlst.org>) recensait 33615 isolats de *S. aureus*, dont 1980 identifiés comme étant résistants à la méticilline (en date du 19 juillet 2018). (59)

Parmi les 291 souches de SARM pour lesquelles l'origine est précisée (colonne « detailed_disease »), seules 69 ont été décrites comme isolées de patients atteints de mucoviscidose. Seules 22 de ces souches ont des STs mis en évidence dans notre étude, 15 étant de ST5 et 7 étant de ST30. L'ensemble de ces souches a été isolé à Rio De Janeiro (Brésil).

6) Lien avec les données cliniques et microbiologiques

La co-infection des différents STs de SARM avec le *P. aeruginosa* a été mise en évidence chez 46,2% (6/13) des patients porteurs de ST5 (dont un patient également colonisé par ST4782), chez 87,5% (7/8) des patients porteurs de ST8, chez l'unique patient porteur de ST30, ainsi que chez l'unique patient porteur de ST398.

La colonisation par *A. xylosoxidans* est mise en évidence chez 3 patients porteurs respectivement de souches de SARM de ST5, de ST8 et de ST4780.

La colonisation par levure est mise en évidence chez 2 patients porteurs respectivement de souches de SARM de ST5 et de ST8. Il en est de même pour les 2 patients colonisés par *Aspergillus* sp..

Parmi les 7 patients diabétiques insulino-dépendants, 3 étaient colonisés par des souches de ST8, 2 par des souches de ST5, 1 par une souche de ST30, et un dernier patient était colonisé par des souches de ST5 et ST45.

De par le faible effectif de notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre les données microbiologiques des co-infections et les STs des souches isolées. Il en est de même avec les données cliniques (âge, diabète insulino-dépendant).

L'ensemble de ces données sont présentées dans les **Tableaux 9, 10 et 12**, ainsi qu'en **Annexe 3**.

7) Distance allélique entre les *sequence types* des souches de SARM étudiées

Les STs des SARM analysés dans notre étude sont généralement assez éloignés les uns des autres. En dehors des nouveaux génotypes dérivants de STs connus, il y a au minimum 5 allèles différents entre chacun des STs identifiés au cours de notre étude (**Figure 14** et **Annexe 2**).

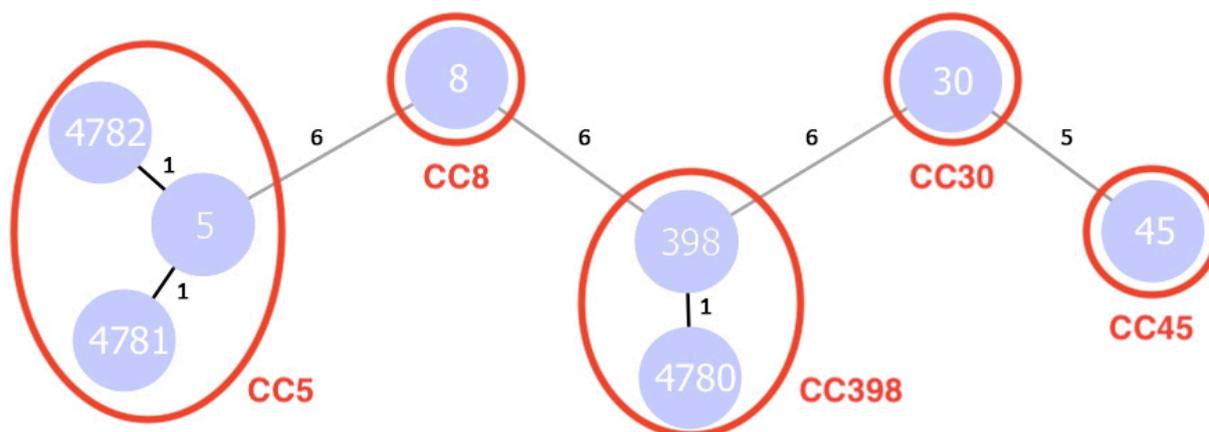


Figure 14 : Arbre de recouvrement minimum des types de sequences identifiés dans notre étude et représentation des complexes clonaux

Les STs sont représentés au sein des cercles bleus. Les CCs sont représentés au sein des cercles rouges. Le chiffre annoté à côté des liaisons entre STs correspond au nombre d'allèles différents entre ces STs.

8) Étude longitudinale

Une analyse longitudinale des STs a été réalisée chez les 4 patients de notre étude colonisés de longue date par le SARM. Deux de ces patients sont issus de la même fratrie, il s'agit des patients 4 et 5.

Un total de 23 souches a été analysé par MLST, 14 souches anciennes et 9 souches datant de 2016.

Pour deux patients sur les quatre, le même ST a été identifié à 4 ou 5 années d'intervalle : SARM de ST5 en novembre 2012 et octobre 2016 pour le patient 4 ; SARM de ST8 en décembre 2011 et septembre 2016 pour le patient 23.

Le patient 5 a présenté un changement de souche, la colonisation impliquant un SARM de ST8 en février 2010 et un SARM de ST5 en septembre 2016. Il s'agit de l'un des 2 membres de la fratrie (avec le patient 4).

Le dernier patient a conservé sa souche de ST5, mais a été colonisé par un second génotype (ST45) en décembre 2016 (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Analyse longitudinale des sequence types de SARM chez les patients de notre étude colonisés de longue date

N° patient	Année de primo-colonisation à SARM	Année				
		2010	2011	2012	...	2016
4*	2007			ST5 (4)		ST5 (2)
5*	2004	ST8 (2)				ST5 (1)
11	2009			ST5 (3)		ST5 / ST45 (2)
23	2004		ST8 (5)			ST8 (4)

Entre parenthèses : le nombre de morphotypes étudiés pour l'échantillon respiratoire correspondant

* : patients d'une même fratrie

9) Biofilm

La capacité à former du biofilm a été testée chez les souches de SARM des patients 4 et 5. Neuf souches ont été testées au total. Pour toutes les souches, récentes ou anciennes, de ST5 ou de ST8, il existe une cinétique tendant vers une production de biofilm entre 1h et 5h après début de l'incubation (**Figure 15** et **Annexe 4**).

Concernant le patient 4, un biofilm en cours de développement a été mis en évidence à 1h pour 3 souches anciennes sur les 4 (a, b et d), la quatrième souche (c) ne produisant pas de biofilm. A 5h, un biofilm en cours de développement a été mis en évidence pour 3 souches anciennes (a, b et c), la quatrième (d) ayant produit du biofilm.

Pour les 2 souches récentes de ce même patient (e et f), un biofilm en cours de développement a été mis en évidence après 1h d'incubation. Seule 1 souche (e) a produit du biofilm à 5h.

Concernant le patient 5, un biofilm en cours de développement à 1h et la présence de biofilm à 5h ont été mis en évidence pour 1 souche ancienne (a) et l'unique souche récente (c). La deuxième souche ancienne ne produisait pas de biofilm à 1h, et la formation était en cours de développement après 5h d'incubation.

Ces résultats doivent toutefois être confirmés par d'autres tests afin d'obtenir des données plus précises.

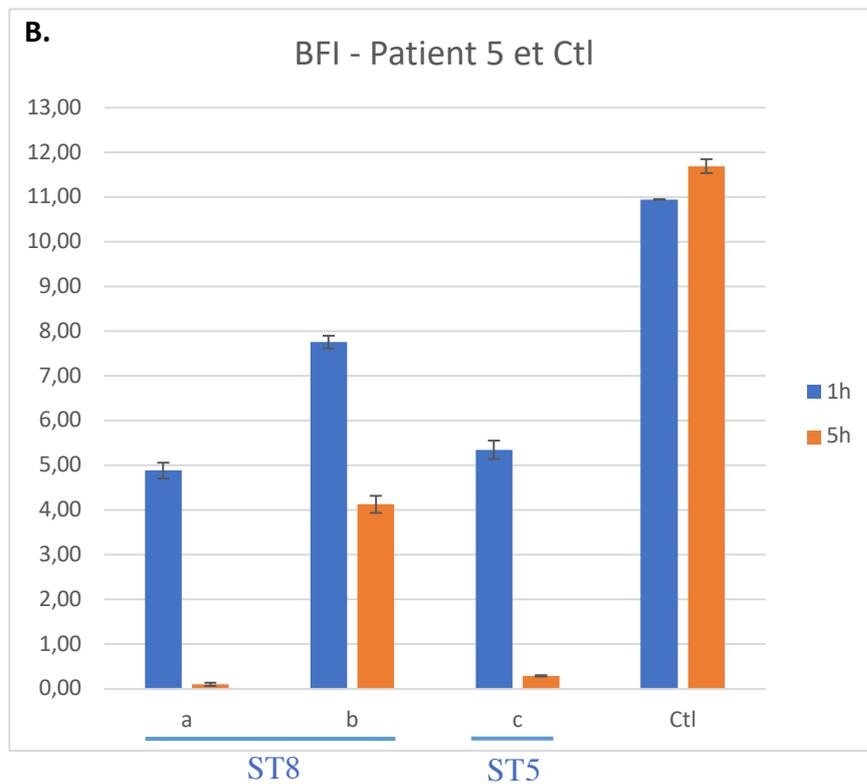
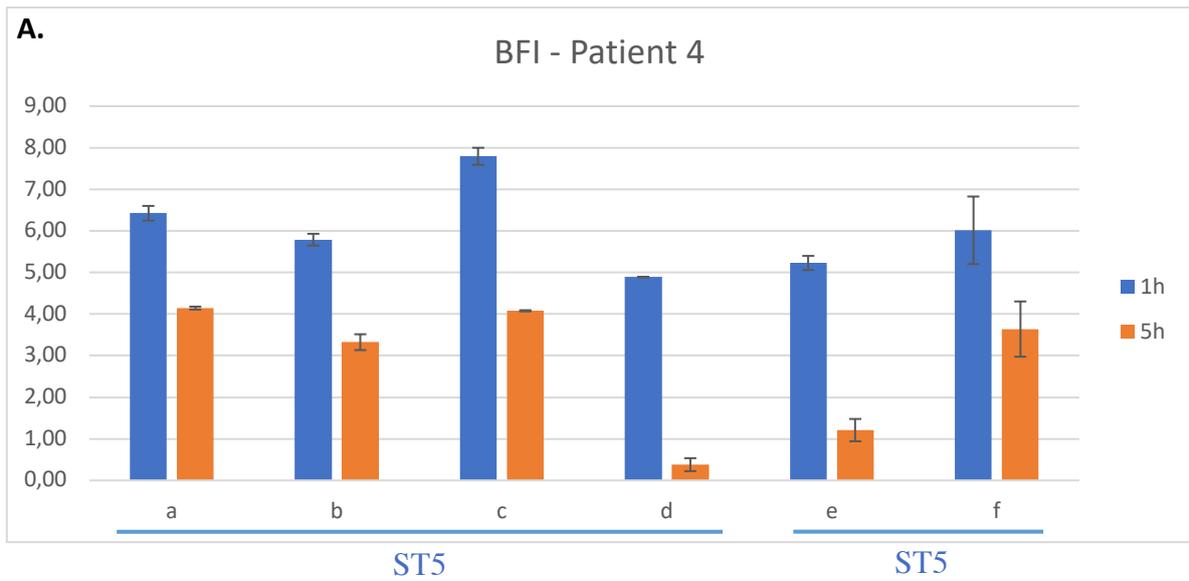


Figure 15 : Histogrammes représentant l'évolution du BFI de 9 souches de SARM de 2 patients atteints de mucoviscidose, après 1h et 5h d'incubation

Ces 9 souches ont été isolées de 2 échantillons respiratoires anciens et de 2 échantillons respiratoires récents, chez 2 patients d'une même fratrie. Les STs de ces souches sont indiqués dans la figure.

(A) Patient 4, 4 morphotypes de SARM d'un échantillon ancien (a, b, c, d) et 2 morphotypes d'un échantillon récent (e, f).

(B) Patient 5, 2 morphotypes d'un échantillon ancien (a, b) et 1 morphotype d'un échantillon récent (c). Ctl : contrôle négatif.

IV. Discussion

Cette étude épidémiologique a été réalisée afin de caractériser les clones majoritaires de *S. aureus* méticillino-résistants, isolés chez les patients atteints de mucoviscidose suivis au CRCM de Montpellier en 2016. Il s'agit ici d'analyser la prévalence des différents clones de SARM, mais également de mettre en évidence de possibles modifications de ST, que ce soit suite à un changement de souche ou suite à une mutation du clone déjà présent.

1) Prévalence du SARM

Dans notre étude, la prévalence du SARM pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose est de 12,7%. Cette prévalence est significativement plus élevée que la moyenne nationale de 2016 qui est de 6,9% ($p=0,0016$). Les données du Registre français de la mucoviscidose de 2015 ne montrent en revanche pas de différence significative entre la prévalence locale de SARM (9,8%) et la prévalence nationale (7,8%) ($p=0,2960$). (3,184,186)

Ni la stratégie thérapeutique, ni la fréquence des prélèvements respiratoires n'ont été modifiées au sein du CRCM de Montpellier durant cette période. Il n'a notamment pas été prescrit plus de céphalosporines de 3^{ème} génération ou de ciprofloxacine à cette période, molécules connues comme pouvant favoriser l'émergence de SARM. (112,113) De même, aucune modification technique notable n'a eu lieu à cette période au sein du laboratoire de bactériologie traitant ces échantillons.

Cette prévalence en augmentation au CRCM de Montpellier contraste avec les données épidémiologiques françaises et européennes, qui montrent une diminution de la prévalence du SARM dans l'ensemble des pays européens, contrairement aux États-Unis où cette bactérie continue de proliférer. (3,62,100,187)

En l'absence de données locales concernant les autres CRCM, nous ne pouvons déterminer si cette augmentation de la prévalence est spécifique à Montpellier, ou si elle est présente dans d'autres régions en France. Toutefois, cette augmentation de prévalence de SARM au CRCM de Montpellier étant d'apparition récente, une surveillance de cette bactérie multi-résistante semble primordiale afin de déterminer si cette tendance se confirme dans les années à venir.

2) Données cliniques

Notre étude ne permet pas d'établir avec certitude de lien entre la présence de SARM et le taux plus faible de VEMS observé dans la population colonisée par rapport à la valeur moyenne du VEMS de l'ensemble des patients du CRCM de Montpellier.

De nombreuses études démontrent pourtant une association entre colonisation par SARM et fonction pulmonaire objectivée par le VEMS, comme celle de *Ren et al.* au cours de laquelle les auteurs ont mesuré le VEMS de 1834 patients colonisés par *S. aureus* et ont montré des VEMS significativement plus faibles chez les patients colonisés par SARM (80,7% contre 89,4%). (101) Il en est de même dans l'étude de *Vanderhelst et al.* dans laquelle la diminution du VEMS à 2 ans post-colonisation était de 5% chez les patient colonisés par SARM contre 1,8% chez les patients colonisés par SASM, ainsi que dans l'étude de *Dasenbrook et al.* dans laquelle la diminution du VEMS après 1 an de colonisation était de 2,06% contre 1,44%, chez des patients âgés de 8 à 21 ans. (102,188)

Nous observons dans notre étude que l'ensemble des 27 patients sont insuffisants pancréatiques exocrines. Cette observation a déjà été faite dans une étude comparant 19 patients colonisés par SARM et 19 patients colonisés par SASM, dans laquelle 100% des patients porteurs de SARM étaient insuffisants pancréatiques exocrines contre 68% des patients colonisés à SASM, cette différence étant significative. (102)

Les patients de notre étude sont également significativement plus âgés que la moyenne de l'ensemble des patients suivis au CRCM de Montpellier. Ces données sont en accord avec les précédentes études sur le sujet montrant une prévalence de SARM maximale après 15 à 20 ans. (3,97)

Une étude de causalité entre la présence du SARM et un déclin du VEMS, les comorbidités (comme la présence d'insuffisance pancréatique exocrine ou de diabète insulino-dépendant), l'âge des patients, ou encore la colonisation par un ou plusieurs autres pathogènes et la présence d'une pression antibiotique importante pourrait permettre d'analyser l'impact clinique réel du portage du SARM pulmonaire chez cette population de malade.

3) Épidémiologie moléculaire

L'analyse des souches isolées d'échantillons respiratoire de patients suivis au CRCM de Montpellier met en évidence la présence de 8 génotypes.

Le ST le plus fréquemment identifié dans notre étude est le ST5, appartenant au CC5. Au vu des données épidémiologiques françaises, ces souches sont probablement des clones pédiatriques, ou éventuellement des clones Géraldine. Une analyse complémentaire des gènes *spa*, *sea*, ou encore la mise en évidence du gène de la TSST-1 (fréquemment mis en évidence dans le clone Géraldine) pourrait nous orienter vers l'un des 2 clones. (39,40,87) Une analyse par biopuce à ADN aurait également permis de préciser ces clones.

Le second ST le plus fréquemment isolé est le ST8, appartenant au CC8. Selon les mêmes considérations épidémiologiques, il est probable que ces souches appartiennent au clone Lyon (également appelé clone V). (39,40)

D'autres STs ont également été mis en évidence ponctuellement. C'est le cas du ST45, également appelé clone Berlin, habituellement isolé en Europe centrale et en Scandinavie. (88,189) Ce clone appartenant au CC45 a déjà été isolé chez les patients atteints de mucoviscidose dans plusieurs études, notamment une française et une espagnole dans lesquelles il a été mis en évidence à hauteur de, respectivement, 27% et 11% des souches étudiées (**Tableau15**). (49,137)

Le clone ST30 a également été mis en évidence. Il s'agit d'une souche de SARM communautaire, également appelé clone sud-ouest pacifique, qui s'est propagée en Amérique du sud et en Europe (Royaume-Uni et Allemagne principalement). (24,50) Dans l'étude espagnole de *Guzman et al.*, ce clone appartenant au CC30 représente 17% des souches isolées d'échantillons respiratoires de patients atteints de mucoviscidose. (137) Il est en revanche rarement isolé dans les autres études européennes (**Tableau 15**).

Une souche de ST398 a également été isolée chez un patient. Ce clone est principalement isolé en Allemagne et en Autriche, et est habituellement porté par les cochons. Des infections humaines superficielles et invasives ont toutefois été décrites, notamment chez les éleveurs de bétails. (190,191) En revanche, le patient porteur de cette souche n'a *a priori* pas de contact rapproché avec ces animaux. Il pourrait s'agir d'une souche de ST398 génétiquement adaptée à l'homme et indépendante du cochon, comme récemment décrit dans plusieurs études. (192,193) Deux cas d'infections à SARM ST398 ont déjà été décrits chez des patients atteints de mucoviscidose, mais ces derniers étaient en contact fréquents avec ces animaux. (194,195)

Trois nouveaux ST ont été découverts lors de notre étude, et ont été déposés dans la base de données PubMLST (<https://pubmlst.org>). (59) Tout d'abord le ST4780, dérivant probablement du ST398 au vu de l'unique mutation ponctuelle qui les différencie au niveau du gène domestique *arcC*. Le patient colonisé par cette souche n'a lui non plus aucun contact avec les cochons. Puis les ST4781 et ST4782, également génétiquement très proches d'un clone connu ; en effet, tout comme le ST5, ces souches appartiennent au CC5.

Il existe une importante diversité des souches de SARM, en Europe mais également au sein d'un même pays. L'étude de *Dauwalder et al.* notamment met en évidence cette diversité en analysant les clones de SARM responsables d'infections invasives dans la population générale en France. (40)

Au cours de la mucoviscidose, notre étude montre qu'une majorité des souches de SARM sont de CC5 comme dans de précédentes études réalisées à Paris, en Espagne, en Italie, ou en Irlande du Nord. Il existe toutefois des divergences quant aux autres CCs identifiés (**Tableau 15**).

L'étude réalisée à Paris montre que 27% (6/22) des souches appartiennent au CC45, contre seulement 2% (1/54) des souches isolées au CRCM de Montpellier. Il existe également une différence au niveau des souches de CC5, avec 59% d'isolats du CRCM de Montpellier appartenant à ce complexe clonal, contre 36% de souches isolées à Paris. (49)

Les souches analysées à Valence en Espagne sont plus fréquemment de CC30 (17%) par rapport aux autres pays étudiés, et moins fréquemment de CC5 (20%) et de CC8 (6%). (137)

En revanche, nos résultats sont sensiblement identiques à l'étude nationale italienne, et proches des données de l'étude réalisée à Belfast en Irlande du Nord. (48,136)

Tableau 15 : Comparaison des clones de SARM identifiés de patients atteints de mucoviscidose au CRCM de Montpellier et en Europe, par CC

Pays (région)	Nombre de patients	Nombre de souches	CC										Ref
			1	5	8	25	30	34	45	51	398	Autre	
France (Paris)	14	22	5%	36%	23%	0%	5%	0%	27%	0%	0%	0%	(49)
Espagne (Valence)	118	200	5%	20%	6%	5%	17%	7%	11%	6%	7%	16%*	(137)
Italie (9 centres)	98	98	0%	57%	40%	0%	2%	0%	1%	0%	0%	0%	(48)
Irlande du Nord (Belfast)	38	76	nr	43%	41%	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	(136)
Espagne (Madrid)	15	67	0%	73%	4%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	21%**	(138)
France (Montpellier)	27	54	0%	59%	31%	0%	4%	0%	2%	0%	4%	0%	(cette étude)

nr : non renseigné ; Ref : référence bibliographique

* : CC non précisé dans l'étude

** : ST235 n'appartenant à aucun CC

4) Diversité intra-échantillon

Concernant la diversité inter-spécifique, une co-infection pulmonaire par plusieurs microorganismes est fréquente chez ces patients. Dans notre étude, 23 des 27 patients étaient colonisés par au moins une bactérie ou un champignon en plus du SARM. La bactérie la plus fréquemment isolée est le *Pseudomonas aeruginosa* (55,6%), connue comme étant le principal microorganisme colonisant les patients adultes (prévalence de plus de 40% chez les adultes en France en 2016). (3,97)

Certains autres microorganismes sont également des espèces fréquemment isolées d'échantillons respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. Plusieurs patients de notre étude sont notamment colonisés par des champignons filamenteux de type *Aspergillus* sp.. (3,5)

Des bactéries plus rares sont également mises en évidence, telles que *S. maltophilia*, *M. abscessus*, ou encore *A. xylosoxidans*. Ces 2 dernières bactéries sont considérées comme des pathogènes émergents, la prévalence en France des mycobactéries atypiques chez les patients atteints de mucoviscidose étant passée de 1,2% en 2006 à 1,9% en 2016, et la prévalence d '*A. xylosoxidans* étant passée de 3,5% à 6,3% durant cette même période. (3,196,197)

L'une des particularités de notre étude est l'analyse de l'ensemble des morphotypes de SARM observés en culture afin de rechercher une éventuelle diversité intra-spécifique. En effet, devant la possible colonisation par plusieurs clones de SARM, cette analyse nous permet d'avoir une vision des données épidémiologiques plus complète. (133)

Seules les colonies d'aspect visuellement distincts en culture ont été analysées. Or, il a déjà été démontré chez d'autres bactéries comme *P. aeruginosa* ou *Achromobacter* sp. l'existence d'une diversité génétique entre colonies de morphotype identique. (197,198) Notre étude a donc possiblement sous-évalué la diversité intra-spécifique réelle au sein des échantillons respiratoires.

Dans notre étude, la présence de plusieurs morphotypes a été observée dans 59% (16/27) des échantillons respiratoires de 2016. Ces morphotypes s'avéraient être de même ST pour 81% de ces échantillons, mais nous avons mis en évidence une colonisation par plusieurs génotypes de SARM chez 3 patients de notre étude.

Il n'existe que peu d'études prenant en compte l'ensemble des morphotypes de SARM. Bien que certaines études montrent la présence ponctuelle de clones de CC différents, *Vu-Thien et al.* mettent en évidence la présence de populations bactériennes diversifiées à travers la présence de plusieurs variants chez certains de leurs patients, ces variations ne permettant toutefois pas de conclure à des STs différents. (49,133) Dans d'autres études, il a été observé à plusieurs reprises des mutations au cours de la colonisation par *S. aureus* entraînant des modifications de métabolisme, de résistance aux antibiotiques ou des changements de *spa*-type. (49,158–161) Ces mutations peuvent résulter de pressions de sélection, telles que la pression antibiotique (avec notamment l'apparition de SCV suite à l'utilisation de sulfaméthoxazole-triméthoprim), ou encore la co-infection avec d'autres microorganismes. (127,133,162)

Pour 2 patients de notre étude porteurs des nouveaux génotypes ST4781 et ST4782, une colonisation par une souche de ST5 a été mise en évidence dans le même échantillon respiratoire. Au vu de la proximité génétique entre ces clones, il est probable que ces nouveaux ST soient apparus au cours de la colonisation par la souche ST5 par un phénomène de diversification adaptative. Chez ces 2 patients la colonisation à SARM est ancienne, ce qui a pu permettre à la souche initialement présente de muter. Chez le patient porteur du clone ST4781, la date primo-infection à SARM n'est pas connue de façon précise, mais est antérieure à 2015. Pour le patient porteur du clone ST4782, le premier échantillon respiratoire avec détection de SARM date de décembre 2008.

L'un de ces 2 patients est également colonisé par *P. aeruginosa*, bactérie connue comme exerçant une forte pression de sélection sur *S. aureus*. (127,128) Le deuxième patient n'est en revanche colonisé par aucun autre microorganisme.

La présence de plusieurs variants d'une même espèce bactérienne a également été mise en évidence chez plusieurs autres bactéries comme *P. aeruginosa* ou *Achromobacter* sp.. (197,199)

Dans le cas du troisième patient, nous avons une colonisation par les clones ST5 et ST45, clones appartenant à deux complexes clonaux différents. La coexistence de deux souches de SARM génétiquement non reliées est rare et n'est généralement que temporaire, notamment en raison d'une probable compétition entre les différents SARM dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Cette compétition est observée dans l'étude de *Kahl et al.* portant sur 52 patients suivis pendant 6 ans, dans laquelle 6 patients ont présenté un changement de souche sans coexistence détectée, 8 patients ont présenté un changement de souche avec détection des 2 souches dans au moins un échantillon respiratoire, et 2 patients ont eu le remplacement de 2 génotypes par un troisième. (133)

5) Étude longitudinale

L'analyse longitudinale de souches isolées à plusieurs années d'intervalle de 4 patients a permis de mettre en évidence des changements de clones de SARM au cours du temps. Seuls 2 patients sur les 4 ont conservé une souche de ST identique après plus de 4 ans de colonisation (ST5 pour le patient 4 et ST8 pour le patient 23), alors que des modifications de colonisation ont eu lieu pour les 2 autres patients (changement de clone au cours du temps ou cohabitation du clone initial avec un autre clone).

Bien que réalisée sur un faible échantillon de patients, notre étude longitudinale est en accord avec les publications sur le sujet. En effet, *Gilpin et al.* mettent en évidence par MLVA une persistance du même génotype de SARM après 2 ans chez 76% des 38 patients étudiés. (136) Des résultats semblables ont été mis en évidence par l'étude de *Molina et al.* portant sur 18 patients suivis pendant 2 à 5 ans. (138) Dans une autre étude ayant suivi 71 patients durant plus de 5 ans, 41% des patients ont conservé une souche de même ST (typage par MLST et *spa* typing), avec une persistance moyenne de *S. aureus* estimée à 8,25 ans. (158)

Ces données sont à mettre en parallèle avec celles observée pour d'autres pathogènes, comme *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans* ou *S. maltophilia*.

Dans leur étude utilisant la technique des biopuces à ADN portant sur 45 patients, *Hall et al.* observent la présence de 68% de souches de *P. aeruginosa* identiques à 2 ans, ce qui est relativement proche des données mises en évidence pour *S. aureus*. (200) Utilisant la même technique, *Cramer et al.* mettent en évidence près de trois quarts de clones de *P. aeruginosa* identiques chez 35 patients après 10 ans de colonisation à Hanovre (Allemagne), et un taux proche de 50% après 20 ans. Cette même étude observe en revanche un remplacement de souches chez 11 patients sur 12 à Copenhague (Danemark) après 20 ans, remplacements qu'ils expliquent, après analyse détaillée des traitements, comme étant dus à un recours plus fréquent à des antibiothérapies anti-*P. aeruginosa* par voie intraveineuse dans ce centre. (201)

Concernant *S. maltophilia* et *A. xylosoxidans*, *Krzewinski et al.* ont observé durant une période de 2 ans les souches de, respectivement, 12 et 15 patients colonisés par ces bactéries. Les résultats obtenus par amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD-PCR) montrent que 5 patients sur 12 étaient colonisés par une même souche de *S. maltophilia* durant la période de l'étude, contre 13 patients sur 15 pour *A. xylosoxidans*. (202)

Il existe donc des fréquences de changement de souche variables selon les bactéries, mais aussi également selon les stratégies thérapeutiques antibiotiques utilisées.

Une autre particularité de notre étude est l'analyse de la colonisation pulmonaire par SARM chez deux sœurs atteintes de mucoviscidose (patientes 4 et 5). Bien que le clone isolé en 2016 soit identique chez ces 2 patientes (clone ST5), nous observons dans notre analyse longitudinale la présence d'une souche de ST8 présente chez l'une de ces 2 patientes en février 2010, alors que sa sœur était porteuse d'une souche ST5 en novembre 2012.

Il est possible que la patiente colonisée depuis plusieurs années par le clone ST5 ait transmis cette souche à sa sœur, comme cela peut être le cas au sein des fratries. En effet, l'étude de *Ankrum et al.* portant sur 13 fratries colonisées à SARM suivies durant 22 mois met en évidence par WGS la présence d'un clone identique dans 78% des cas. (156)

Par la suite, nous avons analysé un paramètre phénotypique, la cinétique de production de biofilm. Tous les isolats ont montré une cinétique tendant vers la production de biofilm entre 1h et 5h. Des variations ont toutefois été mises en évidence avec la présence de souches plus productrices que d'autres, sans qu'un lien d'ancienneté de colonisation ne soit établi, les souches plus récentes n'étant pas plus productrices de biofilm que les souches anciennes. Cette analyse nécessite néanmoins la réalisation d'autres tests, afin de préciser et de confirmer ces résultats.

La présence de souches productrices de biofilm dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose n'est pas surprenante. En plus des mutations du gène *ica* pouvant entraîner une production accrue de biofilm, l'anaérobiose locale favorise également cette production. (165–168) L'étude de *Cakir Aktas et al.* montre également une production significativement plus importante de biofilm par les *S. aureus* isolés d'échantillons respiratoires chez ces malades par rapport aux patients sains. (172)

Une analyse à des temps d'incubation plus rapprochés permettrait une caractérisation plus précise de la cinétique de formation de biofilm par ces souches. De même, l'étude d'autres paramètres phénotypiques tels que l'hémolyse, la production de toxines ou la résistance aux antibiotiques comme réalisé par *Hirschhausen et al.* permettrait également d'analyser ces souches de façon plus complète. (158)

CONCLUSION

Devant l'importante prévalence du SARM chez les patients atteints de mucoviscidose, notre étude avait pour principaux objectifs de décrire les clones présents dans les échantillons respiratoires des patients suivis au CRCM de Montpellier en 2016, ainsi que d'étudier l'évolution du portage de ces bactéries chez des patients colonisés au long cours.

Bien que le portage pulmonaire de SARM soit de 6,9% au niveau national chez cette population de malades en 2016, cette bactérie multi-résistante est mise en évidence chez 12,7% des patients suivis au CRCM de Montpellier. Les ST5 et ST8 représentent plus des trois-quarts des souches isolées, ce qui est globalement en accord avec les données françaises concernant les clones de SARM isolés d'infections invasives. D'autres génotypes rarement isolés en France sont également identifiés de façon ponctuelle, comme les ST30, ST45, ou encore le ST398 initialement isolé chez le cochon mais s'adaptant à l'homme depuis peu. De nouveaux types de séquences ont aussi été mis en évidence, provenant probablement de mutations ponctuelles de génotypes déjà existants au vu de l'unique mutation les différenciant d'autres génotypes comme les ST5 ou ST398.

L'analyse de plusieurs morphotypes coloniaux de SARM au sein d'un échantillon nous a permis de mettre en évidence un portage clonal unique dans la majorité des cas, et l'étude longitudinale réalisée pour 4 patients colonisés au long cours par du SARM montre la persistance d'une souche de même ST dans 3 cas sur 4 après 4 à 5 ans. Ces données sont en faveur de la persistance d'une même souche de SARM durant plusieurs années chez les patients atteints de mucoviscidose, conformément à ce qui a déjà été décrit dans la littérature.

Enfin, l'étude de la colonisation par SARM d'une fratrie nous montre que les 2 sœurs sont porteuses en 2016 d'une souche de même ST, alors que l'une des 2 sœurs était porteuse d'une souche de génotype différent plusieurs années auparavant. Bien qu'en l'absence d'analyse complémentaire pouvant discriminer avec précision les souches de SARM, nous ne puissions conclure formellement à une transmission intrafamiliale, nos résultats semblent en accord avec les études publiées sur le sujet.

L'étude des souches de SARM apporte des données épidémiologiques intéressantes et nouvelles concernant cette catégorie de patients.

En dehors du suivi de la prévalence du SARM au CRCM de Montpellier, il serait intéressant d'analyser le lien entre cette bactérie et les données cliniques telles que le VEMS ou les comorbidités.

Une analyse longitudinale plus étendue pourrait permettre une meilleure compréhension des changements de souches colonisant les voies respiratoires de ces patients. Cette analyse aurait également toute son importance dans le cas de fratries, chez lesquelles les changements de souches paraissent complexes et demeurent peu étudiés à l'heure actuelle.

De même, des analyses phénotypiques complémentaires auraient pour avantage de permettre l'observation de la capacité adaptative des souches de SARM chez cette population de patients, que ce soit par des modifications de métabolisme ou de sensibilité aux antibiotiques par exemple.

Des analyses génotypiques plus complètes permettraient, quant à elles, une caractérisation plus précise et discriminante de ces bactéries, et la mise en évidence de possibles transmissions croisées. Notre étude analysant uniquement le ST de chaque souche, nous ne pouvons conclure à ce type de transmissions au sein du CRCM de Montpellier.

BIBLIOGRAPHIE

1. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 23 janv 2015;347(6220):1260419-1260419.
2. Tissue expression of CFTR - The human protein atlas available from www.proteinatlas.org [Internet]. [cité 26 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000001626-CFTR/tissue>
3. Bellis G, Dehillotte C, Lemonnier L. Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2016 - Disponible sur <http://www.vaincrelamuco.org/la-une/mediatheque/valorisation-des-donnees>. Vaincre Mucoviscid Inst Natl Études Démographiques. 21 déc 2017;
4. Kurbatova P, Bessonov N, Volpert V, Tiddens HAWM, Cornu C, Nony P, et al. Model of mucociliary clearance in cystic fibrosis lungs. *J Theor Biol*. mai 2015;372:81-8.
5. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 30 mai 2009;373:1891-904.
6. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 1 janv 2011;24(1):29-70.
7. John G, Chillappagari S, Rubin BK, Gruenert DC, Henke MO. Reduced surface toll-like receptor-4 expression and absent interferon- γ -inducible protein-10 induction in cystic fibrosis airway cells. *Exp Lung Res*. 20 juill 2011;37(6):319-26.
8. Kerem B, Kerem E. The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet EJHG*. 1996;4(2):65-73.
9. Centre de référence mucoviscidose de Lyon. Protocole national de diagnostic et de soins - Mucoviscidose - Disponible sur https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-09/pnds_2017_vf1.pdf. juill 2017;
10. Bronsveld I, Mekus F, Bijman J, Ballmann M, de Jonge HR, Laabs U, et al. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of $\Delta F508$ homozygous twins and siblings. *J Clin Invest*. 1 déc 2001;108(11):1705-15.
11. Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: The role of modifier genes. *Am J Med Genet*. 22 juill 2002;111(1):88-95.
12. Sly PD, Brennan S, Gangell C, de Klerk N, Murray C, Mott L, et al. Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juill 2009;180(2):146-52.
13. Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. mars 2003;2(1):29-34.
14. Société Française de Pédiatrie. Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose - Disponible sur https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_272206/fr/prise-en-charge-du-patient-atteint-de-mucoviscidose-pneumologie-et-infectiologie. Paris; 2002 nov.
15. Dasenbrook EC, Merlo CA, Lechtzin N, Diener-West M, Boyle MP. The effect of persistent MRSA infection on outcomes in CF: an eleven year longitudinal analysis of the CFF patient registry data. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42.
16. Thomas SR, Gyi KM, Gaya H, Hodson ME. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact at a national cystic fibrosis centre. *J Hosp Infect*. nov 1998;40(3):203-9.
17. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis - 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax*. 24 janv 2007;62(4):360-7.
18. Adams C, Morris-Quinn M, McConnell F, West J, Lucey B, Shortt C, et al. Epidemiology and clinical impact of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis using AP-PCR fingerprinting. *J Infect*. sept 1998;37(2):151-8.

19. Davies JC. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. :7.
20. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):505–520.
21. Ruimy R, Armand-Lefevre L, Barbier F, Ruppe E, Coccojaru R, Mesli Y, et al. Comparisons between geographically diverse samples of carried *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 15 sept 2009;191(18):5577-83.
22. Goerke C, Kraning K, Stern M, Döring G, Botzenhart K, Wolz C. Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without cystic fibrosis Patients. *J Infect Dis.* 2000;181(3):984–989.
23. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med.* 1998;13.
24. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* août 2003;9(8):978-84.
25. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* juin 2008;46(S5):S344-9.
26. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 1 avr 2002;15(2):194-222.
27. Dasenbrook EC. Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. *JAMA.* 16 juin 2010;303(23):2386.
28. Guillemot D. *Sem. Resp Crit Care Med.* Available from: www.infectiologie.com.
29. Endimiani A, Blackford M, Dasenbrook EC, Reed MD, Bajaksouszian S, Hujer AM, et al. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2011;55(4):1684-92.
30. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet.* juill 2001;358(9277):207-8.
31. Bourgeois-Nicolaos N, Rouard C, Desroches M, Doucet-Populaire F. Résistance au linézolide chez les staphylocoques. *J Anti-Infect.* oct 2012;14(3):108-15.
32. Jevons P. « Celbenin »-resistant Staphylococci. *-Days Drugs.* janv 1961;
33. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 déc 2009;53(12):4961-7.
34. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* janv 2014;22(1):42-7.
35. Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 1 janv 2014;69(1):45-50.
36. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* août 2011;11(8):595-603.
37. Skov R, Larsen AR, Kearns A, Holmes M, Teale C, Edwards G, et al. Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. *J Antimicrob Chemother.* 1 janv 2014;69(1):133-5.
38. Chan LC, Basuino L, Diep B, Hamilton S, Chatterjee SS, Chambers HF. Ceftobiprole- and ceftaroline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2015;59(5):2960-3.

39. Tristan A, Durand G, Durupt F, Ferry T, Bes M, Reverdy M-E, et al. SARM : Données épidémiologiques récentes et évolution de la résistance. Rev Francoph Lab. nov 2005;(376).
40. Dauwalder O, Lina G, Durand G, Bes M, Meugnier H, Jarlier V, et al. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. J Clin Microbiol. 1 oct 2008;46(10):3454-8.
41. Ferry T, Bes M, Dauwalder O, Meugnier H, Lina G, Forey F, et al. Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones. J Clin Microbiol. 1 juill 2006;44(7):2642-4.
42. Cartolano GL, Cheron M, Benabid D, Leneveu M, Boisivon A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to glycopeptides (GISA) in 63 French general hospitals. Clin Microbiol Infect. mai 2004;10(5):448-51.
43. Hiramatsu K. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med. mai 1998;104(5):7S-10S.
44. Rong SL, Leonard SN. Heterogeneous vancomycin resistance in *Staphylococcus Aureus*: a review of epidemiology, diagnosis, and clinical significance. Ann Pharmacother. mai 2010;44(5):844-50.
45. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 1 juill 2014;124(7):2836-40.
46. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis. oct 2001;1(3):147-55.
47. Köser CU, Holden MTG, Ellington MJ, Cartwright EJP, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. N Engl J Med. 14 juin 2012;366(24):2267-75.
48. Cocchi P, Cariani L, Favari F, Lambiase A, Fiscarelli E, Gioffré FV, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italian cystic fibrosis patients: A national overview. J Cyst Fibros. déc 2011;10(6):407-11.
49. Vu-Thien H, Hormigos K, Corbineau G, Fauroux B, Corvol H, Moissenet D, et al. Longitudinal survey of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients using a multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis method. BMC Microbiol. 2010;10(1):24.
50. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet. mai 2010;375(9725):1557-68.
51. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. Braz J Infect Dis [Internet]. févr 2003 [cité 17 juill 2018];7(1).
52. Belkum AV, Leeuwen WV, Kaufmann ME, Cookson B, Forey FO, Etienne J, et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI Macrorestriction Fragments: a Multicenter Study. J CLIN MICROBIOL. 1998;36:7.
53. Peacock SJ, de Silva GDI, Justice A, Cowland A, Moore CE, Winearls CG, et al. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological Setting. J Clin Microbiol. 1 oct 2002;40(10):3764-70.
54. Miao J, Chen L, Wang J, Wang W, Chen D, Li L, et al. Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microb Pathog. juin 2017;107:17-28.
55. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. mars 1995;33(3):551-5.

56. Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonca R, De Ryck R, Struelens MJ. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol.* 1 janv 2007;45(1):127-33.
57. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol.* 1 avr 2003;41(4):1574-85.
58. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1008.
59. Base de données MLST - *Staphylococcus aureus* [Internet]. [cité 2 juin 2018]. Disponible sur: <https://pubmlst.org/saureus/>
60. Gomes AR, Vinga S, Zavolan M, de Lencastre H. Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 2005;49(1):366-79.
61. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 1 mars 2004;186(5):1518-30.
62. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents.* avr 2012;39(4):273-82.
63. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* nov 1999;37(11):3556-63.
64. GmbH R. Ridom - *spa* server [Internet]. 2003 [cité 17 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.spaserver.ridom.de>
65. Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing, *Sma*I macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 1 juill 2006;44(7):2533-40.
66. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, Keckevoet U, Friedrich AW, Harmsen D, et al. Characterization of clonal relatedness among the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using *spa* sequence typing and the BURP (Based upon Repeat Patterns) algorithm. *J Clin Microbiol.* 1 août 2008;46(8):2805-8.
67. Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *INFECT IMMUN.* 1977;15:5.
68. Hong X, Qin J, Li T, Dai Y, Wang Y, Liu Q, et al. Staphylococcal protein A promotes colonization and immune evasion of the epidemic healthcare-associated MRSA ST239. *Front Microbiol* [Internet]. 27 juin 2016 [cité 17 juill 2018];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00951/abstract>
69. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol.* 1 févr 2004;42(2):792-9.
70. Sabat A, Krzysztan-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 1 avr 2003;41(4):1801-4.

71. Roussel S, Felix B, Vingadassalon N, Grout J, Hennekinne J-A, Guillier L, et al. *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France: comparison of different molecular typing methods, including MLVA. *Front Microbiol* [Internet]. 11 sept 2015 [cité 17 juill 2018];6.
72. Bosch T, Pluister GN, van Luit M, Landman F, van Santen-Verheuvél M, Schot C, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis is superior to *spa* typing and sufficient to characterize MRSA for surveillance purposes. *Future Microbiol*. juill 2015;10(7):1155-62.
73. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol*. juill 2008;53(2):237-51.
74. Monecke S, Jatzwauk L, Weber S, Slickers P, Ehricht R. DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Eastern Saxony. *Clin Microbiol Infect*. juin 2008;14(6):534-45.
75. Technologies A. Alere Technologies GmbH: *S. aureus* [Internet]. [cité 18 juill 2018]. Disponible sur: <https://alere-technologies.com/products/lab-solutions/grampositive-bacteria/s-aureus.html>
76. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*. 6 avr 2011;6(4):e17936.
77. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. avr 2001;357(9264):1225-40.
78. Gharizadeh B, Ghaderi M, Nyrén P. Pyrosequencing technology for short DNA sequencing and whole genome sequencing. *Seibutsu Butsuri*. 2007;47(2):129-32.
79. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. sept 2005;437(7057):376-80.
80. Strauß L, Ruffing U, Abdulla S, Alabi A, Akulenko R, Garrine M, et al. Detecting *Staphylococcus aureus* virulence and resistance genes: a comparison of whole-genome sequencing and DNA microarray technology. *Richter SS, éditeur. J Clin Microbiol*. avr 2016;54(4):1008-16.
81. SenGupta DJ, Cummings LA, Hoogstraat DR, Butler-Wu SM, Shendure J, Cookson BT, et al. Whole-genome sequencing for high-resolution investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and genome plasticity. *J Clin Microbiol*. 1 août 2014;52(8):2787-96.
82. Bartels MD, Petersen A, Worning P, Nielsen JB, Larner-Svensson H, Johansen HK, et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for *spa* typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1 déc 2014;52(12):4305-8.
83. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2000;44(6):1549-55.
84. Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*. déc 2016;101:56-67.
85. Oliveira DC, Lencastre H d. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 juill 2002;46(7):2155-61.

86. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci*. 28 mai 2002;99(11):7687-92.
87. Durand G, Bes M, Meugnier H, Enright MC, Forey F, Liassine N, 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*. 1 mars 2006;44(3):847-53.
88. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. mars 2007;13(3):222-35.
89. Reverdy ME, Meugnier H, Bes M, Terry F, Forey F, Lina G, et al. Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003. *Epidémiologie des SARM en France* [Internet]. 2005. Disponible sur: http://opac.invs.sante.fr/index.php?lvl=notice_display&id=1822
90. Heym B. Multilocus sequence typing (MLST) shows that the « Iberian » clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has spread to France and acquired reduced susceptibility to teicoplanin. *J Antimicrob Chemother*. 1 sept 2002;50(3):323-9.
91. Sá-Leão R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM, de Lencastre H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol*. juin 1999;37(6):1913-20.
92. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* Type VI. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 oct 2006;50(10):3457-9.
93. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol*. déc 2012;10(12):841-51.
94. Ulrich M, Worlitzsch D, Viglio S, Siegmann N, Iadarola P, Shute JK, et al. Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. mai 2010;9(3):217-27.
95. Goss CH, Muhlebach MS. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. sept 2011;10(5):298-306.
96. Glikman D, Siegel JD, David MZ, Okoro NM, Boyle-Vavra S, Dowell ML, et al. Complex molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children with cystic fibrosis in the era of epidemic community-associated methicillin-resistant *S aureus*. *Chest*. 2008;133(6):1381–1387.
97. 2016 Patient Registry Annual Data Report. 2016;94. available from www.cff.org [Internet]. [cité 26 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/>
98. Ramsay KA, Sandhu H, Geake JB, Ballard E, O'Rourke P, Wainwright CE, et al. The changing prevalence of pulmonary infection in adults with cystic fibrosis: A longitudinal analysis. *J Cyst Fibros*. janv 2017;16(1):70-7.
99. Garske L., Kidd T., Gan R, Bunting J., Franks C., Coulter C, et al. Rifampicin and sodium fusidate reduces the frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation in adults with cystic fibrosis and chronic MRSA infection. *J Hosp Infect*. mars 2004;56(3):208-14.
100. Carbonne A, Arnaud I, Maugat S, Marty N, Dumartin C, Bertrand X, et al. National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9 year experience. *J Antimicrob Chemother*. 1 avr 2013;68(4):954-9.

101. Ren CL, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, et al. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatr Pulmonol.* juin 2007;42(6):513-8.
102. Vanderhelst E, De Meirleir L, Verbanck S, Piérard D, Vincken W, Malfroot A. Prevalence and impact on FEV1 decline of chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* janv 2012;11(1):2-7.
103. McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM, Shearer JES, et al. Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 sept 2010;54(9):3804-11.
104. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis.* 15 sept 2007;45(Supplement_3):S171-6.
105. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance and virulence. *Biosci Trends* [Internet]. 2013 [cité 31 mai 2018]; Disponible sur: <http://www.biosciencetrends.com/getabstract.php?id=677>
106. Abman S, Ogle J, Harbeck R, Butlersimon N, Hammond K, Accurso F. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. *J Pediatr.* août 1991;119(2):211-7.
107. Bonestroo HJC, de Winter-de Groot KM, van der Ent CK, Arets HGM. Upper and lower airway cultures in children with cystic fibrosis: Do not neglect the upper airways. *J Cyst Fibros.* mars 2010;9(2):130-4.
108. Mainz JG, Naehrlich L, Schien M, Kading M, Schiller I, Mayr S, et al. Concordant genotype of upper and lower airways *P. aeruginosa* and *S. aureus* isolates in cystic fibrosis. *Thorax.* 1 juin 2009;64(6):535-40.
109. McBryde ES, Bradley LC, Whitby M, McElwain DLS. An investigation of contact transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* oct 2004;58(2):104-8.
110. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Author(s): Melissa D. Sanford, Andreas F. Widmer, Martha J. Bale, Ronald N. Jones and Richard P. Wenzel. *Clin Infect Dis.* 1994;19(6):1123-8.
111. Johnson PDR, Martin R, Burrell LJ, Grabsch EA, Kirsa SW, O'Keeffe J, et al. Efficacy of an alcohol/chlorhexidine hand hygiene program in a hospital with high rates of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *Med J Aust.* 21 nov 2005;183(10):509-14.
112. Nadesalingam K, Conway SP, Denton M. Risk factors for acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* mars 2005;4(1):49-52.
113. Dancer SJ. The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 19 déc 2007;61(2):246-53.
114. Katz SL, Strug LJ, Coates AL, Corey M. Disease severity in siblings with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* mai 2004;37(5):407-12.
115. Picard E, Aviram M, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, et al. Familial concordance of phenotype and microbial variation among siblings with CF. *Pediatr Pulmonol.* oct 2004;38(4):292-7.
116. Harik NS, Com G, Tang X, Melguizo Castro M, Stemper ME, Carroll JL. Clinical characteristics and epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in children with cystic fibrosis from a center with a high MRSA prevalence. *Am J Infect Control.* avr 2016;44(4):409-15.

117. Muhlebach MS, Heltshe SL, Popowitch EB, Miller MB, Thompson V, Kloster M, et al. Multicenter observational study on factors and outcomes associated with various methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* types in children with cystic fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. juin 2015;12(6):864-71.
118. Jennings MT, Dasenbrook EC, Lechtzin N, Boyle MP, Merlo CA. Risk factors for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* [Internet]. avr 2017 [cité 1 août 2018]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569199317301066>
119. Zhang Y, Li X, Grassme H, Doring G, Gulbins E. Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by CFTR-Deficient macrophages on infection. *J Immunol*. 1 mai 2010;184(9):5104-11.
120. Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol*. sept 2006;8(9):933-44.
121. Murphy BS, Bush HM, Sundareshan V, Davis C, Hagadone J, Cory TJ, et al. Characterization of macrophage activation states in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. sept 2010;9(5):314-22.
122. Porto PD, Cifani N, Guarnieri S, Di Domenico EG, Mariggiò MA, Spadaro F, et al. Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. Nigou J, éditeur. *PLoS ONE*. 18 mai 2011;6(5):e19970.
123. Li C, Wu Y, Riehle A, Ma J, Kamler M, Gulbins E, et al. *Staphylococcus aureus* survives in cystic fibrosis macrophages, forming a reservoir for chronic pneumonia. Pirofski L, éditeur. *Infect Immun*. mai 2017;85(5):e00883-16.
124. Limoli DH, Yang J, Khansaheb MK, Helfman B, Peng L, Stecenko AA, et al. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection is associated with cystic fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. juin 2016;35(6):947-53.
125. McGuigan L, Callaghan M. The evolving dynamics of the microbial community in the cystic fibrosis lung: CF microbiome. *Environ Microbiol*. janv 2015;17(1):16-28.
126. Maliniak ML, Stecenko AA, McCarty NA. A longitudinal analysis of chronic MRSA and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection in cystic fibrosis: A single-center study. *J Cyst Fibros*. mai 2016;15(3):350-6.
127. Goerke C, Wolz C. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol*. déc 2010;300(8):520-5.
128. Hoffman LR, Déziel E, D'Argenio DA, Lépine F, Emerson J, McNamara S, et al. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(52):19890–19895.
129. Vessillier S, Delolme F, Bernillon J, Saulnier J, Wallach J. Hydrolysis of glycine-containing elastin pentapeptides by LasA, a metalloelastase from *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrolysis of elastin pentapeptides by *Pseudomonas* LasA. *Eur J Biochem*. févr 2001;268(4):1049-57.
130. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*. déc 2004;10(12):599-606.
131. Wilson R, Sykes DA, Watson D, Rutman A. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infection and Immunity* Sep 1988, 56 (9) 2515-2517.
132. Park J-H, Lee J-H, Cho MH, Herzberg M, Lee J. Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. *FEMS Microbiol Lett*. oct 2012;335(1):31-8.

133. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, et al. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 1 sept 2003;41(9):4424-7.
134. Goodrich JS, Sutton-Shields TN, Kerr A, Wedd JP, Miller MB, Gilligan PH. Prevalence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1 avr 2009;47(4):1231-3.
135. Dolce D, Ravenni N, Campana S, Camera E, Neri S, Braggion C, et al. Longitudinal study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genetic background isolated from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* juin 2017;16 Suppl. 1:S90-1.
136. Gilpin DF, Torres-Bustos J, Carson G, Payne J, Hoffman L, O'Leary C, et al. Characterisation of MRSA from initial versus chronic infection in CF patients. *J Cyst Fibros.* juin 2017;16 Suppl. 1:S92.
137. Guzman K, Cervera-Alamar M, Garcia-Ortega A, Ziemyte M, Marti M, Canton R, et al. Role of mobile genetic elements in the virulence of *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* juin 2017;16 Suppl. 1.
138. Molina A, Del Campo R, Maiz L, Morosini M-I, Lamas A, Baquero F, et al. High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST228-SCCmecI capable of biofilm formation. *J Antimicrob Chemother.* 18 juill 2008;62(5):961-7.
139. Masoud-Landgraf L, Johler S, Badura A, Feierl G, Luxner J, Wagner-Eibel U, et al. Genetic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patients in Austria. *Respiration.* 2015;89(5):390-5.
140. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins.* 25 mai 2010;2(5):1148-65.
141. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins.* 18 août 2010;2(8):2177-97.
142. Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infect Genet Evol.* janv 2014;21:583-92.
143. Liu Y, Zhang J, Zhong D, Ji L, Yang J, Phillips J, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients with cystic fibrosis. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. oct 2016 [cité 1 août 2018];32(10). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-016-2122-4>
144. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol.* févr 2014;17:32-7.
145. Ormerod KL, George NM, Fraser JA, Wainwright C, Hugenholtz P. Comparative genomics of non-pseudomonal bacterial species colonising paediatric cystic fibrosis patients. *PeerJ.* 15 sept 2015;3:e1223.
146. Abdelnour A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun.* 1993;61:7.
147. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology.* 1 août 2008;154(8):2265-74.
148. Fusco NM, Toussaint KA, Prescott Jr WA. Antibiotic management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-associated acute pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Ann Pharmacother.* 2015;49(4):458–468.
149. Zobell JT, Epps KL, Young DC, Montague M, Olson J, Ampofo K, et al. Utilization of antibiotics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis: Survey of Anti-MRSA Antibiotics in CF. *Pediatr Pulmonol.* juin 2015;50(6):552-9.
150. Vanderhelst E, De Wachter E, Willekens J, Piérard D, Vincken W, Malfroot A. Eradication of chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis patients. An observational prospective cohort study of 11 patients. *J Cyst Fibros.* déc 2013;12(6):662-6.

151. Bittencourt PH, Pimentel CSS, Bonfim BS, Marostica PJ, Souza EL. Incidence and treatment of methicillin-resistant *S. aureus* infection in cystic fibrosis patients: a cohort study. *Braz J Infect Dis.* janv 2017;21(1):107-11.
152. Doe SJ, McSorley A, Isalska B, Kearns AM, Bright-Thomas R, Brennan AL, et al. Patient segregation and aggressive antibiotic eradication therapy can control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at large cystic fibrosis centres. *J Cyst Fibros.* mars 2010;9(2):104-9.
153. Araújo AAS, de Melo MGD, Rabelo TK, Nunes PS, Santos SL, Serafini MR, et al. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Nat Prod Res.* 2 déc 2015;29(23):2167-80.
154. Pompilio A, Riviello A, Crocetta V, Di Giuseppe F, Pomponio S, Sulpizio M, et al. Evaluation of antibacterial and antibiofilm mechanisms by usnic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* oct 2016;11(10):1315-38.
155. Duan F, Feng X, Jin Y, Liu D, Yang X, Zhou G, et al. Metal-carbenicillin framework-based nanoantibiotics with enhanced penetration and highly efficient inhibition of MRSA. *Biomaterials.* nov 2017;144:155-65.
156. Ankrum A, Hall BG. Population dynamics of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients to determine transmission events by use of Wwhole-genome sequencing. *Forbes BA, éditeur. J Clin Microbiol.* juill 2017;55(7):2143-52.
157. Renders NH., Sijmons MA., Van Belkum A, Oberbeek SE, Mouton JW, Verbrugh HA. Exchange of *Pseudomonas aeruginosa* strains among cystic fibrosis siblings. *Res Microbiol.* juin 1997;148:447-54.
158. Hirschhausen N, Block D, Bianconi I, Bragonzi A, Birtel J, Lee JC, et al. Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *Int J Med Microbiol.* déc 2013;303(8):685-92.
159. López-Collazo E, Jurado T, de Dios Caballero J, Pérez-Vázquez M, Vindel A, Hernández-Jiménez E, et al. In vivo attenuation and genetic evolution of a ST247-SCCmecI MRSA clone after 13 years of pathogenic bronchopulmonary colonization in a patient with cystic fibrosis: implications of the innate immune response. *Mucosal Immunol.* mars 2015;8(2):362-71.
160. Besier S, Zander J, Kahl BC, Kraiczy P, Brade V, Wichelhaus TA. The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 juin 2008;52(6):2183-9.
161. Prunier A-L, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel J-F, Leclercq R. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis.* 2003;187(11):1709–1716.
162. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol.* 1 janv 2007;45(1):168-72.
163. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* avr 2006;4(4):295-305.
164. Fluckiger U, Ulrich M, Steinhuber A, Doring G, Mack D, Landmann R, et al. Biofilm formation, *ica*A_{DBC} transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect Immun.* 1 mars 2005;73(3):1811-9.
165. Schwartbeck B, Birtel J, Treffon J, Langhanki L, Mellmann A, Kale D, et al. Dynamic in vivo mutations within the *ica* operon during persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients. Prince A, éditeur. *PLOS Pathog.* 30 nov 2016;12(11):e1006024.

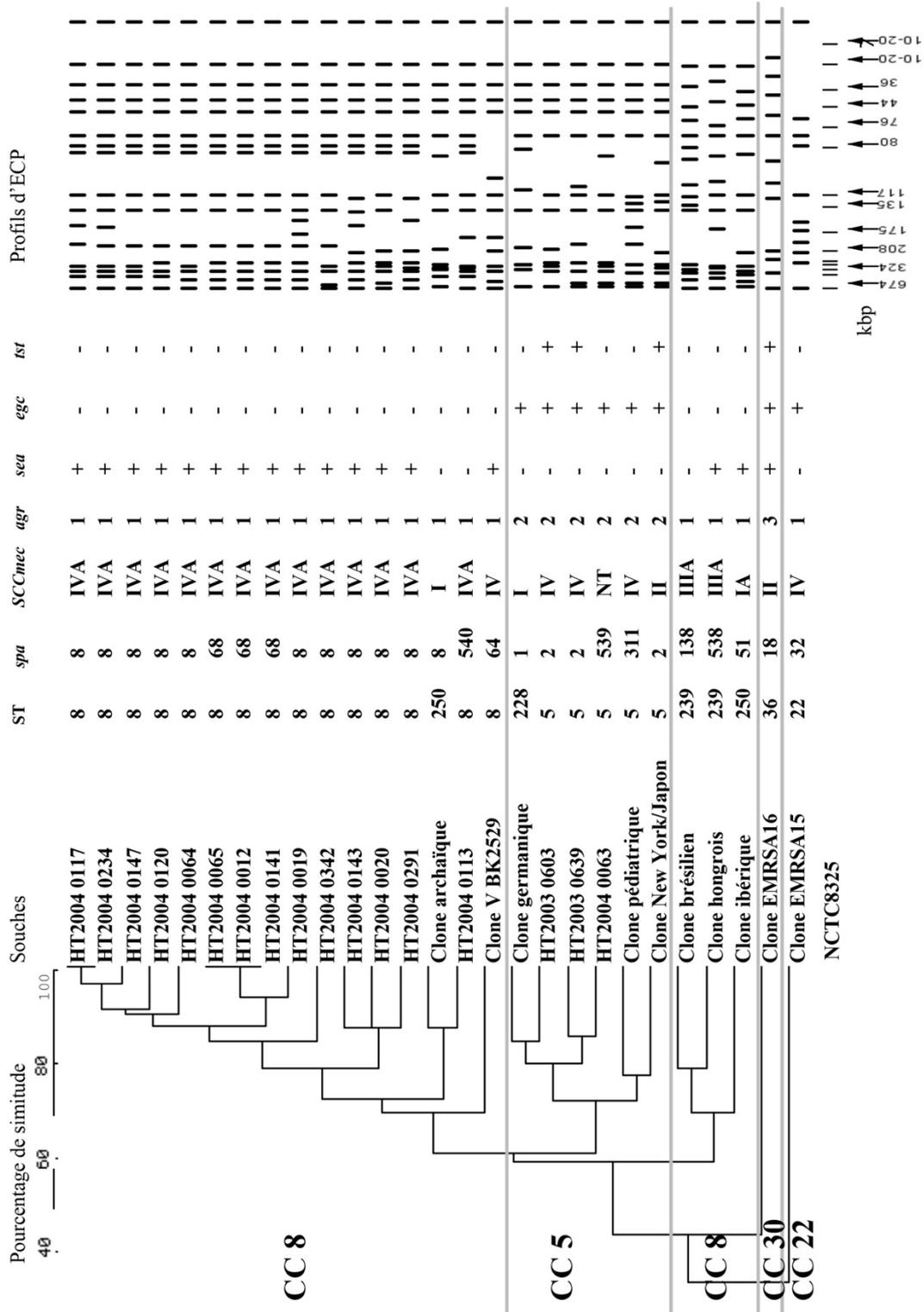
166. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *The Lancet*. févr 2003;361(9358):681-9.
167. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*. 1 févr 2002;109(3):317-25.
168. Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, et al. The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol*. sept 2007;65(5):1276-87.
169. Kinkel TL, Roux CM, Dunman PM, Fang FC. The *Staphylococcus aureus* SrrAB Two-Component System Promotes Resistance to Nitrosative Stress and Hypoxia. *mBio*. 12 nov 2013;4(6):e00696-13-e00696-13.
170. Pragman AA, Yarwood JM, Tripp TJ, Schlievert PM. Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 15 avr 2004;186(8):2430-8.
171. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol*. nov 2010;5(11):1663-74.
172. Cakir Aktas N, Erturan Z, Karatuna O, Karahasan Yagci A. Panton-Valentine leukocidin and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 15 nov 2013 [cité 1 août 2017];7(11). Disponible sur: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/4135>
173. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 1 avr 2002;15(2):167-93.
174. Manago K, Nishi J, Wakimoto N, Miyanochara H, Sarantuya J, Tokuda K, et al. Biofilm formation by and accessory gene regulator typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from patients with nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. févr 2006;27(02):188-90.
175. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, et al. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in CFTR / Mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 oct 2007;51(10):3677-87.
176. Ridderberg W, Nielsen SM, Nørskov-Lauritsen N. Genetic Adaptation of *Achromobacter* sp. during persistence in the lungs of cystic fibrosis patients. *Coenye T, éditeur. PLOS ONE*. 27 août 2015;10(8):e0136790.
177. Silva IN, Santos PM, Santos MR, Zlosnik JEA, Speert DP, Buskirk SW, et al. Long-term evolution of *Burkholderia multivorans* during a chronic cystic fibrosis infection reveals shifting forces of selection. *Eisen J, éditeur. mSystems*. 28 juin 2016;1(3):e00029-16.
178. Viberg LT, Sarovich DS, Kidd TJ, Geake JB, Bell SC, Currie BJ, et al. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* during chronic infection of seven australasian cystic fibrosis patients. *Parkhill J, éditeur. mBio*. 3 mai 2017;8(2):e00356-17.
179. Predari SC, Ligozzi M, Fontana R. Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 1991;35(12):2568-73.
180. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, de Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and-resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(17):9865–9870.
181. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1 déc 1977;74(12):5463-7.

182. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods*. mars 2007;68(3):605-12.
183. Nascimento M, Sousa A, Ramirez M, Francisco AP, Carriço JA, Vaz C. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*. 1 janv 2017;33(1):128-9.
184. Registre français de la mucoviscidose : Données spécifiques au centre Montpellier (Hôpital Arnaud de Villeneuve) - Données 2016.
185. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, et al. How clonal is *Staphylococcus aureus* ? *J Bacteriol*. 1 juin 2003;185(11):3307-16.
186. Registre français de la musoviscidose : Données spécifiques au centre Montpellier (Hôpital Arnaud de Villeneuve) - Données 2015.
187. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. juill 2015;28(3):603-61.
188. Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP. Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 oct 2008;178(8):814-21.
189. Stegger M, Driebe EM, Roe C, Lemmer D, Bowers JR, Engelthaler DM, et al. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain CA-347, a USA600 methicillin-resistant isolate. *Genome Announc*. 25 juill 2013;1(4):e00517-13-e00517-13.
190. Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis*. mai 2005;11(5):711-4.
191. Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, central Europe. *Emerg Infect Dis*. févr 2007;13(2):255-8.
192. He L, Zheng H-X, Wang Y, Le KY, Liu Q, Shang J, et al. Detection and analysis of methicillin-resistant human-adapted sequence type 398 allows insight into community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution. *Genome Med* [Internet]. janv 2018 [cité 22 juin 2018];10(1). Disponible sur: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-018-0514-9>
193. Uhlemann A-C, Porcella SF, Trivedi S, Sullivan SB, Hafer C, Kennedy AD, et al. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. *mBio*. 28 févr 2012;3(2):e00027-12-e00027-12.
194. Garbacz K, Piechowicz L, Podkowik M, Mroczkowska A, Empel J, Bania J. Emergence and spread of worldwide *Staphylococcus aureus* clones among cystic fibrosis patients. *Infect Drug Resist*. févr 2018;Volume 11:247-55.
195. Lima DF, Cohen RW, Rocha GA, Albano RM, Marques EA, Leão RS. Genomic information on multidrug-resistant livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from a Brazilian patient with cystic fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. janv 2017;112(1):79-80.
196. Hill UG, Floto RA, Haworth CS. Non-tuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *J R Soc Med*. juin 2012;105(2_suppl):14-8.
197. Dupont C, Michon A-L, Jumas-Bilak E, Nørskov-Lauritsen N, Chiron R, Marchandin H. Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of cystic fibrosis airways. *Infect Genet Evol*. juin 2015;32:214-23.
198. Foweraker JE. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 11 avr 2005;55(6):921-7.

199. Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, Purighalla S, Norgaard-Gron JC, Parkins MD, et al. Phenotypic Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* Populations in a Cystic Fibrosis Patient. Battista JR, éditeur. PLoS ONE. 3 avr 2013;8(4):e60225.
200. Hall AJ, Fothergill JL, McNamara PS, Southern KW, Winstanley C. Turnover of strains and intraclonal variation amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates from paediatric CF patients. Diagn Microbiol Infect Dis. déc 2014;80(4):324-6.
201. Cramer N, Wiehlmann L, Ciofu O, Tamm S, Høiby N, Tümmler B. Molecular Epidemiology of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Airway Infections in Cystic Fibrosis. Gulbins E, éditeur. PLoS ONE. 28 nov 2012;7(11):e50731.
202. Krzewinski JW, Nguyen CD, Foster JM, Burns JL. Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1 oct 2001;39(10):3597-602.

ANNEXES

Annexe 1 : Caractérisation de souches françaises de SARM par comparaison avec les grands clones épidémiques mondiaux, selon Reverdy et al. (89)



Les souches françaises sont désignées par le préfixe « HT ».

Annexe 2 : STs et profils alléliques des souches de SARM isolées au CRCM de Montpellier

ST	arcC	aroE	glpF	gmk	pta	tpi	yqiL
5	1	4	1	4	12	1	10
8	3	3	1	1	4	4	3
30	2	2	2	2	6	3	2
45	10	14	8	6	10	3	2
398	3	35	19	2	20	26	39
4780	563	35	19	2	20	26	39
4781	1	4	1	4	589	1	10
4782	1	713	1	4	12	1	10

Annexe 3 : Données cliniques et microbiologiques complètes des patients de notre étude

N° patient	Sexe	Age en 2016 (en années)	Age de diagnostic	Mutation	Insuffisance pancréatique exocrine	DID	VEMS (%)	VEMS mesuré (l/s)	Colonisation (autre que <i>S. aureus</i>)	Date du prélèvement	N° échantillon	Nom de l'isolat	Sequence type par morphotype	Sequence type par patient	
1	F	16	4 mois	F508del/F508del	oui	non	29	0,91	<i>A. xylosoxidans</i>	avr-16	9916 098 3676	SAUR 5	4780	ST4780	
2	M	49	naissance	F508del/2184insA	oui	non	40	1,32		oct-16	9916 061 2496	SAUR R Grosse b	5	ST5	
3	M	26	naissance	F508del/G542X	oui	non	45	1,94	<i>P. aeruginosa</i>	juin-16	9916 173 2911	SAUR R Grosse	5	ST5	
4	F	24	4 ans	F508del/R553X	oui	non	80	1,94	<i>P. aeruginosa ; levure</i>	06/11/12-B-3274	06/11/12-B-3274	06/11/12-B-3274	06/11/12-B-3274	5	ST5
										06/11/12-B-3274	06/11/12-B-3274	06/11/12-B-3274	5	ST5	
										06/11/12-B-3274	06/11/12-B-3274	06/11/12-B-3274	5	ST5	
5	F	20	2 mois	F508del/R553X	oui	non	104	2,21	<i>Aspergillus sp.</i>	oct-16	9916 300 2710	SAUR grand Meti R	5	ST5	
										févr-10	02/02/10-4379	SAUR PETITE Meti R	5	ST5	
6	F	11	1 mois	F508del/F508del	oui	non	42	1,14		oct-16	9916 257 2495	SAUR R	5	ST5	
										juin-16	99161692406	SAUR R	5	ST5	
7	M	34	naissance	F508del/F508del	oui	oui	36	1,27	<i>P. aeruginosa ; levure</i>	sept-16	9916 250 1933	SAUR R AT1	8	ST8	
										sept-16	9916 293 2644	SAUR ATB1	8	ST8	
8	M	32	3 ans	F508del/1811+1.6kba->G	oui	non	89	3,27	<i>P. aeruginosa ; Aspergillus sp.</i>	oct-16	9916 293 2644	SAUR ATB2	8	ST8	
										oct-16	9916 293 2644	SAUR ATB3	8	ST8	
9	F	14	1 an	F508del/R553X	oui	non	78	2,45	<i>P. aeruginosa</i>	sept-16	9916 253 2443	SAUR R Grosse	5	ST5	
										sept-16	9916 253 2443	SAUR R Moyen	5	ST5	
10	M	33	4 ans	F508del/1717-1G->A	oui	non	64	2,56	<i>P. aeruginosa</i>	nov-16	9916 320 2633	PAUR R Petit	5	ST5 et ST4782	
										nov-16	99163202633	SAUR R ATB3	4782	ST4782	
11	F	26	naissance	F508del/F508del	oui	oui	43	1,34	<i>S. maltophilia</i>	mai-12	15/05/12-B-2489	SAUR Metir	5	ST5	
										mai-12	15/05/12-B-2489	SAUR Metir	5	ST5	
12	F	20	naissance	F508del/F508del	oui	non	59	1,98	<i>P. aeruginosa</i>	déc-16	9916 355 2134	SAUR R Jaune	5	ST5 et ST45	
										déc-16	9916 355 2134	SAUR R Gris	45	ST45	
13	F	35	5 mois	F508del/F508del	oui	non	103	2,84	<i>P. aeruginosa</i>	nov-16	9916 328 3067	SAUR R Gros	5	ST5	
										nov-16	9916 328 3067	SAUR R Moyen	5	ST5	
14	M	23	5 mois	F508del/711+1G->T	oui	non	54	2,03		févr-16	9916 047 3344	SAUR R non β	8	ST8	
										févr-16	9916 047 3344	SAUR R β	8	ST8	
15	M	33	4 ans	F508del/R347P	oui	oui	26	1,04	<i>P. aeruginosa ; M. abscessus</i>	nov-16	9916 327 2720	SAUR R Moyen	4781	ST5 et ST4781	
										nov-16	9916 327 2720	SAUR R Plat	5	ST5 et ST4781	
16	F	17	4 ans	F508del/F508del	oui	non	100	3,40		juin-16	9916 327 2720	SAUR R Petit	4781	ST5 et ST4781	
										juin-16	9916 158 2511	SAUR ATB1	30	ST30	
17	M	25	7 ans	F508del/F508del	oui	non	37	1,56	<i>P. aeruginosa</i>	juin-16	9916 158 2511	SAUR ATB2	30	ST30	
										juin-16	9916 158 2511	SAUR ATB2	30	ST30	
18	F	52	naissance	F508del/507del	oui	oui	25	0,56	<i>A. xylosoxidans</i>	jul-16	9916 012 3524	SAUR R Jaune	5	ST5	
										juil-16	9916 012 3524	SAUR R β	5	ST5	
19	M	20	2 mois	F508del/F508del	oui	oui	32	1,41	<i>A. xylosoxidans</i>	févr-16	9916 054 2846	SAUR	398	ST398	
										févr-16	9916 050 2638	SAUR 1	8	ST8	
19	M	20	2 mois	F508del/F508del	oui	oui	32	1,41	<i>A. xylosoxidans</i>	févr-16	9916 050 2638	SAUR 2	8	ST8	
										févr-16	9916 050 2638	SAUR 3	8	ST8	
19	M	20	2 mois	F508del/F508del	oui	oui	32	1,41	<i>A. xylosoxidans</i>	févr-16	9916 056 2580	SAUR 1 ATB1 R	5	ST5	
										févr-16	9916 056 2580	SAUR 2 ATB2 R	5	ST5	

N° patient	Sexe	Age en 2016 (en années)	Age de diagnostic	Mutation	Insuffisance pancréatique exocrine	DID	VEIMS (%)	VEIMS mesuré (I/s)	Colonisation (autre que <i>S. aureus</i>)	Date du prélèvement	N° échantillon	Nom de l'isolat	Sequence type par morphotype	Sequence type par patient
20	M	2	4 mois	F508del/F508del	oui	non	29	1,22	<i>P. mirabilis</i>	mai-16	9916 139 3199	SAUR R Jaune	8	ST8
21	F	28	13 ans	F508del/R709X	oui	non	54	1,77	<i>S. maltophilia ; E. coli</i>	sept-16	9916 266 2600	SAUR 4 AT5	5	ST5
											9916 266 2600	SAUR 1 AT2	5	
											9916 266 2600	SAUR 2 AT3	5	
22	M	34	12 ans	F508del/R334W	oui	non	54	2,12	<i>P. aeruginosa</i>	févr-16	9916 266 2600	SAUR 3 AT4	5	ST8
											9916 040 2839	SAUR MetiR petit	8	
											9916 040 2839	SAUR MetiR_grosse	8	
23	F	43	1 an	G542X/R792X	oui	oui	66	1,85	<i>P. aeruginosa</i>	déc-11	13/12/11-B-2546	III-72	8	ST8
											13/12/11-B-2546	III-73	8	
											13/12/11-B-2546	III-74	8	
											13/12/11-B-2546	III-75	8	
											13/12/11-B-2546	III-76	8	
24	F	11	naissance	G542X/R1066C	oui	non	81	NR		sept-16	9916 271 2455	SAUR 1 MetiR	8	ST5
											9916 271 2455	SAUR 2 MetiR	8	
											9916 271 2455	SAUR 3 MetiR	8	
											9916 271 2455	SAUR 4 MetiR	8	
											9916 174 2552	SAUR R Jaune	5	
25	M	30	5 ans	F508del/F508del	oui	non	39	1,72	<i>P. aeruginosa</i>	nov-16	9916 174 2552	SAUR R Blanc	5	ST5
											9916 174 2552	SAUR R Gris	5	
											9916 174 2552	SAUR R Ocra	5	
26	F	33	5 ans	F508del/F508del	oui	oui	36	1,36	<i>P. aeruginosa</i>	févr-16	9916 334 3179	SAUR R Jaune	5	ST5
											9916 033 2886	SAUR MetiR Blanc	5	
27	F	18	naissance	F508del/F508del	oui	non	35	1,30	<i>P. aeruginosa</i>	oct-16	9916 194 2664	SAUR R Jaune	8	ST8

Annexe 4 : BFI après 1h et 5h des 9 souches de SARM étudiées par le Biofilm Ring Test®

Les valeurs 1 et 2 correspondent aux BFI lus dans les 2 puits dans lesquels ont été déposés les suspensions bactériennes, chaque souche ayant été déposée en double.

		Patient 4					
		a	b	c	d	e	f
1h	valeur1	6,55	5,69	7,94	4,89	5,35	6,59
	valeur2	6,30	5,89	7,65	4,89	5,11	5,44
	moyenne	6,43	5,79	7,80	4,89	5,23	6,02
	ecart type	0,1767767	0,14142136	0,20506097	0	0,16970563	0,8131728
5h	valeur1	4,17	3,46	4,07	0,27	1,40	4,11
	valeur2	4,12	3,19	4,09	0,49	1,02	3,17
	moyenne	4,15	3,33	4,08	0,38	1,21	3,64
	ecart type	0,03535534	0,19091883	0,01414214	0,15556349	0,26870058	0,66468037

		Patient 5			Ctl
		a	b	c	Ctl
1h	valeur1	4,94	7,19	5,26	11,06
	valeur2	4,83	8,33	5,44	10,84
	moyenne	4,89	7,76	5,35	10,95
	ecart type	0,07778175	0,80610173	0,12727922	0,15556349
5h	valeur1	0,00	3,49	0,03	12,13
	valeur2	0,21	4,77	0,56	11,26
	moyenne	0,11	4,13	0,30	11,70
	ecart type	0,14849242	0,90509668	0,37476659	0,6151829

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

Diversité moléculaire de souches de *Staphylococcus aureus* méticillinorésistant isolées de patients atteints de mucoviscidose

Résumé :

La mucoviscidose est une maladie génétique fréquente, à transmission autosomique récessive, dont l'atteinte respiratoire détermine le pronostic. Une colonisation du tractus respiratoire par des bactéries pathogènes opportunistes est fréquente, impliquant parfois des bactéries multi-résistantes comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). De par son large éventail de toxines et de facteurs de virulence, *Staphylococcus aureus* est un pathogène majeur pouvant entraîner des atteintes pulmonaires graves chez ces patients. Cependant, les études épidémiologiques moléculaires du SARM dans ce contexte demeurent rares en Europe et une seule étude a été menée en France jusqu'alors.

Nous avons génotypé par Multi-Locus sequence typing (MLST) 54 isolats issus de 27 échantillons respiratoires de 27 patients (dont une fratrie) suivis au CRCM de Montpellier en 2016, afin d'étudier la diversité des clones circulant au sein de cette population de patients. Une analyse longitudinale a également été réalisée chez 4 de ces patients (dont la fratrie) afin d'étudier d'éventuels changements de souches au cours du temps. Enfin, une étude de la cinétique de production de biofilm (Biofilm Ring Test ®) a été réalisée pour des souches des 2 membres de la fratrie.

Nous avons identifié 8 types de séquences (ou STs), 53% des souches sont de ST5, 31% de ST8, 4% de ST30, 2% de ST45 et 2% de ST398 ; 3 nouveaux STs sont identifiés pour les 3 souches restantes (8%). L'analyse longitudinale montre que 2 patients sont colonisés par des souches de mêmes STs après 4 et 5 ans (dont l'un des membres de la fratrie) tandis que pour les 2 autres patients, des souches de STs différents sont identifiées seules ou conjointement à une souche de même ST que la souche initiale. L'analyse de la cinétique de production de biofilm n'a montré que de faibles variations entre les souches testées, avec une tendance à la production de biofilm comprise entre 1h et 5h.

L'étude des génotypes de SARM colonisant les patients atteints de mucoviscidose du CRCM de Montpellier apporte des données épidémiologiques nouvelles chez cette population de patients en France. L'observation de génotypes distincts chez certains patients, au cours du temps et/ou au sein d'un même échantillon révèle la complexité de la colonisation pulmonaire par SARM chez ces patients et suggère une dynamique adaptative de ces souches au cours du temps dont l'étude devra être poursuivie.

Mots clés : *Staphylococcus aureus* méticillinorésistant, mucoviscidose, multi-locus sequence typing, diversité moléculaire