



HAL
open science

Analyse prospective par séquençage haut-débit de souches de *Staphylococcus aureus* d'origine respiratoire isolées au service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges

Sylvain Meyer

► **To cite this version:**

Sylvain Meyer. Analyse prospective par séquençage haut-débit de souches de *Staphylococcus aureus* d'origine respiratoire isolées au service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03215658

HAL Id: dumas-03215658

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03215658>

Submitted on 3 May 2021

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.

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021

Thèse n° 42

**MEMOIRE du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de
BIOLOGIE MEDICALE**

tenant lieu de THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par MEYER Sylvain

Né le 03 Septembre 1992 à Colmar (68)

Le 09 Avril 2021

**ANALYSE PROSPECTIVE PAR SEQUENÇAGE HAUT DÉBIT
DE SOUCHES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* D'ORIGINE
RESPIRATOIRE ISOLÉES AU SERVICE DE
RÉANIMATION POLYVALENTE DU CHU DE LIMOGES**

Sous la direction de Monsieur le Docteur Olivier BARRAUD

Membres du jury :

Mme le Professeur Véronique DUBOIS	PU-PH	Présidente
Mme le Professeur Laurence DELHAES	PU-PH	Examineur
Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY	PU-PH	Examineur
Mme le Docteur Anne JAMET	MCU-PH	Examineur
Mr le Docteur Bruno FRANÇOIS	PH	Examineur
Mr le Docteur Olivier BARRAUD	MCU-PH	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Véronique DUBOIS, vous me faites l'honneur de juger et de présider ce travail de thèse. Veuillez recevoir l'expression de tout mon respect et de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Laurence DELHAES, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Travailler dans votre équipe fut un honneur, et j'espère que nous aurons l'occasion de continuer à échanger sur des thématiques communes. Acceptez mes plus sincères remerciements.

A Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY, vous avoir aujourd'hui dans ce jury de thèse est un véritable privilège. Je vous remercie sincèrement d'avoir initié mon parcours Recherche, de m'avoir accueilli dans votre équipe et d'avoir toujours cru en moi. Soyez assurée de mon éternelle gratitude.

A Madame le Docteur Anne JAMET, pour avoir très gentiment accepté de participer à ce jury de thèse. Je vous remercie pour tout l'intérêt que vous portez à ce travail, et pour les discussions que nous avons pu partager lors de ma venue à Paris. Je garderai un excellent souvenir de mon passage dans votre équipe.

A Monsieur le Docteur Bruno FRANÇOIS, vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience et votre point de vue critique sur ce sujet. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Croyez en mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Olivier BARRAUD, directeur de ce travail de thèse. Tu as su, comme à chaque fois, me donner la motivation, les outils et des conseils de génie pour accomplir ce projet. Travailler avec toi est un plaisir, et je sais que nos futurs projets seront nombreux. Ta présence dans ce jury est un véritable honneur pour moi.

Ces premiers mots, je les dois à mes parents. Merci d'avoir toujours été là, d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour votre indéfectible soutien tout au long de ces interminables études (et ce n'est pas fini !). Partir à l'autre bout de la France aura probablement été la décision la plus difficile pour moi, comme pour vous, je le sais. Mais je sais aussi que l'amour que je vous porte dépasse, de loin, la distance qui nous sépare.

A toi, Pierre, mon tendre frère. Je sais que je peux toujours compter sur toi et cela n'a pas de prix. Merci de m'avoir suivi un peu partout où j'ai atterri, le temps d'une semaine ou d'un week-end, avec toujours la joie de se retrouver.

A la plus douce et la plus adorable des Mamies. Merci pour tout ton amour (et tes *bredelas*). Et à la plus merveilleuse des familles : merci à tous pour votre affection et votre bonne humeur à chacune de nos retrouvailles !

A Suzanne, pour ton soutien à toute épreuve, et nos conversations qui mettent toujours du baume au cœur. On a commencé ces études ensemble, on les finira ensemble !

Mention spéciale également à toute *la team* du Koeb, pour ces treize années passées à vos côtés et pour ces liens toujours aussi forts qui nous lient. J'espère sincèrement que l'on pourra bientôt se retrouver, disons pour changer ... en Bretagne ?

A Quentin, fidèle compagnon des bancs de la Fac Strasbourgeoise, qui aurait bien voulu participer au jury de cette thèse, mais en même temps, je sais que les bactéries, les virus et les parasites, ce n'est pas vraiment ton truc !

A toi mon Rouge, ma plus belle rencontre de cet internat. Merci d'avoir été là dans les meilleurs moments comme dans les plus durs. Qui l'eut cru qu'un gars du Sud Lointain et un gars du Grand Nord se lieraient d'amitié à Limoges ? Ta joie de vivre et tes chansons m'auront bien accompagné ces 4 années. Merci à toi aussi Adélaïde, d'avoir su lui redonner cette énergie et de supporter nos 400 coups.

A tous les amis coureurs et grimpeurs du Limousin (et d'ailleurs) : Mylène, Guillaume, Marie, Rémy et Maxime. A tous les bons moments passés (encore des burpees ?) avec vous Vannapha, Christophe, Shirley et toute la bande.

A tous mes amis internes d'ici ou d'ailleurs : Mylène et Marie-Fleur (là où tout a commencé), Yohan (alias Rouge), Julien, Raphaëlle, Marine (une petite bataille navale ?), Camille, Mouff et Malika, Théo, Virginie, Sarah N, Sarah M, Etienne, Alice, Selena, Lucie, Intissar, ... et à toutes les autres belles rencontres bordelaises, tourangelles, parisiennes ou limougeaudes qui se reconnaîtront.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène et du Centre de Prélèvements du CHU de Limoges. Vous êtes bien trop nombreux pour vous citer tous ici mais soyez assurés du plaisir quotidien de travailler à vos côtés.

Tous mes remerciements à Emilie et Valentin sans qui ce travail n'aurait jamais abouti. Et surtout, un grand merci à Delphine, Carole et Sarah de l'Unité de Recherche Clinique pour toute l'aide technique et logistique apportée sur ce projet comme sur bien d'autres !

Merci, également, à toute l'équipe du service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges, sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Et un spécial remerciement au Docteur Anne-Laure Fedou pour la collection (express) des données cliniques.

A toute l'équipe de l'UMR INSERM 1092 : merci ! Si j'ai décidé de prolonger l'aventure c'est aussi grâce à vous tous et à la formidable ambiance de travail. Spéciale dédicace au bureau 307 et au climat favorable qui y règne pour faire pousser les champignons et gourmandises en tout genre.

A Julie, la meilleure des voisines. Bière-sushis ?

Danke Ana und Carolina für unsere viersprachige Freundschaft. Gracias por los momentos pasar juntos y espero que nos volveremos a encontrar pronto. I never know which language I should use to speak with you, mas eu sei que estou apaixonado pelas suas coxinhas!

Y, para terminar, no puedo olvidar el encuentro con la más hermosa, y su adorable familia, al final de este maravilloso viaje. Tú, Catalina, mi musa del Nuevo Mundo, me hiciste el hombre más feliz, y contigo, construiré un nuevo mundo. Te amo.

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	2
Liste des abréviations	8
Index des Figures	11
Index des Tableaux	13
Index des Annexes	14
Introduction	15
Première partie : Etude Bibliographique.....	17
1. L'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> : un pathogène majeur	17
1.1. Caractères généraux.....	17
1.2. Structure et évolution génomique	18
1.2.1. Les éléments génétiques mobiles (EGM).....	18
1.2.1.1. Les plasmides	19
1.2.1.2. Les bactériophages.....	20
1.2.2. Les îlots génomiques	22
1.3. <i>Sequence type</i> et complexes clonaux.....	24
1.3.1. Techniques de typage moléculaire de souches	24
1.3.1.1. Le <i>multilocus sequence typing</i> (MLST)	24
1.3.1.2. Le <i>spa</i> typing	25
1.3.1.3. Séquençage haut-débit du génome	27
1.3.2. Répartitions et fréquence des principaux <i>spa type</i> , ST et CC	27
1.4. Habitat et pouvoir pathogène	28
2. Problématiques de la résistance chez <i>S. aureus</i>	30
2.1. Facteur de résistance - définition.....	30
2.2. Evolution de la résistance aux β -lactamines	30
2.2.1. Mécanisme de résistance à la pénicilline	31
2.2.2. Mécanisme de résistance à la méticilline	31
2.3. Evolution de la résistance aux autres antibiotiques.....	33
3. Les facteurs de virulence chez <i>S. aureus</i>	36
3.1. Facteur de virulence - définition	36
3.2. L'adhésion	38
3.2.1. Les MSCRAMMs.....	38
3.2.1.1. Le <i>clumping factor</i> ou coagulase liée	39
3.2.1.2. Les protéines liant la fibronectine.....	39
3.2.1.3. La protéine liant le collagène	40
3.2.2. La protéine A.....	40
3.2.3. Les SERAMs.....	41
3.2.3.1. La coagulase libre	41
3.2.3.2. Les autolysines	42
3.2.3.3. Autres SERAMs.....	42
3.3. La formation de biofilm.....	43

3.4.	Les dommages tissulaires et cellulaires	44
3.4.1.	Les exoenzymes	44
3.4.1.1.	Inducteurs enzymatiques chez l'hôte.....	45
3.4.1.2.	Enzymes dégradant la MEC.....	46
3.4.2.	Les cytotoxines	48
3.4.2.1.	Exotoxines	48
3.4.2.1.1.	Les hémolysines.....	48
3.4.2.1.2.	Les leucocidines.....	49
3.4.2.1.3.	Exotoxines-like protéines.....	51
3.4.2.2.	Les exfoliatines.....	51
3.4.2.3.	Les toxines superantigéniques	52
3.4.2.3.1.	Les entérotoxines et entérotoxines-like	53
3.4.2.3.2.	La toxine du syndrome de choc toxique	54
3.5.	Les mécanismes de survie et d'échappement au système immunitaire.....	55
3.5.1.	Mécanismes de résistance à la phagocytose	55
3.5.2.	Résistance aux actions des polynucléaires neutrophiles.....	56
3.5.3.	Echappement à l'action du complément.....	58
3.6.	Les systèmes de régulation d'expression	60
3.6.1.	Le système Agr.....	60
3.6.2.	Autres systèmes de régulation	63
4.	La Pneumopathie Acquisée sous Ventilation Mécanique (PAVM).....	64
4.1.	Définition, fréquence et critères diagnostiques.....	65
4.2.	Physiopathologie.....	66
4.3.	Importance de <i>S. aureus</i> dans la PAVM	68
4.3.1.	Le poumon : une niche écologique pour <i>S. aureus</i>	68
4.3.2.	La PAVM à <i>S. aureus</i> : état des lieux.....	68
4.3.3.	Intérêt de l'étude génomique des souches de <i>S. aureus</i> en service de Réanimation	69
	Deuxième partie : Matériels et Méthodes	71
1.	Les souches de <i>S. aureus</i>	71
1.1.	Sélection des isolats	71
1.2.	Recueil des informations cliniques.....	72
1.3.	Extraction de l'ADN	72
2.	Le séquençage haut débit.....	73
2.1.	Préparation des bibliothèques	73
2.2.	Caractérisation et validation des bibliothèques.....	74
2.3.	PCR émulsion et séquençage	75
3.	Analyse bioinformatique.....	78
3.1.	Assemblages des <i>reads</i>	78
3.2.	Utilisation des bases de données	78
3.2.1.	Typage des souches et phylogénie	78
3.2.2.	Identification des facteurs de résistance	79
3.2.3.	Identification des facteurs de virulence	79
3.2.4.	Identification des éléments génétiques mobiles (EGM).....	80
3.3.	Associations des variables.....	80

4.	Associations des données génomiques aux données cliniques	80
Troisième partie : Résultats		81
1.	Nombre d'échantillons et données cliniques	81
2.	Données issues du séquençage haut débit	83
3.	Description des populations circulantes de <i>Staphylococcus aureus</i>	83
3.1.	Caractérisation génotypique des isolats	83
3.1.	Analyse phylogénétique des isolats	87
3.2.	Etude des facteurs de résistance.....	89
3.2.1.	Analyse génomique des facteurs de résistance.....	89
3.2.2.	Comparaison avec les données de l'antibiogramme	93
3.2.3.	Profil de répartition des plasmides.....	93
3.3.	Etude des facteurs de virulence	94
3.3.1.	Analyse génomique des facteurs de virulence	94
3.3.1.1.	Adhésion	95
3.3.1.2.	Enzymes	95
3.3.1.3.	Molécules d'échappement immunitaire	95
3.3.1.4.	Protéines exotoxines-like	96
3.3.1.5.	Toxines	96
3.3.2.	Profil de répartition des phages	102
4.	Impact de la virulence dans la survenue d'une infection respiratoire	103
4.1.	Profils de virulence des souches	103
4.2.	Association données génomiques / données cliniques	105
Quatrième partie : Discussion.....		107
Conclusion.....		115
Bibliographie.....		116
Annexes.....		128

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations courantes

ADN :	acide désoxyribonucléique
AET :	aspiration endotrachéale
AIP :	peptide auto-induit
ARN :	acide ribonucléique
CC :	complexe clonal
CMH II :	complexe majeur d'histocompatibilité de type II
CRISPR/Cas9 :	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
IEC :	<i>Immune evasion cluster</i>
IgG :	Immunoglobuline G
IS :	séquence d'insertion
kb :	kilobase
MEC :	matrice extracellulaire
MLST :	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
MSCRAMMs :	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
NET :	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NGS :	<i>Next Generation Sequencing</i>
PAVM :	pneumopathie acquise sous ventilation mécanique
pb :	paire de base
PLP :	protéine liant les pénicillines
PVL :	leucocidine de Panton-Valentine
ROS :	espèces réactives de l'oxygène
SaPI :	<i>Staphylococcus aureus pathogenicity island</i>
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SASM :	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SCC :	<i>Staphylococcus Cassette Chromosome</i>
SCN :	Staphylocoque à coagulase négative
SCP :	Staphylocoque à coagulase positive
SERAMs :	<i>Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules</i>
ST :	<i>sequence type</i>
TCR :	récepteur des cellules T
TIAC :	toxi-infection alimentaire collective
VISA :	<i>Staphylococcus aureus</i> intermédiaire à la vancomycine
VRSA :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine

Dénomination des gènes étudiés chez *S. aureus*

Les gènes de ménage

<i>arcC</i>	carbamate kinase
<i>aroE</i>	shikimate déshydrogénase
<i>glpF</i>	glycérol kinase
<i>gmk</i>	guanylate kinase
<i>pta</i>	phosphate acétyltransférase
<i>tpi</i>	triosephosphate isomérase
<i>yqiL</i>	acétyl coenzyme A acétyltransférase

Les adhésines

<i>atlE</i>	autolysine E
<i>clfA et clfB</i>	clumping factor A et B
<i>cna</i>	protéines de liaison du collagène
<i>eap/map</i>	protéine d'adhérence extracellulaire / protéine analogue au CMH II
<i>ebp</i>	protéines liant l'élastine
<i>efb</i>	protéines liant le fibrinogène
<i>fnbA et fnbB</i>	protéines liant la fibronectine A et B
<i>icaA, B, C, D, R</i>	locus d'adhésion intracellulaire (formation de biofilm)
<i>sdrC, D, E, F, G, H</i>	protéines à motifs répétés Sérine-Aspartate C, D, E, F, G, H
<i>spA</i>	protéine A

Les enzymes

<i>coa</i>	coagulase libre
<i>geh / lip</i>	lipases
<i>hysA</i>	hyaluronidase
<i>nuc</i>	thermonucléase
<i>sak</i>	staphylokinase
<i>splA, B, C, D, E</i>	sérine protéases A, B, C, D et E
<i>sspA, B, C</i>	cystéine protéases A, B, C

Les toxines

<i>egc</i>	<i>enterotoxin gene cluster</i>
<i>eta, etb, etc, etd</i>	exfoliatines A, B, C, D
<i>hla, hlb, hlg, hld</i>	hémolysine alpha, bêta, gamma, delta
<i>lukE-lukD</i>	leucocidines Luke et LukD
<i>lukSPV-lukFPV</i>	leucocidine de Panton Valentine
<i>sea-sei, sep, ser, ses, yent1-2</i>	entérotoxines A-I, P, R, S, YENT1 et YENT2
<i>sej-o, seq, seu</i>	entérotoxines-like J-O, Q, U
<i>set1- 40</i>	protéines Exotoxines-like 1 – 40
<i>tst</i>	toxine du syndrome du choc toxique

Les molécules d'échappement

<i>adsA</i>	adénosine synthase A
<i>cap</i>	capsule
<i>chips</i>	<i>chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus</i>
<i>sbi</i>	<i>second immunoglobulin binding protein</i>
<i>scin</i>	<i>staphylococcal complement inhibitor</i>

Les systèmes de régulation

<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
<i>rot</i>	<i>repressor of toxins</i>
<i>sar</i>	<i>staphylococcal accessory regulator</i>

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Photographie d'une culture pure de <i>S. aureus</i> sur milieu gélosé et d'une coloration de Gram	18
Figure 2 : Description des différents types de transferts horizontaux de gènes entre bactéries	19
Figure 3 : Arbre phylogénétique des principaux phages décrits chez <i>S. aureus</i> classés selon leur homologie d'intégrase et description des facteurs de virulence retrouvés sur chacun d'entre eux	21
Figure 4 : Caractéristiques générales d'un îlot génomique	23
Figure 5 : Exemple de différents allèles décrits pour les gènes <i>glpF</i> , <i>gmk</i> , <i>arcC</i> et <i>aroE</i> , permettant la détermination du ST	25
Figure 6 : Représentation schématique du gène de la protéine A	26
Figure 7 : Schéma en réseau de la proximité génétique entre complexes clonaux des SARM et des relations entre éléments génétiques SCCmec	32
Figure 8 : Proportion de souches cliniques de SARM isolées de prélèvements invasifs en Europe	33
Figure 9 : Mécanisme d'échappement de la réponse immunitaire par la protéine A	41
Figure 10 : Etapes de colonisation du matériel implanté par <i>S. aureus</i>	42
Figure 11 : Rôle des protéines IcaA, B, C et D dans la production des polysaccharides du biofilm	44
Figure 12 : Détournement des voies de la coagulation par <i>S. aureus</i> pour échapper au système immunitaire	45
Figure 13 : Schéma de la formation de pores par les toxines à double composants dans la membrane plasmique	49
Figure 14 : Mécanismes d'action de la toxine PVL impliquée dans la survenue de la pneumonie nécrosante aiguë et dans l'inflammation pulmonaire	50
Figure 15 : Mécanismes d'activation des lymphocytes T par les superantigènes	52
Figure 16 : Présentation et support génétique des principales entérotoxines et entérotoxines-like toxines	53
Figure 17 : Images obtenues en microscopie électronique à transmission (A) d'un isolat de <i>S. aureus</i> produisant une capsule de type 5 et (B) d'un mutant non capsulé	55
Figure 18 : Mécanismes d'échappement à l'action des polynucléaires neutrophiles	57
Figure 19 : Cascade du complément et facteurs de virulence impliqués dans son échappement	59
Figure 20 : Différentes combinaisons génomique du cluster IEC et fréquence retrouvée dans des souches de <i>S. aureus</i>	60
Figure 21: Organisation et fonctions du système Agr	61
Figure 22 : Représentation structurelle en acides aminés des différents variants de peptides autoinduits	62

Figure 23 : Systèmes de régulation de l'expression des facteurs de virulence chez S. aureus	64
Figure 24 : Représentation schématique de la physiopathologie lors de l'intubation endotrachéale	67
Figure 25 : Flowchart de l'étude	71
Figure 26 : Etapes de la fabrication des bibliothèques par le kit Ion Xpress Fragment Library Kit for AB Library Builder® System (ThermoFisher Scientific)	74
Figure 27 : Etapes de la PCR émulsion préalable au séquençage haut débit	75
Figure 28 : Principe du séquençage par technologie Ion	76
Figure 29 : Photographie de la plateforme de séquençage haut-débit du laboratoire	77
Figure 30 : Arbre phylogénétique obtenu par REALPHY et correspondance entre Sequence Type (ST) et complexe clonal (CC).	88
Figure 31 : Répartition des types plasmidiques retrouvés dans chaque isolat selon la classification phylogénétique.	94
Figure 32 : Représentation en shade plot de la répartition des facteurs de virulence étudiés selon les isolats et leur Sequence Type.	97
Figure 33 : Représentation en shade plot de la répartition des gènes de virulence impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm.	98
Figure 34 : Représentation en shade plot de la répartition des gènes de virulence codant des enzymes et des protéines impliquées dans l'échappement à la réponse immune.	99
Figure 35 : Représentation en shade plot des différentes associations de protéines exotoxines-like.	100
Figure 36 : Représentation en shade plot de la répartition des gènes codant des toxines.	101
Figure 37 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) des gènes de virulence retrouvés en fonction du ST.	104

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition mondiale des principaux spa-type, sequence type et complexes clonaux	28
Tableau 2 : Mécanismes d'acquisition chromosomique de la résistance aux fluoroquinolones chez <i>S. aureus</i>	34
Tableau 3 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>S. aureus</i>	35
Tableau 4 : Classification des mécanismes de virulence bactériens	37
Tableau 5 : Principales enzymes retrouvées chez <i>S. aureus</i>	47
Tableau 6 : Critères de diagnostic d'une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique	65
Tableau 7 : Caractéristiques cliniques et microbiologiques	82
Tableau 8 : Nombre de reads, de contigs et profondeur moyenne obtenue pour chaque isolat après séquençage haut-débit	84
Tableau 9 : Description des sequence type, complexe clonal, type de protéine A, système Agr et type capsulaire	85
Tableau 10 : Comparaison des profils de résistance génotypique (G) et phénotypique (P) retrouvés pour les différents isolats	90
Tableau 11 : Type et fréquence des IEC retrouvés	96
Tableau 12 : Types de phages retrouvés, complexes clonaux et types d'IEC associés	103
Tableau 13 : Nombre de Sequence type associés à l'issue clinique	106

INDEX DES ANNEXES

Annexe 1 : Tableau recensant les 115 facteurs de virulence étudiés dans ce travail.....	130
Annexe 2 : Résultats obtenus auprès de la base de données PHASTER.....	131
Annexe 3 : Données cliniques associées à chaque isolat.....	133

Introduction

Depuis des centaines de millions d'années, les bactéries coexistent en étroite relation avec leurs hôtes. Les bactéries effectuent une perpétuelle évolution de leur génome afin de se défendre contre d'autres espèces bactériennes et/ou micro-organismes mais également afin de fournir un avantage de survie vis-à-vis des défenses mises en jeu par leur hôte. La mise en évidence et la compréhension des mécanismes de défense développés par les bactéries est un attrait scientifique majeur qui permet de refléter la sophistication et l'élégance du pouvoir de dissémination des gènes et de l'adaptation des bactéries à leur environnement.

Depuis plusieurs décennies maintenant, l'augmentation de l'incidence des bactéries résistantes aux antibiotiques est une préoccupation majeure en termes de santé publique. Cette situation est d'autant plus inquiétante que l'utilisation des antibiotiques ne cesse de croître et est devenue primordiale dans la pratique de la médecine actuelle telle que la transplantation d'organe, la chirurgie thoracique ou encore la prophylaxie de l'immunodéprimé. Par ailleurs, l'utilisation même des antibiotiques est aujourd'hui remise en cause puisqu'elle détruit à la fois le pathogène mais également les flores commensales protectrices pouvant conduire à l'émergence d'infections potentiellement plus graves encore (diarrhées à *Clostridioides difficile*, infections à Bactéries Multi Résistantes et Hautement Résistantes...). De plus, la diminution de l'identification et du développement de nouvelles molécules antibiotiques a conduit les microbiologistes à intensifier leur recherche sur ces mécanismes développés par les bactéries afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Parmi ceux-ci, les facteurs de virulence (FDV) et de résistance (FDR) semblent être des cibles privilégiées pour prévenir le risque infectieux et développer de nouvelles molécules thérapeutiques. En effet, il est dorénavant clair que le développement de telles molécules présente un intérêt notable en particulier pour prévenir l'apparition de l'infection voire contrôler son expansion, bien que le spectre d'utilisation de chaque molécule développée soit très étroit et limité à un ou deux pathogènes.

La mise au point et la démocratisation des techniques génomiques en recherche a permis, ces dix dernières années, l'identification et l'amélioration des connaissances dans ce domaine. L'arrivée du séquençage haut-débit (NGS) a facilité l'accès à l'intégralité du génome bactérien tandis que l'amélioration des outils bioinformatiques a amélioré l'analyse de ces données et permis la modélisation des protéines identifiées.

C'est pourquoi, la compréhension des mécanismes génotypiques et phénotypiques d'invasion et d'échappement aux réponses de l'hôte, est devenue essentielle pour poursuivre la lutte antibactérienne et mieux comprendre la physiopathologie des différentes infections. La mise en évidence des mécanismes de résistance demeure également primordiale pour préserver et mieux cibler l'utilisation des antibiotiques. Ensemble, ces deux stratégies semblent être synergiques pour mieux comprendre, contrôler et traiter les infections bactériennes réfractaires chez l'Homme.

Dans un premier temps, nous détaillerons la bibliographie concernant la pathogénicité de *Staphylococcus aureus* à l'hôpital et plus particulièrement en service de Réanimation. L'étude bibliographique permettra également de faire un état des lieux des connaissances concernant les principaux mécanismes de résistance et de virulence chez cette espèce bactérienne. Dans un second temps, nous présenterons et discuterons les résultats de notre étude exhaustive d'analyse des gènes de virulence et de résistance par séquençage haut débit des souches de *Staphylococcus aureus* isolées chez des patients hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges.

Première partie : Etude Bibliographique

1. L'espèce *Staphylococcus aureus* : un pathogène majeur

1.1. Caractères généraux

Staphylococcus aureus est un cocci à Gram positif observé au microscope pour la première fois par Louis Pasteur en 1878 dans des prélèvements de pus de furoncles. Sa dénomination provient de la pigmentation jaune des colonies obtenues en culture *in vitro* par Friedrich J. Rosenbach à partir de 1882 [1]. C'est une bactérie mesurant de 0,8 à 1 μm , immobile et qui se regroupe en amas (Figure 1). Elle peut survivre à de nombreuses conditions hostiles comme des milieux contenant jusqu'à 10% de NaCl, des milieux très secs ou encore des températures allant de 10°C à 45°C. Elle présente comme caractéristiques microbiologiques principales une catalase positive, une oxydase négative, une coagulase libre ainsi qu'un métabolisme aérobie-anaérobie facultatif. La caractérisation de la coagulase libre a notamment permis de séparer le genre *Staphylococcus* en deux groupes : les staphylocoques à coagulase positive (SCP) dont fait partie le *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) tels que *S. epidermidis*. Les SCP présentent généralement un pouvoir pathogène plus élevé que les SCN, en raison de la capacité de la coagulase libre à générer des caillots dans le plasma. Celle-ci est d'ailleurs considérée comme un facteur de virulence notable de *S. aureus*.

D'un point de vue taxonomique, l'espèce *S. aureus* appartient au règne des Bactéries, au phylum des Firmicutes (bactéries à Gram positif), à la classe des Bacilli, à l'ordre des Bacillales, à la famille des Staphylococcaceae et au genre *Staphylococcus*. A l'heure actuelle, le genre *Staphylococcus* comprend 55 espèces reconnues.

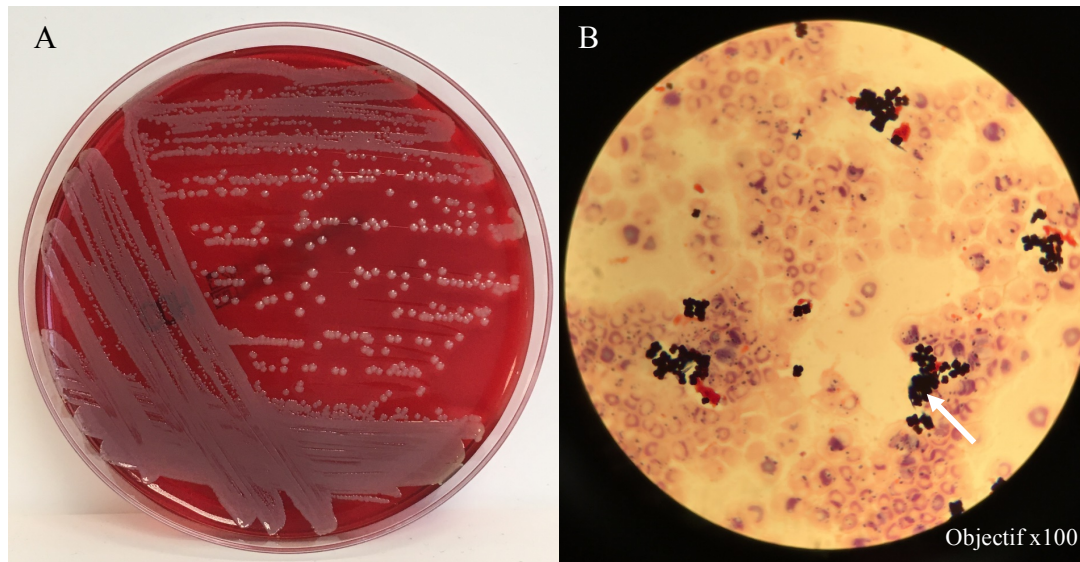


Figure 1 : A. Photographie d'une culture pure de *Staphylococcus aureus* sur milieu gélosé au sang de mouton après 24h d'incubation. A noter la franche hémolyse bêta autour des colonies. B. Photographie d'une coloration de Gram d'une hémoculture positive à *Staphylococcus aureus* avec un regroupement typique de cocci à Gram positif en amas.

Photos collection personnelle.

1.2. Structure et évolution génomique

S. aureus est une espèce bactérienne constituée d'un chromosome circulaire unique évalué entre 2,7 et 2,9 Mb et comprenant environ 2800 gènes. Il est composé d'une faible teneur en guanine et cytosine (de 30 à 40% selon les souches) [2] [3]. Le "core génome", c'est-à-dire les gènes ayant une fonction vitale pour la bactérie (gènes de structure, voies métaboliques d'utilisation des sucres...), représente 75% de ce génome. Peu de variations y sont décrites entre différentes souches. De ce fait, pour s'adapter à son environnement, son évolution génétique s'est effectuée à travers l'apparition de mutations ponctuelles, mais surtout à travers l'acquisition d'éléments génétiques accessoires et mobiles par transferts horizontaux de gènes [4].

1.2.1. Les éléments génétiques mobiles (EGM)

Le transfert d'EGM peut se faire directement à partir d'ADN libre ou bien, plus couramment, par l'intermédiaire d'éléments génétiques spécialisés tels que les plasmides ou les transposons mais également par l'intermédiaire de virus (bactériophages). L'échange de matériel génétique est ainsi possible par trois moyens de transfert : la transformation, la conjugaison et la transduction (Figure 2).

S. aureus est naturellement peu compétent, c'est-à-dire qu'il est peu récepteur au transfert d'ADN passif. Un vecteur est donc nécessaire pour réaliser ce transfert. C'est pourquoi les plasmides et les bactériophages sont des intermédiaires essentiels à la dissémination de gènes.

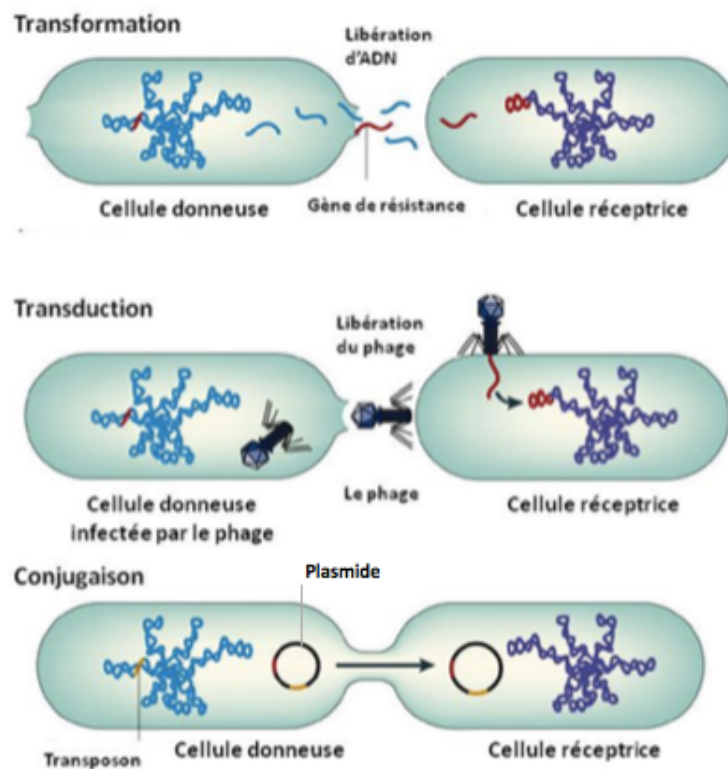


Figure 2 : Description des différents types de transferts horizontaux de gènes entre bactéries. D'après Lingli Zhang *et al* [5].

1.2.1.1. Les plasmides

Les souches d'intérêt clinique possèdent la plupart du temps un ou plusieurs plasmides qui confèrent de la résistance à diverses classes d'antibiotiques, d'antiseptiques ainsi qu'aux métaux lourds. L'acquisition de plasmides est très fréquente chez les Staphylocoques. Elle joue un rôle majeur dans la dissémination de l'antibiorésistance mais peut également concerner certains facteurs de virulence [6]. Cependant, le maintien d'un plasmide dans la bactérie hôte représente un coût métabolique (ou *fitness cost*) important qui devrait conduire à leur disparition mais il semble que l'avantage sélectif conféré par les gènes portés sur ces plasmides soit suffisant pour expliquer leur persistance au fil des générations [7].

L'essentiel des plasmides décrits chez *S. aureus* est de petite taille (de 1 à 10 kb) portant quelques gènes de répllication et un ou deux gènes de résistance (souvent à l'érythromycine, à la tétracycline, ou au chloramphénicol). Ils sont cependant présents en de nombreuses copies

par bactérie (entre 10 et 50 copies) [8]. Il existe deux autres types de plasmides présents chez *S. aureus*. Les plasmides de multirésistance sont de plus grande taille (de 10 à 30 kb), portent plusieurs gènes de résistance séparés par des séquences d'insertions (IS) et transportent fréquemment des transposons qui hébergent eux-mêmes des gènes de résistance (souvent aux β -lactamines, aux aminoglycosides ou aux macrolides) [9][10]. Ils sont classiquement présents en 5 copies par cellule. Enfin, il existe des plasmides conjugatifs de multirésistance qui sont les plus grosses structures retrouvées chez *S. aureus* (>30 kb). Ils sont capables de se transférer d'une bactérie à une autre ou bien de s'intégrer au chromosome [11] et hébergent de multiples gènes de résistance.

La classification des plasmides circulant chez *S. aureus* repose sur la détermination des séquences des gènes *rep* responsables de la production des protéines de réplication du plasmide. Il a été constaté qu'il est impossible de trouver deux plasmides ayant le même gène *rep* au sein d'une même bactérie. Ceci définit entre autres les groupes d'incompatibilité, c'est-à-dire des plasmides non identiques qui partagent la même machinerie de réplication, et donc qui sont incapables de se maintenir efficacement au sein de la bactérie. Plus de quinze groupes d'incompatibilité ont déjà été décrits. Par ailleurs, la présence de certains gènes de résistance est fortement associée à un groupe de plasmide comme par exemple le gène *tetK* avec les plasmides de type *rep7* [12]. Quelques gènes codant des entérotoxines ont également été décrits sur un support plasmidique [13]. De même, il a été démontré que certains plasmides sont associés à une ou plusieurs lignées de *S. aureus*. Il y a donc une relation étroite entre lignées de *S. aureus*, gènes *rep* et gènes de résistance/virulence.

1.2.1.2. Les bactériophages

La plupart des souches de *S. aureus* hébergent des bactériophages, des prophages ou des îlots génomiques liés aux phages au sein de leur génome. Beaucoup de ces phages portent, outre leur machinerie répliative, des facteurs de virulence staphylococciques, qui sont d'importance pour expliquer le succès de dissémination de certains clones.

L'acide téichoïque, très présent sur la paroi de *S. aureus*, est le récepteur d'entrée principal du phage dans la bactérie. Son abondance, sa constance et l'absence fréquente de système de protection de type CRISPR/Cas9 chez *S. aureus* permet l'acquisition rapide et l'échange d'éléments génétiques d'origine phagique ou *phage-like*. A contrario, les SCN présentent une variabilité d'acide téichoïque en surface, ce qui les rend moins sensibles à l'action des bactériophages [14].

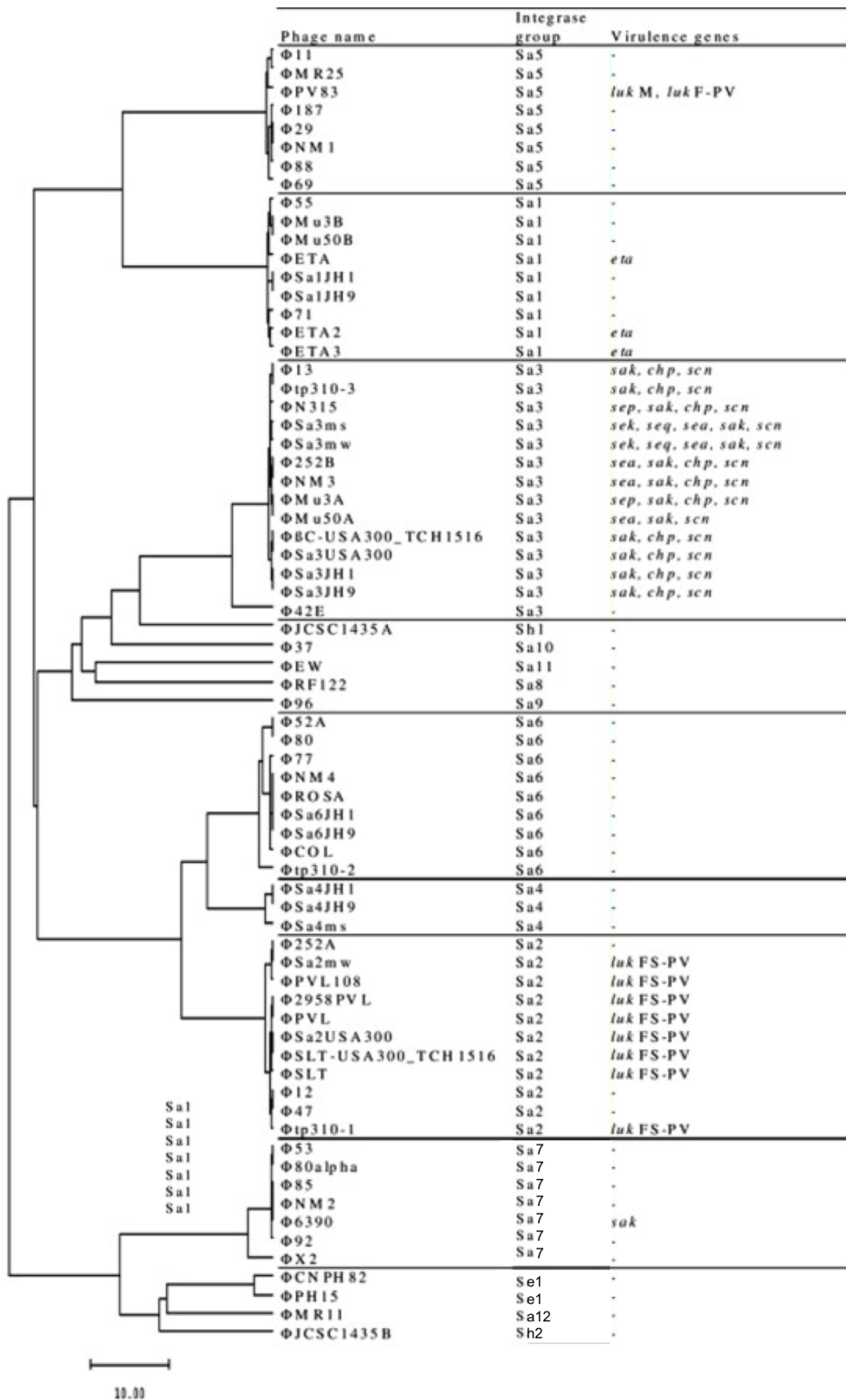


Figure 3 : Arbre phylogénétique des principaux phages décrits chez *S. aureus* classés selon leur homologie d'intégrase et description des facteurs de virulence retrouvés sur chacun d'entre eux. Adapté d'après Goerke *et al* [15].

Des FDV notables tels que la leucocidine de Panton Valentine, l'exfoliatine A, l'entérotoxine A, la staphylokinase ou encore la protéine staphylococcique inhibitrice du complément sont transmis par des phages de *S. aureus* (Figure 3) [16][17]. Leur expression est également très dépendante du cycle de vie du phage. Les dommages à l'ADN induits, par exemple, par l'utilisation d'antibiotiques tels que les fluoroquinolones ou les β -lactamines, conduisent à l'expression des gènes prophagiques via le système SOS de la bactérie [14][18]. Cela est notamment bien connu chez *Escherichia coli* avec la production de la shigatoxine *stx* responsable du syndrome hémolytique et urémique [19]. Il en est de même pour les FDV prophagiques de *S. aureus*. Il apparaît donc clairement qu'étudier et limiter la transmission de phages est important pour combattre l'émergence de nouveaux clones pathogènes. A noter, toutefois, que certains complexes clonaux de *S. aureus* ne possèdent aucun gène d'origine phagique dans leur génome comme c'est le cas du CC15, ce qui suggère que cette lignée est particulièrement restrictive à la captation d'ADN étranger.

1.2.2. Les îlots génomiques

De nombreux gènes accessoires sont regroupés au sein du génome sous forme d'îlots génomiques. *S. aureus* en contient plusieurs où sont regroupés divers gènes de virulence et/ou de résistance. Parmi ces îlots, on distingue les îlots symbiotiques, les îlots métaboliques, les îlots de *fitness*, les îlots de résistance et les îlots de pathogénicité (IDP) [20]. Ce sont des structures continues de taille très variable allant de 15 kb à plus de 200 kb, et qui contiennent de nombreuses séquences répétées, ainsi qu'une intégrase et une recombinaison permettant l'insertion de gènes dans le chromosome. Il est assez facile de les détecter puisque leur GC% est beaucoup plus faible que le reste du core-genome (Figure 4), la fréquence de dinucléotides y est plus élevée et leur localisation est souvent proche de gènes codants pour des ARN de transfert.

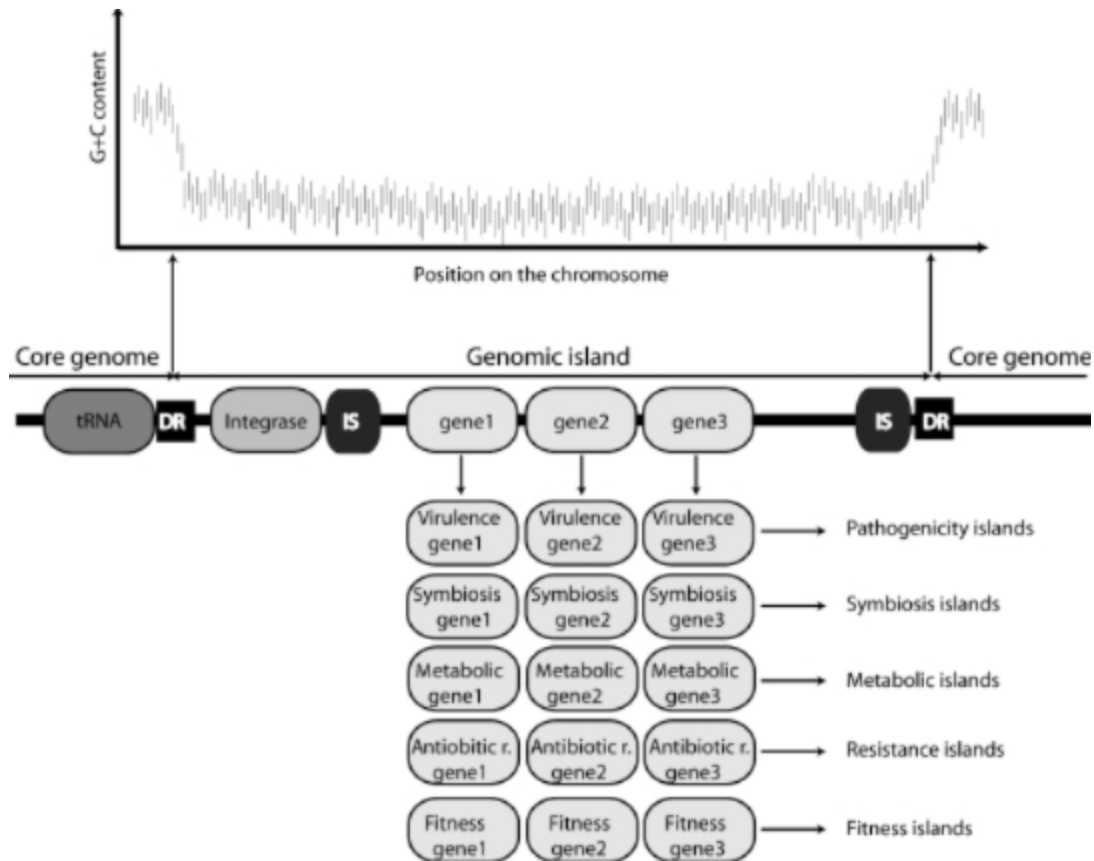


Figure 4 : Caractéristiques générales d'un îlot génomique. D'après Juhas *et al* [21].

Les IDP sont les plus importants et les plus prévalents chez *S. aureus* avec une moyenne d'un îlot par souche et pouvant aller jusqu'à plus de trois [22]. Ils sont également ceux qui permettent des changements majeurs de phénotypes et de virulence [23]. De nombreux îlots de pathogénicité -dénommés SaPI- ont été décrits et regroupés en sous-groupes selon l'homologie de leur intégrase [24]. La présence de cette dernière et de site *att* suggère une étroite relation entre IDP et bactériophages. Plusieurs de ces structures ont très probablement été acquises à partir de génomes phagiques [25]. En outre, les SaPI peuvent être mobilisés par certains bactériophages ou par l'induction de prophages endogènes.

1.3. *Sequence type* et complexes clonaux

A des fins épidémiologiques pour connaître et prévenir l'origine d'une infection, de nombreuses techniques ont été développées pour mieux identifier les clones. Parmi les techniques les plus couramment utilisées, le « *multilocus sequence typing* » (ou MLST) ainsi que le « *spa typing* » ou typage de la protéine A ont permis la caractérisation structurelle des populations de *S. aureus* à travers le monde.

1.3.1. Techniques de typage moléculaire de souches

1.3.1.1. Le *multilocus sequence typing* (MLST)

Le MLST est une méthode qui consiste à séquencer plusieurs gènes structuraux ou gènes dits de « ménage » présents dans le génome bactérien. C'est une méthode reproductible, au fort pouvoir discriminant et qui a pendant longtemps été très utilisée. La méthode, développée en 1998 par Maiden *et al*, est basée sur l'amplification de sept gènes de 450 à 500 pb [2]. Ces gènes de ménages sont choisis selon leur variabilité engendrée par des mutations ponctuelles. Ainsi, la probabilité pour que deux isolats partagent le même profil par hasard est très faible. Par conséquent, deux souches présentant le même profil allélique peuvent être considérées avec une grande certitude comme appartenant au même clone. Concernant *S. aureus*, les sept gènes en question choisis sont *arcC* (carbamate kinase), *aroE* (shikimate déshydrogénase), *glpF* (glycérol kinase), *gmk* (guanylate kinase), *pta* (phosphate acétyltransférase), *tpi* (triose-phosphate isomérase) et *yqiL* (acétyl-coenzyme A acétyltransférase) [3]. En fonction des polymorphismes observés sur ces gènes (Figure 5), un allèle distinct est assigné, ce qui permet de définir un profil allélique et donc un ST pour chaque isolat. Si deux ST possèdent plus de cinq allèles identiques, ils sont alors regroupés au sein d'un même complexe clonal (CC). Il existe pour chaque gène plus d'une centaine d'allèles différents.

```

glpF
      11112223334
      55627892791671
      79688657612627
allele 1  GTCGGCAAGCGACC
allele 2  .AT.....A.T.
allele 3  .AT....T..A.T.
allele 4  .....AT....
allele 6  .A.....
allele 7  ...A.....
allele 8  AA....G.....T
allele 9  .....AT.C..
allele 10 .AT.A....A.T.
allele 11 .A...T.....
allele 12 .A....G.....

gmk
      11223333334
      2223881355790
      0790568178302
allele 1  GACAGCACTGAGT
allele 2  ..T..TT....AC
allele 3  ..T..TTA...AC
allele 4  ..T..TT.CA...
allele 5  ...ATT.C..AC
allele 6  ..T..TT....A.
allele 7  ...ATT.C.CAC
allele 8  .GT..TT.CA...
allele 9  ...G.....
allele 10 .GT..T..CA...
allele 11 A.T..TT....AC

arcC
      111111122222334
      6674689999013379170
      0987240389301229582
allele 1  TAGTTGCCCAACTAAGATT
allele 2  ..A.A...TG.T..G....
allele 3  .....TG.T.....
allele 4  ...C.....A.
allele 5  .....TG.T..T...
allele 6  .....A..TG.T.....
allele 7  .....T..
allele 8  ...A...TG.T.....
allele 9  ..A.A.....
allele 10 .....A.....
allele 11 .G.....C.....
allele 12 ...C...ATG.T.....
allele 13 .....C.....
allele 14 A.....TG.TC.....
allele 15 .....T...C.....
allele 16 .....A..TG.T.....G
allele 17 ....A.....G.....

aroE
      1111111222223333444
      12380234589155671366333
      75194344604447921245579
allele 1  AACGTCACCGCATACTCTCCTAC
allele 2  ...A..G...G...A...G.
allele 3  ...A...T..G.....
allele 4  .....T..G.....G.
allele 5  ...A..G...GAG.....GA
allele 6  .....G...G.....A..
allele 7  ...A.....GA...C...G.
allele 8  .....G...G.....G.
allele 9  .....T..G.....A..
allele 10 G..A..G...TGA..AA...G.
allele 11 G..A..G..ATGA...A...G.
allele 12 ...A.TG...G...A...G.
allele 13 .C.A...T...G...C...
allele 14 G..A..G...TGA...A...G.
allele 15 .C.A...T...G...C...G...
allele 16 ..AA..G...G...T...T.G.
allele 17 ...A..G...G...A.T..G.

```

Figure 5 : Exemple de différents allèles décrits pour les gènes *glpF*, *gmk*, *arcC* et *aroE*, permettant la détermination du ST. D’après Enright MC *et al* [26]. Seuls les nucléotides différents de l’allèle 1 sont retranscrits sur les allèles suivants, l’absence de modification est retranscrite par un point.

La classification selon le « *sequence type* » permet d’analyser plus finement la dissémination et l’importance pathogénique de chaque clone. Il a été démontré que certains clones sont plus fréquemment la cause d’infections invasives, ce qui est dû à la présence d’une quantité plus importante ou de la présence de certains facteurs de virulence spécifiques. Ces derniers augmentent les chances pour la souche d’accéder aux sites normalement stériles.

1.3.1.2. Le *spa* typing

Technique développée en 1996 par Frénay *et al*, le typage moléculaire de la protéine A de *S. aureus* a rapidement montré de nombreux avantages [27]. En effet, outre sa rapidité, c’est une technique facile à mettre en œuvre et à interpréter. De plus, la méthode s’est révélée aussi discriminante et concordante que les données issues du MLST.

Le gène de la protéine A est retrouvé chez toutes les souches de *S. aureus*. Il est composé de cinq régions permettant la liaison de la protéine au fragment Fc des Immunoglobulines G (Figure 6) ainsi qu'une région X en position C-terminale du gène. Cette technique est basée sur l'analyse des variations de séquences nucléotidiques dans la région X du gène codant la protéine A. Cette région présente la particularité de posséder une variation du nombre de répétitions en tandem. Les répétitions, qui sont engendrées par des erreurs de l'ADN polymérase lors de la réplication ou par des événements de recombinaison, sont différentes en fonctions des clones. Il existe également des variations ponctuelles sur ces séquences répétées issues de mutations aléatoires acquises au fil des cycles de division. Il est ainsi possible de distinguer deux souches différentes en fonction du type de protéine A [28].

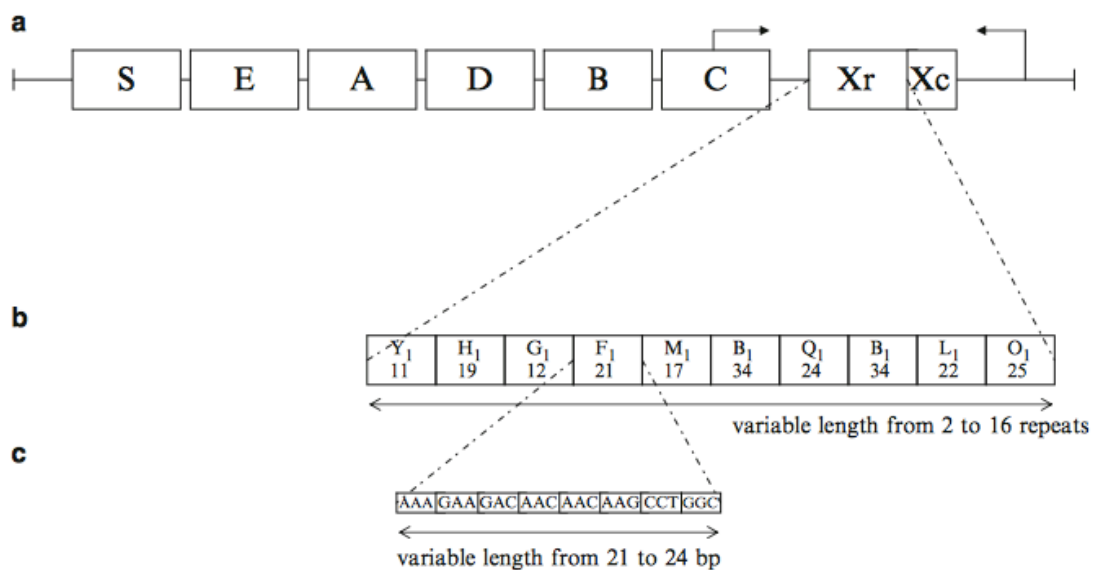


Figure 6 : Représentation schématique du gène de la protéine A

a. Différentes régions du gène : S = séquence signal, E, A, D, B, C = régions de la protéine se liant au récepteur Fc des IgG, Xc = région de liaison au peptidoglycane, Xr = région du gène présentant des variations du nombre de séquences en tandem. b. Représentation du nombre de séquences répétées sur la région Xr du *spa* type t008. c. Exemple de séquence nucléotidique d'une de ces séquences répétées. D'après Hallin M *et al* [29].

1.3.1.3. Séquençage haut-débit du génome

Le séquençage nouvelle génération ou haut-débit (NGS) permet de séquencer massivement des millions de fragments d'ADN simultanément. Les applications en microbiologie sont nombreuses et apportent une nouvelle perspective à la discipline. Les études de génomes bactériens et des flores microbiennes sont devenues en quelques années un attrait scientifique majeur pour améliorer la compréhension des interactions hôtes – microorganismes et des processus physiopathologiques. En effet, la majorité des bactéries présentes dans les flores microbiennes ne sont pas cultivables ou identifiables par les méthodes standards de bactériologie. Le développement et la démocratisation du NGS pour l'étude des génomes de souches bactériennes (ou WGS : « *Whole Genome Sequencing* ») a permis d'accéder à l'ensemble du répertoire de gènes présents chez les bactéries en un temps court et à un coût raisonné. Il permet une caractérisation fine et précise d'une souche donnée. Il est ainsi possible, à partir de données de NGS, de réaliser en même temps une analyse de type MLST, de typer le gène de la protéine A, mais surtout d'analyser la présence de gènes tels que, par exemple, les gènes de résistance ou de virulence [30]. De ce fait, cette technologie est dorénavant massivement utilisée pour accéder à l'intégralité de ces informations.

1.3.2. Répartitions et fréquence des principaux *spa type*, ST et CC

Les techniques de typage développées au fil du temps ont permis de révéler une population de *S. aureus* hautement clonale, composée de très nombreux ST eux-mêmes regroupés en CC. A ce jour, de très nombreux *spa type*, ST et CC différents ont été décrits à travers le monde. Une association entre *spa-type* et ST existe (Tableau 1). Par exemple, le t008 est systématiquement associé au ST8 ou ST247, l'inverse n'est en revanche pas toujours le cas. Les *spa type* t008 et t002 ont été les plus fréquemment isolés sur ces dix dernières années dans le monde et surtout en Europe. Il faut tout de même relever que plus de 50% des *spa types* n'ont été rapportés que dans un seul pays, ce qui confirme le haut pouvoir clonal de *S. aureus* [31].

Néanmoins, plusieurs études ont montré que seulement quelques clones étaient d'intérêt clinique notable de par leur fréquence d'isolation ou de par leur caractère particulièrement virulent ou résistant. Ainsi les complexes clonaux CC1, CC5, CC8, CC15 et CC97 ont pendant longtemps été les clones les plus répandus à travers le monde. Par exemple, le CC5 s'est répandu dans les hôpitaux de très nombreux pays [32][33][34][35].

Tableau 1 : Répartition mondiale des principaux *spa*-type, sequence type et complexes clonaux. D’après Asadollahi P. *et al* [31].

Continent	Prevalent <i>spa</i> types (No. of isolates)	MLST clonal complex/M-CC (No. of <i>spa</i> types)	Sequence type/ST (No. of <i>spa</i> types)
Europe	t032 (1,250)	M-CC22 (97)	ST22 (173)
	t008 (899)	M-CC8 (57)	ST8 (295), ST247 (51)
	t002 (794)	M-CC5 (162)	ST5 (186)
Asia	t030 (1,748)	M-CC59 (11), M-CC8 (159)	ST239 (1,422), ST22
	t037 (1,467)	M-CC8 (198), M-CC5 (8), M-CC	(99)
	t002 (1,285)	188 (16)	ST 239 (1,124)
America	t008 (2,100)	M-CC5 (145), M-CC8 (157)	ST5 (459)
	t002 (1,525)	M-CC 85 (85), M-CC5 (5)	ST8 (524), ST247 (100)
	t242 (752)	M-CC5 (30), M-CC8 (5)	ST5 (701)
Africa	t037 (381)	-	-
	t084 (267)	M-CC239 (30)	ST 239 (173)
	t064 (123)	M-CC15 (75)	ST 15 (60)
Australia	t202 (50)	M-CC8 (10), M-CC30 (68)	ST8 (68)
	t037 (32)	-	-
	t437 (19)	-	-

L'épidémiologie des souches circulantes change avec le temps d'où la nécessité de surveiller l'émergence de nouveaux clones. C'est par exemple le cas du CC398 qui regroupe plusieurs ST (dont le ST398). Ce clone, apparu au début des années 2000 dans les troupeaux de bétail, est rapidement devenu une menace en clinique humaine depuis 2007 [36][37][38]. Sa prévalence dans le sepsis à *S. aureus* est passé de 3,6% des ST isolés en 2010 à plus de 20% en 2017. Parmi les hypothèses avancées, une capacité accrue d'adhésion aux cellules humaines, un meilleur *fitness*, un haut pouvoir de colonisation environnemental ou bien la capacité d'acquérir des gènes de résistance et de virulence ont été émises [39].

1.4. Habitat et pouvoir pathogène

La bactérie *S. aureus* est naturellement présente au niveau des voies respiratoires supérieures chez environ 30% de la population humaine et peut également être retrouvée au sein de la flore cutanée. Bien que les infections à *S. aureus* surviennent également chez les non porteurs, elles interviennent plus fréquemment chez les patients colonisés [40] [41]. La présence d'une colonisation nasale par *S. aureus* est d'ailleurs considérée comme un facteur de risque important de développer une infection [42] et représente une des raisons majeures de la prédominance de *S. aureus* dans les infections des sites opératoires et les infections de la peau

et des tissus mous [43] [44]. En effet, *S. aureus* suivi de *Pseudomonas aeruginosa* et des Entérobacterales, sont les micro-organismes les plus fréquemment isolés lors d'infections associées aux soins en Europe. De plus, *S. aureus* est également responsable de pneumopathies, d'infections du tractus urinaire, et surtout de sepsis et d'endocardite chez le patient fragile. Ce fort pouvoir pathogène, notamment à l'hôpital, est principalement lié aux capacités de *S. aureus* de coloniser les cathéters intravasculaires ou autres matériels implantés chirurgicaux [45]. Les conséquences cliniques associées peuvent être désastreuses et mettre en jeu ou aggraver le pronostic vital du patient.

A côté des infections nosocomiales, les infections cutanées superficielles suppurées sont les plus fréquentes expressions de *S. aureus* en milieu communautaire. Elles s'expriment lors d'une rupture de barrière protectrice de l'hôte (blessure, microtraumatisme) avec une prolifération locale de la bactérie et production de pus. Les folliculites ou les furoncles sont les entités cliniques les plus communes de ce type d'infection. La production de certaines toxines comme les exfoliatines peut engendrer des formes plus sévères telles que le syndrome de la peau ébouillantée chez le jeune enfant. A noter que la localisation de la bactérie et l'expression de facteurs de virulence conduisent au déclenchement d'entités cliniques bien différentes.

La pathogénicité de *S. aureus* est due à son répertoire de toxines, exoenzymes, adhésines et protéines immunomodulatrices qu'il peut produire. A l'exception de certaines pathologies directement liées à la production de toxines (comme les entérotoxines, exfoliatines ou la toxine du syndrome du choc toxique), aucun facteur de virulence seul n'est suffisant pour provoquer l'infection. Cette dernière est déclenchée après une succession d'actions de divers facteurs de virulence. En effet, les abcès des tissus mous et les pathologies systémiques telles que le choc septique sont le résultat de la capacité d'adhésion aux tissus, d'échappement au système immunitaire (facteurs empêchant la phagocytose, ou facteurs inhibant l'action des anticorps) et de production de protéases, exotoxines et enzymes qui causent spécifiquement des dommages aux cellules et organes et permettent la dissémination de la bactérie.

2. Problématiques de la résistance chez *S. aureus*

2.1. Facteur de résistance - définition

L'utilisation d'antibiotiques pour prévenir ou traiter une infection, promouvoir la croissance animale ou contrôler l'apparition d'une maladie dans l'agriculture, expose constamment les bactéries de la flore humaine et animale aux antibiotiques. Cette exposition favorise la sélection d'organismes plus résistants à travers la dissémination et l'expression de facteurs de résistance. Sont considérés comme facteurs de résistance, tous gènes situés sur le chromosome bactérien ou sur un plasmide, qui permettent l'expression d'une protéine dégradant l'antibiotique ou visant à protéger la bactérie de l'action de ce dernier. Plusieurs facteurs de résistances peuvent être localisés sur le chromosome ou sur un même EGM (plasmide, transposon). La facilité de dissémination des EGM au sein des flores bactériennes conduit à la sélection de bactéries multi-résistantes capables de résister à l'action de plusieurs antibiotiques.

S. aureus est listé par l'Organisation Mondiale de la Santé comme l'une des espèces bactériennes de haute importance clinique parmi plusieurs espèces regroupées sous le nom de ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter spp*). Chacune d'entre elles représente une menace pour la santé de la population mondiale [46]. Concernant *S. aureus*, la plus grande inquiétude justifiant son inscription dans ce groupe, provient de sa faculté à résister aux β -lactamines et glycopeptides. En effet, de sérieuses impasses thérapeutiques peuvent être engendrées par le *Staphylococcus aureus* résistant à la Mécilline (SARM) qui résiste à l'action de toutes les β -lactamines (sauf les céphalosporines de 5^{ème} génération : ceftobiprole, ceftaroline), ou encore du *S. aureus* intermédiaire/résistant à la Vancomycine (VISA /VRSA). A côté de ces deux résistances préoccupantes, il ne faut pas négliger la dissémination d'autres gènes de résistance aux antibiotiques, qui peuvent compliquer le traitement de certaines infections chez l'Homme [47].

2.2. Evolution de la résistance aux β -lactamines

La résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* est apparue de façon croissante après les introductions successives de différents antibiotiques anti-staphylococciques. Schématiquement, chaque décennie amène à l'émergence de nouveaux clones [48]. Les β -lactamines ont été les premiers antibiotiques massivement utilisés en clinique humaine et constituent encore aujourd'hui le traitement de première intention. Très rapidement après leur

introduction, l'apparition de mécanismes de résistance a complexifié le traitement et nécessité la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques.

2.2.1. Mécanisme de résistance à la pénicilline

Dès l'introduction de la pénicilline dans les années 1940, une nette augmentation des souches résistantes aux Pénicillines G est apparue. Elle fut plus tard expliquée par la diffusion du gène *blaZ* qui confère la résistance aux pénicillines par production d'une sérine β -lactamase qui dégrade le noyau β -lactame des pénicillines. Ce gène de résistance a rapidement disséminé dans les souches de *S. aureus* pour atteindre plus de 90% des isolats à l'heure actuelle. Il est essentiellement porté par le transposon Tn552, qui se retrouve localisé sur un plasmide ou même parfois intégré au chromosome [49].

2.2.2. Mécanisme de résistance à la méticilline

Depuis l'apparition en 1960 des premières souches résistantes à la méticilline, le SARM est devenu un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. En effet, l'apparition d'une telle résistance empêche l'utilisation de la quasi-totalité des β -lactamines. Cette résistance est conférée quasi-exclusivement par le gène *mecA* qui code une protéine liant les pénicillines (PLP) ayant une affinité diminuée pour les β -lactamines, la PLP2a. Le gène *mecA* est localisé au sein d'un îlot génomique chromosomique dénommé *Staphylococcus Cassette Chromosome* (SCCmec) [25]. Le nombre de gènes de résistance localisés dans cet îlot peut différer selon la présence d'autres transposons dans la cassette. De ce fait, la variabilité des cassettes est importante et il est possible de distinguer plusieurs variants alléliques de SCCmec. Les variants de type IV et V (plus petits en taille) sont retrouvés quasi-systématiquement chez les souches de SARM d'origine communautaire tandis que les SARM nosocomiaux portent plus fréquemment les types I, II ou III.

A côté du gène *mecA*, le gène homologue *mecC* a pu être détecté au sein de la cassette SCCmec et confère également un phénotype de SARM [50]. Il doit être suspecté devant toute souche résistante à la méticilline en l'absence du gène *mecA* [51]. Plus exceptionnel encore, le gène *mecB* habituellement présent dans le genre *Micrococcus* a aussi été décrit chez *S. aureus* [52].

Initialement, les clones de SARM étaient uniquement retrouvés en milieu hospitalier, là où la concentration en antibiotiques était la plus forte. Depuis 20 ans, les clones de SARM communautaires sont de plus en plus fréquents et peuvent causer de sérieuses infections de la peau et des tissus mous. Certaines souches de SARM sont caractéristiques et endémiques d'une zone géographique donnée, tandis que d'autres ont pu diffuser au niveau mondial. C'est le cas par exemple du clone ST8-USA300 ou du clone ST80 en Europe, qui ont diffusé massivement à la fin des années 1990. Depuis les années 2010, en Europe, ce sont des clones de SARM retrouvés chez l'animal comme le CC398, qui prédominent à côté d'autres complexes clonaux tels les CC5, 8, 22, 30 ou 45 (Figure 7) [53][54].

L'épidémiologie des SARM évolue constamment tout comme l'apparition de nouvelles cassettes SCCmec et cette coévolution apparaît primordiale pour l'émergence de nouveaux clones à haut pouvoir de diffusion. C'est ainsi que l'apparition du SCCmec de type IV dans de nombreux CC (Figure 7) ainsi que chez *Staphylococcus epidermidis* suggère le haut pouvoir de transmission et/ou le faible coût métabolique de cet élément génétique.

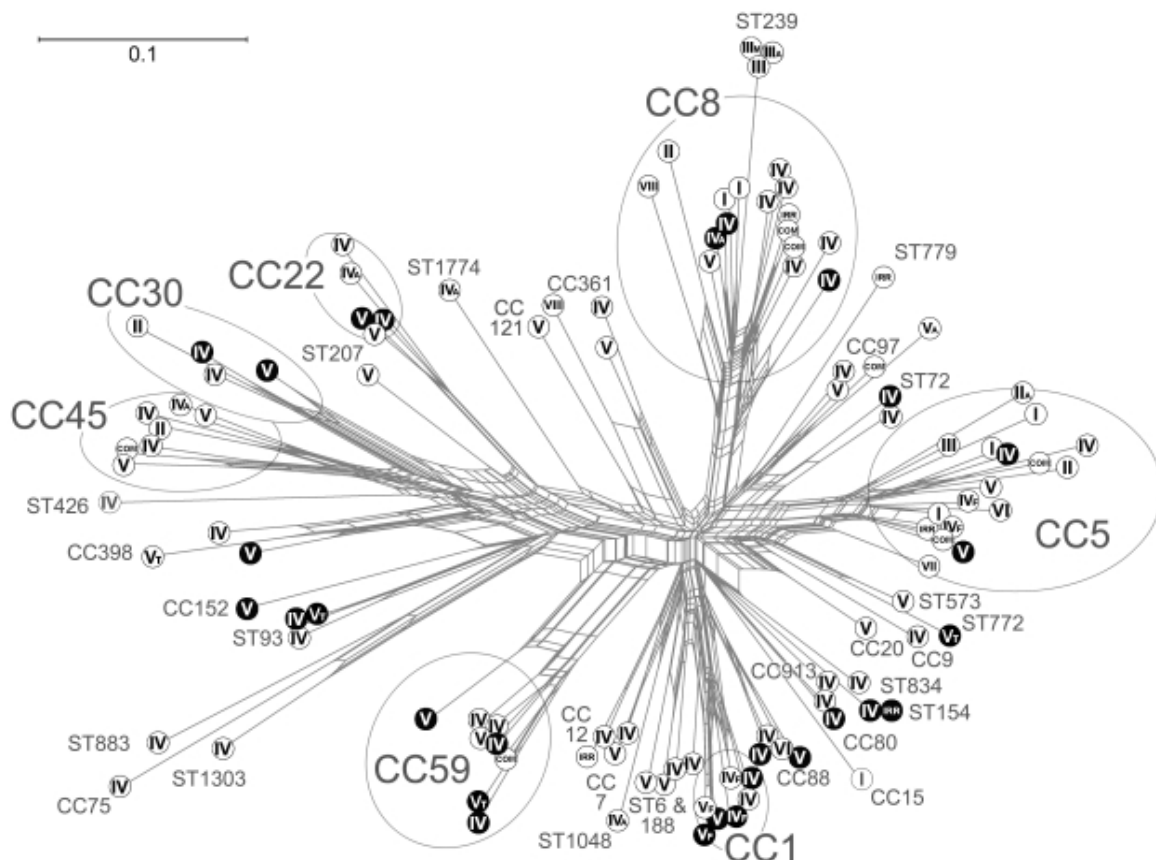


Figure 7 : Schéma en réseau de la proximité génétique entre complexes clonaux des SARM et des relations entre éléments génétiques SCCmec. D'après Monecke S et al [32].

Chaque clone est représenté par un trait et défini selon son ST, son CC s'il existe, ainsi que le type de SCCmec retrouvé (type I, II, III, IV, V, VI, VII ou VIII).

Bien que le SARM reste difficile à traiter, la détection et le contrôle de la diffusion des clones ainsi que l'amélioration de l'usage des antibiotiques ont permis de limiter son expansion. En France, environ 10 à 20% des souches de *S. aureus* isolées de prélèvements invasifs sont des SARM (Figure 8). Ce chiffre continue de baisser depuis dix ans mais prouve que le SARM reste toujours un pathogène important en clinique.

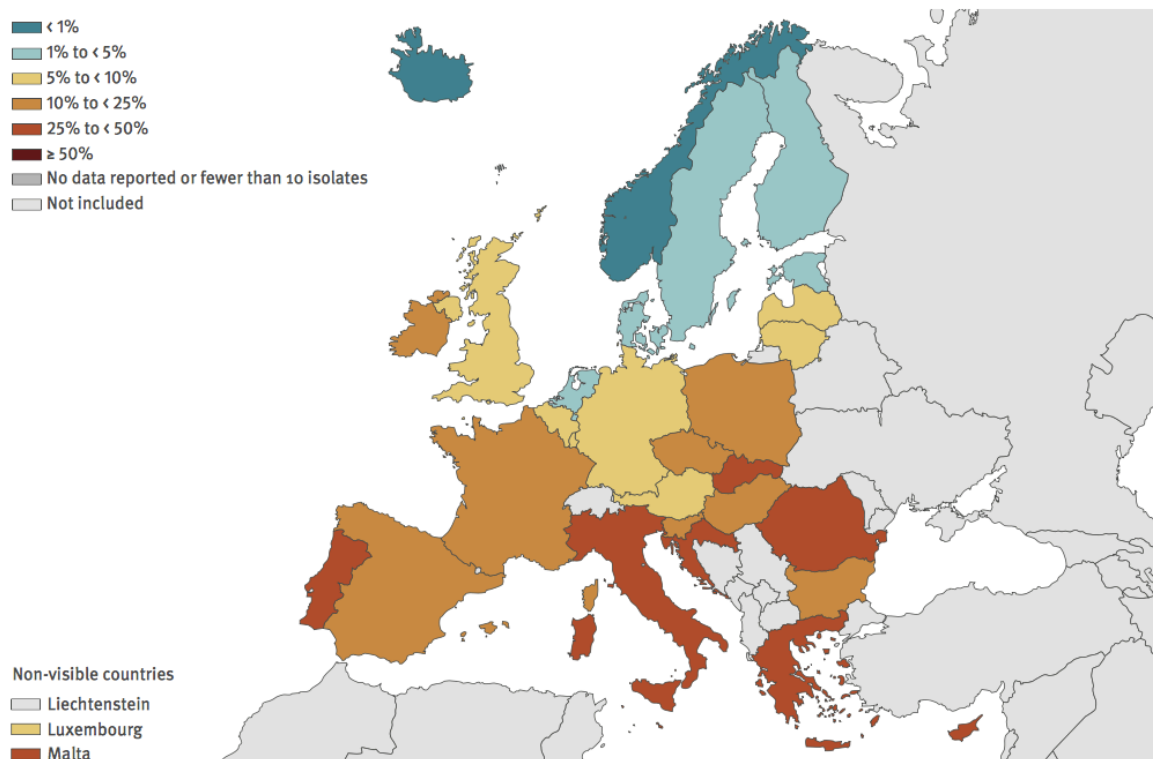


Figure 8 : Proportion de souches cliniques de SARM isolées de prélèvements invasifs en Europe. D'après le rapport 2018 du réseau EARS-Net [55].

2.3. Evolution de la résistance aux autres antibiotiques

S. aureus a développé de très nombreux mécanismes de résistance aux différents antibiotiques anti-staphylococciques comme résumé dans le Tableau 2. A chaque fois, l'apparition de telles résistances s'est effectuée après l'utilisation incontrôlée des antibiotiques. La plupart de ces mécanismes mettent en jeu un gène de résistance transmis par un EGM (le plus souvent plasmidique) bien qu'il existe également des mutations chromosomiques ponctuelles, concernant par exemple les fluoroquinolones ou l'acide fusidique.

La résistance aux fluoroquinolones chez *S. aureus* est surtout chromosomique et s'exprime en plusieurs temps. L'étape initiale d'acquisition de résistance implique une mutation faux-sens dans la sous-unité A de la topoisomérase IV codée par le gène *grlA*. L'apparition

d'une deuxième mutation faux-sens, cette fois dans le gène *gyrA*, est indispensable pour obtenir un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones (Tableau 2).

Tableau 2 : Mécanismes d'acquisition chromosomique de la résistance aux fluoroquinolones chez *S. aureus*. D'après Bisognano C. [56]

Mutant/Sauvage	Mutations		CMI de Ciprofloxacine (µg/ml)
	<i>gyrA</i>	<i>griA</i>	
Souche sensible	-	-	0.25
Mutant 1 ^{ère} étape	-	Ser 80 Tyr Ou Glu 84 Lys	2
Mutant 2 ^{ème} étape	Glu 88 Lys Ou Ser 84 Leu	Ser 80 Tyr Ou Glu 84 Lys	32

La résistance à la vancomycine a initialement été décrite chez les entérocoques. Néanmoins, il est très vite apparu de premiers mutants résistants à la vancomycine chez *S. aureus*. Cette constatation est inquiétante, d'autant plus que la vancomycine représente le traitement de choix des infections à SARM. Le transfert de résistance s'est effectué lors d'une co-infection via un plasmide conjugatif portant le transposon Tn1546. Ce dernier transporte le gène *vanA*, responsable de la synthèse d'un peptidoglycane différent avec la production d'un dipeptide D-Ala-D-Lactate, ce qui rend inefficace l'action de la vancomycine [57].

La résistance aux autres antibiotiques anti-staphylococciques ainsi que leur support de résistance sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*. Adapté d'après Malachowa N *et al* [8]

Antibiotique	Gène de résistance	Support génétique	Protéine	Mécanisme de résistance
β-lactamines	<i>blaZ</i>	Transposon (Tn552), Plasmides	β-lactamase	Hydrolyse enzymatique du noyau β-lactame
	<i>mecA mecC</i>	Cassettes SCCmec	PLP2a, PLP2c	Affinité réduite pour les β-lactamines
Glycopeptides	GISA : ?	?	Peptidoglycane altéré	Blocage de la vancomycine dans la paroi cellulaire
	VRSA : <i>vanA</i>	Transposon Tn1546	D-Ala-D-Lac	Synthèse d'un dipeptide avec une affinité réduite pour la vancomycine
Fluoroquinolones	<i>parC</i>	Chromosomique	Région ParC de la Topoisomérase IV	Mutations dans le domaine QRDR réduisant l'affinité du complexe enzyme-ADN avec les quinolones
	<i>gyrA / gyrB</i>	Chromosomique	Région GyrA et GyrB de l'ADN Gyrase	
Aminosides	<i>aac, aph...</i>	Transposon (Tn4001), Plasmides	Acétyltransférase, phosphotransférase	Enzymes permettant l'acétylation et la phosphorylation des aminosides
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	<i>sulA</i>	Plasmides	Dihydroptéroate synthase	Surproduction d'acide p-aminobenzoïque par l'enzyme
	<i>dfrB</i>	Plasmides	DHFR	Affinité réduite pour la DHFR
Acide fusidique	<i>fusA</i>	Chromosomique	Facteur d'élongation G (EF-G)	Mutations ponctuelles diminuant l'affinité de l'antibiotique pour sa cible
	<i>fusB/fusC</i>	Plasmides, SaPI, SCC	Protéine de protection de EF-G	Protection de la cible
Tétracyclines	<i>tetM</i>	Transposon (Tn5801)	Protéine de protection du ribosome	Protection du ribosome et impossibilité de la liaison de l'antibiotique au site actif
	<i>tetK</i>	Plasmides, SCC	Pompe d'efflux	Pompe d'efflux
Erythromycine	<i>msrA</i>	Plasmides	Pompe d'efflux	Pompe d'efflux
	<i>erm(A,C)</i>	Transposon (Tn551/554), Plasmides, SCC	Méthylase ribosomale	Altération de l'ARNr 23S
Clindamycine	<i>erm(A,C)</i>	Transposon (Tn551/554), Plasmides, SCC	Méthylase ribosomale	Altération de l'ARNr 23S
Linézolide	<i>cfr</i>	Plasmide	Méthyltransférase ribosomale	Méthylation de l'ARNr 23S
Daptomycine	<i>mprF</i>		Lysylphosphatidylglycerol synthetase	Augmentation de la synthèse de LPG, translocation externe de LPG, changement de charges du LPG à la membrane

3. Les facteurs de virulence chez *S. aureus*

3.1. Facteur de virulence - définition

La virulence bactérienne est définie comme la capacité d'une bactérie à entrer, à se répliquer et à persister dans un site de l'hôte normalement stérile et inaccessible aux espèces bactériennes commensales. La virulence permet de mesurer la pathogénicité engendrée par un microorganisme et peut être déterminée expérimentalement en évaluant le nombre de bactéries nécessaires pour induire la lésion, la maladie ou la mort d'un animal. Le degré de virulence est donc directement relié à la capacité de cet organisme à déclencher une pathologie malgré les mécanismes de défense mis en route par le système immunitaire de l'hôte. Plusieurs variables affectent la virulence comme le nombre minimal de bactéries infectantes, la voie d'entrée chez l'hôte, l'état et la capacité des réponses du système immunitaire de l'hôte ainsi que les gènes codants des facteurs de virulence présents dans le génome du microorganisme.

Un facteur de virulence est défini comme toute protéine, glycoprotéine ou lipide exprimé ou sécrété par la bactérie qui l'aide à envahir et franchir les barrières de l'hôte, à provoquer la maladie ou à échapper au système immunitaire. De très nombreux facteurs de virulence ont été décrits dans la littérature et classés selon leur mécanisme d'action (Tableau 4). Les gènes qui codent ces différents facteurs peuvent être présents sur le génome chromosomique bactérien et participer à la structure de la bactérie mais ils peuvent également être présents sur un EGM acquis de l'environnement, probablement à partir de SCN ou de Streptocoques commensaux [7].

Etant intrinsèquement immobile, *S. aureus* ne possède pas de flagelle ou d'autres facteurs de virulence liés à la mobilité. En revanche, il peut être doté d'un vaste répertoire de gènes de virulence essentiellement impliqués dans l'adhésion et les dommages aux tissus cellulaires, avec en particulier un vaste panel de toxines responsables de pathologies fulgurantes. On distingue classiquement chez *S. aureus* :

- les protéines de surface permettant d'adhérer et de coloniser la peau, les muqueuses ou les matériaux,
- les enzymes et les toxines responsables de dommages tissulaires,
- les protéines impliquées dans l'échappement de la réponse immunitaire,
- les mécanismes de régulation d'expression des gènes de virulence.

La plupart de ces facteurs de virulence ont été particulièrement bien décrits chez *S. aureus* puisque la production de certaines toxines engendre l'apparition de pathologies souvent impressionnantes et fulgurantes. La mortalité associée reste toujours grande. Ceci est notamment le cas des entérotoxines responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ou de la leucocidine de Panton-Valentine avec l'apparition de pneumonies nécrosantes chez le sujet jeune.

Tableau 4 : Classification des mécanismes de virulence bactériens. D'après Webb S. et Kahler C. [58]

Adhésion

Adhésion lâche
Adhésion intime

Invasion

Transcellulaire
Intracellulaire

Mécanismes de survie intracellulaire

Echappement à l'action du phagosome
Blocage de la formation du phagolysosome
Prévention de l'apoptose de la cellule hôte

Mécanismes de survie extracellulaire

Mécanismes anti-phagocytaires
Résistance à l'action du sérum

Acquisition de nutriments

Systèmes de captation du fer

Dommages tissulaires ou cellulaires

Cytotoxines
Enzymes dégradant la matrice extracellulaire

Mobilité

Flagelle
Motilité de contraction ou « *twitching motility* »

Formation de biofilm

Régulation de la virulence

Perception de l'environnement
Perception des autres bactéries : *Quorum sensing*

3.2. L'adhésion

Le succès en tant que pathogène de *S. aureus* est en grande partie dû à sa capacité d'adhérer à de nombreux tissus. En effet, *S. aureus* possède un véritable arsenal de protéines de surface permettant l'adhésion et l'ancrage aux cellules de l'hôte. Cela lui permet de facilement coloniser les muqueuses et les épithéliums. La paroi bactérienne est essentiellement composée de peptidoglycane ainsi que d'acides teichoïques et lipoteichoïques, qui représentent plus de 60% de la masse de la paroi et possèdent des propriétés d'adhésion grâce à leurs fortes charges négatives. Le peptidoglycane permet, quant à lui, l'ancrage de certaines protéines de surface. Celles-ci peuvent être classées selon leur propriétés structurales et fonctionnelles. Classiquement, on distingue les MSCRAMMs ou « *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* » des protéines de surface sécrétées ou SERAMs (« *Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules* »).

3.2.1. Les MSCRAMMs

Les MSCRAMM sont un ensemble de protéines associées au peptidoglycane et appartenant à la superfamille des adhésines. L'appartenance au groupe des MSCRAMMs est définie par la présence structurelle en région N-terminale de deux domaines IgG-like adjacents impliqués dans la liaison au ligand [59]. Le collagène ou le fibrinogène localisés à la surface des cellules hôtes sont les ligands principaux. Ces protéines sont synthétisées par la bactérie, adressées à la membrane cellulaire puis transférées vers le peptidoglycane grâce à la sortase, une enzyme localisée à la surface cellulaire.

La fonction des MSCRAMMs est de lier la bactérie spécifiquement aux molécules de la matrice extracellulaire, ce qui permet son ancrage à la surface cellulaire. Ce sont les protéines les plus prévalentes à la surface de *S. aureus*, qui est capable d'en exprimer plus de vingt différentes. En outre, un même MSCRAMMs peut souvent exercer diverses fonctions et ainsi reconnaître plusieurs ligands. Elles jouent donc un rôle essentiel dans l'adhésion mais peuvent aussi être impliquées dans l'échappement aux réponses immunitaires, la formation d'abcès internes ou la fabrication de biofilm.

Les MSCRAMMs sont classifiées en fonction des protéines auxquelles elles adhèrent, telles que le fibrinogène (*clumping factor A et B*), la fibronectine (*fibronectin binding protein A et B*) ou le collagène (*collagen binding protein*).

3.2.1.1. Le *clumping factor* ou coagulase liée

Les **clumping factor A (ClfA) et B (ClfB)** sont deux MSCRAMMs majeurs de *S. aureus*. Elles appartiennent à la famille des *Sérine-aspartate repeat-containing protein* (ou Sdr). L'adhésion aux cellules épithéliales s'effectue grâce à un pont impliquant le fibrinogène, lui-même lié à une intégrine de la cellule hôte. Ce sont des facteurs de virulence particulièrement bien reconnus chez *S. aureus* puisqu'ils permettent, entre autres, son adhésion aux dispositifs médicaux implantables (cathéters, sondes...), ce qui représente une voie d'entrée principale lors d'infections nosocomiales. Une fois dans le sang, la liaison du ClfA au fibrinogène libre du plasma sanguin active le mécanisme d'agglutination, d'où son nom de « Facteur d'Agglutination A ». L'agglutination du plasma permet de protéger la bactérie de l'opsonisation et, de ce fait, confère à ClfA une activité antiphagocytaire. ClfA serait également impliquée dans le clivage de la protéine du complément C3b, protégeant ainsi la bactérie de son action [60]. ClfB est quant à lui particulièrement impliqué dans la colonisation nasale de *S. aureus*, ce qui explique sa niche écologique chez l'Homme [61].

Six autres protéines appartenant à la famille Sdr ont été décrites chez *S. aureus*, mais leurs rôles en tant que facteurs de virulence restent débattus. Il a été montré que SdrC et SdrD joueraient également un rôle dans l'adhésion de *S. aureus* à l'épithélium nasal tandis que SdrE, SdrF, SdrG et SdrH seraient impliqués dans l'adhésion aux molécules de collagène et dans l'agrégation plaquettaire.

3.2.1.2. Les protéines liant la fibronectine

Les **fibronectin binding proteins (FnBPs)** ont été les premières protéines de surface décrites chez les bactéries à Gram positif. Ces protéines sont chacune codées par un gène, *fnbA* et *fnbB*, qui sont retrouvés dans la majorité des souches de *S. aureus*, bien que quelques complexes clonaux tels que CC30 ou CC45 n'ont été décrits qu'avec le gène *fnbA* [62]. L'adhésion, chez l'hôte s'effectue par un pont impliquant la fibronectine, elle-même reconnue par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Celle-ci est largement répandue à la surface des cellules de l'hôte [63]. La liaison à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ peut entraîner des réarrangements du cytosquelette de la cellule hôte et conduire à l'internalisation de la bactérie dans la cellule sans qu'elle ne soit dégradée. Ce mécanisme permet, en plus, d'échapper au système immunitaire. Enfin, la forte affinité pour la fibronectine est également impliquée dans l'adhésion de *S. aureus* au matériel médical implanté.

3.2.1.3. La protéine liant le collagène

La **protéine liant le collagène** ou Cna (« *collagen binding protein* ») est impliquée dans la survenue d'arthrites et de spondylodiscites septiques à *S. aureus* [64]. Elle prévient également l'activation de la voie classique du complément par fixation et séquestration de la protéine C1q [65].

3.2.2. La protéine A

Première protéine identifiée chez *S. aureus* en 1972 [66], c'est la protéine de surface la mieux connue et la plus étudiée. Son intérêt en microbiologie et en épidémiologie est important puisqu'elle demeure un marqueur essentiel de détection de *S. aureus* en biologie moléculaire et permet toujours d'aider à caractériser la proximité phylogénétique entre différents isolats cliniques (spa typing). C'est un facteur de virulence majeur puisqu'elle peut se lier au fragment Fc des immunoglobulines gamma (IgG) et ainsi bloquer l'opsonisation médiée par les anticorps. Par un mécanisme similaire de liaison au récepteur Fab, elle peut également modifier le développement des lymphocytes B et conduire à leur apoptose (Figure 9). Le blocage du système immunitaire engendré retarde la dégradation des bactéries par la réponse immunitaire innée et l'activation de la réponse immunitaire adaptative, ce qui permet à la bactérie de disséminer plus facilement. Par ailleurs, la protéine A peut se lier au facteur de Willebrand présent à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales endommagées, ce qui favorise les infections endovasculaires (endocardites, thromboses septiques...) [67]. De même, il a été démontré par Gomez et al que la protéine A peut se lier au récepteur du TNF α très présent à la surface des épithéliums respiratoires et déclencher une forte réponse inflammatoire impliquée dans la physiopathologie de la pneumonie à *S. aureus* [68].

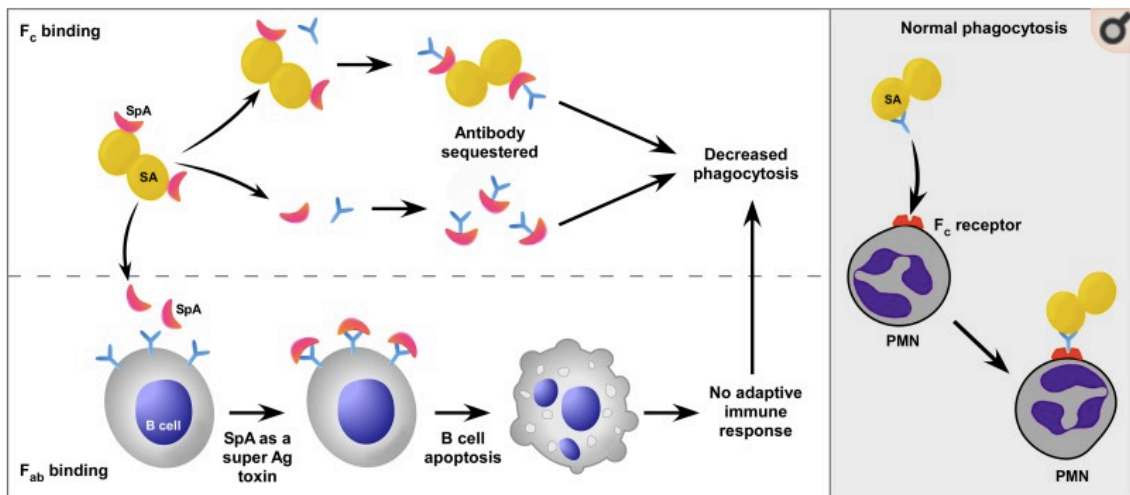


Figure 9 : Mécanisme d'échappement de la réponse immunitaire par la protéine A.

D'après Kobayashi S et DeLeo F [69].

SpA (en rouge) est retrouvée à la fois à la surface de *S. aureus* et sécrétée dans le milieu environnant afin de lier la région Fc des anticorps et d'empêcher la phagocytose médiée par les polynucléaires neutrophiles. SpA peut également lier la région Fab des récepteurs lymphocytaires ce qui conduit à leur apoptose et empêche ainsi la fabrication d'anticorps spécifiques. PMN = polynucléaire neutrophile, SA = *Staphylococcus aureus*, Ag = antigène, SpA = protéine A de *S. aureus*

3.2.3. Les SERAMs

Les SERAMs ne possèdent pas, à la différence des MSCRAMMs, de propriétés structurales communes. Il s'agit de protéines sécrétées par la bactérie, qui se lient de façon non covalente (liaisons hydrophobes ou électrostatiques) à plusieurs protéines de la matrice extracellulaire ou du plasma. Les actions engendrées sont souvent nombreuses et interfèrent avec les mécanismes de défenses immuns.

3.2.3.1. La coagulase libre

La **staphylocoagulase** ou **coagulase libre** (ou Coa) est une enzyme caractéristique de *S. aureus*. Elle a pendant longtemps permis de le différencier microbiologiquement des autres Staphylocoques. C'est une protéine sécrétée par la bactérie, qui peut lier la prothrombine, l'activer sans nécessiter la cascade de la coagulation et, ainsi, conduire à la formation de caillots. La manipulation de l'hémostase par la coagulase contribue ainsi à l'échappement au système immunitaire et à la dissémination de la bactérie par la formation de microcaillots. Elle joue un rôle primordial dans la formation d'embolus septiques, qui contribuent à la mortalité élevée dans le sepsis et dans l'endocardite [70].

3.2.3.2. Les autolysines

Les **autolysines** sont des enzymes localisées au niveau de la paroi des bactéries et impliquées dans l'hydrolyse du peptidoglycane. Leur action est primordiale pour la dégradation de la paroi bactérienne ou lors de la division cellulaire. Elles sont également fortement activées lors d'un traitement par β -lactamines et contribuent à l'effet bactéricide observé. L'autolysine majeure (ou AtlE) de *S. aureus* est capable, tout comme les acides téichoïques de la paroi bactérienne, de se lier aux surfaces composées de polystyrènes. Elles jouent donc un rôle essentiel dans l'attachement aux surfaces abiotiques (Figure 10). Cela constitue d'ailleurs la première étape de la colonisation du matériel médical (avec les acides téichoïques) pouvant conduire au développement d'infections locales ou disséminées.

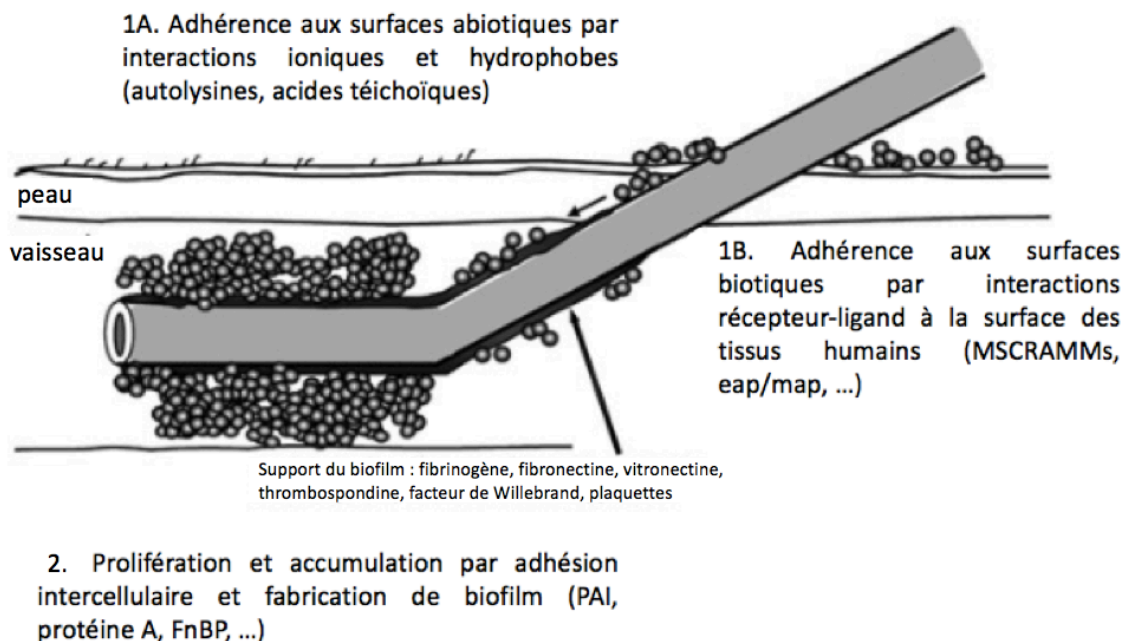


Figure 10 : Etapes de colonisation du matériel implanté par *S. aureus*. D'après Heilmann C *et al* [71].

3.2.3.3. Autres SERAMs

D'autres SERAMs possèdent un spectre d'adhésion plus large encore comme les **eap/map** ou « *extracellular adherence proteins/ MHC II analogous proteins* », qui présentent une forte affinité à diverses protéines de la matrice extracellulaire telles que le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine, ou encore les sialoprotéines ou la thrombospondine exprimée à la surface du tissu osseux [72]. Les eap/map favorisent l'adhésion bactérienne aux produits de dégradation de la matrice extracellulaire et permettent l'internalisation de la bactérie. Il a

également été démontré que les protéines eap/map sont capables de se lier à l'ADN libre et de l'agréger, ce qui constitue un moyen de défense efficace à la formation des NETs (ou *Neutrophil Extracellular Traps*) par les polynucléaires neutrophiles [73].

La protéine **Efb** (*fibrinogen binding protein*), capable de se lier au fibrinogène plaquettaire, a également une action immunomodulatrice sur le système immunitaire par liaison directe au facteur C3 natif du complément. Cette liaison empêche l'activation des voies classique et alternative du complément, et donc l'opsonisation médiée par le complément [74].

Enfin, les **Ebp** ou protéines liant l'élastine sont cruciales pour la bactérie pour coloniser certains tissus riches en élastine comme le poumon, la vessie ou la peau. Ces facteurs de virulence sont donc très fréquents dans les souches de *S. aureus* isolées chez l'Homme [75].

3.3. La formation de biofilm

Une caractéristique supplémentaire de *Staphylococcus aureus* réside dans sa capacité et sa grande facilité à former du biofilm. C'est pourquoi il est un pourvoyeur important d'infections sur matériel médical invasif (sondes, cathéters, prothèses...). La formation de biofilm confère à la bactérie des avantages d'adhésion, de multiplication, de dissémination mais également de résistance à l'action du système immunitaire et à certains antibiotiques. En effet, le biofilm empêche la bonne pénétration des antibiotiques, et promeut la dormance de certaines bactéries (ralentissement du métabolisme), ce qui augmente les problématiques de traitements, la plupart des antibiotiques n'étant actifs que sur des bactéries en phase de multiplication [76]. Il est d'ailleurs estimé que 60 à 80% des infections humaines sont associées à la production d'un biofilm. Ces données soulèvent le besoin de compréhension de ce mécanisme pour pouvoir potentiellement réduire sa production et donc mieux traiter les patients.

La formation du biofilm est un processus complexe qui débute par la liaison de certaines adhésines aux surfaces, en particulier grâce aux différents MSCRAMMs présents sur la paroi bactérienne. Ce premier signal induit la production d'une matrice extracellulaire (MEC) composée de polysaccharides, d'ADN extracellulaire et de protéines. Les polysaccharides décrits dans le biofilm, également connus sous le nom de poly-N-acetyl-glucosamine (PNAG) ou *Polysaccharide Intercellular adhesin* (PAI), possèdent une charge positive qui interagit avec les charges négatives de la paroi bactérienne. La synthèse de ces polysaccharides est contrôlée par l'opéron *ica* (*intercellular adhesion*) composé de cinq gènes, dont les protéines sont actuellement reconnues comme des facteurs de virulence (Figure 11) [77][78].

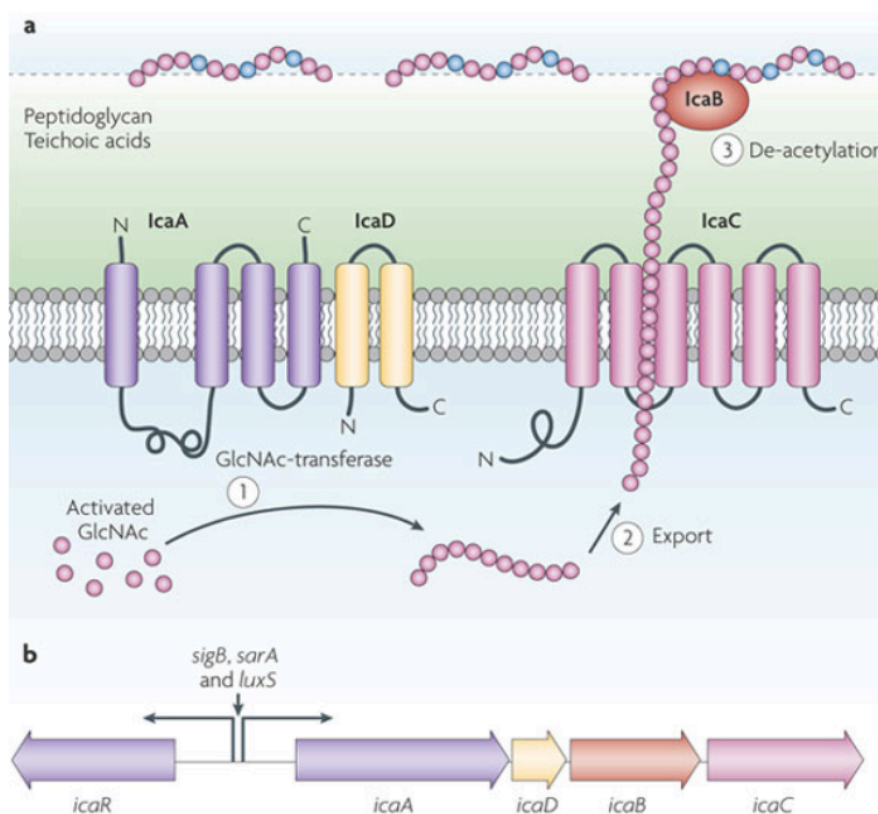


Figure 11 : Rôle des protéines IcaA, IcaB, IcaC et IcaD dans la production des polysaccharides du biofilm. D'après Otto M *et al* [78]

a. IcaA, localisée au niveau de la membrane plasmidique, permet avec l'aide d'IcaD la synthèse d'un homopolymère de bêta 1-6 N-acétylglucosamine. Ce dernier est exporté grâce à la protéine transmembranaire IcaC. Enfin, IcaB permet la dé-acétylation de quelques groupes conférant l'activité cationique essentielle du polysaccharide pour l'adhésion aux surfaces.

b. Description de l'organisation génomique de l'opéron *ica*, régulée par le gène *icaR* codant une protéine régulatrice.

3.4. Les dommages tissulaires et cellulaires

3.4.1. Les exoenzymes

Nous avons précédemment vu que *S. aureus* peut produire un abondant biofilm. Néanmoins, il est capable de sécréter de nombreuses enzymes capables de dégrader la MEC environnante et remodeler ce biofilm. Ceci afin de s'adapter à son environnement immédiat, de profiter de nouvelles niches de réplication ou pour produire certains substrats nécessaires à son métabolisme et à sa réplication.

3.4.1.1. Inducteurs enzymatiques chez l'hôte

Les facteurs de virulence appartenant à ce groupe d'exoenzymes activent certaines voies enzymatiques de l'hôte. L'effet généré sert généralement à protéger la bactérie de la réponse innée du système immunitaire. Parmi ces exoenzymes, on retrouve essentiellement la **coagulase** libre (Coa) mais aussi la **staphylokinase** (Sak) [79]. Ces deux protéines détournent le système de la coagulation, la première en activant la prothrombine et la deuxième en activant la formation de plasmine (Figure 12). La staphylokinase permet ainsi de désolidariser au moment opportun les microthrombi formés par la coagulase Coa pour favoriser la dissémination de *S. aureus*. Il est ainsi remarquable de constater à quel point *S. aureus* a su détourner les voies physiologiques de l'Homme pour disséminer.

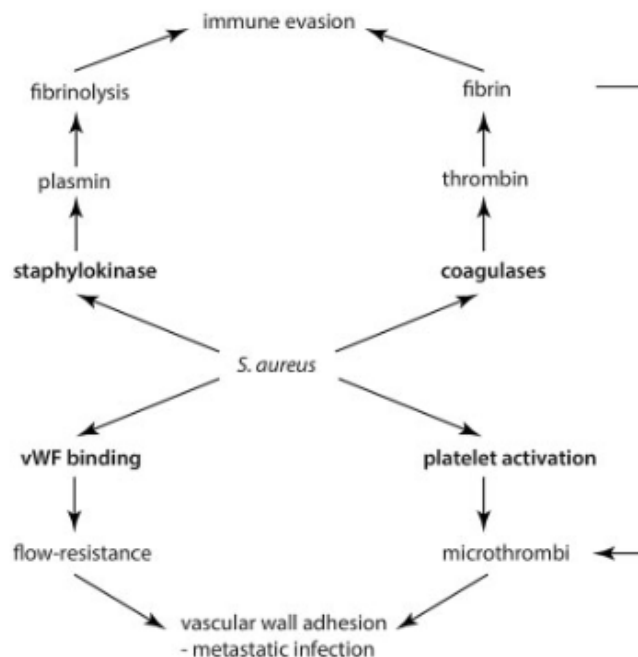


Figure 12 : Détournement des voies de la coagulation par *S. aureus* pour échapper au système immunitaire. D'après Peetermans *et al* [70].

Comme le montre la Figure 3, le gène *sak* est présent sur des souches lysogéniques de staphylocoques. En effet, il est souvent retrouvé sur un élément prophagique et essentiellement si l'intégrase est de type 3 (exemples : Φ NM3, Φ Sa3...)

3.4.1.2. Enzymes dégradant la MEC

Il existe de très nombreuses enzymes chez *S. aureus* qui dégradent tout type de composés tissulaires. Le Tableau 5 recense les principales enzymes, leurs substrats, leurs fonctions physiologiques et leur impact en termes de virulence chez l'hôte. Il est intéressant de constater que ces enzymes sont parfois regroupées en cluster de gènes et issues d'une même pré-protéine. Bien entendu ces enzymes ont un rôle primordial dans la destruction tissulaire pour permettre la dissémination de la bactérie et ont donc une action à l'opposé des molécules d'adhésion. Il existe donc un équilibre entre adhésion et dissémination, qui passe par l'expression différentielle de ces facteurs de virulence. Toutefois il est intéressant de souligner qu'elles peuvent également avoir un rôle dans l'échappement aux réponses immunes avec par exemple un rôle dans la dégradation de peptides antimicrobiens, d'immunoglobulines ou encore de protéines du complément.

Tableau 5 : Principales enzymes retrouvées chez *S. aureus*. D'après Tam K. *et al* [79].

Enzyme	Gène	Substrat	Fonctions	Effet sur la virulence
Sérine protéase A	<i>splA</i>			
Sérine protéase B	<i>splB</i>			
Sérine protéase C	<i>splC</i>	Protéines à motifs inconnus	Maturation des protéines de surface	Facilite la colonisation
Sérine protéase D	<i>splD</i>		Modulation de la production des facteurs de virulence	Impact global sur l'expression de la virulence
Sérine protéase E	<i>splE</i>			
Sérine protéase F	<i>splF</i>			
Sérine protéase V8	<i>sspA</i>	Protéines à motifs inconnus	Enzyme nécessaire à la survie et à la croissance de <i>S. aureus</i>	Dégradation des immunoglobulines humaines Rôle dans le choc septique
Cystéine protéase B	<i>sspB</i>		Maturation de SspB et SspC	
Cystéine protéase C	<i>sspC</i>	Elastine, fibrinogène, collagène...	Cystéine endopeptidase	Destruction tissulaire, ulcération Inhibition de l'activation des polynucléaires neutrophiles
			Inhibiteur de SspB	
Métalloprotéase	<i>aur</i>	Nombreux	Maturation et clivage de diverses protéines de surface / sécrétées	Clivage de la protéine C3 du complément Clivage de peptides antimicrobiens
Thermonucléase	<i>nuc</i>	ADN, ARN	Activité d'endo et exo-nucléase	Relâchement du biofilm par dégradation de l'ADN libre. Dégradation et échappement aux NETs Induction de l'apoptose des macrophages
Hyaluronidase	<i>hysA</i>	Acide hyaluronique	Dégradation des polymères d'acides hyaluroniques	Dégradation de la MEC : dommages tissulaires (rôle avéré dans la pneumopathie chez la souris) Dissémination de la bactérie
Lipases	<i>lipI/geh</i>	Triglycérides	Production d'acides gras à chaînes courtes	Colonisation de sites riches en acides gras (sébum, peau) Empêche le développement de la flore locale

3.4.2. Les cytotoxines

La force pathogénique du *S. aureus* réside essentiellement dans sa capacité à produire de nombreuses et diverses toxines. Chaque souche est au moins dotée d'une dizaine de toxines. Parmi elles, on retrouve des exotoxines, des toxines super-antigéniques et des exfoliatines. Chacune d'entre elle a une action bien spécifique qui concourt à la pathogénicité et à la clinique induite par la souche. Pour des raisons de clarté, nous ne détaillerons que les principales toxines de grand intérêt clinique.

3.4.2.1. Exotoxines

S. aureus peut porter au sein de son génome, produire et sécréter plusieurs types d'exotoxines qui peuvent endommager la membrane cellulaire des cellules humaines. Chacune de ces toxines est associée à des entités cliniques bien décrites en pathologie humaine.

3.4.2.1.1. Les hémolysines

Actuellement quatre hémolysines ont été décrit chez *S. aureus* nommées hémolysines α , β , γ et δ . Ce sont des peptides aux effets et aux tropismes bien différents mais qui utilisent un même mécanisme d'action.

L'**hémolysine α** ou **α -toxine**, codée par le gène *hla*, est la plus étudiée des hémolysines ; c'est également la plus fréquente puisque toutes les souches en sont porteuses. Elle a la capacité de s'insérer dans la membrane plasmique et d'y former des pores après oligomérisation, ce qui conduit à l'apoptose de la cellule par déséquilibre ionique. Le récepteur cellulaire de l'hémolysine α qui permet son entrée, la protéine ADAMS10, n'a été décrit qu'en 2010 [72]. L'effet de la toxine est dépendant de l'expression de ce récepteur ce qui explique pourquoi les lymphocytes et les monocytes sont particulièrement sensibles à son action tandis que les globules rouges ou les polynucléaires y résistent [81]. Elle induit une activation particulièrement importante de la réponse immunitaire innée pouvant être délétère sur les tissus de l'hôte.

L'**hémolysine β** , ou sphingomyélinase, est codée par le gène *hlyB*. Elle est très peu retrouvée dans les isolats humains mais est beaucoup plus fréquente dans les isolats vétérinaires. En effet, le gène *hlyB* est un site fréquent d'intégration de prophage ce qui détruit

l'intégrité du gène. Le phage Sa3int s'intègre en particulier à cet endroit. Ce dernier est très prédominant dans les isolats humains et porte le cluster de gènes IEC (*Immune Evasion Cluster*), impliqué dans l'échappement aux réponses de l'hôte.

L'**hémolysine δ** est constamment retrouvée dans les souches de *S. aureus*. Son action pro-inflammatoire et cytotoxique ciblée préférentiellement sur les mastocytes en fait une toxine importante dans les dermatites atopiques associées à *S. aureus* [82].

Enfin, l'**hémolysine γ** , fait partie à la fois des hémolysines et des toxines à deux composants comme les leucocidines. Ceci s'explique par son action lytique à la fois sur les érythrocytes et sur les leucocytes. Elle est présente sur plus de 99% des souches de *S. aureus*.

3.4.2.1.2. Les leucocidines

Les leucocidines sont des protéines à deux composants, c'est-à-dire que leur effet n'est présent qu'après la dimérisation de deux sous-unités (Figure 13). Trois principales leucocidines ont un intérêt notable tant pour leur mécanisme d'action que pour les effets cliniques associés. Elles sont présentes sur un nombre limité de souches et sont typiquement associées aux gènes transmis par des EGM de type prophagique.

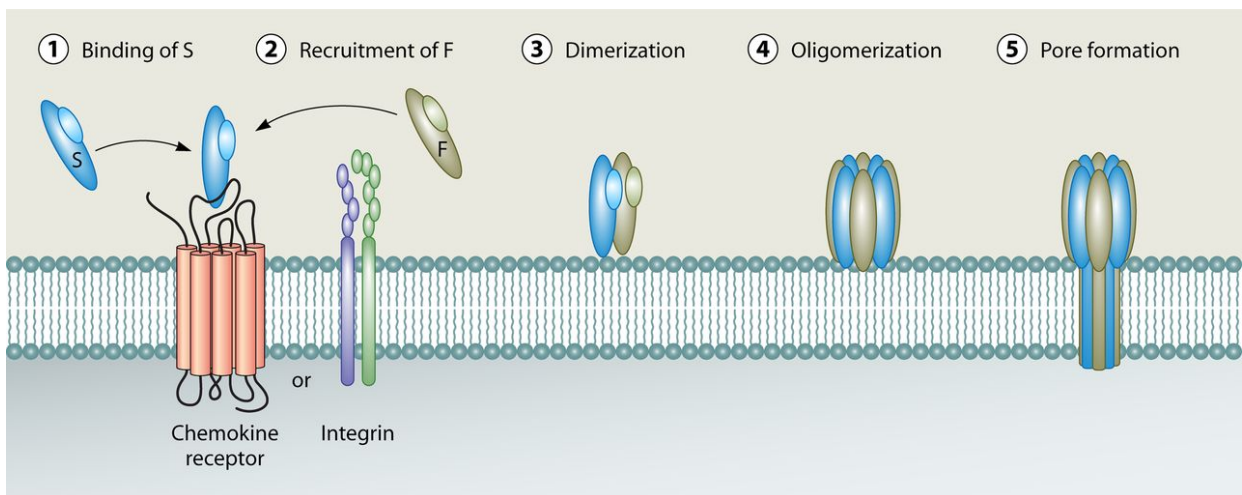


Figure 13 : Schéma de la formation de pores par les toxines à double composants dans la membrane plasmique. D'après Alonzo F. et Torres V. [83].

La sous-unité S reconnaît un récepteur cellulaire (intégrine ou récepteur aux chimiokines) qui facilite le rapprochement à la membrane plasmique. La sous-unité S recrute la sous-unité F, ce qui forme le dimère. L'oligomérisation de plusieurs dimères conduit à la formation du pore et à la lyse de la cellule par déstabilisation électrolytique.

Découverte en 1894, la **leucocidine de Panton-Valentine** (ou PVL) est une toxine cytolytique à deux composants, qui est codée par les gènes *lukPV* et *lukS*. Les deux protéines se dimérisent jusqu'à s'insérer dans la membrane plasmique afin de former un pore (Figure 13). Le tropisme de la PVL pour les polynucléaires et les monocytes conduit à la lyse de ces cellules immunitaires. Un relargage massif de cytokines s'en suit conduisant à une réponse pro-inflammatoire exceptionnellement élevée dans le tissu infecté (Figure 14). Sa présence sur le génome bactérien est étroitement corrélée à certains tableaux cliniques fulgurants comme des lésions cutanées sévères suppurées et récidivantes ou encore une pneumopathie communautaire nécrosante et hémorragique. Cette dernière survient surtout chez le sujet jeune et évolue généralement défavorablement avec l'apparition d'un état de choc ou de syndrome de détresse respiratoire aiguë. En France, moins de 5% des souches sont porteuses de PVL et la plupart de celles-ci sont sensibles à la méticilline.

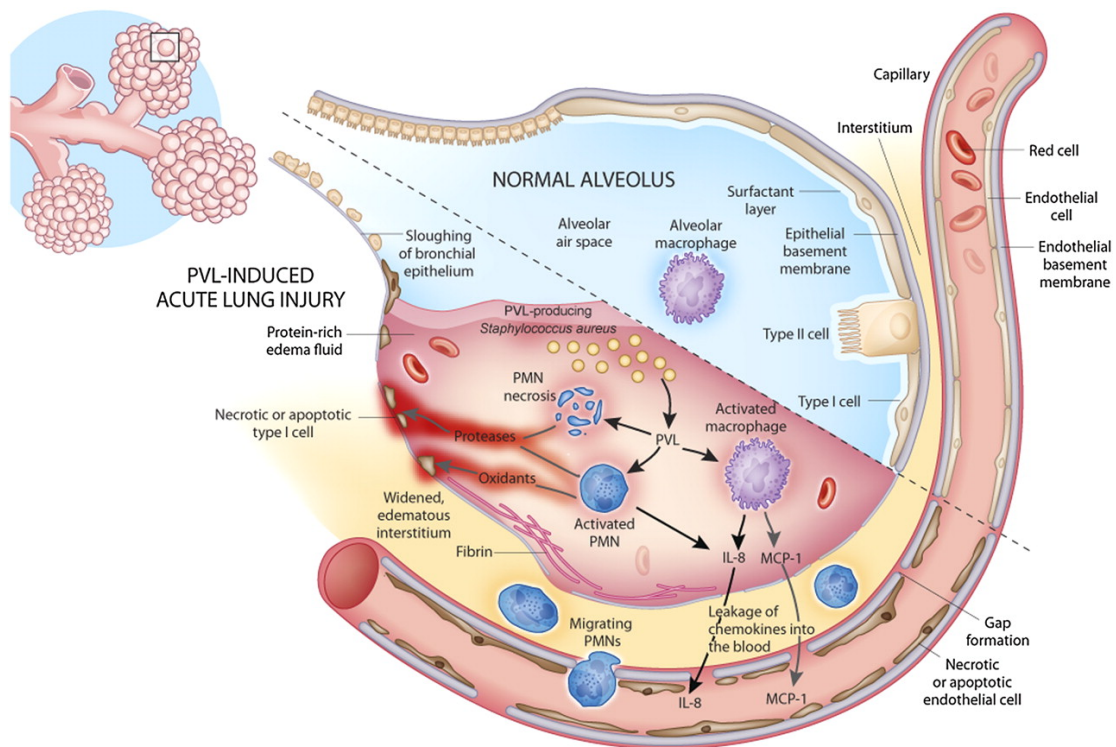


Figure 14 : Mécanismes d'action de la toxine PVL impliquée dans la survenue de la pneumonie nécrosante aiguë et dans l'inflammation pulmonaire. D'après Alonzo F. *et al* [84].

La présence d'une forte concentration bactérienne de *S. aureus* porteurs de PVL dans les poumons conduit à une production élevée de toxine. La lyse des cellules immunitaires induite par la toxine conduit au relargage massif d'enzymes et de cytokines proinflammatoires telles que l'interleukine-8 ou la chimiokine MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) contenues dans les granules des polynucléaires neutrophiles. Les cytokines sont responsables de la perméabilisation des vaisseaux sanguins permettant un afflux de cellules immunitaires au site de l'infection, tandis que les enzymes et réactifs oxygénés relargués détruisent les cellules environnantes et génèrent un œdème tissulaire.

Les **leucocidines D et E**, respectivement codées par *lukD* et *lukE*, sont présentes dans environ 70% des souches de *S. aureus*. Néanmoins, cela est très variable en fonction des CC et elles sont ainsi systématiquement absentes des CC 30, 45 ou 398 [83]. Ces gènes font partie et sont localisés au niveau de l'îlot de pathogénicité vSaβ. Celui-ci est particulièrement stable puisqu'il n'est pas mobilisable. Cependant le contenu en gènes peut varier entre souches et plus de quinze types différents ont d'ores-et-déjà été décrits en fonction des gènes présents [85].

Comme les autres leucocidines, LukD et LukE sont capables d'induire conjointement une réponse pro-inflammatoire en ciblant et lysant les cellules immunitaires par formation de pores. Mais elles permettent surtout de lyser les érythrocytes afin de faciliter la disponibilité et la captation de fer par la bactérie [86].

3.4.2.1.3. Exotoxines-like protéines

Les **exotoxines staphylococciques like** (ou SET) sont un ensemble de gènes homologues localisés sur une région chromosomique hautement variable. Plus de 37 gènes d'exotoxines ont déjà été identifiés et chaque ST contient une combinaison de cinq à dix de ces gènes. Il a d'ailleurs été envisagé de typer les différents isolats en analysant les combinaisons de gènes *set* retrouvés sur chaque souche [87]. La structure génétique de cette région variable pourrait ainsi jouer un rôle important dans le maintien évolutif de chaque ST.

Les protéines produites possèdent toutes un haut degré de similarité avec d'autres exotoxines staphylococciques. Néanmoins, bien qu'elles soient considérées comme des facteurs de virulence, leur rôle exact n'est toujours pas bien compris [88].

3.4.2.2. Les exfoliatines

Les **exfoliatines** également connues sous le nom de toxines épidermolytiques, sont des sérines protéases qui ont une très forte affinité pour la desmoglérine-1. Cette protéine est impliquée dans la formation des desmosomes, qui permettent la liaison des kératinocytes composant la couche superficielle de la peau. Son action entraîne une dissociation des kératinocytes et l'apparition de lésions cutanées sévères comme le syndrome de la peau ébouillantée ou l'impétigo bulleux chez l'enfant [89].

Quatre gènes codent des exfoliatines. Le gène *eta* est présent sur un élément phagique chromosomique, *etb* diffuse via un plasmide, tandis que *etd* et *etd-like* sont localisés sur un îlot génomique. Peu de souches sont porteuses de ces gènes, il s'agit essentiellement du complexe clonal 121 [90].

3.4.2.3. Les toxines superantigéniques

La terminologie de superantigènes (ou SAg) regroupe des toxines sécrétées par *S. aureus* qui activent le système immunitaire par liaison directe au récepteur des cellules T (TCR) et au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II (Figure 15) [91] [92]. Cette liaison aspécifique active plus de 20% du pool total de lymphocytes T circulants contre 0,01% lors d'une liaison conventionnelle. Il en résulte une décharge cytokinique qui endommage les cellules endothéliales et conduit au choc hémorragique, et à la défaillance d'organes [93].

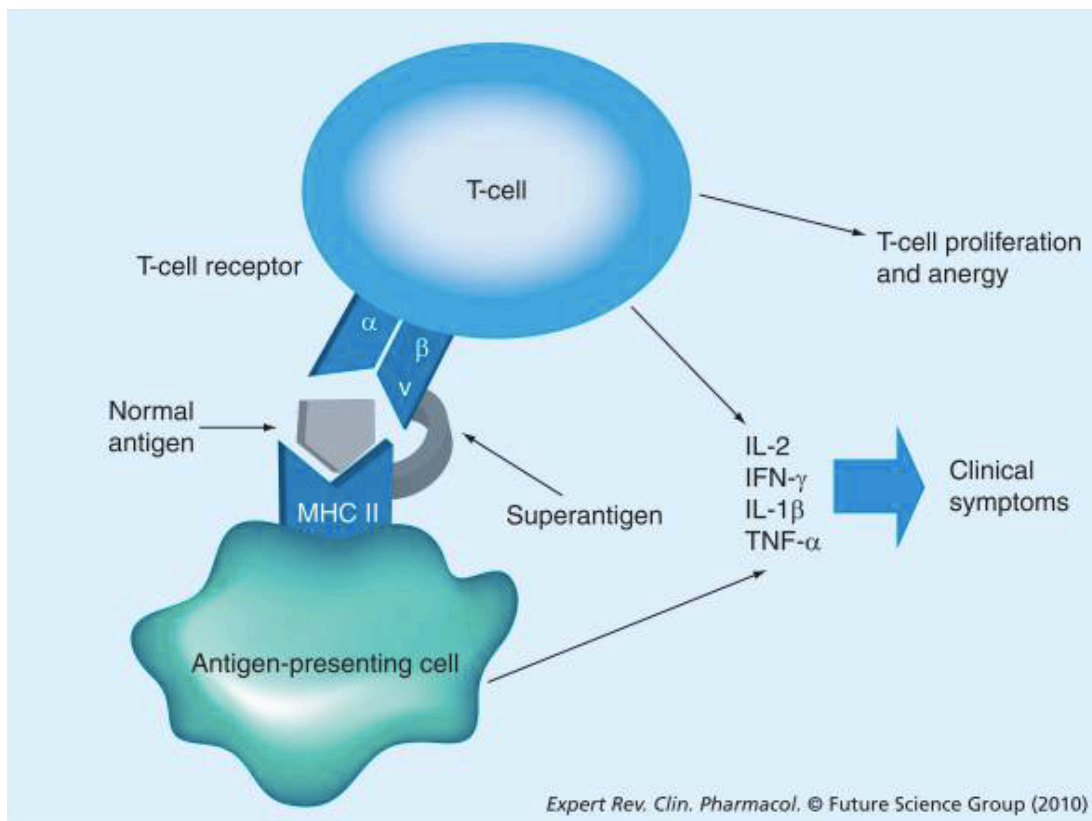


Figure 15 : Mécanismes d'activation des lymphocytes T par les superantigènes. D'après Lin Y. et Peterson M. [94].

La liaison du superantigène entre les récepteurs du CMH de type II et du TCR conduit à l'activation des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages) qui produisent une grande quantité de cytokines proinflammatoires (IL-2, TNF α , IFN γ ...) responsables de la symptomatologie.

Plusieurs SAg existent chez *S. aureus* dont la toxine du choc toxique (ou TSST) ainsi que les entérotoxines. Il existe de grandes similitudes entre les superantigènes retrouvés chez les staphylocoques et les streptocoques, ce qui soulève l'étroite relation génétique (via le transfert horizontal de gènes) qu'entretiennent ces deux genres bactériens.

3.4.2.3.1. Les entérotoxines et entérotoxines-like

S. aureus est un agent responsable d'intoxications alimentaires. Cet effet est consécutif à l'ingestion d'aliments contaminés par une souche productrice d'entérotoxines. Ces facteurs de virulence, très résistants à la chaleur, entraînent rapidement l'apparition d'une symptomatologie digestive alliant diarrhée, vomissements et crampes abdominales. Actuellement, il existe 11 entérotoxines staphylococciques (SE) et 15 entérotoxines-like toxines (SEI). La différence entre les deux groupes est basée sur la capacité de la toxine à induire des propriétés émétiques [95].

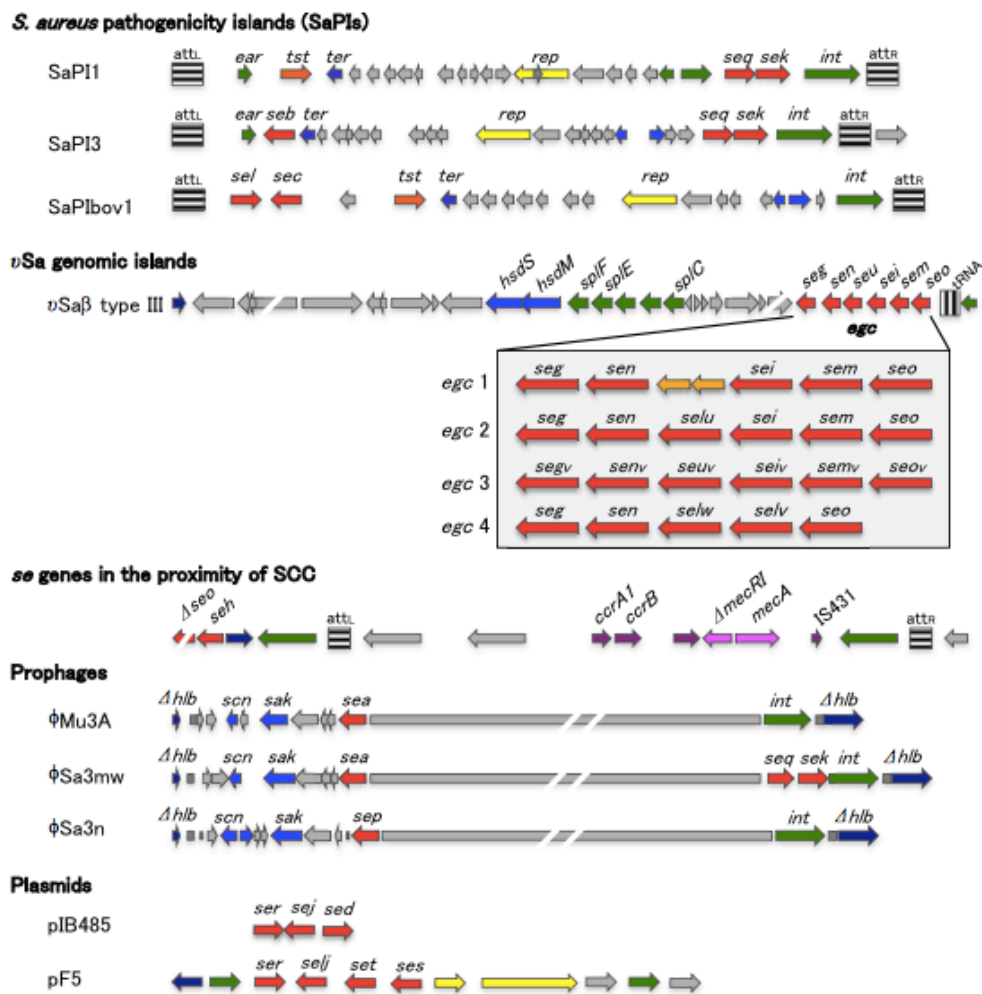


Figure 16 : Présentation et support génétique des principales entérotoxines et entérotoxines-like toxines. Adapté d'après Hu *et al* [95].

Comme nous pouvons l'observer dans la Figure 16, la totalité des gènes des entérotoxines est portée par des EGM. Ces FDV sont l'exemple le plus typique des capacités d'évolution génomique de *S. aureus*. La plupart de ces gènes sont isolés sur un EGM comme

par exemple *sea* présent sur un prophage ou *seg* et *sek* présents sur un îlot de pathogénicité. Néanmoins, un cluster de gènes d'entérotoxines (ou *egc*) est remarquable car il regroupe systématiquement cinq à six gènes d'entérotoxines (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* +/- *seu*) localisés sur l'îlot génomique vSaβ. Ce dernier est très variable entre les isolats et peut héberger de nombreux gènes de virulence comme *lukD*, *lukE*, des gènes de sérine protéases *splA*, *splB*, *splC*, *splD* et *splE*, des entérotoxines ainsi que des gènes de résistance. La diversité d'îlots vSaβ rencontrée est telle que chaque CC possède presque un type d'îlot vSaβ différent. Cela souligne que l'acquisition et la diversification de cette région est apparue avant ou simultanément à la diversification clonale des souches de *S. aureus* [96].

3.4.2.3.2. La toxine du syndrome de choc toxique

La toxine du syndrome de choc toxique 1 (ou TSST-1) est codée par le gène *tst*, qui est localisé sur l'îlot de pathogénicité SaPII (Figure 16). Peu de souches de *S. aureus* en sont porteuses et ce sont essentiellement certains complexes clonaux qui l'hébergent, avec principalement le CC30 le plus souvent en cause [97][98].

La toxine TSST-1 agit comme SAg dans le sang où elle active de façon non spécifique les lymphocytes via la chaîne Vβ du TCR, ainsi que les macrophages et les cellules dendritiques. L'activation du pool de lymphocytes résulte en une très grande libération de cytokines proinflammatoires dont l'IL-2 et le TNFα conduisant au choc toxique [94]. Ce dernier est particulièrement redouté car la létalité est estimée à 30% lors de sa survenue. Le choc toxique se traduit par une fièvre élevée avec hypotension, un risque de défaillance d'organes, des rashes cutanés ainsi qu'une desquamation de l'épiderme des mains et des pieds. Il peut survenir lors d'une bactériémie à *S. aureus* mais aussi par passage de la toxine dans le sang à partir d'un foyer infectieux local comme c'est le cas, par exemple, lors des chocs toxiques menstruels survenant chez la femme à la suite d'un mésusage des tampons ou des coupes menstruelles [99]. La TSST-1 peut également avoir un effet direct sur les cellules épithéliales des muqueuses ou de la peau. Un effet proinflammatoire et cytotoxique dose dépendant de la TSST-1 a été révélé, ce qui faciliterait la perméabilité capillaire et le passage de la toxine dans le sang. Cet effet proinflammatoire permet également de recruter les polynucléaires au site d'infection et de participer à la destruction tissulaire [94]. Cela a notamment été décrit au niveau vaginal conduisant au choc toxique menstruel [100].

3.5. Les mécanismes de survie et d'échappement au système immunitaire

Nombreuses sont les stratégies développées par *S. aureus* pour contrer ou profiter des réponses induites par le système immunitaire. Elles ciblent plusieurs voies de la réponse immunitaire innée comme la cascade du complément, l'action des polynucléaires neutrophiles ou encore l'opsonisation médiée par les anticorps. Cette capacité à échapper aux défenses de l'hôte participe à la difficulté d'éradication bactérienne. La compréhension des interactions hôtes-pathogènes est donc primordiale pour contrer les actions immunomodulatrices de *S. aureus*.

3.5.1. Mécanismes de résistance à la phagocytose

La production de **polysaccharides capsulaires** est présente chez plus de 90% des souches de *S. aureus*. Elle permet principalement de mieux résister à l'opsonisation et à la phagocytose en masquant certains antigènes de surface (Figure 17). Treize types capsulaires ont actuellement été mis en évidence chez *S. aureus* mais seulement deux (les types 5 et 8) sont principalement retrouvés chez les souches isolées en clinique. Plusieurs candidats vaccins dirigés contre ces deux types capsulaires ont fait l'objet de tentatives de développement sans réel bénéfice observé.

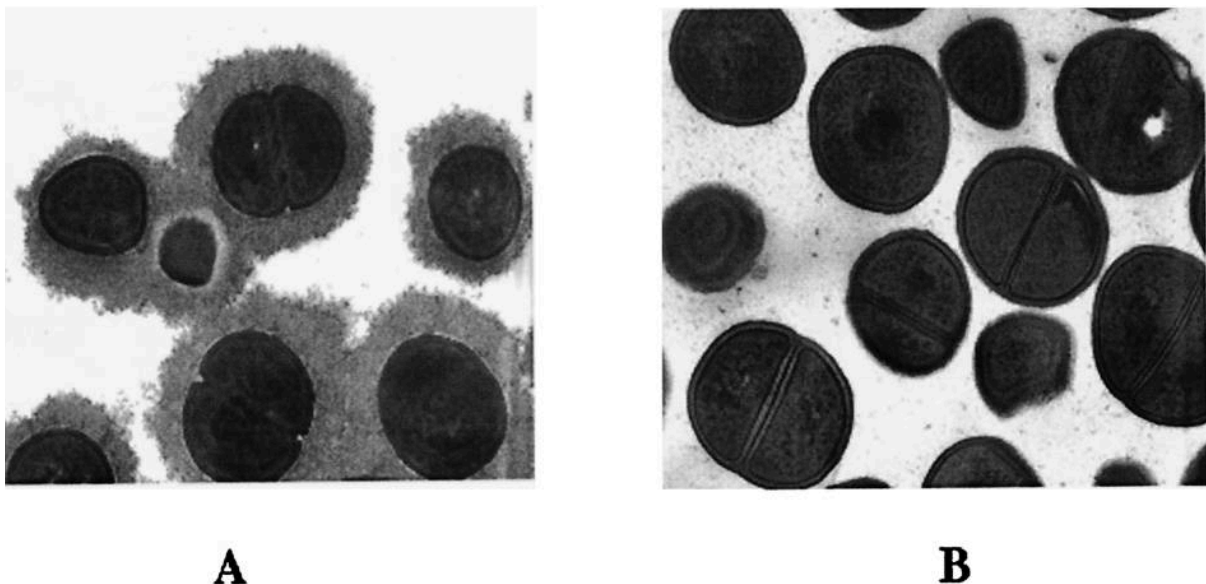


Figure 17 : Images obtenues en microscopie électronique à transmission (A) d'un isolat de *S. aureus* produisant une capsule de type 5 et (B) d'un mutant non capsulé. D'après O'Riordan K. et Lee JC [101].

Le type de capsule retrouvée est très stable entre les souches de *S. aureus* et il est généralement admis qu'un complexe clonal est toujours associé au même type de capsule. Par exemple, les CC 5 ou 8 sont associés au type capsulaire 5, tandis que les CC 30 et 45 sont, eux, associés au type capsulaire 8. Cette régularité de type capsulaire est une particularité de *S. aureus*. En effet, le switch de capsule est très fréquemment utilisé par d'autres espèces pathogènes pour échapper au système immunitaire comme par exemple *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Haemophilus influenzae* [101].

La production de la capsule est régie par un cluster de gènes dénommé *cap*. Les *cap5* et *cap8* sont fortement similaires et composés de seize gènes. La régulation de l'opéron est très influencée par les conditions environnementales ainsi que par les régulateurs Agr et SarA. Il en résulte que la production de capsule n'est pas immédiate. Ceci explique pourquoi la capsule des types 5 et 8 n'a probablement pas de rôle dans la colonisation initiale mais plutôt dans la dissémination d'un site initial vers un site secondaire [103].

Hormis la capsule, la **protéine A** ainsi que la protéine **Sbi** (*second immunoglobulin protein*) ont également un effet sur la phagocytose via l'inhibition de la liaison des immunoglobulines. Elles possèdent deux sites de fixation aux IgG mais peuvent toutes deux inhiber l'activation de la cascade du complément. En outre, elles peuvent directement inhiber respectivement l'activation des fragments C1q et C3 du complément par séquestration [104] [105].

3.5.2. Résistance aux actions des polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles font partie des cellules immunitaires de défense immédiate de l'organisme. Ils sont dotés d'une grande capacité de phagocytose, de production de radicaux oxygénés (ROS) via la NADPH oxydase, d'enzymes et de cytokines pour permettre l'activation du système immunitaire adaptatif. Ces cellules de défense sont clairement destinées à lutter contre les éventuels pathogènes. Elles peuvent également programmer leur apoptose et relarguer leur ADN pour piéger les micro-organismes et faciliter leur phagocytose par d'autres polynucléaires (NET). Néanmoins, de nombreuses bactéries dont *S. aureus* ont réussi à contourner leur système de défense.

Il existe de nombreux mécanismes souvent redondants qui permettent à *S. aureus* d'échapper à l'action des polynucléaires (Figure 18). Nous en avons déjà vu de nombreux parmi les molécules de surface (SpA, capsule...) qui inhibent la reconnaissance et donc l'opsonisation. La résistance aux ROS est possible grâce à la catalase et à la superoxyde

dismutase (SOD), deux enzymes constitutives de *S. aureus*, qui permettent la survie dans le phagosome. La staphyloxanthine, responsable de la pigmentation jaune de *S. aureus* en culture, joue également un rôle similaire. Enfin, plusieurs toxines entraînent directement l'apoptose du polynucléaire comme les hémolysines ou les leucocidines [106].

L'adénosine-synthase possède un effet notable sur l'action inflammatoire des polynucléaires neutrophiles. Son expression est induite par l'hypoxie ou l'exposition aux ROS. Elle est capable grâce à une action 5'-nucléotidase, de libérer une forte concentration d'adénosine dans les tissus infectés. L'adénosine en excès stimule fortement les récepteurs couplés aux protéines G de la surface cellulaire, ce qui entraîne un puissant effet anti-inflammatoire (baisse de production de l'interleukine-1), un effondrement de la dégranulation des polynucléaires, et une activation des voies apoptotiques [107].

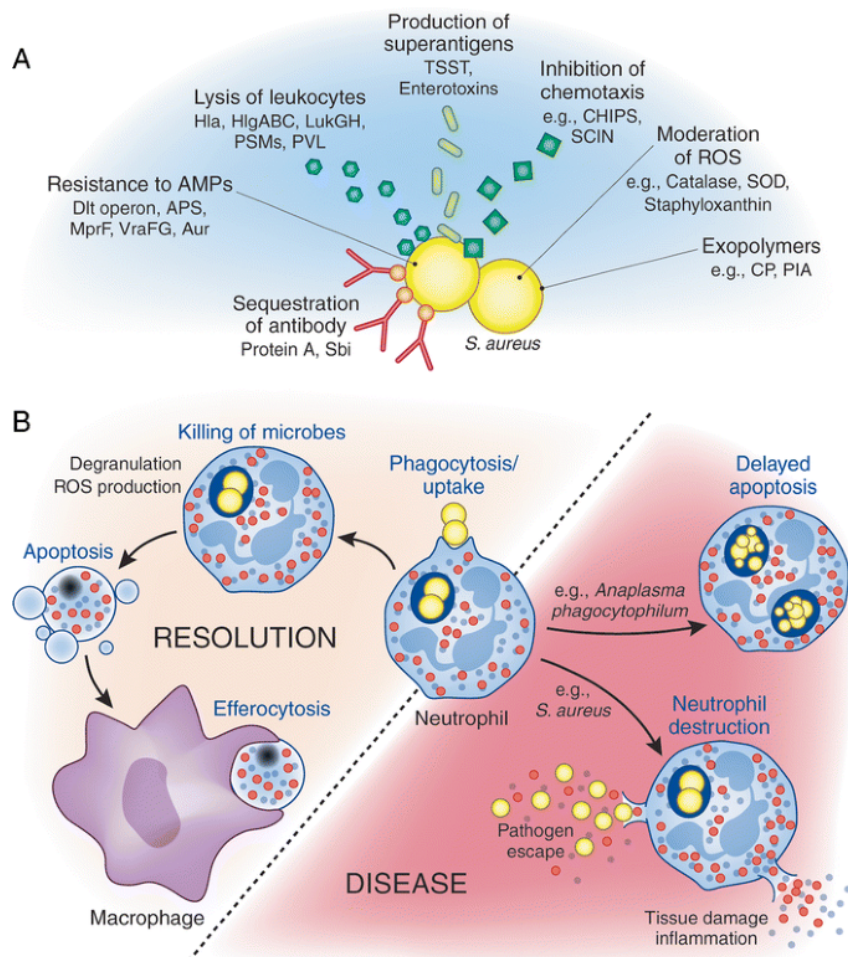


Figure 18 : Mécanismes d'échappement à l'action des polynucléaires neutrophiles.

D'après Rigby K et DeLeo F [106]

3.5.3. Echappement à l'action du complément

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs protéines de surface sont responsables de l'inhibition de l'action du complément à différents niveaux de la cascade protéique. ClfA, SpA, Cna ou encore Efb agissent soit par séquestration ou clivage d'une protéine du complément.

Outre ces FDV, la protéine **Chips** (*chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus*) peut lier et masquer le récepteur C5aR du complément. La distribution prépondérante de ce récepteur au sein des tissus hépatiques, cérébraux et surtout pulmonaires participe à la défense antimicrobienne de ces organes. En effet, l'absence de C5aR rend particulièrement sensibles aux infections des souris qui en sont déficientes [108]. L'inhibition de ce récepteur par Chips bloque le signal chimiotactique et empêche ainsi l'attraction des polynucléaires aux sites infectés. Une autre protéine, dénommée **Scin** (*Staphylococcal complement inhibitor*), agit sur l'inhibition de production de la chimiokine C5a par séquestration et stabilisation du complexe C3-convertase (Figure 19). Il en résulte une diminution de la phagocytose, de la migration phagocytaire et de l'efficacité du complexe d'attaque membranaire.

Les gènes *chips* et *scin* font partie avec la staphylokinase et certaines entérotoxines (*sea* et *sep*) du cluster d'échappement au système immunitaire (IEC). Il existe actuellement sept combinaisons de gènes dans cet IEC (Figure 20) qui sont toutes retrouvées fréquemment dans les isolats cliniques. Dans tous les cas, tous ces types d'IEC sont transmis par des phages s'intégrant dans le gène de l'hémolysine β . Ce cluster est donc particulièrement prévalent dans les souches d'intérêt clinique (environ 90%) [110].

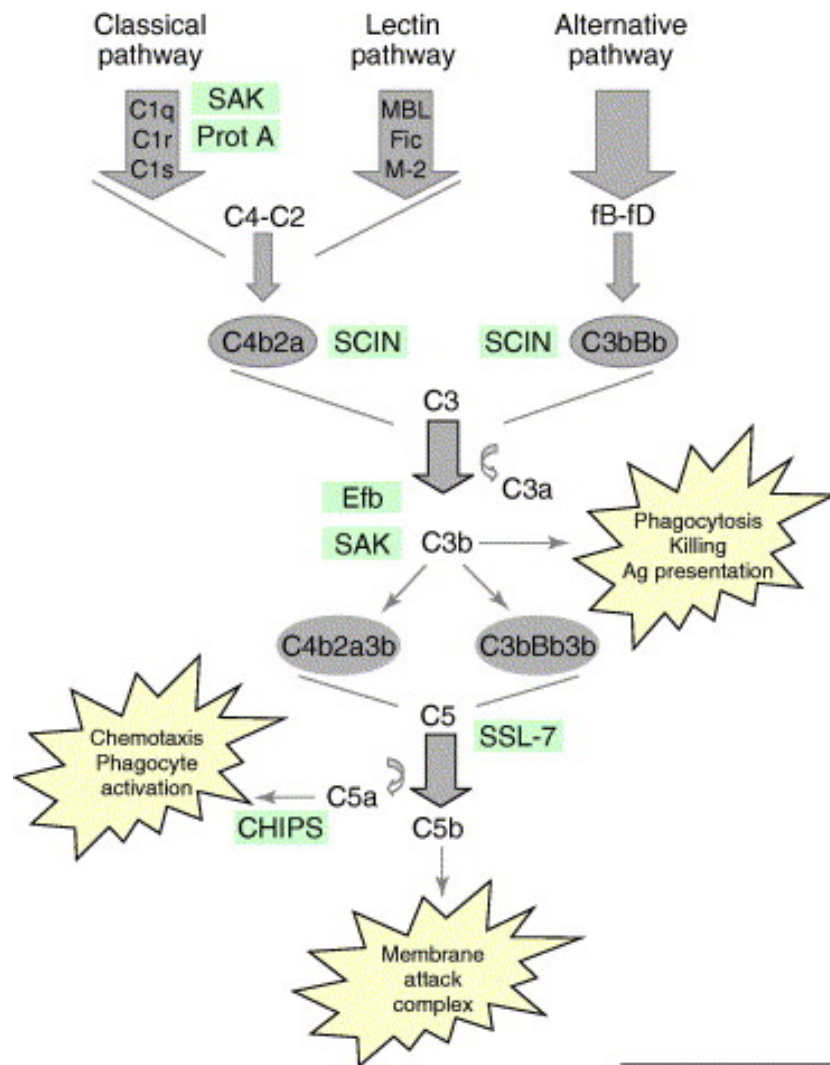


Figure 19 : Cascade du complément et facteurs de virulence impliqués dans son échappement. D'après Rooijackers *et al* [109]

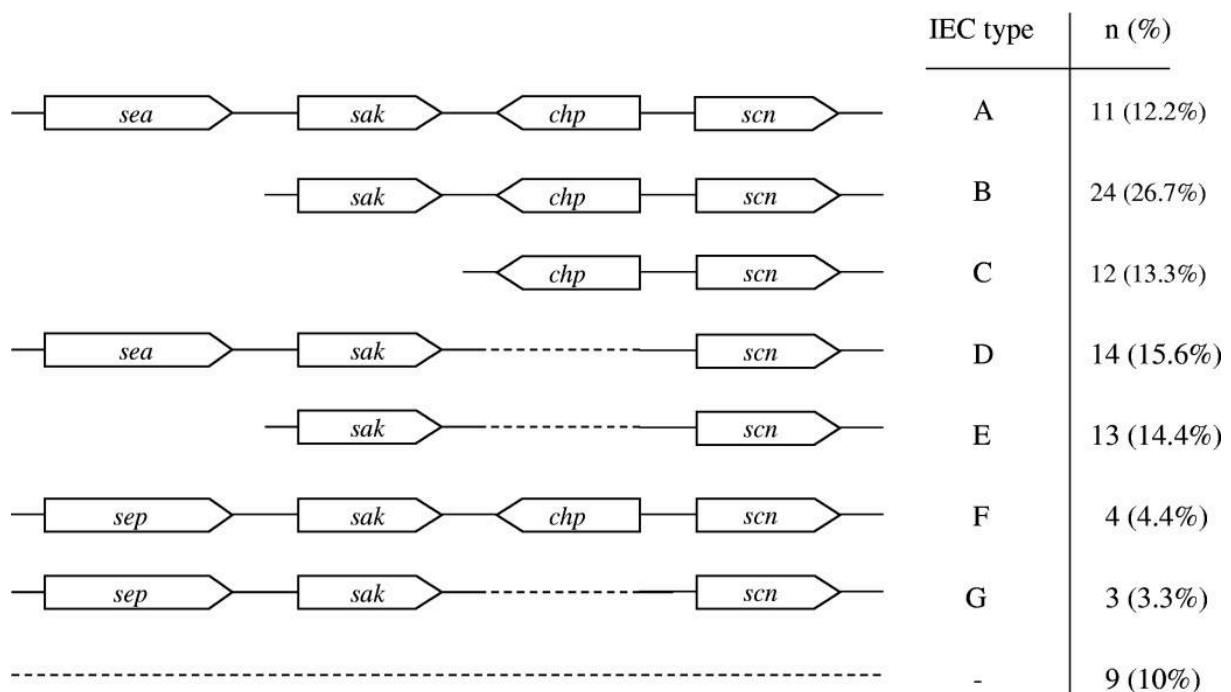


Figure 20 : Différentes combinaisons génomique du cluster IEC et fréquence retrouvée dans des souches de *S. aureus*. D'après van Wamel WJB *et al* [111]

3.6. Les systèmes de régulation d'expression

Afin de s'adapter aux différents environnements et niches écologiques du corps humain, l'expression des gènes portés par la souche bactérienne dépend de nombreux facteurs permettant à ces gènes d'être exprimés au moment opportun. De ce fait, chaque type d'infection nécessite une expression et une coordination particulière des facteurs de virulence. Ainsi les protéines de surface sont synthétisées au début de la colonisation puis réprimées pour laisser la machinerie cellulaire synthétiser les toxines ou les protéines d'échappement au système immunitaire [112]. Cette coordination est essentiellement régie par les système Agr, sarA et saeRS.

3.6.1. Le système Agr

Le système Agr ou « *Accessory Gene Regulator* » est issu de la combinaison d'un système à deux composants, d'un système de *quorum-sensing* et d'un ARN régulateur. Dunman *et al*, ont montré en 2001 que ce système régulait positivement plus de 100 gènes et négativement plus de 30 gènes [113]. C'est le système de régulation le plus important décrit actuellement chez *S. aureus*. Il permet l'expression des protéines de surface et des toxines

sécritées de façon antagoniste avec par exemple la régulation positive de l'hémolysine α et négative de la protéine A.

Le locus hébergeant le système *agr* est composé de quatre gènes codant respectivement :

- un premier peptide du *quorum sensing*, nommé AgrD,
- une protéine d'export ou AgrB permettant le passage d'AgrD,
- un senseur transmembranaire à histidine kinase ou AgrC,
- ainsi qu'un régulateur de réponse AgrA.

AgrD et AgrB produisent conjointement un peptide dénommé AIP ou peptide auto-induit, qui est transporté dans l'espace extracellulaire (Figure 21). L'accumulation de ce dernier dans l'environnement va induire son attachement au récepteur transmembranaire AgrC, une kinase qui permet la phosphorylation du régulateur AgrA responsable de l'autoinduction du locus par liaison au promoteur P2 et P3. Il s'agit donc d'un circuit d'auto-activation [114][115].

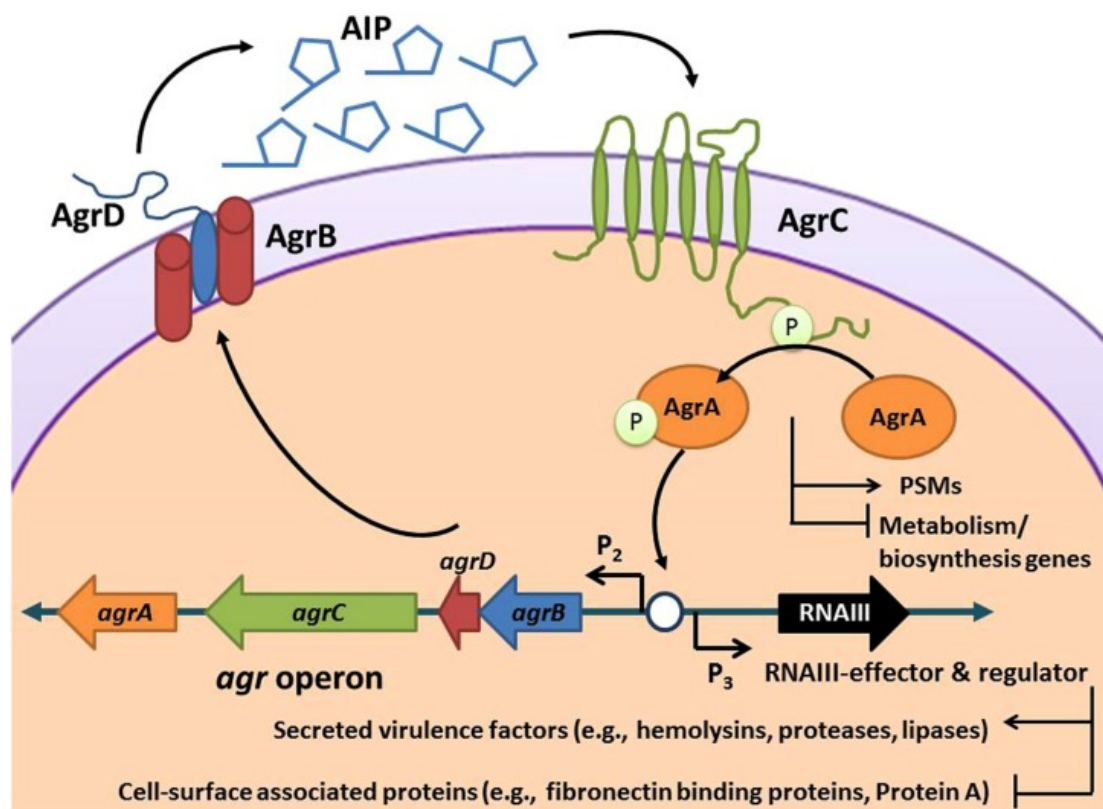


Figure 21: Organisation et fonctions du système Agr. D'après Quave C. et Horswill A. [116].

Deux promoteurs du locus (P2 et P3) permettent respectivement la transcription de l'ARNII et l'ARNIII. L'ARNII est traduit en protéines AgrA, B, C et D qui permettent la transmission du signal. L'ARNIII est, quant à lui, traduit en une unique toxine appelée δ -hémolysine, qui peut augmenter le niveau de transcription de nombreux facteurs de virulence sécrétés et réduire l'expression de certaines protéines de surface.

Il existe quatre variants ou « types d'Agr » qui permettent de classifier les souches de *S. aureus*. Des polymorphismes dans la séquence d'ADN d'AgrD induit la production de quatre types de peptides autoinduits. Ces variants permettent de diviser les souches de *S. aureus* en quatre groupes majeurs : Agr-I, Agr-II, Agr-III et Agr-IV. Ainsi, un variant d'un type d'Agr peut inhiber le système d'un autre type, ce qui peut altérer la croissance de souches de *S. aureus* d'Agr différents au sein d'un même écosystème (Figure 22) [117].

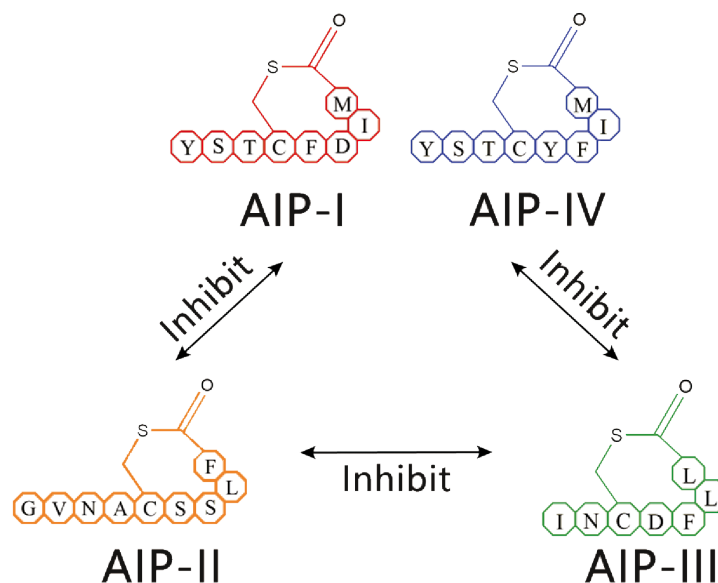


Figure 22 : Représentation structurelle en acides aminés des différents variants de peptides autoinduits. D'après [118].

Il a été montré que les expressions d'Agr et de l'ARNIII sont particulièrement augmentées dans les souches de SARM USA300, ce qui peut aussi expliquer la large diffusion de ce clone [119]. En revanche, quelques souches d'intérêt clinique ont été décrites avec des mutations dans le système Agr le rendant inefficace [120], ce qui suggère que le système Agr n'est pas seul pour contrôler l'expression des facteurs de virulence. Il est d'ailleurs lui-même soumis à plusieurs autres systèmes de régulation dont les systèmes SarA et Rot.

3.6.2. Autres systèmes de régulation

Bien que beaucoup de facteurs de virulence soient sous la dépendance du système Agr, il existe d'autres voies de régulation (Figure 23). *S. aureus* possède, en effet, un arsenal de systèmes à deux composants (actuellement 16 décrits) qui interviennent dans la régulation d'expression de nombreux gènes. Ces systèmes de kinases-phosphorylases permettent à la bactérie de comprendre l'environnement qui l'entoure et d'adapter la réponse cellulaire aux besoins ou niches environnementales. Parmi eux, on retrouve les systèmes SaeR/S et ArlRS (*autolysis related locus*). Ce dernier agit sur l'expression de la capsule ou encore la formation de biofilm par activation directe de la protéine MgrA [121]. Quant au système SaeR/S, il est impliqué dans la régulation directe des gènes de virulence *sbi*, *efb*, *hla*, *hly* et *lukS-PV* [122] [123] et dans la défense aux radicaux libres oxygénés (ROS) produits par les polynucléaires neutrophiles [124]. Un lien direct entre l'expression de ce système et l'infection pulmonaire à *S. aureus* post-grippe a d'ailleurs été démontré [125].

A côté des systèmes à deux composants, il existe le locus *sar* permettant une forte expression de la protéine SarA, qui est responsable de la modulation de l'expression de plus de 120 gènes dont la production des transcrits d'ARNIII par fixation au promoteur P2 [126]. A l'inverse du système Agr, l'expression du système Sar est constante au cours des phases de croissance de la bactérie. Il a également été démontré que l'inactivation de *sarA* entraînait une réduction de la résistance à la ciprofloxacine et à la vancomycine, ce qui confirme l'importance de ces locus de régulation chez *S. aureus* en clinique [127]. Enfin, plusieurs homologues de SarA ont été identifiés dont la protéine Rot (*repressor of toxins*). Cette dernière est en constante interaction avec le locus Agr puisque Rot exerce les effets contraires d'Agr. Ainsi, la transcription de la protéine A est positivement régulée par Rot tandis qu'elle l'est négativement par le système Agr [128].

Ainsi, *S. aureus* a développé un système complexe de régulation d'expression de ses facteurs de virulence qui sont différenciellement exprimés en fonction de la phase de croissance de la bactérie. L'environnement adjacent, le métabolisme ou encore la présence de signaux de stress (réponse immunitaire, antibiotiques...) sont autant de paramètres détectés par ces astucieux systèmes de régulation (système de *quorum-sensing*, systèmes à deux composants...). La réponse liée à l'expression de ces systèmes peut sévèrement impacter l'issue clinique surtout si une altération des fonctions immunitaires est déjà présente (immunosuppression locale ou systémique, infections virales, ...)

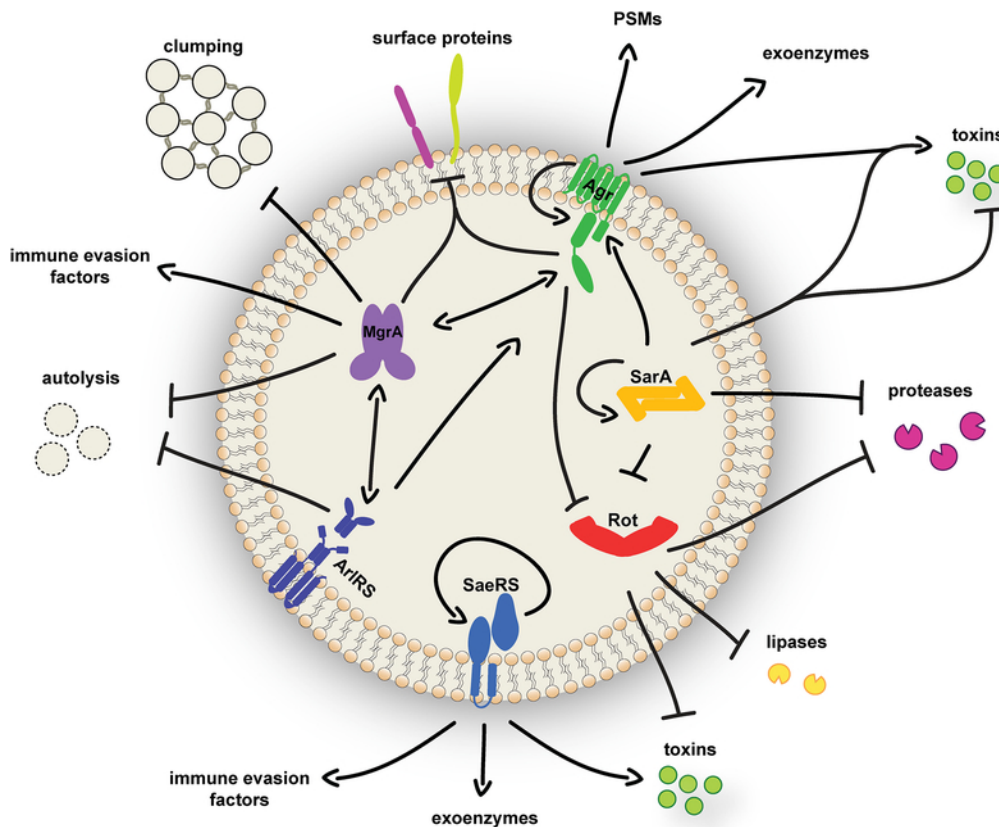


Figure 23 : Systèmes de régulation de l'expression des facteurs de virulence chez *S. aureus*.

D'après Jenul C. et Horswill AR [6].

4. La Pneumopathie Acquisée sous Ventilation Mécanique (PAVM)

Les infections nosocomiales concernent, à l'heure actuelle, près de 5% des patients hospitalisés en France. D'après la dernière enquête nationale de prévalence des infections associées aux soins par Santé Publique France [1], les infections urinaires sont les plus fréquemment contractées avec une prévalence de 1,48%, suivies des infections du site opératoire (0,83%) et les pneumopathies (0,81%). Ces infections sont majoritairement consécutives à l'utilisation de dispositifs invasifs (sondes, prothèses, cathéters, assistance respiratoire...). En effet, il est estimé qu'un patient porteur d'un tel dispositif au cours de son hospitalisation a 4,6 fois plus de risques d'être infecté qu'un patient sans dispositif invasif. Les services de Réanimation sont particulièrement exposés à cette problématique avec, encore aujourd'hui, un grand nombre de décès imputables aux agents infectieux. La grande fragilité des patients (sévérité des lésions, nombreuses comorbidités...) et l'utilisation de dispositifs invasifs qui rompent les barrières cutanéomuqueuses facilitent l'invasion bactérienne de sites normalement stériles.

4.1. Définition, fréquence et critères diagnostiques

La Pneumopathie Acquisée sous Ventilation Mécanique (PAVM) est une des complications majeures retrouvée en service de Réanimation chez les patients intubés-ventilés puisqu'il est estimé que 9 à 27 % des patients vont en développer une au cours de leur séjour. La PAVM se définit comme « toute pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine, soit de manière invasive par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal ou d'une trachéotomie, soit de manière non invasive par l'intermédiaire d'un masque facial ou d'un autre procédé, dans les 48 heures précédant la survenue de l'infection ». L'apparition d'une PAVM entraîne un risque de surmortalité évalué entre 20 et 50%, en fonction du délai d'introduction d'une antibiothérapie adaptée. De plus, elle implique une augmentation de la durée d'hospitalisation (en moyenne 7 jours) et un surcoût des soins évalués entre 10 000 et 40 000 dollars par hospitalisation. Elle entraîne également une surconsommation d'antibiotiques, ce qui en fait un enjeu important de santé publique.

Le diagnostic est difficile puisqu'il repose sur des arguments cliniques, radiologiques et biologiques (Tableau 6). La radiologie est un critère majeur de diagnostic permettant de différencier la pneumopathie de la trachéobronchite (sans atteinte du parenchyme pulmonaire). L'association de ces critères avec les résultats microbiologiques des prélèvements respiratoires permet d'améliorer le diagnostic, la prise en charge et le traitement de la PAVM.

Tableau 6 : Critères de diagnostic d'une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique. Adapté d'après Miler *et al*, 2006 [129].

Signes Radiologiques	Signes Cliniques et Biologiques	
		Plus au moins 2 paramètres suivants
Au moins deux radiographies thoraciques avec une des atteintes suivantes :	Au moins un paramètre suivant :	
- Apparition ou progression d'un infiltrat persistant	- Fièvre (température > 38°C)	- Changement de composition des expectorations, expectorations purulentes
- Consolidation	- Leucopénie (GB < 4000/mm ³)	- Augmentation des sécrétions respiratoires
- Formation d'une cavité pulmonaire	- Ou leucocytose (GB > 12000/mm ³)	- Apparition/Aggravation de la toux, de la dyspnée ou tachypnée
	- Altération de l'état mental sans autre cause connue	- Râles bronchiques
		- Aggravation des échanges gazeux
		- Augmentation de l'oxygène requis

4.2. Physiopathologie

La survenue de la PAVM, c'est-à-dire l'histoire de la maladie, est à ce jour toujours peu comprise. Une longue durée de ventilation mécanique ou l'utilisation préalable d'antibiotiques ont montré être particulièrement associés à une fréquence plus élevée de PAVM. Son délai de survenue est très variable allant de quelques heures à plusieurs semaines [130]. Néanmoins, certains patients ne développeront aucune infection alors que la durée de ventilation mécanique est prolongée. Plusieurs études ont permis d'émettre une hypothèse physiopathologique en relation avec l'intubation et l'altération des voies respiratoires (Figure 24). L'association entre le microbiote de la flore orale et de la plaque dentaire avec le microbiote pulmonaire chez des patients atteints de PAVM a ainsi pu être démontré [131] [132]. Cette flore buccale va dans certains cas permettre le développement d'éventuels pathogènes tels que *S. aureus* ou *P. aeruginosa*, qui vont au cours du temps migrer le long du tube endotrachéal via la formation de biofilm, et devenir une source majeure de colonisation de l'appareil respiratoire bas [133].

La pose du tube endotrachéal favorise également la survenue d'une pneumopathie (nombre de tentatives d'intubation, lieu de l'intubation...) en engendrant de multiples microlésions de l'appareil muco-ciliaire mais aussi l'introduction directe d'un pathogène dans les voies respiratoires. D'autres facteurs favorisant la survenue de la PAVM ont été identifiés, ils sont essentiellement liés à l'hôte : âge, malnutrition, pathologies respiratoires sous-jacentes (bronchopneumopathie chronique obstructive, mucoviscidose...), immunodépression...

Par ailleurs, l'environnement pulmonaire promeut la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques et doit être considéré comme un réservoir de matériel génétique [134]. Les hôpitaux et en particulier les services de Réanimation sont également sujets aux transmissions de bactéries multi-résistantes (comme le SARM ou les entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu). Ces bactéries sont le plus souvent d'origine endogène, par sélection de mutants résistants, mais aussi exogène, par transmission croisée. Cette dernière se fait le plus souvent par manuportage, via l'entourage du patient ou le personnel soignant, pouvant être à l'origine d'épidémies [135].

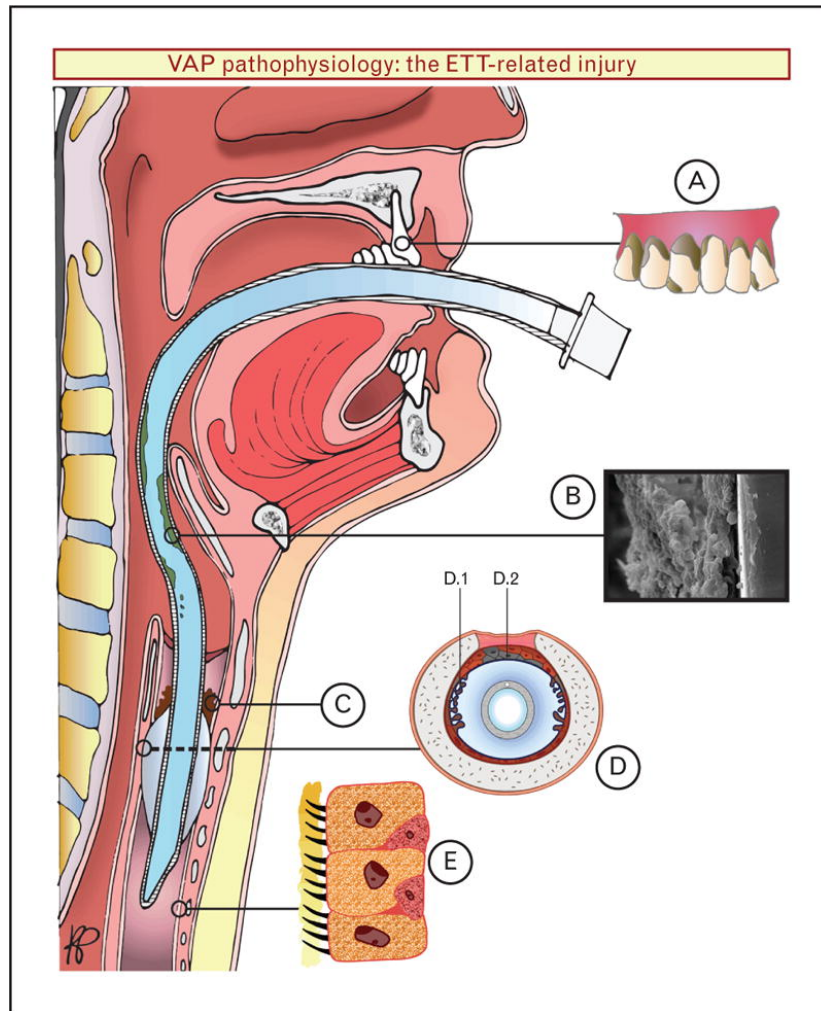


Figure 24 : Représentation schématique de la physiopathologie lors de l'intubation endotrachéale. D'après Pirrone M *et al* [134].

A. Le biofilm bactérien de la plaque dentaire est un excellent réservoir de bactéries très diverses. B. Ces bactéries sont capables, au cours du temps, d'essaimer au niveau du tube endotrachéal, d'adhérer et de former un nouveau biofilm : source majeure de colonisation de l'appareil respiratoire. C et D. Les sécrétions endotrachéales contaminées s'accumulent en amont du ballonnet de maintien du tube endotrachéal tout en se déversant petit à petit dans l'appareil respiratoire bas. E. L'altération locale de l'appareil mucociliaire ne permet pas une élimination efficace des sécrétions/pathogènes.

4.3. Importance de *S. aureus* dans la PAVM

4.3.1. Le poumon : une niche écologique pour *S. aureus*

Le poumon est un endroit propice au développement de *S. aureus*. En effet, la continuité anatomique avec les fosses nasales, son site de colonisation principal chez l'Homme, lui permet de rapidement coloniser via le tube endotrachéal et les sécrétions bronchiques le tissu pulmonaire. Ce succès en tant que pathogène respiratoire peut être attribué à plusieurs facteurs décrits plus haut : l'acquisition d'éléments génétiques mobiles, la grande flexibilité des systèmes de régulation, ainsi que la capacité à réagir rapidement à un stress environnemental ou métabolique sont autant d'atouts qui facilitent sa pathogénicité. L'expression de nombreuses molécules d'adhésion facilite également sa colonisation et sa persistance pulmonaire [119].

Bien qu'il soit un pathogène aérobie extracellulaire, *S. aureus* peut persister et croître dans des conditions moins favorables (anaérobiose locale, milieu intracellulaire), qui sont d'importance dans le poumon où une atmosphère anaérobie est fréquente. La persistance au sein de divers types cellulaires tels que les macrophages, les polynucléaires ou les cellules épithéliales complique également son éradication et favorise sa dissémination systémique [119]. L'adaptation de la bactérie à l'environnement intracellulaire peut engendrer des rechutes bien après l'épisode infectieux ou encore conduire à l'émergence de *Small Colony Variant*, qui présentent une activité métabolique réduite.

4.3.2. La PAVM à *S. aureus* : état des lieux

Bien que *S. aureus* soit une cause peu fréquente d'infection pulmonaire en milieu communautaire (environ 1 à 2% des infections nécessitant une hospitalisation) [136], c'est un pathogène bien plus redoutable en service de Réanimation. En effet, ce dernier représente 17 à 22% des germes isolés dans la PAVM, ce qui en fait le deuxième pathogène le plus prévalent après *P. aeruginosa* [137][138]. C'est également la première cause de PAVM chez le patient traumatisé crânien [139]. Récemment, il a été identifié parmi les bactéries principales responsables de surinfections dans la pneumopathie à SARS-CoV-2 [140]. Néanmoins, ces données varient selon les écologies locales des différents services de Réanimation. Dans une étude très récente, le taux de PAVM à *S. aureus* en Europe de l'Ouest a été clairement associé au portage nasal. Les auteurs retrouvent un risque de PAVM de 15,9 pour 1000 jours de ventilation chez les patients colonisés contre 2,2 pour 1000 jours de ventilation chez les patients non colonisés [137]. La survenue d'un tel événement est très précoce (aux alentours de 3 jours), ce qui tend à démontrer que les patients s'infectent à partir de leur propre souche de portage.

Dans tous les cas, *S. aureus*, en Réanimation, est lié à une forte mortalité à 30 jours (environ 48%) [141]. Ce sombre pronostic est, avant tout, consécutif aux problématiques d'infections nosocomiales par le SARM, qui représente aujourd'hui encore 23,5% des isolats cliniques hospitaliers en Europe [142].

La pneumopathie à *S. aureus* survient lorsque la bactérie accède à l'épithélium respiratoire bas et induit une activation accrue des réponses immunitaires innées (activation des neutrophiles et recrutement des macrophages) [143]. Cette étape peut être facilitée si une infection virale (grippe, SARS-CoV-2...) ou une lésion de l'épithélium est déjà présente. Comme nous l'avons vu précédemment, *S. aureus* est capable d'envahir les tissus et d'échapper à l'action immunitaire grâce à ses nombreux facteurs de virulence. L'afflux de neutrophiles dans les poumons, l'activation locale du système immunitaire et la dégradation tissulaire conduisent à l'apparition d'un œdème pulmonaire, responsable de l'augmentation en besoin d'oxygène [144][145].

Néanmoins, les mécanismes responsables de l'infection du parenchyme pulmonaire dans la PAVM ne sont pas encore compris. En effet, la différence entre colonisation et infection demeure floue, et il reste difficile de prédire avec les techniques microbiologiques actuelles quels patients sont à risque de PAVM. L'existence de seuils de quantification dans les prélèvements respiratoires est reconnue comme une aide au diagnostic de la PAVM avec un risque estimé élevé à partir de 10^4 UFC/ml dans un liquide de lavage broncho-alvéolaire ou 10^5 UFC/ml dans un aspirat endotrachéal [146]. Cependant ces seuils ne permettent pas d'expliquer la physiopathologie de la maladie. De plus, il est fréquent qu'un patient ne développant pas de pneumopathie ait une charge bactérienne dépassant ces seuils ou qu'un patient infecté ne les dépasse pas.

4.3.3. Intérêt de l'étude génomique des souches de *S. aureus* en service de Réanimation

Avec l'augmentation de l'incidence des bactéries résistantes aux antibiotiques et une baisse de l'arrivée de nouvelles molécules antibiotiques sur le marché, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques émerge depuis 10 ans. La détection des gènes de résistance aux antibiotiques et des facteurs de virulence de *S. aureus* constitue une exploration nouvelle accessible via le NGS qui pourrait, à terme, contribuer à une meilleure prise en charge des patients à l'hôpital et en particulier pour les patients atteints de PAVM. Les facteurs de

virulence et de résistance sont des cibles importantes dans la lutte microbiologique et de nombreuses thérapies sont en cours d'essai clinique.

L'expression coordonnée de plusieurs FDV staphylococciques est requise pour instaurer un état infectieux durable. Cela inclut les protéines de surface établissant la colonisation et échappant à l'activité du système immunitaire ou encore l'expression d'enzymes ou de toxines.

Plusieurs candidats vaccins contre *S. aureus* ont été développés dans diverses pathologies dont la pneumopathie mais sans réel succès. Les études préliminaires sur modèles animaux ont pourtant montré des résultats intéressants mais jamais confirmés chez l'Homme. Une des études s'est d'ailleurs arrêtée prématurément devant un nombre plus élevé d'infections et de décès dans le groupe de patients vaccinés [147]. La raison des échecs à répétition des premiers candidats vaccins commence à être comprise car la cible de ces vaccins concernait surtout des protéines de surface de *S. aureus* (*clumping factor A*, polysaccharides capsulaires de type 5 et 8...). La production d'IgG contre ces déterminants engendrerait une agrégation accrue des bactéries dans le sang avec un risque thrombotique plus important. De plus, *S. aureus* est habitué à échapper aux réponses immunitaires de l'Homme puisqu'il fait partie de la flore microbienne normale [148][149].

Une réponse immunitaire de type Th17 est clairement impliquée dans l'immunité anti-staphylococcique chez l'Homme. Cette immunité semble être particulièrement importante dans la protection de la peau et des muqueuses pulmonaires par production accrue de peptides antimicrobiens. De plus, la recherche de FDV impliqués dans l'apparition de la pneumopathie a permis de mettre en évidence que la toxine Hla (hémolysine α) contribuait aux dommages tissulaires dans un modèle animal de pneumopathie par l'induction excessive d'une réponse immune Th17. Ces résultats ont récemment été confirmés chez l'Homme dans de premières études cliniques prometteuses [150][151]. C'est pourquoi, de nouvelles thérapies ciblant les toxines staphylococciques voient désormais le jour, telles que l'utilisation d'anticorps anti-endotoxines ou anti-cytolysines, afin de limiter l'action destructrice de la bactérie et de réduire les effets proinflammatoires de ces toxines [152][148].

Outre l'analyse des FDV et des FDR portés par les différents clones, l'analyse des isolats circulant au service de Réanimation permet d'apporter un point de vue épidémiologique important. La description et la caractérisation des clones permet de suivre la dynamique de dissémination de certains ST. Ceci afin de prévenir ou d'alerter précocement sur l'émergence d'un clone particulier et d'une éventuelle épidémie.

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

Les étapes du protocole pour générer les résultats de cette étude sont résumées dans le *flowchart* suivant (Figure 25) :

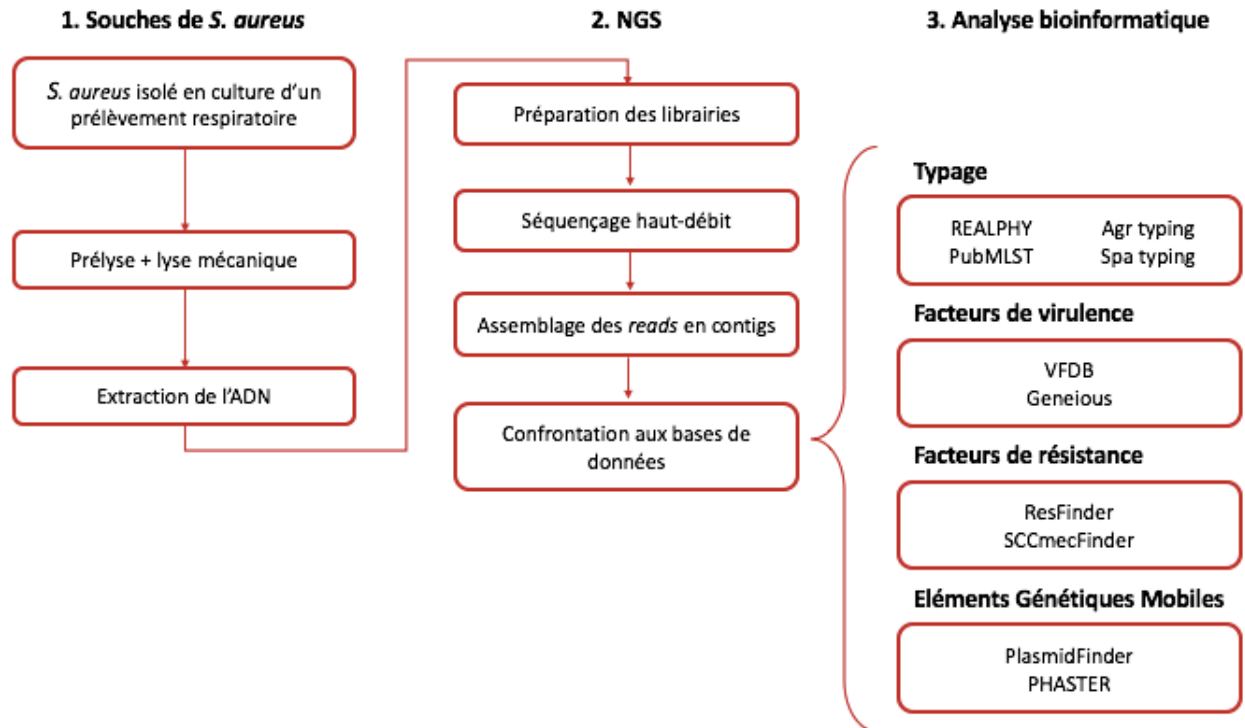


Figure 25 : Flowchart de l'étude

1. Les souches de *S. aureus*

1.1. Sélection des isolats

De Juillet 2020 à Décembre 2020, toutes les souches de *S. aureus* isolées par culture microbiologique de prélèvements respiratoires (expectoration, aspirat endotrachéal (AET), aspiration protégée ou liquide de lavage broncho-alvéolaire) et provenant de patients hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges ont été recueillies. Chaque souche a été identifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène et ré-isolée sur gélose au sang avant conservation à -80°C . En parallèle, un antibiogramme en milieu liquide a été réalisé et interprété selon les critères de l'EUCAST CA-SFM 2019v2. Les profils de résistance déterminés à l'aide de l'automate Vitek2 (carte AST-P631) ont été recueillis à partir du système informatique du laboratoire.

1.2. Recueil des informations cliniques

Plusieurs paramètres cliniques ont été colligés pour apprécier l'évolution clinique et infectieuse du patient au cours de son hospitalisation. Les dates d'entrées à l'hôpital et en service de Réanimation, le motif d'admission, la nécessité d'une intubation pour permettre une ventilation mécanique et le développement éventuel d'une PAVM ou de toute autre infection respiratoire ont été recensés pour chaque patient.

1.3. Extraction de l'ADN

Les bactéries à Gram positif possèdent une épaisse couche de peptidoglycane qui peut compromettre la lyse de la paroi et la bonne extraction de l'ADN bactérien. Il est donc nécessaire de préalablement dégrader la paroi bactérienne.

Un tampon de prélyse constitué de 200 µl de Tris HCL (tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate), de 100 µl de SDS (dodécylsulfate de sodium) et de 1700 µl d'eau distillée stérile a été préparé le jour même. Quatre à cinq colonies de bactéries, isolées après 24h de croissance sur gélose au sang à partir d'isolats purs congelés à -80°C, ont été resuspendues dans 500 µl de cette solution. Pour permettre la libération de l'ADN des *S. aureus*, nous avons réalisé, à partir de 500 µl de suspension bactérienne, une lyse mécanique grâce au kit *FastPrep Lysing Matrix D*[®] (MP Biomedical) pendant 40 secondes à vitesse 6. L'automate *FastPrep*[®] permet, par l'agitation haute vitesse de billes de céramiques de 1,4 mm de diamètre, de casser la paroi et le peptidoglycane bactérien, ce qui libère les acides nucléiques dans la suspension.

A partir de ce lysat, une centrifugation permettant de culotter les débris cellulaires a été réalisée. Deux cents microlitres de surnageant de ce lysat et 200 µl de solution d'extraction BL2B (tampon d'extraction) ont été ajoutés avant de procéder à l'extraction de l'ADN selon la procédure du kit *SaMag Bacterial DNA Extraction Kit* (Saccace Biotechnologies[®]). Le volume d'élution était de 50 µL.

Les extraits d'ADN obtenus ont été quantifiés à l'aide de l'automate *Qubit*[®] selon la procédure du kit *Qubit dsDNA Broad Range Assay* (ThermoFisher Scientific).

2. Le séquençage haut débit

La technique de séquençage « *shotgun* » de génome entier ou WGS (*Whole Genome Sequencing*) permet de séquencer directement le contenu global en ADN d'une souche bactérienne. La fragmentation aléatoire de l'ADN total en petits fragments capables d'être séquencés est préalablement nécessaire. Elle peut s'effectuer par sonication ou par digestion enzymatique. Puis une sélection de taille est requise pour ne conserver que les fragments de taille souhaitée à même d'être séquencés.

2.1. Préparation des bibliothèques

Avant de pouvoir séquencer l'ADN bactérien de façon aléatoire, il est nécessaire de le fragmenter en morceaux d'ADN d'environ 200 à 300 pb. Cette contrainte est liée aux capacités du séquenceur haut-débit qui ne peut analyser que des fragments allant jusqu'à maximum 400 pb. Il est également nécessaire d'attribuer à chaque échantillon (et donc à chaque fragment d'ADN) un « code-barres » composé de quelques paires de bases, qui seront identifiées lors du séquençage et permettront ainsi de rattacher chaque fragment à son échantillon correspondant. Des adaptateurs sont également nécessaires pour fixer chaque fragment d'ADN aux « *Ion Sphere Particles* » (ISP). Cette étape a pu être automatisée grâce à l'automate *AB Library Builder*[®] System (ThermoFisher Scientific). Il permet de réaliser et de simplifier la création des différentes bibliothèques pour le séquençage par technologie Ion Torrent.

Le *Ion Xpress Plus Fragment Library kit for AB Library Builder*[®] System (ThermoFisher Scientific) est recommandé pour créer les bibliothèques à partir d'ADN entier. En effet, il permet, à partir de 100 ng d'ADN bactérien initial, de réaliser une fragmentation enzymatique à l'aide de l'enzyme *Ion Shear*[®]. Puis, après purification des fragments générés par des billes *AMPure*[®], une étape de ligature des adaptateurs (A et P1) et des codes-barres (*Ion Xpress*[®] *Barcode Adapters Kit*, ThermoFisher Scientific) en extrémité de chaque fragment, est effectuée sous l'action d'une DNA ligase et d'une nick-repair polymérase (Figure 26). Une nouvelle purification *AMPure* est réalisée par l'automate afin de ne conserver que les fragments d'ADN sur lesquels sont fixés les adaptateurs et codes-barres.

En sortie d'automate, une courte étape d'amplification de 6 cycles utilisant comme amorces des séquences correspondantes aux adaptateurs A et P1, permet d'optimiser le rendement de la bibliothèque et de ne sélectionner que les fragments d'ADN ayant incorporé à la fois les adaptateurs A et P1. Une enzyme hautement fidèle, la polymérase *Platinum PCR SuperMix High Fidelity*, est préconisée pour éviter l'insertion d'erreurs.

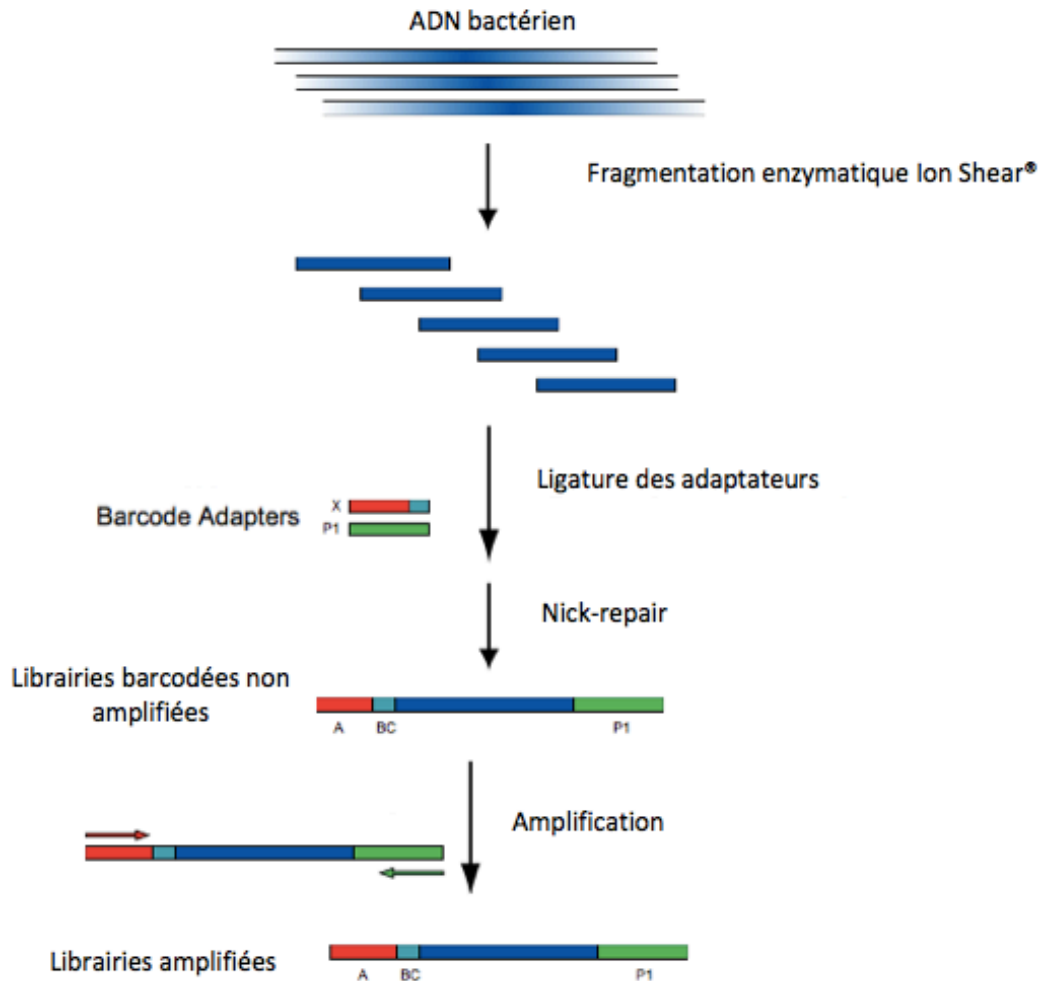


Figure 26 : Etapes de la fabrication des librairies par le kit *Ion Xpress Fragment Library Kit for AB Library Builder® System* (ThermoFisher Scientific)

2.2. Caractérisation et validation des librairies

Le contrôle et la qualification des librairies ont été réalisés selon la procédure du kit *Agilent High Sensitivity DNA* sur l'automate *Agilent 2100 Bioanalyzer®*. Il s'agit d'une électrophorèse automatisée permettant l'analyse de la taille, de la composition et de la quantité de librairies présente dans chaque échantillon. Il est ainsi possible d'estimer la concentration d'ADN en picomolaires (pM).

Les différentes librairies ont ensuite été réunies de façon équimolaire à 100 pM (concentration recommandée par le fournisseur) avant la réalisation de la PCR émulsion.

2.3. PCR émulsion et séquençage

Ces étapes ont été réalisées par les ingénieurs de la plateforme de séquençage hospitalo-universitaire *BISCEm* de Limoges.

La technologie Ion Torrent utilise la PCR émulsion. Celle-ci, réalisée à l'aide de l'automate Ion Chef, permet l'amplification clonale de chaque fragment d'ADN à la surface d'une sphère possédant des séquences complémentaires aux adaptateurs. Chaque bille est individualisée par une émulsion dans un mélange eau-huile, et forme ainsi un microréacteur (ou « *Ion Sphere Particules* ») comprenant plusieurs millions de copies clonales du fragment d'ADN initial. Cette PCR de 50 cycles est réalisée grâce à l'automate Ion Chef[®] Instrument et dure environ 6 heures (Figure 27).

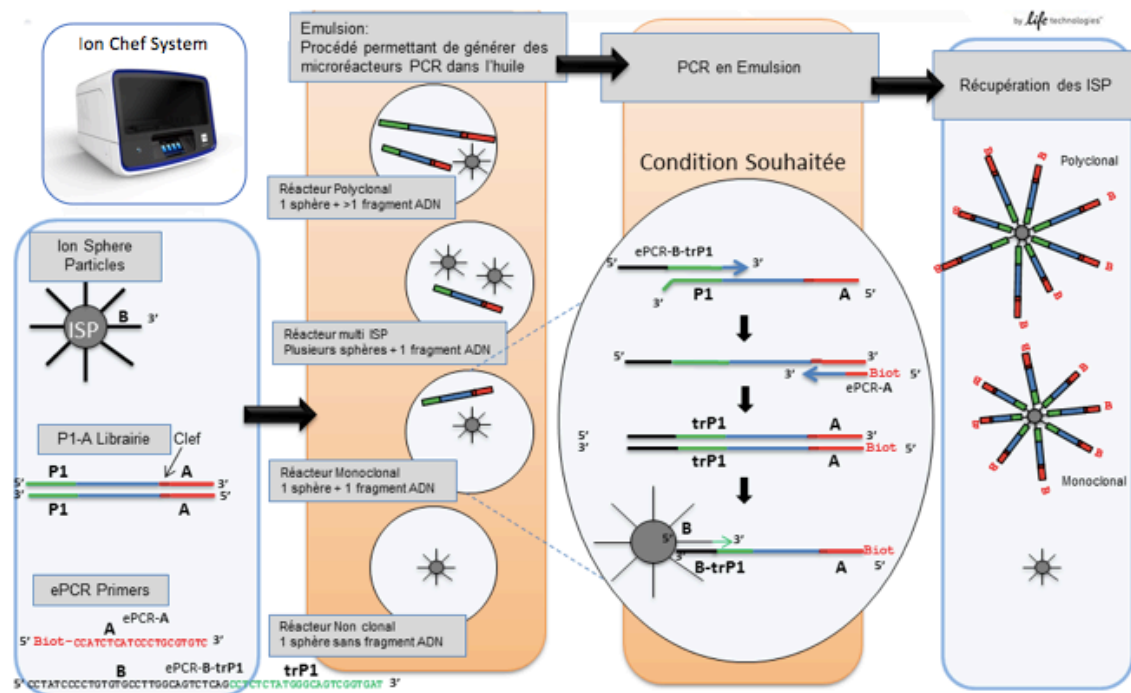


Figure 27 : Etapes de la PCR émulsion préalable au séquençage haut débit. D'après ThermoFisher Scientific.

La configuration optimale et souhaitée correspond à l'individualisation, au sein d'une seule et même microgouttelette : d'une sphère (ISP), d'un unique fragment d'ADN et du nécessaire pour réaliser la PCR émulsion (amorces, dNTP, ADN polymérase). L'adaptateur P1 (en vert) permet la fixation des fragments d'ADN au niveau de la surface des sphères tandis que l'adaptateur A (en rouge) sert par la suite à la capture des sphères couplées aux fragments d'ADN.

Les ISP sont ensuite purifiées et chargées sur une puce dont la surface est recouverte de 150 millions de micropuits, dont chacun permet l'insertion d'une seule bille. L'ajout des enzymes et des nucléotides donne lieu, s'il y a incorporation du nucléotide présent en solution (A, T, C ou G), à la détection des ions proton H^+ par un micro-pHmètre présent au fond de chaque puit (Figure 28). Ces protons sont libérés lors de la phase d'élongation ; ce signal chimique est converti en signal électrique, ce qui permet de recueillir les séquences correspondantes à chaque fragment.

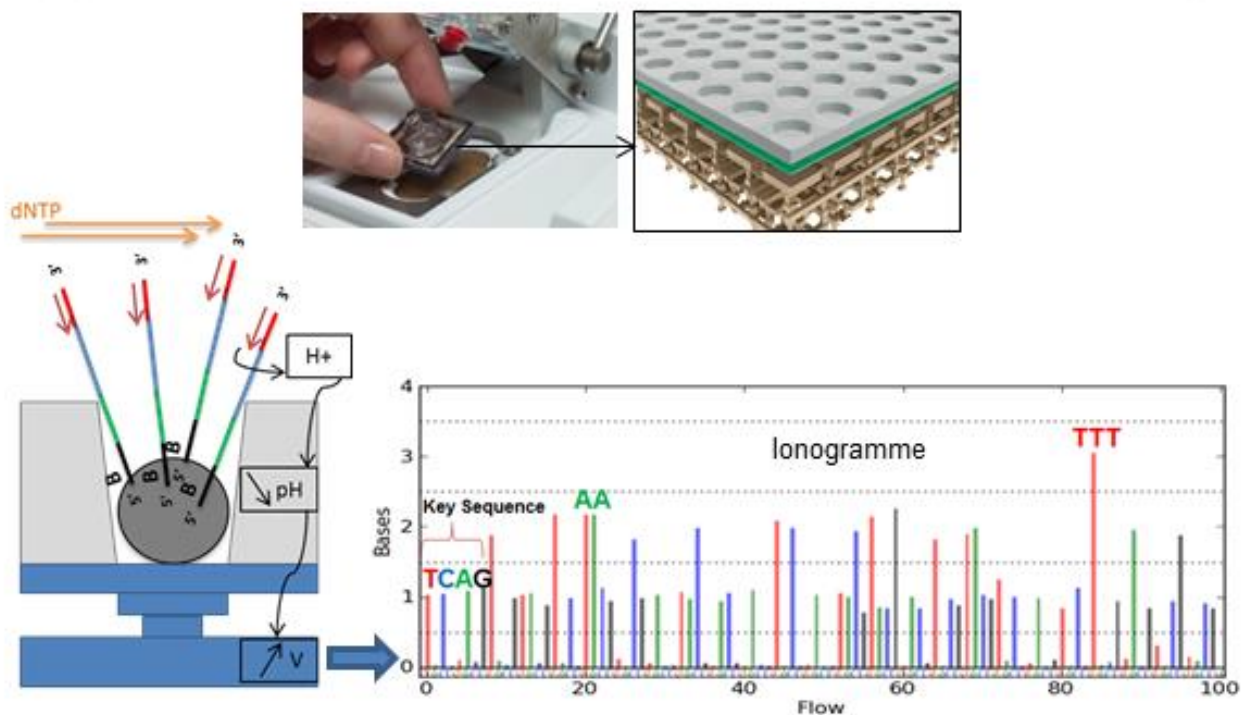


Figure 28 : Principe du séquençage par technologie Ion Torrent. D'après ThermoFisher Scientific.

Les puces sont élaborées de manière à ce qu'un puit ne puisse contenir qu'une seule sphère. La technologie Ion Torrent repose sur la mesure en temps réel de l'émission de protons produits lors de l'incorporation d'une base pendant l'élongation. Ces signaux chimiques (variations de pH) sont transformés en signaux électriques (variations de potentiel) puis traduits sous forme d'ionogramme : à chaque cycle, une base différente est injectée et une différence de potentiel est mesurée si elle est incorporée. Cette valeur est proportionnelle au nombre de bases. La séquence clé « TCAG » permet d'aligner les résultats sur ses niveaux d'expression (intensité de signal correspondant à 1 base incorporée).



Figure 29 : Photographie de la plateforme de séquençage haut-débit du laboratoire

A droite, l'automate Ion Chef[®] System permettant la préparation de la PCR à émulsion, à gauche le séquenceur Ion GeneStudio[®] S5Plus, ThermoFisher Scientific

Le séquençage a été réalisé sur l'automate Ion GeneStudio[®] S5 Plus (ThermoFisher Scientific) avec une puce Ion 540 Chip[®], qui permet de générer près de 90 millions de fragments (ou *reads*) et de lire des séquences jusqu'à 400 pb (Figure 29). Trente bibliothèques (soit trente souches de *S. aureus*) ont été simultanément séquencées sur une puce afin d'obtenir une profondeur de séquençage suffisantes. La profondeur correspond au nombre de fois qu'un nucléotide donné a été lu. Plus elle est importante, plus la détection des éventuels variants sera bonne, et meilleure sera la fraction du génome couverte.

A l'issue du séquençage, les fichiers ont été directement traités par le programme Ion Torrent Suite v5.8.

3. Analyse bioinformatique

3.1. Assemblages des *reads*

Après le séquençage des échantillons, la conversion des données brutes en données exploitables biologiquement est une étape essentielle et critique. L'algorithme de « *base calling* » permet la conversion des données sous forme de nucléotides (A, T, C, G) formant des séquences appelées « *reads* » regroupées dans un fichier au format UBAM. Ce dernier sera par la suite converti en format FASTQ par le logiciel Bamtools. À chaque base incorporée est associé un score de qualité de séquençage (ou Phred Score), qui est retrouvé à la fois dans les fichiers UBAM et FASTQ. Néanmoins, ces fichiers générés sont très volumineux et peuvent dépasser plusieurs Giga octets d'informations. Afin de réduire leur taille et pour interpréter les résultats, il est nécessaire d'assembler les *reads* qui se superposent afin de recréer la séquence d'ADN originelle de la bactérie sous forme de contigs, c'est-à-dire des fragments de plusieurs centaines de milliers de bases. Cette étape est particulièrement critique car elle dépend beaucoup de la qualité du séquençage, du taux d'erreurs de la technique employée, de la profondeur du séquençage [153], ou encore du logiciel d'assemblage [154][155]. Nous avons choisi d'assembler nos différents *reads* en contigs via le logiciel d'assemblage MIRA v4.9.5. Les paramètres par défaut et l'option « Iontor » pour spécifier la technologie ont été utilisés.

Les données brutes (*reads*) ont de plus été confrontées à la séquence de référence du *S. aureus* NCTC8325 (numéro d'accension Genbank CP000253.1) afin de déterminer la profondeur du séquençage. A partir des contigs, les différents échantillons ont été soumis à plusieurs bases de données d'analyse de séquences.

3.2. Utilisation des bases de données

3.2.1. Typage des souches et phylogénie

L'affiliation aux ST et CC de chaque souche a été réalisée grâce à PubMLST, une interface qui utilise la *Bacterial Isolate Genome Sequence database* (BIGSdb). Cette dernière a été développée par Jolley K. et est localisée à l'Université d'Oxford [156]. Ce programme recherche dans l'échantillon la présence des sept gènes de ménage (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) et renseigne leurs allèles et leurs éventuelles variations.

L'identification du type d'Agr a été effectuée sur le logiciel Geneious[®] version Prime v2020.0.4 par identification de séquences à partir des amorces utilisées dans l'étude de Garnier F. *et al* [157].

Concernant le typage de la protéine A, nous avons utilisé la base de données spaTyper, qui identifie les profils de répétition selon la nomenclature de Ridom et Kreiswirth [158].

Enfin, la proximité phylogénétique des souches a été investiguée à partir du logiciel REALPHY v1.12 développé par l'Université de Bâle et qui permet de construire un arbre phylogénétique en fonction de la proximité de séquences. Cette analyse permet de visualiser les liens génétiques entre les différents CC et ST. Trois souches de références (*Mu50*, *RF122* et *NC_017333*) de ST et CC différents ont été utilisées pour générer cet arbre.

3.2.2. Identification des facteurs de résistance

La base de données ResFinder v4.1. du *Center for Genomic Epidemiology* (Lyngby, Danemark) a été utilisée afin de détecter les FDR présents dans les génomes de nos isolats [159]. Les paramètres par défaut, à savoir une identification nucléotidique supérieure à 90 % et une couverture de la longueur des gènes supérieure à 60 %, ont été sélectionnés pour rechercher les gènes de résistance acquis. Pour les isolats présentant une résistance à la méticilline conférée par le gène *mecA*, nous avons utilisé le programme SCCmecFinder v1.2. pour identifier les variants de *SCCmec* [160]. Un seuil supérieur à 60% minimum de couverture de séquence et une identité supérieure à 90% ont été également choisis.

3.2.3. Identification des facteurs de virulence

Pour identifier les gènes associés aux FDV, nous avons soumis les séquences des différents échantillons à la base de données VFDB (*Virulence Finder DataBase*). Cette dernière permet l'identification de 115 FDV d'intérêt (Tableau Annexe 1). Pour confirmer la présence de gènes codant les protéines d'adhésion ainsi que certaines enzymes, nous avons individuellement analysé les contigs sur le logiciel Geneious[®] Prime v2020.0.4 par alignement de séquences nucléotidiques (paramètres de bases, sensibilité intermédiaire, 5 itérations) et « *Basic Local Alignment Search Tool* » (BLASTn) des régions d'intérêt avec un pourcentage de couverture et d'identification supérieur à 99,5%. En effet, la base de données VFDB n'est pas en mesure de séparer certains gènes dont la similarité de séquence est haute (certains gènes codant des protéines de la famille des MSCRAMMs) ou dont la variation allélique est forte (par exemple la protéine A et la coagulase libre).

De la même façon, le typage capsulaire a été réalisé à l'aide de Geneious Prime, avec comme gènes de référence les clusters *cap5* et *cap8* (numéro GenBank U81973 et U73374, respectivement).

3.2.4. Identification des éléments génétiques mobiles (EGM)

Enfin, pour identifier les éléments génétiques mobiles portés par les différents isolats, les bases de données PlasmidFinder v.2.1 et PHASTER ont été utilisées, respectivement pour l'identification des éléments plasmidiques et pour l'identification des éléments phagiques. Nous avons choisi pour la première, basée sur la reconnaissance des gènes de réplicase *rep*, un seuil supérieur à 60% minimum de couverture de séquence et une identité supérieure à 95%. Pour la seconde, un score d'identification des séquences codantes phagiques supérieur à 90 a été accepté. Ce score est basé sur une combinaison de trois méthodes de recherche des éléments phagiques et peut atteindre 150 (score maximal). Un score compris entre 90 et 150 est considéré comme excellent.

3.3. Associations des variables

L'intégralité des analyses en coordonnées principales et corrélation de Pearson a été réalisée à partir du logiciel Primer-e version 7.

4. Associations des données génomiques aux données cliniques

Les résultats de typage des isolats, la présence d'éléments génétiques mobiles et des gènes de virulence ont été confrontés aux données cliniques recueillies et notamment au développement d'un processus infectieux respiratoire au cours du séjour en Réanimation Polyvalente. Toute association a été relevée.

Troisième partie : Résultats

Nous avons choisi de décrire les caractéristiques de chaque isolat selon les données cliniques, les données de typage, les données phylogénétiques, les profils de résistance puis de virulence. Ces derniers ont été comparés aux EGM retrouvés et aux données cliniques afin de mettre en évidence des associations statistiques.

1. Nombre d'échantillons et données cliniques

De Juillet 2020 à Décembre 2020, quarante-trois isolats de *S. aureus* issus de quarante-et-un patients ont été recueillis à partir de différents prélèvements respiratoires. Dans le Tableau 7, sont référencés les données démographiques des patients, le motif d'admission, le recours à une intubation orotrachéale, l'apparition d'infections au cours du séjour et leur localisation, l'origine ainsi que les caractéristiques microbiologiques de chaque prélèvement.

Une prédominance masculine a été observée avec trente-deux hommes (78%) et neuf femmes (22%). L'âge moyen des patients de notre étude était de 56 ans.

Les motifs d'admission étaient surtout d'ordre neurologique (n=16, 39%) puis cardiaque (n=6, 15%), infectieux (n=6, 15%), poly-traumatique (n=5, 12%), digestif (n=3, 7%), et autres (n=5, 12%). Un seul patient n'a pas été intubé. Trente-trois patients ont présenté un épisode infectieux au cours de leur séjour, dont vingt-cinq au niveau pulmonaire. Parmi ces derniers, dix-neuf PAVM et deux trachéobronchites ont été documentées. La durée moyenne d'intubation avant l'apparition d'une PAVM était d'environ 5 jours.

D'un point de vue microbiologique, la plupart des prélèvements analysés provenaient d'AET et étaient plurimicrobiens. En effet, dix-huit prélèvements présentaient à la fois du *S. aureus* et une entérobactériale (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* ...) en culture. Dans neuf cas, une association avec *Haemophilus influenzae* était observée tandis que douze prélèvements ne retrouvaient que du *S. aureus*. Onze PAVM et deux trachéobronchites ont été documentées à *S. aureus*, quatre PAVM en co-infection *H. influenzae* – *S. aureus*, et quatre autres PAVM à Entérobacterales.

Quinze bactériémies ont été observées dans notre étude dont 6 documentées à *S. aureus*. Quatre de ces dernières avaient un point d'appel pulmonaire, pour les deux autres bactériémies, une porte d'entrée cutanée a été identifiée.

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques et microbiologiques

	n (%)
Sexe	
Homme	32 (78%)
Age moyen	56 ans
Motif d'admission	
Neurologique	16 (39%)
Cardiaque	6 (15%)
Infectieux	6 (15%)
Polytraumatisme	5 (12%)
Digestif	3 (7%)
Autre	5 (12%)
Intubation	40 (97%)
Infections au cours du séjour	33 (80%)
Respiratoires	25 (60%)
PAVM	19 (46%)
à <i>S. aureus</i>	11 (27%)
à Entérobactérales	4 (10%)
à <i>H. influenzae</i> et <i>S. aureus</i>	4 (10%)
Trachéobronchite	2 (5%)
à <i>S. aureus</i>	2 (5%)
Légionellose	1 (2%)
Autres (abcès, atélectasie infectée)	3 (7%)
Digestives	5 (12%)
Liées au cathéter	2 (5%)
Urinaires	1 (2%)
Bactériémie	15 (36%)
<i>S. aureus</i>	6
Autres bactéries	9
Type de prélèvement	
AET	36 (88%)
LBA	2 (5%)
Aspiration protégée	2 (5%)
Expectoration	1 (2%)
Prélèvements monomicrobiens à <i>S. aureus</i>	12 (29%)
Prélèvements plurimicrobiens	29 (71%)
Entérobactérales	18
<i>Haemophilus influenzae</i>	9
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1

2. Données issues du séquençage haut débit

A l'issue du séquençage haut-débit, le nombre de *reads* générés pour chaque échantillon a été relevé (Tableau 8). Pour la quasi-totalité des échantillons, plus de 1 million de *reads* ont été générés hormis l'échantillon *Sa4* pour lequel 776,892 *reads* ont été générés. Après mapping sur la séquence de référence du *S. aureus* CP000253.1, il a été possible d'obtenir la profondeur moyenne de nos échantillons. Celle-ci oscille entre 50 à 300 fois (50-300 X), avec une moyenne de 183 fois, c'est-à-dire qu'à chaque position du génome, environ 183 *reads* couvrent ce nucléotide et permettent de s'assurer du bon « recopiage » de la base originelle. Enfin, après assemblage des données via le logiciel MIRA, nous avons obtenu un nombre de contigs >500 pb compris entre 40 et 221 par génome.

3. Description des populations circulantes de *Staphylococcus aureus*

3.1. Caractérisation génotypique des isolats

Dans le Tableau 9 sont référencés les quarante-trois isolats ainsi que leur ST, CC, *spa type*, Agr et type de capsule respectifs. Nous pouvons observer une population polyclonale composée de treize ST différents regroupés en six CC principaux. Les CC30 (n=12) et CC15 (n=9) sont les plus fréquents dans notre étude, suivis du CC5 (n=7), CC398 (n=5), CC8 et CC45 (n=3), et enfin du CC22 (n=2). A noter qu'un nouveau ST a également pu être découvert pour l'isolat *Sa40*.

En ce qui concerne le typage de la protéine A, au moins vingt-deux profils ont été détectés parmi nos isolats. Plusieurs profils sont présents au sein de chaque ST. Par exemple, les isolats appartenant au ST15 présentent plus de six *spa type* différents. Le ST398 fait figure d'exception puisque les cinq isolats possèdent tous le *spa type* t1451. En outre, deux isolats du ST30 présentent le t021 et le t276 tandis que deux isolats du ST5 possèdent le t777. Ceci confirme que les isolats retrouvés dans le service de Réanimation Polyvalente n'appartiennent pas au même clone. Néanmoins, le typage de la protéine A n'a pas pu être réalisé pour huit échantillons soit parce que les séquences répétées identifiées ne correspondaient à aucun profil de la base de données, soit parce que la séquence n'était pas entière après assemblage des *reads*.

Tableau 8 : Nombre de reads, de contigs et profondeur moyenne obtenue pour chaque isolat après séquençage haut-débit.

Isolat	Nombre total de reads	Nombre de contigs > 500 pb	Profondeur moyenne (X)
Sa1	1 296 047	48	92
Sa1bis	1 525 323	56	108
Sa2	1 829 078	80	118
Sa3	1 625 286	40	96
Sa4	776 892	51	53
Sa5	1 280 407	62	87
Sa6	1 728 648	78	122
Sa7	2 204 788	109	157
Sa8	3 488 909	149	240
Sa9	2 423 122	99	165
Sa10	1 427 475	79	93
Sa11	2 096 858	54	145
Sa12	1 780 676	66	124
Sa13	1 824 606	64	119
Sa14	2 994 348	76	213
Sa15	2 246 520	75	157
Sa16	3 467 310	175	240
Sa17	3 491 478	97	225
Sa18	3 124 802	98	203
Sa19	3 146 067	73	225
Sa20	3 313 059	82	220
Sa21	3 077 277	93	203
Sa22	3 602 218	96	238
Sa23	2 334 839	85	162
Sa23bis	1 994 786	54	135
Sa24	4 253 304	221	291
Sa25	3 712 738	139	262
Sa26	4 476 312	202	313
Sa27	2 945 228	104	201
Sa28	3 499 472	85	239
Sa29	3 501 546	152	243
Sa30	2 883 185	186	197
Sa31	2 573 660	53	177
Sa32	3 110 475	96	204
Sa33	3 365 245	74	220
Sa34	3 185 618	80	207
Sa35	2 768 641	84	187
Sa36	2 529 393	43	152
Sa37	2 459 826	63	147
Sa38	3 449 465	81	242
Sa39	4 144 815	57	237
Sa40	2 793 241	134	171
Sa41	3 776 528	105	251

Tableau 9 : Description des *sequence type*, complexe clonal, type de protéine A, système Agr et type capsulaire. ND : non déterminé

Patient	Isolat	<i>Sequence type</i> (ST)	Complexe Clonal (CC)	<i>spa type</i>	Système Agr	Typage capsulaire
1	<i>Sa1</i>	398	398	t1451	I	5
	<i>Sa1bis</i>	398	398	t1451	I	5
2	<i>Sa2</i>	30	30	t276	III	8
3	<i>Sa3</i>	5	5	t045	II	5
4	<i>Sa4</i>	8	8	ND	I	5
5	<i>Sa5</i>	7	7	t605	I	8
6	<i>Sa6</i>	398	398	t1451	I	5
7	<i>Sa7</i>	15	15	t254	II	8
8	<i>Sa8</i>	30	30	t276	III	8
9	<i>Sa9</i>	6	5	t10002	I	8
10	<i>Sa10</i>	45	45	t230	I	8
11	<i>Sa11</i>	30	30	t2018	III	8
12	<i>Sa12</i>	15	15	t8107	II	8
13	<i>Sa13</i>	30	30	t021	III	8
14	<i>Sa14</i>	398	398	t1451	I	5
15	<i>Sa15</i>	398	398	t1451	I	5
16	<i>Sa16</i>	15	15	ND	II	8
17	<i>Sa17</i>	30	30	t4600	III	8
18	<i>Sa18</i>	5	5	t1400	II	5
19	<i>Sa19</i>	582	15	t434	II	8
20	<i>Sa20</i>	30	30	ND	III	8
21	<i>Sa21</i>	5	5	ND	II	5
22	<i>Sa22</i>	30	30	t012	III	8
23	<i>Sa23</i>	4155	22	ND	I	5
	<i>Sa23bis</i>	4155	22	ND	I	5
24	<i>Sa24</i>	30	30	ND	III	8

Patient (suite)	Isolat	Sequence type (ST)	Complexe Clonal (CC)	spa type	Système Agr	Typage capsulaire
25	<i>Sa25</i>	2416	8	t024	I	5
26	<i>Sa26</i>	45	45	t9087	I	8
27	<i>Sa27</i>	15	15	t803	II	8
28	<i>Sa28</i>	30	30	t363	III	8
29	<i>Sa29</i>	5	5	t2302	II	5
30	<i>Sa30</i>	15	15	ND	II	8
31	<i>Sa31</i>	45	45	ND	I	8
32	<i>Sa32</i>	15	15	t12685	II	8
33	<i>Sa33</i>	3661	30	t8574	III	5
34	<i>Sa34</i>	30	30	t021	III	8
35	<i>Sa35</i>	5	5	t777	II	5
36	<i>Sa36</i>	15	15	t1877	II	8
37	<i>Sa37</i>	15	15	t335	II	8
38	<i>Sa38</i>	8	8	ND	I	5
39	<i>Sa39</i>	34	30	t369	III	8
40	<i>Sa40</i>	New ST	New ST	t160	II	8
41	<i>Sa41</i>	5	5	t777	II	5

Parmi les quatre types d'Agr décrits, trois ont été retrouvés dans notre étude. Dans le détail, treize isolats possèdent un Agr de type I (32%), seize un Agr de type II (39%) et douze un Agr de type III (29%). Aucun isolat ne présentait d'Agr de type IV. Nous pouvons observer qu'un même ST porte systématiquement le même type d'Agr avec, par exemple, le ST30 associé à l'Agr de type I. Il en est également de même pour le type capsulaire.

Les types capsulaires 5 et 8 ont été retrouvés dans nos isolats cliniques. Dix-sept isolats ont une capsule de type 5 (40%) tandis que vingt-six présentent une capsule de type 8 (60%).

Les patients 1 et 23 ont chacun présenté deux morphotypes de *S. aureus* (dénommés *Sa1bis* et *Sa23bis*) lors de la culture microbienne de leur échantillon respiratoire, avec un morphotype bêta-hémolytique et un non-hémolytique. Le séquençage de ces isolats montre qu'ils appartiennent au même ST (398 pour le patient 1 et 4155 pour le patient 23), au même type d'Agr, type capsulaire et *spa type*. Ces résultats suggèrent que les deux morphotypes appartiennent très probablement au même clone bactérien mais que l'expression phénotypique en culture peut être différente.

3.1. Analyse phylogénétique des isolats

Un arbre phylogénétique réalisé à partir de l'ensemble des séquences assemblées a été généré (Figure 30). Nous pouvons observer que les différents isolats se regroupent selon leur ST, eux même regroupés en fonction de leur CC. Nous pouvons observer que *Mu50*, de ST5, est bien regroupé au niveau des isolats de même ST, tout comme *NC_017333*, de ST398.

L'isolat *Sa40*, dont le ST est inconnu de la base de données PubMLST, est localisé seul à proximité du ST6 et du ST7.

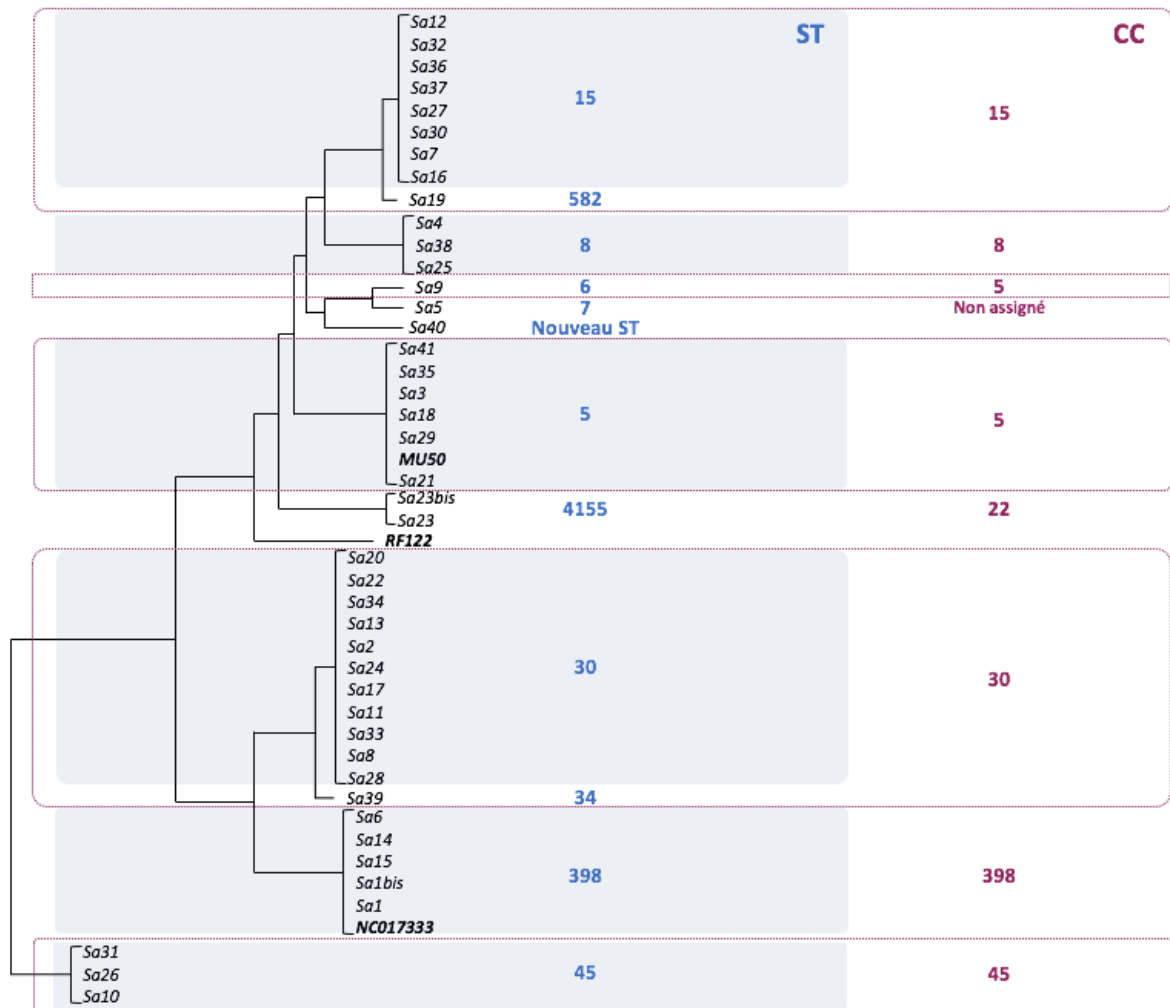


Figure 30 : Arbre phylogénétique obtenu par REALPHY et correspondance entre Sequence Type (ST) et complexe clonal (CC).

3.2. Etude des facteurs de résistance

3.2.1. Analyse génomique des facteurs de résistance

La recherche des gènes de résistance présents sur nos isolats a permis de mettre en évidence des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques (Tableau 10). En premier lieu, le gène *blaZ*, conférant la résistance aux pénicillines, a été retrouvé sur trente-cinq isolats, ce qui correspond à une présence de 81% dans notre étude. Les souches ne portant pas le gène *blaZ* sont réparties dans différents CC. Deux SARM, via le gène *mecA*, ont été identifiés : l'isolat *Sa4*, qui appartient au ST8 et l'isolat *Sa18* au ST5. Lors du typage des cassettes SCCmec par l'outil SCCmecFinder, nous avons retrouvé que les deux isolats portent le type IV (2B). Néanmoins, une différence dans la région J permet de sous-typer la cassette SCCmec. Ainsi, nous retrouvons pour l'isolat *Sa4* une SCCmec de type IVc (2B) et pour l'isolat *Sa18* une SCCmec de type IVi (2B). Des co-résistances aux fluoroquinolones ont également été retrouvées pour ces deux SARM.

La résistance à certains aminosides est portée par cinq isolats. Le gène *aadA1* (n=2) confère une résistance à la spectinomycine et à la streptomycine, tout comme le gène *aadA9* (n=2). Le gène *ant-(9)-Ia* retrouvé sur un isolat ne confère qu'une résistance à la spectinomycine.

Le nouveau ST détecté dans notre étude est le seul isolat pour lequel une résistance à la tétracycline, par l'intermédiaire du gène *tetM*, a été détectée. Enfin, la résistance aux macrolides a été observée sur trois isolats du ST398 via le gène *erm(T)*, et sur trois isolats des ST5 et ST30 via le gène *erm(A)*.

En ce qui concerne les résistances chromosomiques, la résistance aux fluoroquinolones est la plus fréquente. Plusieurs degrés de mutations ont pu être détectés au sein des gènes *grrA* et *gyrA*. En effet, trois isolats ont une mutation unique dans le gène *grrA* : deux substitutions en position 80 d'une sérine par une phénylalanine (pS80F), mutation connue pour conférer une augmentation des niveaux de CMI aux fluoroquinolones, et une substitution en position 45 d'une isoleucine en méthionine (pI45M). Trois autres isolats ont une ou plusieurs mutations dans le gène *grrA* et *gyrA* conférant une résistance de haut-niveau aux fluoroquinolones. La sérine en position 80 du gène *grrA* est systématiquement mutée tout comme la sérine en position 84 du gène *gyrA*.

La résistance chromosomique à l'acide fusidique n'a été retrouvée que dans l'isolat 7 avec la substitution d'une lysine par une sérine en position 461 du gène *fusA*. Deux autres résistances acquises à l'acide fusidique conférées par le gène *fusC* ont également été retrouvées.

Tableau 10 : Comparaison des profils de résistance génotypique (G) et phénotypique (P) retrouvés pour les différents isolats

Sa	ST	CC	Group	β-lactamines		Aminosides			Tétracyclines	Macrolides			Fluoroquinolones	Acide fusidique	Cotrimoxazole	Glycopeptides
				ATB	peg	ox	kan	gen	tob	tet	ery	lin	pri	ofx	fuc	sxt
1	398	398	G	-	-	-	-	-	-	<i>erm(T)</i>			-	-	-	-
			P	0.06	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	>4.0	2.0	1.0	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
Ibis	398	398	G	-	-	-	-	-	-	<i>erm(T)</i>			-	-	-	-
			P	0.12	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	>4.0	2.0	1.0	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
2	30	30	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	2.0	1.0	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
3	5	5	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
4	8	8	G	<i>mecA</i>		-	-	-	-	-			<i>grlA (S80Y)</i> <i>gyrA (S84L)</i>	<i>fusC</i>	-	-
			P	>0.25	>2.0	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	>4.0	16.0	≤10	1.0
5	7	-	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
6	398	398	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	0.5	≤1.0	<0.5	1.0	≤0.5	≤10	≤0.5
7	15	15	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	<i>fusA L461S</i>	-	-
			P	0.06	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	≤0.5	2.0	≤10	1.0
8	30	30	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
9	6	5	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
10	45	45	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
11	30	30	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	≤0.5
12	15	15	G	<i>blaZ</i>		<i>(aadA9)</i>			-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	<0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0
13	30	30	G	<i>blaZ</i>		-	-	-	-	-			-	-	-	-
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	1.0	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0

14	398	398	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	>4.0	2.0	1.0	<0.5	<0.5	≤10
15	398	398	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	0.12	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
16	15	15	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
17	30	30	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
18	5	5	G	<i>blaZ + mecA</i>		<i>(aadA1)</i>			-			<i>grlA (S80F)</i>		-	
			P	>0.25	>2.0	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	2.0	≤0.5	1.0	≤0.5	≤10
19	582	15	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	0.12	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
20	30	30	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
21	5	5	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
22	30	30	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
23	4155	22	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	0.5	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
23bis	4155	22	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	<0.5	≤10
24	30	30	G	<i>blaZ</i>		<i>(aadA1)</i>			-			-		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	2.0	1.0	≤0.5	≤0.5	≤10
25	2416	8	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
26	45	45	G	-		-			-			<i>grlA (I45M)</i>		-	
			P	0.06	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	<1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10
27	15	15	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		<i>fusC</i>	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	8.0	≤10
28	30	30	G	<i>blaZ</i>		<i>(ant(9)-Ia)</i>			-			<i>erm(A)</i>		-	
			P	>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	>4.0	≤1.0	1.0	≤0.5	≤0.5	≤10

29	5	5	G	<i>blaZ</i>		-			-			<i>erm(A)</i>		-	-	-	-
				>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	>4.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	≤0.5	
30	15	15	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	-	-	-
				>0.25	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	≤0.5	
31	45	45	G	-		-			-			<i>grIA (S80F + I45M)</i>		-	-	-	-
				0.12	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	1.0	≤0.5	≤10	1.0	
32	15	15	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	-	-	-
				>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	2.0	≤0.5	<0.5	≤0.5	≤10	1.0	
33	3661	30	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	-	-	-
				>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	2.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	≤0.5	
34	30	30	G	<i>blaZ</i>		<i>(ant(9)-Ia)</i>			-			<i>erm(A)</i>		-	-	-	-
				>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	>4.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0	
35	5	5	G	<i>blaZ</i>		-			-			<i>grIA(S80F + E84K)</i> <i>gyrA(S84L)</i>		-	-	-	-
				>0.25	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	>4.0	≤0.5	≤10	1.0	
36	15	15	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	-	-	-
				>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0	
37	15	15	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	-	-	-
				>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	2.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0	
38	8	8	G	-		-			-			-		-	-	-	-
				0.12	≤0.25	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0	
39	34	30	G	<i>blaZ</i>		-			-			-		-	-	-	-
				>0.25	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	≤0.5	≤10	1.0	
40	Nouvel ST	-	G	-		-			<i>tetM</i>			-		-	-	-	-
				0.12	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	>8.0	1.0	≤1.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤10	1.0	
41	5	5	G	-		-			-			<i>grIA(S80F + E84K)</i> <i>gyrA(S84L)</i>		-	-	-	-
				0.12	0.5	≤4	≤0.5	≤1.0	≤1.0	1.0	≤1.0	≤0.5	>4.0	≤0.5	≤10	1.0	

Vert : Sensible, Jaune : Intermédiaire, Rouge : Résistant, ATB : antibiotique, peg : Pénicilline G, ox : Oxacilline, kan : Kanamycine, gen : Gentamicine, tob : Tobramycine, tet : Tétracycline, ery : Erythromycine, lin : Clindamycine, pri : Pristinamycine, ofx : Ofloxacin, fuc : Acide fusidique, van : Vancomycine.

3.2.2. Comparaison avec les données de l'antibiogramme

Une concordance totale a été observée entre les résultats issus des antibiogrammes et des données génomiques (Tableau 10). Le rendu systématique « résistant » de la Pénicilline G au laboratoire de culture bactérienne explique la discordance pour les six isolats ne possédant pas le gène *blaZ*. Sur le panel d'aminosides testés au laboratoire, seules la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine sont testées. Les gènes de résistance aux aminosides retrouvés (*aadA1*, *aadA9*, *ant-9-Ia*) ne confèrent qu'une résistance à la spectinomycine plus ou moins à la streptomycine qui ne sont pas des antibiotiques testés en routine. Il est donc impossible de détecter la résistance sur l'antibiogramme. Enfin, concernant les fluoroquinolones, l'association de mutations dans *grrA* (en position 80) et *gyrA* (en position 84) confère une augmentation de la CMI significative. Une mutation isolée ou deux mutations localisées dans *grrA* permettent d'augmenter modestement la CMI sans conférer un phénotype d'antibiorésistance.

3.2.3. Profil de répartition des plasmides

La plupart des souches de *S. aureus* portent un voire plusieurs plasmides. Neuf types plasmidiques basés sur la classification des gènes initiant la réplication (*rep*) ont été retrouvés dans nos isolats après confrontation des séquences à la base de données PlasmidFinder. Les plasmides ayant un gène de type *rep16* et *rep5a* sont clairement les plus fréquents avec respectivement 26 et 23 isolats porteurs (Figure 31). Ces deux types plasmidiques sont quasi-systématiquement associés et prédominent au sein des ST15 et ST30. D'autres plasmides sont exclusivement retrouvés dans un seul ST. C'est le cas par exemple de *rep7c* présent dans le ST8, *rep20* dans le ST5 ou encore *rep13* dans le ST398. Par ailleurs, d'autres plasmides sont retrouvés dans plusieurs ST différents tels les *rep19* et *rep21*. Enfin, deux plasmides n'ont été retrouvés que dans un seul isolat : le *repUS5* dans un isolat du ST45 et le *repUS43* dans l'isolat *Sa40* (nouveau ST).

En comparant les profils de répartition des plasmides avec la présence de gènes de résistance dans nos isolats, il est possible de mettre en évidence des superpositions, qui ont été confirmées par l'analyse des séquences plasmidiques dans la Genbank. Ainsi, il a été retrouvé une association entre la présence du gène *erm(T)* et le plasmide *rep13* au sein du ST398, de même pour *tetM* et *repUS43*. Enfin, le gène *blaZ* a été associé et retrouvé dans plusieurs plasmides dont *rep16* et *rep20*. La dissémination de ce plasmide dans nos isolats corrèle donc avec la forte résistance associée à la Pénicilline G. Quelques-uns des isolats qui ne portent pas de plasmide ne présentent d'ailleurs pas le gène *blaZ*, tels les isolats *Sa26*, *Sa31* (ST45), *Sa38* (ST8) ou *Sa41* (ST5).

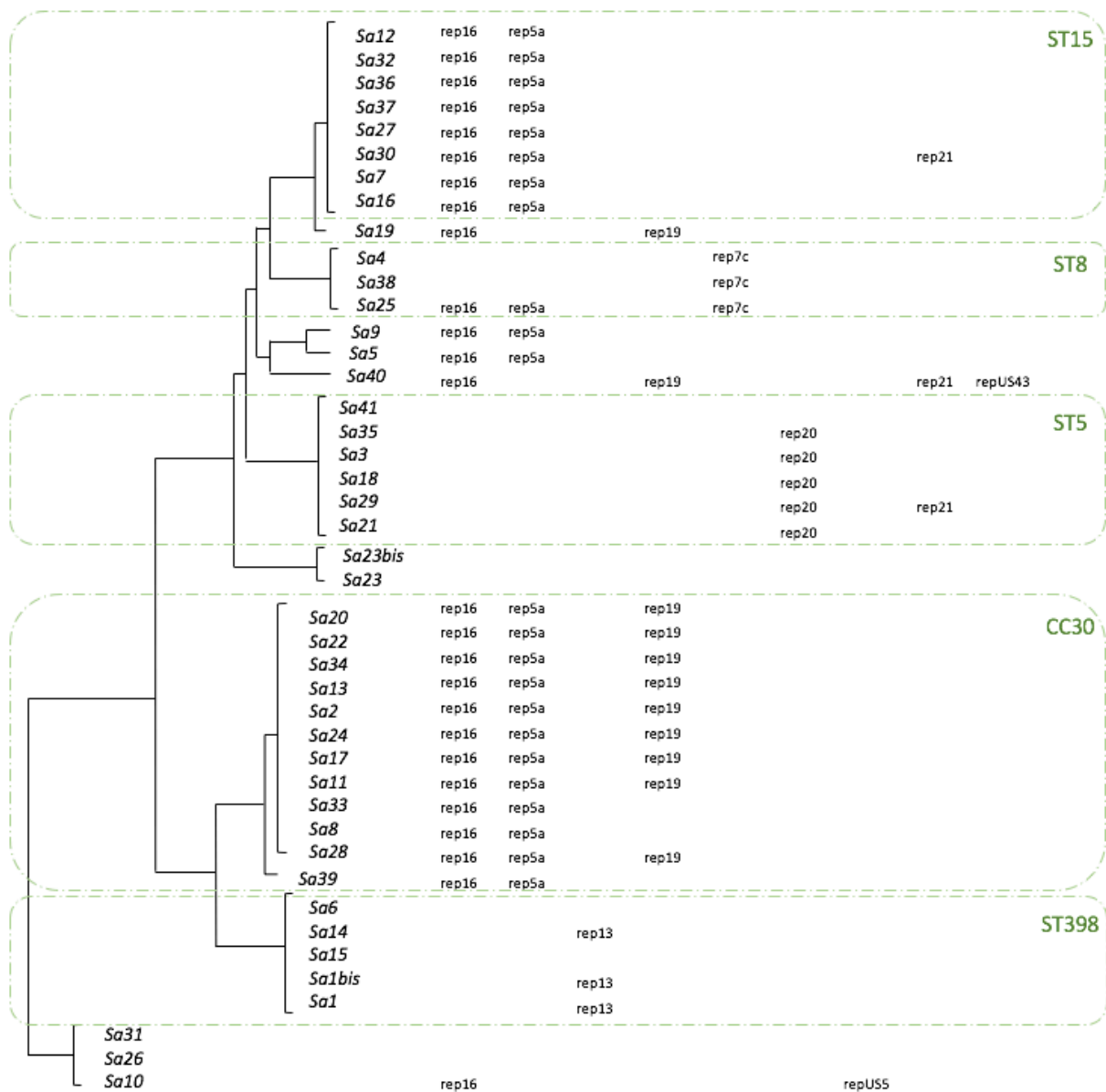


Figure 31 : Répartition des types plasmidiques retrouvés dans chaque isolat selon la classification phylogénétique.

3.3. Etude des facteurs de virulence

3.3.1. Analyse génomique des facteurs de virulence

La présence de 115 gènes de virulence a été investiguée parmi nos quarante-trois isolats. La Figure 32 permet de visualiser la présence de l'ensemble de ces facteurs de virulence. Nous pouvons d'une part observer que certains gènes sont présents sur la totalité des isolats et font partie du *core* génome de *S. aureus*. C'est essentiellement le cas des facteurs d'adhésion, des enzymes et des hémolysines. D'autre part, il existe un certain nombre de facteurs de virulence communs entre les isolats d'un même ST.

Afin d'être plus précis et d'analyser plus finement la distribution des gènes de virulence au sein des isolats, nous avons choisi de séparer ces données par classes de gènes (molécules d'adhésion, enzymes et molécules d'échappement au système immunitaire, protéines exotoxines-*like* et enfin toxines).

3.3.1.1. Adhésion

La plupart des gènes codant des protéines de surface sont présents dans la totalité de nos isolats, c'est par exemple le cas des autolysines, du Clumping Factor A et B, ou encore de la protéine A. De même l'opéron *ica*, en partie responsable de la formation de biofilm, est retrouvé dans les quarante-trois génomes. En revanche, les protéines SdrF, G et H n'ont pas été retrouvées (Figure 33).

Il est intéressant de relever que la distribution des gènes codant les protéines de liaison au collagène (*cna*) et les *fibronectin binding proteins* A et B (FnbA, FnbB) sont directement dépendantes du typage de la souche. En effet, le gène *cna* est systématiquement absent des CC5, 7, 8 et 15. De plus, le gène *fnbA* est absent du CC22, tout comme l'est le gène *fnbB* du CC30.

3.3.1.2. Enzymes

La coagulase libre a été retrouvée dans tous les isolats. La présence des gènes codant les cystéine protéases, métalloprotéases, thermonucléases et lipases est, elle aussi, ubiquitaire (Figure 34). En revanche, celle des gènes des sérine protéases est dépendante du typage de la souche. Ainsi, elles sont quasi systématiquement présentes dans les isolats du CC15 alors qu'elles sont absentes des isolats des CC22, 45 et 398. *splA* et *splB* sont, elles, absentes du CC30 tandis que seule *splE* est absente du CC5. Chaque CC possède donc un profil de sérine protéases différent.

3.3.1.3. Molécules d'échappement immunitaire

Bien évidemment, la capsule est présente sur tous nos isolats et le typage a été effectué (cf Tableau 9). Le gène codant l'adénosine-synthétase (*adsA*) et le gène *sbi* sont également partout retrouvés (Figure 34). Cependant, les gènes *sak*, *chips* et *scn* sont aléatoirement distribués au sein de nos isolats. Ces gènes font, en effet, partie du cluster d'échappement immunitaire (IEC) avec l'entérotoxine A et P. La distribution de ces gènes est variable et

fonction des types d'IEC rencontrés et nous avons pu définir leur fréquence dans le Tableau 11. Les types A, B et C sont les plus fréquents et environ 10% des isolats ne portent pas d'IEC.

Tableau 11 : Type et fréquence des IEC retrouvés

Type d'IEC	Gènes	Nombre	Pourcentage
A	<i>sea-sak-chips-scin</i>	10	24,4 %
B	<i>sak-chips-scin</i>	6	14,6 %
C	<i>chips-scin</i>	11	26,8 %
D	<i>sea-sak-scin</i>	3	7,3 %
E	<i>sak-scin</i>	2	4,9 %
F	<i>selp-sak-chips-scin</i>	3	7,3 %
G	<i>selp-sak-scin</i>	2	4,9 %
absent	-	4	9,8 %

3.3.1.4. Protéines exotoxines-*like*

La Figure 35 recense les différents profils de gènes codant les protéines exotoxines-*like*. Sans surprise, leur présence est corrélée au ST à quelques exceptions près. Entre deux et onze gènes associés aux protéines exotoxines-*like* sont retrouvés par isolat.

3.3.1.5. Toxines

Enfin, la présence des gènes de toxines est présentée dans la Figure 36. Outre les hémolysines α , δ et γ qui sont systématiquement retrouvées, aucune autre toxine n'est uniformément présente. Peu d'entérotoxines sont retrouvées hormis le cluster de gènes des entérotoxines (*egc*) regroupant *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo* et *selu*. Ce dernier est retrouvé dans les CC5, 22, 30 et 45 mais absent des autres complexes.

Les leucocidines D et E n'ont été retrouvées que dans les isolats du CC5, 6, 7, 8 et 15. A noter que seul l'isolat *Sa6* présente le gène codant l'exfoliatine A (*eta*), et que dix isolats du CC30 (83%) portent le gène *tst*. Il n'est d'ailleurs exclusivement retrouvé que dans ce CC. Seuls les cinq représentants du CC398 ne portent aucun gène de virulence étudié à l'exception des hémolysines.

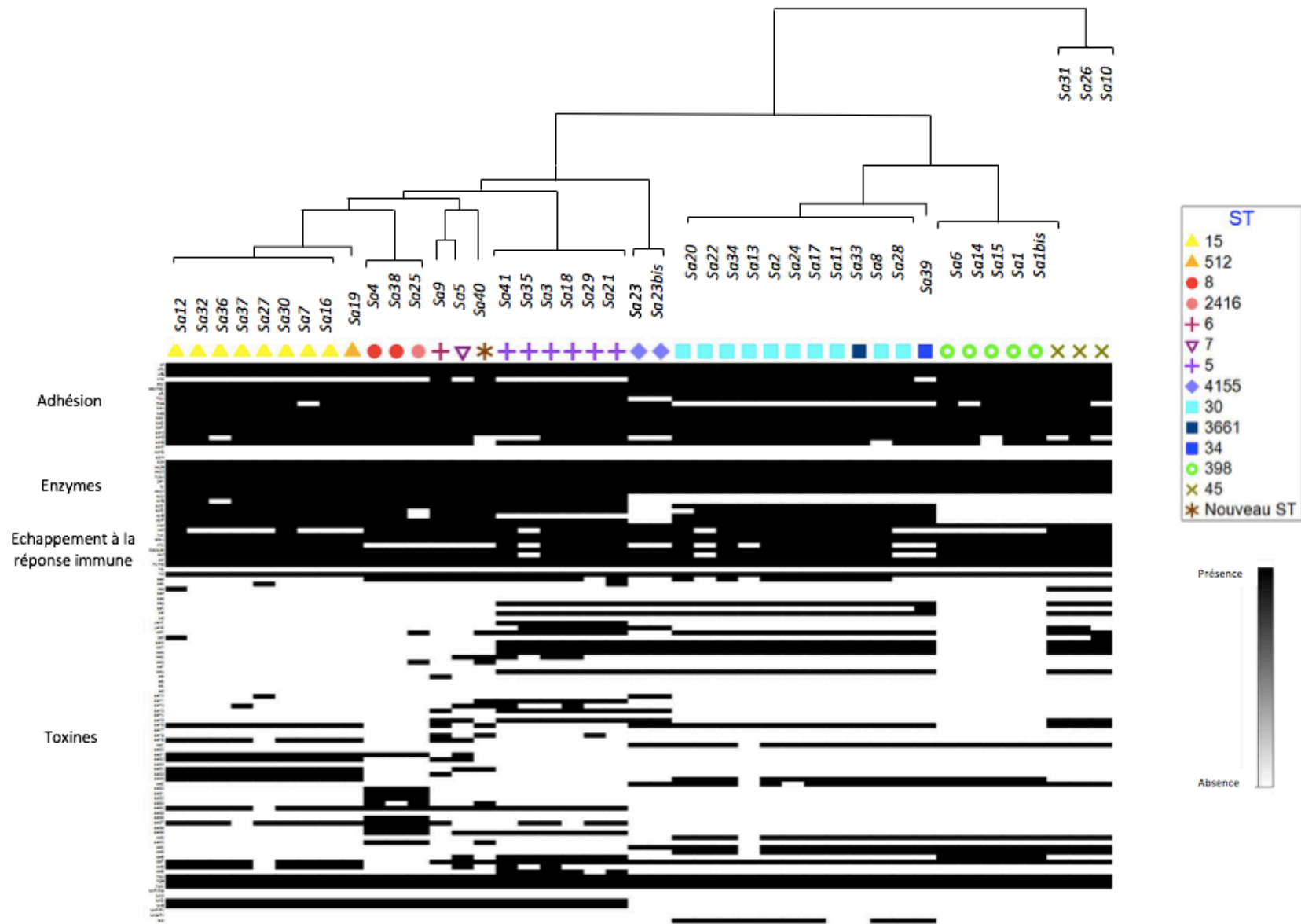


Figure 32 : Représentation en *shade plot* de la répartition des facteurs de virulence étudiés selon les isolats et leur Sequence Type.

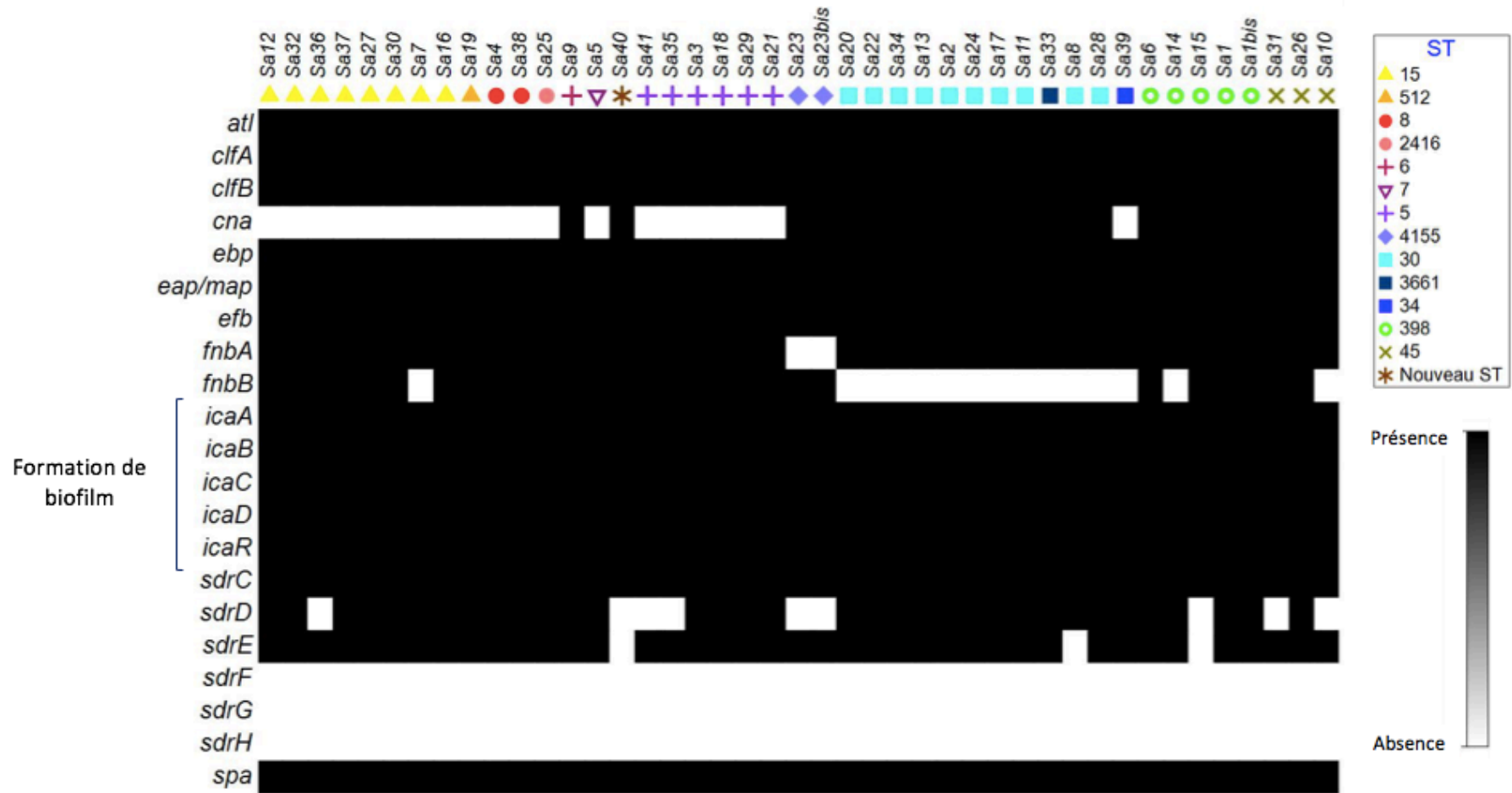


Figure 33 : Représentation en *shade plot* de la répartition des gènes de virulence impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm.



Figure 34 : Représentation en *shade plot* de la répartition des gènes de virulence codant des enzymes et des protéines impliquées dans l'échappement à la réponse immune.

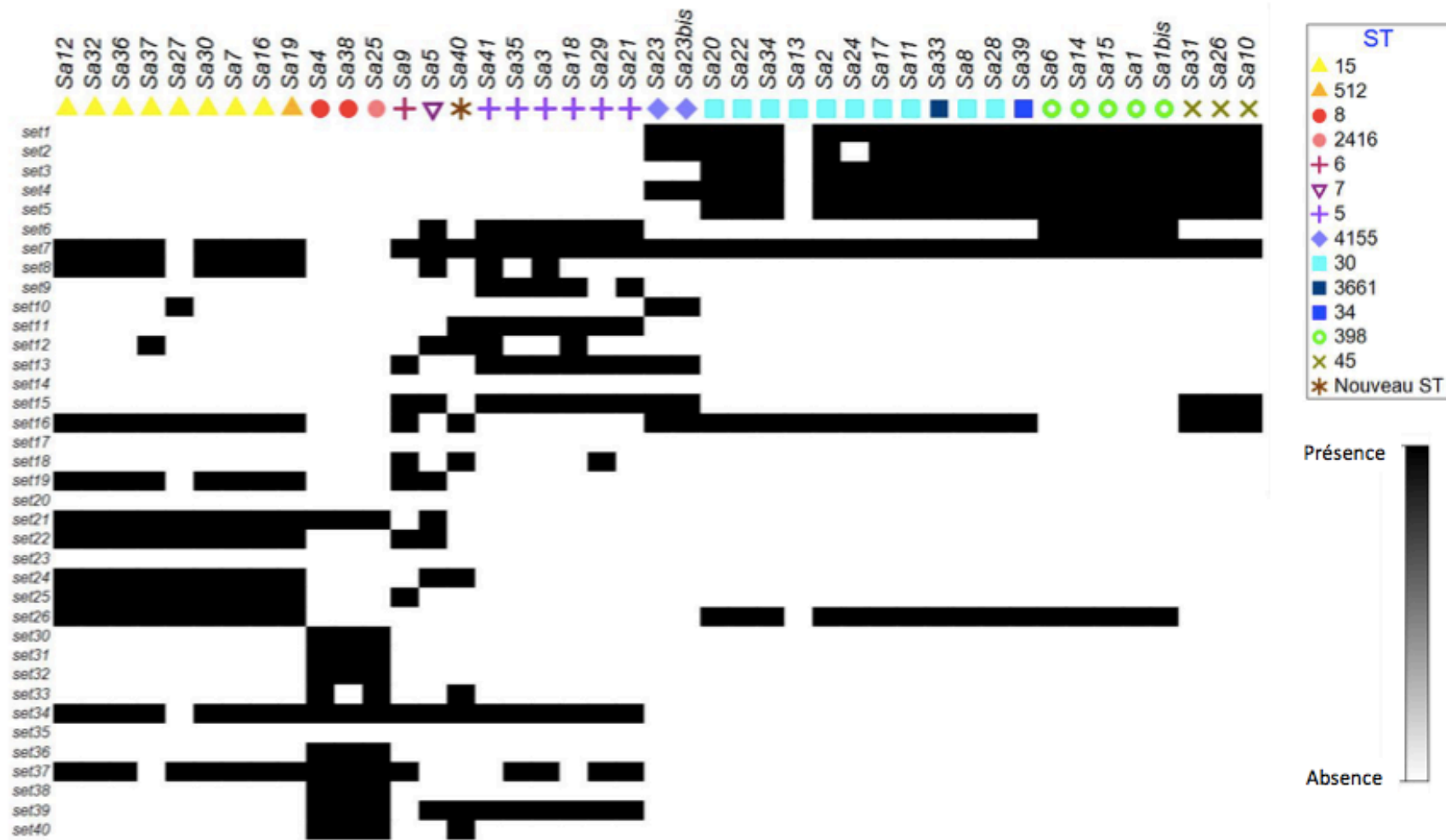


Figure 35 : Représentation en *shade plot* des différentes associations de protéines exotoxines-*like*.

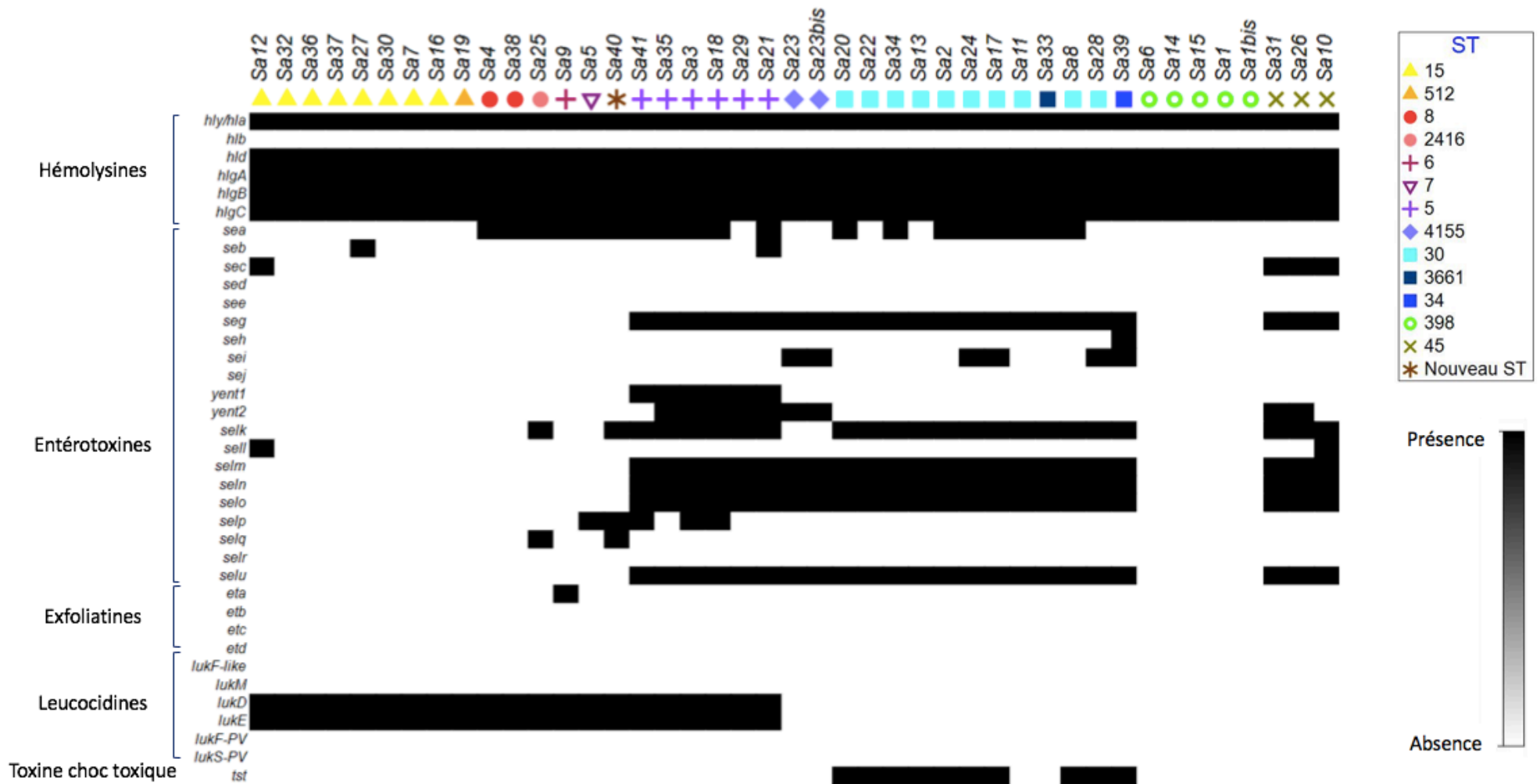


Figure 36 : Représentation en *shade plot* de la répartition des gènes codant des toxines.

3.3.2. Profil de répartition des phages

A partir des données issues de PHASTER, dix-huit phages différents ont pu être retrouvés dans nos quarante-trois isolats avec un excellent score d'identification. Seuls ceux-ci ont été pris en compte dans notre analyse. Les autres phages dont le score était intermédiaire sont référencés en Annexe 2.

Une moyenne de 1,3 phage par isolat a été retrouvée. Quatre isolats n'ont cependant pas présenté de phages : il s'agit de deux isolats du CC15 et de deux du CC45. Dans tous les autres isolats, au moins un phage a été identifié. Le CC30 est celui qui en contient le plus fréquemment. Les phages phiNM3 et phiPT1028 sont d'ailleurs uniquement retrouvés dans ce CC (Tableau 12). Dans plus d'un tiers de nos isolats, le phage phi2958PVL a été retrouvé avec une répartition au sein de plusieurs CC. Il est également intéressant de noter que tous les isolats du CC398 portent le phage phiST398 qui comme son nom l'indique n'est retrouvé que dans ce ST. Enfin, neuf phages ne sont présents que dans un seul isolat. Ceci confirme la diversité des souches retrouvées, en particulier dans les CC5 et 15 qui hébergent une grande diversité de phages.

A partir de ces données, il nous a été possible d'associer la présence de certains FDV aux phages retrouvés dans nos isolats. En effet, certains phages portent des gènes de virulence appartenant principalement à l'IEC, aux leucocidines de Panton-Valentine et aux exfoliatines.

Parmi nos isolats, il y a clairement une association entre le type d'IEC et les phages retrouvés (Annexe 2). En effet, le phage phiNM3 porte dans son génome les gènes *sea-sak-chips* et *scin*. Six isolats du ST30 possédant ce prophage sont associés à ce type d'IEC. De même, le phage phiN315 est associé au type F d'IEC, tout comme le sont le type B avec le phage P282 et le type C avec le phage ST398.

Le nouveau ST détecté possède un seul phage retrouvé uniquement dans cet isolat. Il s'agit du phage phiNM2.

Tableau 12 : Types de phages retrouvés, complexes clonaux et types d'IEC associés.

Phages	Nombre d'isolats	CC impliqués	Type d'IEC associé
phi2958PVL	16	CC5 (n=3), CC8 (n=2) CC15 (n=5), CC22 (n=2) CC30 (n=4)	-
phiNM3	6	CC30	A
PT1028	6	CC30	-
phiST398	5	CC398	C
phiJB	4	CC7 (n=1), CC8 (n=1) CC15 (n=1), CC30 (n=1)	-
phiN315	3	CC5	F
AJ-2017	3	CC8 (n=1), CC15 (n=1) CC30 (n=1)	-
53	2	CC5 (n=1), CC30 (n=1)	-
P282	2	CC5	B
SA97	1	CC5	-
SA13	1	CC5	-
88	1	CC5	-
SA345	1	CC8	-
YMC	1	CC15	-
55	1	CC15	-
phiETA3	1	CC15	-
11	1	CC30	-
phiNM2	1	nouveau ST	-
Aucun phage	4	CC15 (n=2), CC45 (n=2)	-

4. Impact de la virulence dans la survenue d'une infection respiratoire

4.1. Profils de virulence des souches

Comme nous l'avons vu précédemment, certains gènes de virulence ne sont pas retrouvés entre tous les isolats. Afin de mieux définir quels gènes sont représentatifs des différents ST, nous avons réalisé une analyse en coordonnées principales (PCoA). Dans ce modèle, la première coordonnée principale, qui compte pour la plus importante distribution des isolats est représentée sur l'axe des abscisses tandis que la seconde est représentée en ordonnée.

Les gènes associés aux exotoxines-*like* protéines ont été enlevés de l'analyse, car ils sont fortement associés au ST et auraient induit un biais d'analyse.

Comme attendu, l'analyse en PCoA des gènes de virulence permet de regrouper les différents isolats selon leur ST (Figure 37). Cinq clusters peuvent y être observés. Le premier cluster correspond aux ST6, 7, 8, 15 ainsi qu'au nouveau ST décrit. Ces ST se démarquent en effet par la présence des gènes des leucocidines *lukD* et *lukE* et des sérine protéases *splA*, *B*, *C* et *D*. Un deuxième cluster regroupant les ST45 et 4155 présente comme caractéristique principale l'association des gènes composant l'*egc* ainsi que l'entérotoxine K. Les ST30, 34 et 3661 portent également ces entérotoxines associées aux sérine protéases C et D. Par ailleurs, les génomes du ST5 se démarquent par la présence simultanée des entérotoxines, des leucocidines et des sérine protéases. Enfin, nous pouvons distinguer le ST398 dont l'absence conjointe de tous ces gènes de virulence est remarquable.

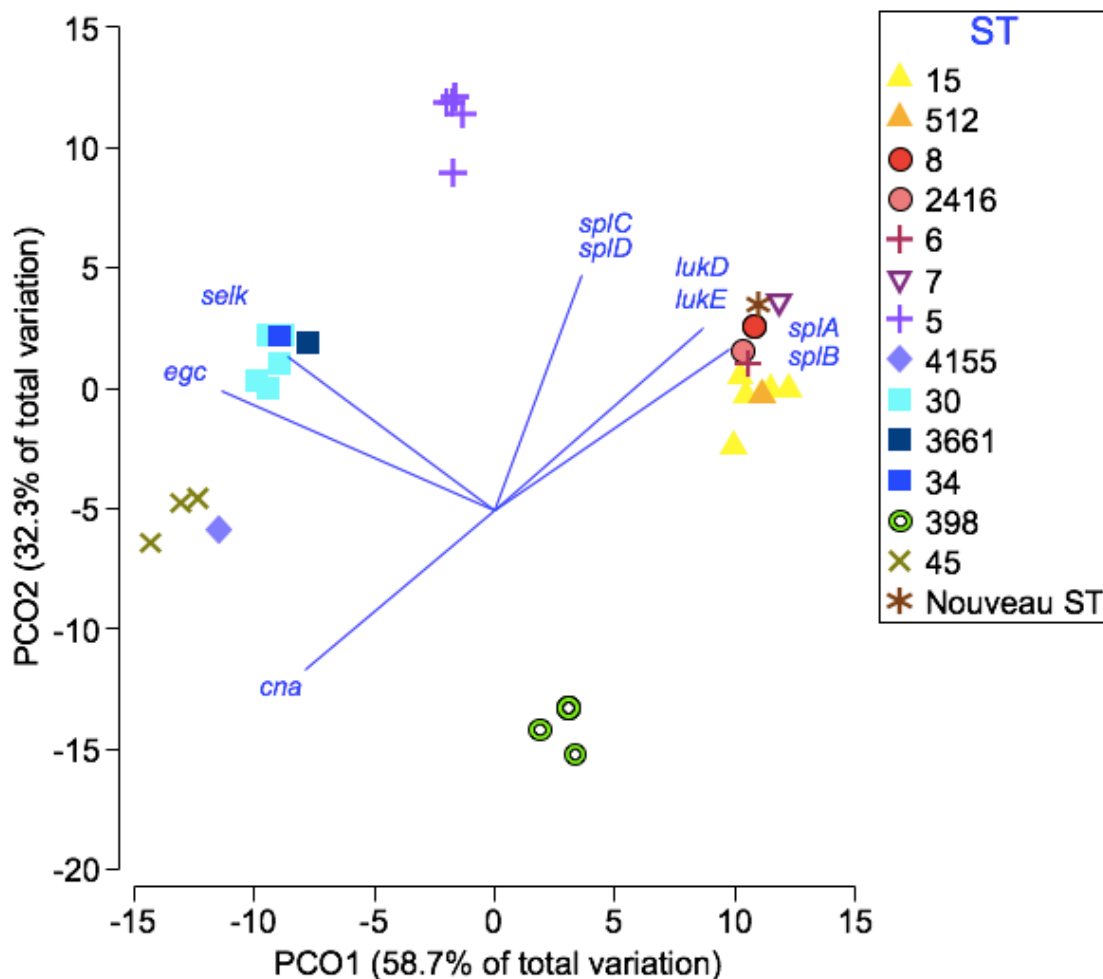


Figure 37 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) des gènes de virulence retrouvés en fonction du ST.

Les gènes associés aux exotoxines-like protéines ont été enlevés de l'analyse. Chaque point représente un isolat, chaque symbole le CC et chaque couleur le ST associé. Les lignes bleues représentent les gènes de virulence ayant permis la séparation des isolats et pour lesquels une corrélation de Pearson $> 0,8$ a été retrouvée.

Un seul gène associé aux protéines d'adhésion permet de différencier les isolats. Il s'agit du gène *cna*. Celui-ci est uniquement présent au sein des ST30, 45 et 398. Il est donc possible de différencier les isolats en fonction de leurs capacités d'adhésion, de profil enzymatique et/ou toxinique.

4.2. Association données génomiques / données cliniques

Les isolats de *S. aureus* ont été retrouvés chez des patients hospitalisés dans plusieurs secteurs d'hospitalisation et sur une échelle de temps de six mois. Il n'a pas été observé de ST prédominant sur une période donnée ni parmi un secteur particulier (Annexe 3).

De plus, nous avons confronté les données de typage des différents isolats à l'évolution clinique des patients d'un point de vue infectieux. Pour rappel, vingt-cinq infections respiratoires ont été recensées, dont douze imputables à *S. aureus* retrouvé prédominant à la culture, avec dans le détail onze PAVM et une infection respiratoire précoce.

Parmi les isolats responsables des infections respiratoires, huit appartiennent au CC30 (7 au ST30), les quatre autres aux CC5, CC15, CC45 et CC398 (Tableau 13). Parmi les douze isolats du CC30 retrouvés dans notre étude, huit sont directement impliqués dans la survenue d'une PAVM à *S. aureus*, auxquels on peut rajouter l'isolat *Sa34* responsable d'une infection respiratoire (atélectasie surinfectée) en association avec *H. influenzae*. Lorsque nous étudions la composition en facteurs de virulence de ces isolats, il est intéressant de relever que ces neuf isolats possèdent tous le gène de virulence *tst* (8 ST30 + 1 ST34). Deux autres isolats (1 ST30 + 1 ST3661) retrouvés en colonisation n'en sont pas porteurs. Le dernier isolat (*Sa20*) possède le gène *tst* : il a été retrouvé chez le patient non intubé qui était considéré comme colonisé.

En ce qui concerne les six bactériémies à *S. aureus* observées dans cette étude, quatre présentaient une porte d'entrée respiratoire (isolats *Sa14*, *Sa24*, *Sa29* et *Sa37*). Plusieurs CC sont impliqués avec, respectivement, un isolat du CC398, CC30, CC5 et CC15. De ce fait, il n'a pas été mis en évidence de relations entre présence du gène *tst* et survenue de bactériémie.

De même, il n'a pas été retrouvé d'autres associations entre FDV et issue clinique.

Tableau 13 : Issue clinique des 41 patients de l'étude colonisés et/ou infectés avec *S. aureus* et association avec les *Sequence type*

		Patients présentant une colonisation respiratoire à <i>S. aureus</i>	Patients présentant une infection respiratoire à <i>S. aureus</i>			Patients présentant une co-infection <i>S. aureus</i> - <i>H. influenzae</i>
			PAVM	Trachéobronchite	Infection respiratoire précoce	
CC15	ST15	4	1	1		2
	ST582	1				
CC8	ST8	2				
	ST2416	1				
CC5	ST6	1				
	ST7	1				
	Nouveau ST	1				
CC5	ST5	4			1	1
CC22	ST4155			1		
CC30	ST30	2 (<i>Sa20</i> [#] , <i>Sa11</i>)	7 (<i>Sa2</i> [*] , <i>Sa8</i> [*] , <i>Sa13</i> [*] , <i>Sa17</i> [*] , <i>Sa22</i> [*] , <i>Sa24</i> [*] et <i>Sa28</i> [*])			1 (<i>Sa34</i> [*])
	ST3661	1 (<i>Sa33</i>)				
	ST34		1 (<i>Sa39</i> [*])			
CC398	ST398	3	1			
CC45	ST45	1	1			1
	Total	22	11	2	1	5

* Patient hébergeant une souche de *S. aureus* productrice de la toxine TSST

Patient non intubé/ventilé

Quatrième partie : Discussion

Le séquençage haut débit des souches bactériennes (ou WGS) constitue une avancée majeure de ces dix dernières années puisqu'il permet d'accéder à l'intégralité du génome bactérien et d'en étudier sa composition et ses caractéristiques. Bien entendu, la qualité des données est primordiale pour les analyses qui en découlent. Le nombre total de *reads* générés de bonne qualité, la profondeur du séquençage ou encore la qualité de l'assemblage réalisés sont des paramètres critiques. A l'issue de nos runs de séquençage, nous avons obtenu un nombre élevé de *reads* pour la quasi-totalité de nos isolats et une profondeur de séquençage en moyenne supérieure à 150 X, ce qui est largement suffisant pour détecter l'intégralité du génome et obtenir la séquence la plus fidèle possible. Sealfon *et al* ont d'ailleurs rapporté qu'une profondeur de 50 X est suffisante pour construire un assemblage correct et pour retrouver les principaux variants d'un génome bactérien [161]. Ces données confirment l'exhaustivité et la qualité des séquences générées. Après assemblage, entre 40 et 220 contigs de plus de 500 pb ont été obtenus, ce qui reste toujours élevé. En effet, un nombre le plus faible possible de contigs est nécessaire pour reconstituer la séquence originelle complète du génome. L'amélioration de nos données pourrait s'envisager par un meilleur choix de logiciel et de paramètres d'assemblage pour générer des contigs de plus grande taille mais elle reste contrainte par la présence de séquences répétées. En effet, avec la technologie de WGS en *short reads*, il est difficile de reconstituer complètement la séquence originelle car la présence de séquences d'insertion (IS) et de séquences répétées complique l'assemblage final. Il est alors nécessaire de combiner des technologies *short reads* avec des technologies *long reads* tel qu'effectué par la plateforme PacBio. Néanmoins, cette dernière augmente drastiquement, à l'heure actuelle, les coûts d'un séquençage, sans forcément apporter d'informations supplémentaires pertinentes par rapport aux questions posées.

Le séquençage haut-débit s'applique à de très nombreuses situations. Cela peut s'effectuer, comme dans notre étude, dans un contexte descriptif des souches bactériennes observées dans un service et/ou dans un contexte pathologique donné. Il est surtout très utilisé dans l'analyse épidémiologique d'un clone circulant tout comme pour rechercher les microévolutions (*Single Nucleotide Polymorphism*) de certains clones [162]. Le recours au NGS peut intervenir aussi, directement à partir du prélèvement primaire, pour la recherche de l'intégralité des gènes de résistance (résistome), de virulence (virulome) ou dans l'identification

des espèces microbiennes présentes (microbiome). Ces applications ont révolutionné la compréhension des interactions entre pathogènes et permis d'identifier de nombreux biomarqueurs protecteurs ou délétères dans la survenue de diverses pathologies (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, mucoviscidose, diabète...).

Enfin, de nouvelles applications du NGS continuent d'augmenter le potentiel de cette technologie au laboratoire de microbiologie. L'identification via la métagénomique clinique de certains agents pathogènes (connus ou non) lors de diagnostics étiologiques difficiles renforce son rôle dans les applications diagnostiques quotidiennes. C'est ainsi, par exemple, que plusieurs virus émergents ont pu être identifiés dans des prélèvements normalement stériles [163][164][165]. Néanmoins, au vu de la quantité et de la complexité des données générées, il est facile de tirer des conclusions hâtives ou erronées et le dialogue avec les cliniciens doit être considéré comme primordial pour éviter toute dérive.

S. aureus demeure un pathogène fréquent chez l'Homme et l'utilisation du WGS permet de mieux caractériser les isolats, de mieux comprendre l'impact des gènes de virulence dans la physiopathologie de certaines infections ou encore de mieux appréhender la dissémination de l'antibiorésistance.

L'étude des isolats de notre étude, a permis de mettre en évidence une population hétérogène composée des CC30, 15, 5, 398, 8, 45 et 22, au sein desquels sont présents différents ST eux-mêmes séparés en plusieurs *spa*-type, permettant d'affirmer le caractère polyclonal des isolats. De même, l'absence de ST prédominant dans un secteur et sur une période donnée confirme l'absence de clone épidémique. Des résultats similaires de l'écologie des *S. aureus* retrouvés en service de Réanimation ont été rapportés aux Pays-Bas et en Pologne où une prédominance des CC1, 5, 8, 15, 30 et 45 était observée [166][160]. Ces CC constituent actuellement les populations clonales les plus répandues dans la population européenne, SASM et SARM confondus [168]. La présence du *S. aureus* dans les voies respiratoires s'effectue le plus souvent par continuité anatomique de sa niche écologique, les voies nasales. Cette colonisation repose surtout sur l'expression de plusieurs protéines de surface dont le *Clumping factor B* [169]. Le gène permettant l'expression de cette protéine a d'ailleurs été retrouvé sur l'ensemble de nos isolats, ce qui conforte l'origine probable du portage respiratoire de nos patients. Le portage nasal constitue un facteur de risque de développer une infection en milieu communautaire et hospitalier [170] et tout particulièrement en service de Réanimation [171]. En effet, les patients se contaminent le plus souvent à partir de leur propre souche et très peu

via l'environnement hospitalier. L'étude de Dancer *et al*, qui a exploré la présence du *S. aureus* dans l'environnement d'un service de Réanimation, confirme ces données [172].

Staphylococcus aureus est, ainsi, un pathogène fréquemment isolé au niveau des voies respiratoires basses en service de Réanimation. Notre étude conforte ce constat. En effet, *S. aureus* a été retrouvé au niveau des voies respiratoires chez quarante-et-un patients sur une période de six mois, soit l'équivalent de deux patients par semaine. La population de notre étude était majoritairement masculine, d'âge moyen de 56 ans avec, dans plus d'un tiers des cas, un motif d'admission d'ordre neurologique. Cependant, nous pouvons tout de même souligner le caractère hétérogène de la population étudiée (motifs d'admission, âges...), qui peuvent influencer les facteurs de risque et, en particulier, l'évolution infectieuse des patients.

Comme attendu, les infections des voies respiratoires basses ont été les épisodes infectieux les plus décrits au service de Réanimation dans notre population. Cela est cohérent avec les résultats de l'étude de Vincent *et al*, qui retrouvait, en 2017, 60% d'infections respiratoires en service de Réanimation à l'échelle mondiale et 56% à l'échelle européenne [173]. Dix-neuf PAVM dont onze directement imputées à *S. aureus* ont été diagnostiquées précocement (inférieur à 5 jours). Cela confirme le caractère particulièrement pathogène du *S. aureus* chez les patients intubés-ventilés. De façon intéressante, neuf patients présentaient une association *Haemophilus influenzae* et *S. aureus* au niveau des voies respiratoires avec cinq co-infections, ce qui révèle une synergie probable entre ces deux espèces.

Peu de gènes de résistances ont été retrouvés parmi nos isolats. Sans surprise, *blaZ* est le gène le plus souvent retrouvé avec une fréquence de 81% d'isolats porteurs. Dans des études similaires, une fréquence évaluée entre 73 et 92% a été mise en évidence [174][175][176][177]. Nos données confortent ainsi cette fréquence moyenne. Seuls deux SARM, de ST5 et ST8, ont pu être isolés. Les éléments SCCmec IVi (2B) et IVc (2B) ont pu être respectivement associés. Ce type de cassette a été découvert en 2002 et dissémine très rapidement à l'échelle mondiale. C'est également le plus petit SCCmec décrit à l'heure actuelle et aucun autre gène de résistance, hormis *mecA*, n'y est retrouvé. Bien qu'il soit de petite taille, les variations observées sont fréquentes et il existe déjà à l'heure actuelle au moins quatorze sous-types [178].

Une concordance parfaite entre le phénotype de l'antibiogramme et les gènes de résistances présents a été observée, bien que peu de résistances d'intérêt clinique aient été relevées. Le WGS est une technique sensible et performante pour détecter les phénotypes de résistance connus mais aussi pour mettre en évidence de nouveaux gènes de résistance.

Néanmoins, il ne remplace pas les méthodes phénotypiques et demeure complémentaire de celles-ci. En effet, le coût, le temps d'obtention des résultats (plusieurs jours vs 48 heures pour un antibiogramme) et la difficulté de certains *pipeline* bioinformatiques à identifier certaines résistances (mutations chromosomiques conférant une résistance aux fluoroquinolones, variants de gènes *blaZ*...) sont des freins à son utilisation en routine hospitalière [179]. L'amélioration des outils bioinformatiques et des bases de données permet de pallier à ces problèmes, et d'obtenir une excellente sensibilité et spécificité comme rapporté par l'étude de Babiker *et al* [180].

Vingt-neuf facteurs de virulence ont été systématiquement retrouvés dans tous nos isolats. La plupart d'entre eux correspondent à des gènes de virulence retrouvés chez tous les *S. aureus* et codent des protéines telles que la protéine A, la coagulase libre ou encore l'hémolysine α . Il est cependant important de signaler que certains gènes présentent une haute variation allélique et ne sont ainsi pas détectés par la base de données VFDB. Il est donc nécessaire de combiner une recherche ciblée de ces FDV aux résultats obtenus. Cela est par exemple le cas, dans l'étude de Bernardy *et al*, du gène codant la coagulase libre, qui a été rapporté absent sur certains isolats mais dont la présence définit pourtant l'espèce *S. aureus* [181]. Il est donc nécessaire d'être prudent quant aux résultats rendus par les différentes bases de données, de les mettre en perspective et de les confirmer individuellement.

Au cours de cette étude exploratoire, nous n'avons pas mis en évidence de souches porteuses du gène de la leucocidine de Panton-Valentine. En revanche, dix souches porteuses du gène *tst* et une souche porteuse du gène codant l'exfoliatine A ont été retrouvées. Par ailleurs, nous avons pu clairement associer le profil de virulence avec le ST. Il nous a ainsi été possible d'identifier des ST qui portent préférentiellement des gènes liés aux entérotoxines, aux leucocidines D et E, à certaines sérine protéases et/ou à des molécules d'adhésion. MacCarthy *et al* avait déjà pu le montrer pour les gènes codant des protéines de surface et des protéines d'échappement à la réponse immunitaire [182].

Le ST398 se distingue des autres par l'absence systématique dans son génome des gènes de toxines étudiés. Celui-ci présente en contrepartie des facultés adhésives plus importantes avec la présence du gène codant les *collagen-binding-proteins*. Ces résultats sont cohérents avec les résultats d'autres études portant sur ce ST [183] [184]. Deux clades ont été rapportés dans la littérature : le premier d'origine humaine, le second d'origine animale et qui s'est, au cours du temps, également transmis à l'Homme. Plusieurs caractéristiques permettent de les

différencier dont la présence de l'IEC de type C (gène *chips-scin*) pour le premier ou la présence d'une résistance à la tétracycline pour le second [185]. Nos résultats tendent à démontrer que ces isolats proviennent du clone d'origine humaine. Le typage de la protéine A montre également que le t1451 est uniformément retrouvé. Celui-ci a été retrouvé dans 11% des ST398 étudiés [186]. Les facultés adhésives accrues du ST398 pourraient en partie expliquer la proportion élevée d'infections de la peau et des tissus mous, des infections ostéo-articulaires ou encore des endocardites, rapportées dans la littérature. A contrario, les souches de SARM du ST398, sont plus fréquemment impliquées dans les infections du tractus respiratoire et des infections du site opératoire, probablement par pression de sélection antibiotique locale. Dans notre étude, seul un isolat appartenant au ST398 a été associé à une survenue de PAVM. Par ailleurs, ce ST est généralement peu résistant. L'étude de Uhlemann *et al* rapporte 25% de résistance aux pénicillines, 3% de résistance aux fluoroquinolones mais 97% de résistance aux macrolides via la présence du gène *erm(T)*. Nous obtenons des résultats globalement similaires. La présence de ce gène porté par un plasmide de type *rep13*, pourrait expliquer l'émergence de ce clone apparu il y a vingt ans. En effet, la résistance à la clindamycine est un avantage sélectif pour ce ST, puisque la prescription de macrolides est fréquente dans les infections de la peau et des tissus mous communautaires, en particulier lors d'infections toxiques (exfoliatines, PVL...).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence un nouveau ST. L'analyse phylogénétique démontre qu'il est isolé, et qu'il est génétiquement le plus proche des ST6 et 7 dans notre étude. Nous avons pu déterminer son *spa*-type de type t160, sa capsule de type 8 et son Agr de type II. Les ST6 et 7 possèdent également une capsule de type 8 mais un Agr de type I, ce qui prouve son éloignement génétique vis-à-vis d'eux. Le type t160 a été retrouvé dans la littérature au sein des ST12 et 13 (absents dans notre travail) et des analyses complémentaires de phylogénie vis-à-vis de ces ST devraient ainsi être envisagées [187]. Cet isolat est le seul pour lequel une résistance à la tétracycline a été retrouvée via l'expression du gène *tetM*. Ce dernier est très probablement porté par le plasmide de type *repUS43*, retrouvé uniquement dans cet isolat. En effet, il a été plusieurs fois rapporté que ce plasmide porte le gène *tetM* chez les Entérocoques [188][189]. Ce plasmide a donc potentiellement été acquis par échange de matériel génétique entre un Staphylocoque et un Entérocoque, ce qui démontre le lien entre les cocci à Gram positif ainsi que le réservoir de gènes de résistance que peut acquérir un Staphylocoque dans son environnement. C'est d'ailleurs de cette façon que les VRSA sont apparus en clinique. La surveillance de l'apparition de nouvelles résistances via des méthodes phénotypiques

(antibiogramme) et génotypiques (WGS) apparaît donc primordiale. Seul le phage phiNM2 a pu être correctement identifié au sein de ce nouveau ST. Il s'agit d'un prophage capable d'être mobilisé. La production de ce bactériophage, comme de certains autres, peut induire la mobilisation de SaPI dont les deux principaux représentants sont SaPI1 et SaPIbov1 pouvant porter les gènes *tst*, *sec*, *sel*, *sek*, ou encore *seq*. Notre nouveau ST peut ainsi présenter une virulence accrue via la mobilisation des gènes *sek* et *seq* présents dans son génome, sur ces îlots. Un variant du *S. aureus* de référence *Mu50*, délété des phages phiNM1, phiNM2, phiNM3 et phiNM4, a clairement été associé à une perte de virulence et donc de pathogénicité, révélant le rôle primordial des prophages dans l'acquisition de virulence chez *S. aureus* [190].

D'autres phages ont été associés, dans notre étude, au cluster d'évasion immunitaire (IEC). Ce dernier regroupe plusieurs gènes de virulence dont l'enchaînement est dépendant du type de phage présent [111]. Ces phages sont le plus souvent insérés au niveau du gène *hly* codant l'hémolysine β , absent dans la totalité de nos isolats. L'insertion de phage à cette localisation est très fréquente dans les isolats d'origine humaine et la présence des gènes de virulence de l'IEC a été associée à une pathogénicité plus importante chez l'animal et l'Homme [191]. Les CC5, 30 et 398 ont ainsi pu être rattachés à un type d'IEC particulier. Néanmoins, il n'a pas pu être mis en évidence d'association entre type d'IEC et profil infectieux respiratoire. Ceci suggère que l'IEC n'est pas un prérequis pour déclencher une infection chez l'Homme. Cependant, il joue un rôle crucial dans l'adaptation à la niche écologique du *S. aureus*.

Pour finir, nous avons pu observer que huit des douze isolats du CC30 étaient responsables de la survenue d'une infection respiratoire basse. Ces isolats sont porteurs du gène *tst* codant la toxine du syndrome de choc toxique. Parmi les quatre autres isolats de ce CC30, deux ne portaient pas le gène *tst* et ont été retrouvés chez des patients qui n'ont pas déclaré d'infection respiratoire. De ce fait, ce gène de virulence pourrait être impliqué dans le déclenchement et la survenue d'une infection pulmonaire, bien qu'il ne soit pas essentiel car d'autres ST peuvent être à l'origine d'une telle infection, sans porter ce gène de virulence. Néanmoins, plusieurs études ont rapporté des cas d'infections respiratoires associés à la présence d'isolats portant le gène *tst* sans pour autant démontrer une association claire [192]. Cela a été en particulier observé lors de co-infections grippe - *S. aureus* [193]. L'expression de cette virulence pourrait également passer, comme pour le nouveau ST décrit dans notre étude, par les phages et la mobilisation des îlots SaPI hébergeant le gène *tst*. Quelques études décrivant l'épidémiologie et la génétique d'isolats pathogènes au niveau respiratoire ont également

montré une fréquence importante de la TSST à la fois dans les pneumopathies communautaires et hospitalières, mais également dans des cas d'endocardites [194]. Plusieurs CC porteurs du gène *tst* (CC22, CC30, CC80) ont ainsi été retrouvés chez les patients présentant une pneumopathie.

Le caractère superantigénique de la TSST et l'activation lymphocytaire forte qui en découle est connue pour perturber profondément le système immunitaire local. En effet, la liaison de cette toxine au niveau du CMH de type II conduit à l'activation des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ avec en particulier un afflux massif d'interleukine 2 et de TNF α . Dans un modèle murin, il a été observé que certains polymorphismes présents sur les gènes HLA-DR pourraient induire une réponse cytokinique amoindrie et donc un effet physiopathologique atténué [195]. Cela a également été observé chez l'Homme, bien que non directement associé à la TSST [196]. A fortes doses, l'IL-2 stimule durablement la réponse T CD8⁺. L'hyperinflammation engendrée par l'activation de ces effecteurs est ainsi délétère pour le tissu pulmonaire. De plus, l'expression d'autres FDV impliqués dans l'échappement à la réponse immunitaire et dans la lyse cellulaire contribuerait à exacerber la réponse immunitaire et l'échappement à celle-ci. Ainsi, l'association synergique de FDV ayant un effet proinflammatoire serait à l'origine du succès pathogénique de certains ST particuliers. D'autres SAg comme les entérotoxines, peuvent conduire à une activation lymphocytaire. Bien que le CC30 porte l'*egc* et l'entérotoxine A, il n'a pas été mis en évidence de caractère plus pathogène de ces SAg. En effet, comme nous l'avons montré, le CC5 possède ces entérotoxines tout comme un arsenal de gènes de virulence (hormis la TSST) mais ne déclenche pas pour autant plus d'infections respiratoires.

Il en résulte que la TSST est probablement la toxine la plus impliquée dans la perturbation et l'exacerbation de la réponse immunitaire au niveau pulmonaire pouvant conduire à la survenue d'une PAVM. Un isolat porteur d'un tel gène doit donc être considéré comme potentiellement plus virulent.

La survenue d'une bactériémie à *S. aureus*, n'a en revanche, pas été associée à la présence du gène *tst* ou d'un autre FDV. Cependant, il est nécessaire de séquencer l'isolat retrouvé dans le sang pour pouvoir affirmer qu'il s'agit du même clone que celui retrouvé dans les voies respiratoires. Des analyses complémentaires sur davantage d'isolats doivent ainsi être effectuées pour confirmer ces résultats préliminaires.

Bien évidemment la pathogénicité dépend fortement des gènes que la bactérie est capable d'exprimer pour coloniser, envahir et échapper au système immunitaire de son hôte. Néanmoins, de nombreux autres facteurs influencent la prolifération de la bactérie tout comme l'expression de ces FDV. Le poumon est un milieu complexe ouvert sur le milieu extérieur où prolifère une flore locale variée qui joue un rôle important dans la colonisation et la multiplication des éventuels pathogènes respiratoires. Les patients hospitalisés en Réanimation présentent de nombreux facteurs de risque et la présence, en particulier, du tube endotrachéal est un frein au bon fonctionnement des défenses locales tant microbiennes qu'immunitaires. Récemment, il a été démontré que certaines bactéries de la flore orale seraient par exemple directement impliquées dans la prolifération du *S. aureus* au niveau pulmonaire et favoriseraient l'expression de certaines toxines via les systèmes de régulation. Ceci a par exemple été démontré sur un modèle de pneumopathie murine à *S. aureus* où un rôle délétère de la bactérie *Prevotella intermedia* a été observée. Cette dernière induirait l'expression de l'hémolysine α à partir du système Agr [197].

Ainsi, le recours aux technologies de séquençage de nouvelle génération permettra probablement dans un futur proche, d'analyser plus finement le microbiote respiratoire et d'éclaircir ces interactions microbiologiques dans la survenue de la pneumopathie à *S. aureus*.

Conclusion

A travers cette étude prospective, nous avons souhaité décrire par WGS, l'écologie des souches de *Staphylococcus aureus* rencontrées dans les prélèvements respiratoires des patients hospitalisés en service de Réanimation sur une période de six mois. Nous avons pu séquencer quarante-trois isolats dont l'analyse de typage montre qu'il s'agit d'une population hautement polyclonale répartie dans l'espace et dans le temps. Nous avons pu identifier un nouveau ST, non connu des bases de données actuelles et son référencement va être réalisé. Les données générées par WGS nous ont permis d'investiguer la composition en facteurs de virulence et de résistance. L'analyse de 115 FDV a mis en évidence un lien fort entre ST et profil de virulence. Une concordance génotypique et phénotypique a été retrouvée lors de l'analyse du profil de résistance, bien que peu d'isolats résistants aient été observés. L'identification d'éléments génétiques mobiles de type plasmidique et phagique nous a permis d'identifier certaines associations entre plasmides et gènes de résistance ainsi qu'entre phages et gènes impliqués dans l'échappement à la réponse immunitaire (IEC).

La confrontation des données cliniques et en particulier l'évolution infectieuse du patient au niveau respiratoire a permis de mettre en évidence le CC30 comme plus fréquemment impliqué dans la survenue d'infections respiratoires et surtout de PAVM. Ce complexe clonal est fortement associé à la présence du gène *tst* codant le superantigène TSST-1 connu pour être responsable du syndrome du choc toxique. Dans notre étude, dix isolats sur douze possédaient effectivement ce gène de virulence. Nous avons, ainsi, émis l'hypothèse que cette toxine pourrait être impliquée dans la survenue de telles infections, bien qu'elle ne soit pas essentielle. Bien entendu, une analyse sur une population plus homogène et sur davantage d'isolats est à envisager pour confirmer ces données.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Rosenbach FJ. Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J.F. Bergmann 1884.
- [2] Gupta SK, Sharma P, Barrett JB, Hiott LM, Woodley TA, Frye JG, et al. Draft genome sequence of a human-associated streptogramin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist* 2019;16:72–3
- [3] Wang J, Liu Y, Wan D, Fang X, Li T, Guo Y, et al. Whole-Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain LCT-SA112. *J Bacteriol* 2012;194:4124.
- [4] Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol IJMM* 2010;300:98–103.
- [5] Zhang L. Vers la compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN chez *Streptomyces* : identification d'acteurs de la recombinaison. *Génomique, Transcriptomique et Protéomique*. Université de Lorraine, 2014.
- [6] Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr* 2018;6.
- [7] Argemi X. Etude de la virulence de *Staphylococcus lugdunensis*. Université de Strasbourg, 2017.
- [8] Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2010;67:3057–71.
- [9] Haaber J, Penadés JR, Ingmer H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2017;25:893–905.
- [10] Kwong SM, Ramsay JP, Jensen SO, Firth N. Replication of Staphylococcal Resistance Plasmids. *Front Microbiol* 2017;8.
- [11] Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2018;31.
- [12] McCarthy AJ, Lindsay JA. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BMC Microbiol* 2012;12:104.
- [13] Omoe K, Hu D-L, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Identification and Characterization of a New Staphylococcal Enterotoxin-Related Putative Toxin Encoded by Two Kinds of Plasmids. *Infect Immun* 2003;71:6088–94.
- [14] Ingmer H, Gerlach D, Wolz C. Temperate Phages of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr* 2019;7.
- [15] Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, et al. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J Bacteriol* 2009;191:3462–8.
- [16] Xia G, Wolz C. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2014;21:593–601.
- [17] Brüssow H, Canchaya C, Hardt W-D. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:560–602.
- [18] Maiques E, Ubeda C, Campoy S, Salvador N, Lasa I, Novick RP, et al. beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2006;188:2726–9.

- [19] Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* 2000;6:458–65. <https://doi.org/10.3201/eid0605.000503>.
- [20] da Silva Filho AC, Raittz RT, Guizelini D, De Pierri CR, Augusto DW, dos Santos-Weiss ICR, et al. Comparative Analysis of Genomic Island Prediction Tools. *Front Genet* 2018;9.
- [21] Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *Fems Microbiol Rev* 2009;33:376–93.
- [22] Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 2003;48:1429–49.
- [23] Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2001;2:376–81.
- [24] Novick RP, Christie GE, Penadés JR. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:541–51.
- [25] Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:14–56.
- [26] 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;38:1008–15.
- [27] Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 1996;15:60–4.
- [28] 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* 2004;42:792–9.
- [29] Hallin M, Friedrich AW, Struelens MJ. spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2009;551:189–202.
- [30] Almeida M. Caractérisation de flores microbiennes intestinale humaine et fromagère par méthode de métagénomique quantitative 2013:162.
- [31] Asadollahi P, Farahani NN, Mirzaii M, Khoramrooz SS, van Belkum A, Asadollahi K, et al. Distribution of the Most Prevalent Spa Types among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* around the World: A Review. *Front Microbiol* 2018;9.
- [32] 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* 2011;6.
- [33] Shettigar K, Murali TS. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2020;39:2235–46.
- [34] Lozano C, Porres-Osante N, Crettaz J, Rojo-Bezares B, Benito D, Olarte I, et al. Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother* 2013;19:233–42.

- [35] Rijnders MIA, Deurenberg RH, Boumans MLL, Hoogkamp-Korstanje J a. A, Beisser PS, Antibiotic Resistance Surveillance Group, et al. Population structure of *Staphylococcus aureus* strains isolated from intensive care unit patients in the netherlands over an 11-year period (1996 to 2006). *J Clin Microbiol* 2009;47:4090–5.
- [36] Smith TC, Wardyn SE. Human Infections with *Staphylococcus aureus* CC398. *Curr Environ Health Rep* 2015;2:41–51.
- [37] Bouiller K, Bertrand X, Hocquet D, Chirouze C. Human Infection of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: A Review. *Microorganisms* 2020;8.
- [38] David MZ, Siegel J, Lowy FD, Zychowski D, Taylor A, Lee CJ, et al. Asymptomatic Carriage of Sequence Type 398, spa Type t571 Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in an Urban Jail: a Newly Emerging, Transmissible Pathogenic Strain. *J Clin Microbiol* 2013;51:2443–7.
- [39] Sauget M, Bouiller K, Richard M, Chagrot J, Cholley P, Hocquet D, et al. Increasing incidence of bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 in a French hospital between 2010 and 2017. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2019;38:2127–32.
- [40] von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 2001;344:11–6.
- [41] Paling FP, Wolkewitz M, Bode LGM, Klein Klouwenberg PMC, Ong DSY, Depuydt P, et al. *Staphylococcus aureus* colonization at ICU admission as a risk factor for developing *S. aureus* ICU pneumonia. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2017;23:49.e9-49.e14.
- [42] Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005;5:751–62.
- [43] Levy P-Y, Ollivier M, Drancourt M, Raoult D, Argenson J-N. Relation between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and surgical site infection in orthopedic surgery: the role of nasal contamination. A systematic literature review and meta-analysis. *Orthop Traumatol Surg Res OTSR* 2013;99:645–51.
- [44] Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 2001;9:605–10.
- [45] Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:521–40.
- [46] Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:297–308.
- [47] Bukowski M, Piwowarczyk R, Madry A, Zagorski-Przybylo R, Hydzik M, Wladyka B. Prevalence of Antibiotic and Heavy Metal Resistance Determinants and Virulence-Related Genetic Elements in Plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2019;10.
- [48] M.-E. Reverdy, H. Meugnier, M Bes, T Ferry, F. Forey, G. Lina, F. Vandenesch, J. Etienne. *Epidémiologie des Sarm en France* 2001.
- [49] Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:430–49.
- [50] Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2014;22:42–7.
- [51] Barraud O, Laurent F, François B, Bes M, Vignon P, Ploy M-C. Severe human bone infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* variant. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2949–50.

- [52] Becker K, van Alen S, Idelevich EA, Schleimer N, Seggewiß J, Mellmann A, et al. Plasmid-Encoded Transferable *mecB*-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2018;24:242–8.
- [53] Marisa H, Jouy E, Madec J-Y, Laurent F. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : un partage entre l'Homme et l'animal ?
- [54] Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018;31. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>.
- [55] Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. EARS-Net; 2018.
- [56] Bisognano C. Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. Genève, 2000.
- [57] Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 2003;348:1342–7.
- [58] Webb SA, Kahler CM. Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences. *Crit Care* 2008;12:234.
- [59] Foster TJ. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. *Trends Microbiol* 2019;27:927–41.
- [60] Hair PS, Ward MD, Semmes OJ, Foster TJ, Cunnion KM. *Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. *J Infect Dis* 2008;198:125–33.
- [61] Wertheim HFL, Walsh E, Choudhury R, Melles DC, Boelens HAM, Miajlovic H, et al. Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Med* 2008;5:e17.
- [62] Speziale P, Pietrocola G. The Multivalent Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in Host Infections. *Front Microbiol* 2020;11:2054.
- [63] Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2016;35:1923–31.
- [64] Xu Y, Rivas JM, Brown EL, Liang X, Höök M. Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen. *J Infect Dis* 2004;189:2323–33. <https://doi.org/10.1086/420851>.
- [65] Kang M, Ko Y-P, Liang X, Ross CL, Liu Q, Murray BE, et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J Biol Chem* 2013;288:20520–31.
- [66] Björk I, Petersson BA, Sjöquist J. Some physicochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem* 1972;29:579–84.
- [67] Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, et al. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 2000;96:2149–56.
- [68] Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, et al. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 2004;10:842–8.
- [69] Kobayashi SD, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* Protein A Promotes Immune Suppression. *MBio* 2013;4.

- [70] Peetermans M, Verhamme P, Vanassche T. Coagulase Activity by *Staphylococcus aureus*: A Potential Target for Therapy? *Semin Thromb Hemost* 2015;41:433–44.
- [71] C H. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv Exp Med Biol* 2011.
- [72] Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock J-I, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 2002;8:687–93.
- [73] Eisenbeis J, Saffarzadeh M, Peisker H, Jung P, Thewes N, Preissner KT, et al. The *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:235.
- [74] Lee LYL, Höök M, Haviland D, Wetsel RA, Yonter EO, Syribeys P, et al. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* 2004;190:571–9.
- [75] Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP, Foster TJ. The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem* 2002;277:243–50.
- [76] Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, Geoghegan JA. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4.
- [77] Graf AC, Leonard A, Schäuble M, Rieckmann LM, Hoyer J, Maass S, et al. Virulence Factors Produced by *Staphylococcus aureus* Biofilms Have a Moonlighting Function Contributing to Biofilm Integrity. *Mol Cell Proteomics MCP* 2019;18:1036–53.
- [78] Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:555–67.
- [79] Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins & Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr* 2019;7.
- [80] Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13473–8.
- [81] Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2.
- [82] Su M, Lyles JT, Petit III RA, Peterson J, Hargita M, Tang H, et al. Genomic analysis of variability in Delta-toxin levels between *Staphylococcus aureus* strains. *PeerJ* 2020;8:e8717.
- [83] Alonzo F, Torres VJ. The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78:199–230.
- [84] Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:5587–92.
- [85] Kläui AJ, Boss R, Graber HU. Characterization and Comparative Analysis of the *Staphylococcus aureus* Genomic Island vSa β : an In Silico Approach. *J Bacteriol* 2019;201.
- [86] Vasquez MT, Lubkin A, Reyes-Robles T, Day CJ, Lacey KA, Jennings MP, et al. Identification of a domain critical for *Staphylococcus aureus* LukED receptor targeting and lysis of erythrocytes. *J Biol Chem* 2020;295:17241–50.

- [87] Aguiar-Alves F, Medeiros F, Fernandes O, Gudziki Pereira RM, Perdreau-Remington F, Riley LW. New *Staphylococcus aureus* Genotyping Method Based on Exotoxin (set) Genes. *J Clin Microbiol* 2006;44:2728–32.
- [88] Williams RJ, Ward JM, Henderson B, Poole S, O’Hara BP, Wilson M, et al. Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infect Immun* 2000;68:4407–15.
- [89] Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 2010;2:1148–65.
- [90] Mariutti RB, Tartaglia NR, Seyffert N, Castro TL de P, Arni RK, Azevedo VA, et al. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Rise Virulence Antibiot Resist IStaphylococcus Aureusi* 2017.
- [91] Que Y-A, Moreillon P. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome). *Mand. Douglas Bennetts Princ. Pract. Infect. Dis.*, Elsevier; 2015, p. 2237-2271.e5.
- [92] G Abril A, G Villa T, Barros-Velázquez J, Cañas B, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, et al. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins* 2020;12.
- [93] G. Abril A, G. Villa T, Barros-Velázquez J, Cañas B, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, et al. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins* 2020;12:537.
- [94] Lin Y-C, Peterson ML. New insights into the prevention of staphylococcal infections and toxic shock syndrome. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2010;3:753–67.
- [95] Hu D-L, Wang L, Fang R, Okamura M, Ono HK. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Staphylococcus Aureus*, Elsevier; 2018, p. 39–55.
- [96] Kläui AJ, Boss R, Graber HU. Characterization and Comparative Analysis of the *Staphylococcus aureus* Genomic Island vSaß: an In Silico Approach. *J Bacteriol* 2019;201.
- [97] Papadimitriou-Olivgeris M, Drougka E, Fligou F, Dodou V, Kolonitsiou F, Filos KS, et al. Spread of Tst-Positive *Staphylococcus aureus* Strains Belonging to ST30 Clone among Patients and Healthcare Workers in Two Intensive Care Units. *Toxins* 2017;9.
- [98] Mairi A, Touati A, Lavigne J-P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST80 Clone: A Systematic Review. *Toxins* 2020;12.
- [99] Chiaruzzi M, Barbry A, Muggeo A, Tristan A, Jacquemond I, Badiou C, et al. Vaginal Tampon Colonization by *Staphylococcus aureus* in Healthy Women. *Appl Environ Microbiol* 2020;86.
- [100] Peterson ML, Ault K, Kremer MJ, Klingelhutz AJ, Davis CC, Squier CA, et al. The Innate Immune System Is Activated by Stimulation of Vaginal Epithelial Cells with *Staphylococcus aureus* and Toxic Shock Syndrome Toxin 1. *Infect Immun* 2005;73:2164–74.
- [101] O’Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:218–34.
- [102] Mohamed N, Timofeyeva Y, Jamrozy D, Rojas E, Hao L, Silmon de Monerri NC, et al. Molecular epidemiology and expression of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States. *PloS One* 2019;14:e0208356.
- [103] Luong T, Sau S, Gomez M, Lee JC, Lee CY. Regulation of *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Expression by agr and sarA. *Infect Immun* 2002;70:444–50.

- [104] Spaan AN, Surewaard BGJ, Nijland R, van Strijp JAG. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annu Rev Microbiol* 2013;67:629–50.
- [105] Smith EJ, Visai L, Kerrigan SW, Speziale P, Foster TJ. The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2011;79:3801–9.
- [106] Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol* 2012;34:237–59.
- [107] Winstel V, Schneewind O, Missiakas D. *Staphylococcus aureus* Exploits the Host Apoptotic Pathway To Persist during Infection. *MBio* 2019;10.
- [108] Höpken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C. Impaired inflammatory responses in the reverse arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor. *J Exp Med* 1997;186:749–56.
- [109] Rooijackers SHM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 2005;13:596–601.
- [110] Verkaik NJ, Benard M, Boelens HA, Vogel CP de, Nouwen JL, Verbrugh HA, et al. Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:343–8.
- [111] van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG. The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Located on β -Hemolysin-Converting Bacteriophages. *J Bacteriol* 2006;188:1310–5.
- [112] Lays CI. ARN régulateurs de *Staphylococcus aureus*: Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques. Université de Lyon, 2012.
- [113] Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, et al. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J Bacteriol* 2001;183:7341–53.
- [114] Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, et al. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet MGG* 1995;248:446–58.
- [115] Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* 2008;42:541–64.
- [116] Quave CL, Horswill AR. Flipping the switch: tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. *Front Microbiol* 2014;5.
- [117] Choudhary KS, Mih N, Monk J, Kavvas E, Yurkovich JT, Sakoulas G, et al. The *Staphylococcus aureus* Two-Component System AgrAC Displays Four Distinct Genomic Arrangements That Delineate Genomic Virulence Factor Signatures. *Front Microbiol* 2018;9:1082.
- [118] Team:XJTLU-CHINA/PeptideProduction - 2017.igem.org n.d. <http://2017.igem.org/Team:XJTLU-CHINA/PeptideProduction>
- [119] Parker D, Prince A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *Semin Immunopathol* 2012;34:281–97.
- [120] Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiol Read Engl* 2008;154:2265–74.

- [121] Crosby HA, Tiwari N, Kwiecinski JM, Xu Z, Dykstra A, Jenul C, et al. The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system regulates virulence factor expression through MgrA. *Mol Microbiol* 2020;113:103–22.
- [122] Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. Importance of the global regulators Agr and SaeRS in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. *PloS One* 2010;5:e15177.
- [123] Nygaard TK, Pallister KB, Ruzevich P, Griffith S, Vuong C, Voyich JM. SaeR binds a consensus sequence within virulence gene promoters to advance USA300 pathogenesis. *J Infect Dis* 2010;201:241–54.
- [124] Guerra FE, Addison CB, de Jong NWM, Azzolino J, Pallister KB, van Strijp JAG, et al. *Staphylococcus aureus* SaeR/S-regulated factors reduce human neutrophil reactive oxygen species production. *J Leukoc Biol* 2016;100:1005–10.
- [125] Borgogna TR, Hisey B, Heitmann E, Obar JJ, Meissner N, Voyich JM. Secondary Bacterial Pneumonia by *Staphylococcus aureus* Following Influenza A Infection Is SaeR/S Dependent. *J Infect Dis* 2018;218:809–13.
- [126] Arya R, Princy SA. An insight into pleiotropic regulators Agr and Sar: molecular probes paving the new way for antivirulent therapy. *Future Microbiol* 2013;8:1339–53.
- [127] Lamichhane-Khadka R, Cantore SA, Riordan JT, Delgado A, Norman AEA, Dueñas S, et al. sarA inactivation reduces vancomycin-intermediate and ciprofloxacin resistance expression by *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:136–41.
- [128] Saïd-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, Macapagal D, Murphy E, McNamara PJ, et al. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* 2003;185:610–9.
- [129] Mier L, Dreyfuss D, Darchy B, Lanore JJ, Djedaïni K, Weber P, et al. Is penicillin G an adequate initial treatment for aspiration pneumonia? A prospective evaluation using a protected specimen brush and quantitative cultures. *Intensive Care Med* 1993;19:279–84.
- [130] Rodrigues PM de A, Carmo Neto E do, Santos LR de C, Knibel MF. Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and impact on the clinical evolution of ICU patients. *J Bras Pneumol Publicacao Of Soc Bras Pneumol E Tisiologia* 2009;35:1084–91.
- [131] Sands KM, Twigg JA, Lewis MAO, Wise MP, Marchesi JR, Smith A, et al. Microbial profiling of dental plaque from mechanically ventilated patients. *J Med Microbiol* 2016;65:147–59.
- [132] Sands KM, Wilson MJ, Lewis MAO, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, et al. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *J Crit Care* 2017;37:30–7.
- [133] Vandecandelaere I, Coenye T. Microbial composition and antibiotic resistance of biofilms recovered from endotracheal tubes of mechanically ventilated patients. *Adv Exp Med Biol* 2015;830:137–55.
- [134] Pirrone M, Pinciroli R, Berra L. Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU. *Curr Opin Infect Dis* 2016;29:160–6.
- [135] Durand A, Dupré C, Robriquet L. Faut-il isoler les patients porteurs de BMR ? *Réanimation* 2016;25:318–27.
- [136] Jacobs DM, Shaver A. Prevalence of and outcomes from *Staphylococcus aureus* pneumonia among hospitalized patients in the United States, 2009-2012. *Am J Infect Control* 2017;45:404–9.
- [137] Paling FP, Hazard D, Bonten MJM, Goossens H, Jafri HS, Malhotra-Kumar S, et al. Association of *Staphylococcus aureus* Colonization and Pneumonia in the Intensive Care Unit. *JAMA Netw Open* 2020;3:e2012741.

- [138] Cabrera R, Fernández-Barat L, Motos A, López-Aladid R, Vázquez N, Panigada M, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains from the endotracheal tubes of patients with nosocomial pneumonia. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020;9:43.
- [139] Robba C, Reborá P, Banzato E, Wieggers EJA, Stocchetti N, Menon DK, et al. Incidence, Risk Factors, and Effects on Outcome of Ventilator-Associated Pneumonia in Patients With Traumatic Brain Injury: Analysis of a Large, Multicenter, Prospective, Observational Longitudinal Study. *Chest* 2020;158:2292–303.
- [140] Contou D, Claudinon A, Pajot O, Micaëlo M, Longuet Flandre P, Dubert M, et al. Bacterial and viral co-infections in patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia admitted to a French ICU. *Ann Intensive Care* 2020;10:119.
- [141] De la Calle C, Morata L, Cobos-Trigueros N, Martínez JA, Cardozo C, Mensa J, et al. *Staphylococcus aureus* bacteremic pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2016;35:497–502.
- [142] European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. Stockholm: ECDC: 2019.
- [143] Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:521–40.
- [144] Parker D, Ryan CL, Alonzo F III, Torres VJ, Planet PJ, Prince AS. CD4+ T Cells Promote the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *J Infect Dis* 2015;211:835–45.
- [145] Spaan AN, Surewaard BGJ, Nijland R, van Strijp JAG. Neutrophils Versus *Staphylococcus aureus*: A Biological Tug of War. *Annu Rev Microbiol* 2013;67:629–50.
- [146] Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2016;63:e61–111.
- [147] Fowler VG, Allen KB, Moreira ED, Moustafa M, Isgro F, Boucher HW, et al. Effect of an investigational vaccine for preventing *Staphylococcus aureus* infections after cardiothoracic surgery: a randomized trial. *JAMA* 2013;309:1368–78.
- [148] Fowler VG, Proctor RA. Where Does a *Staphylococcus aureus* Vaccine Stand? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2014;20:66–75.
- [149] Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Merriman JA, Stach CS, Ji Y, Gillman AN, et al. Vaccination against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Infect Dis* 2014;209:1955–62.
- [150] François B, Luyt C-E, Stover CK, Brubaker JO, Chastre J, Jafri HS. New Strategies Targeting Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Semin Respir Crit Care Med* 2017;38:346–58.
- [151] Ruzin A, Yu L, Barraud O, François B, Sánchez Garcia M, Eggimann P, et al. 2160. Performance of the Cepheid Rapid PCR Test for Patient Screening and Association with Efficacy of Suvratoxumab, A Novel Anti-*Staphylococcus aureus* Monoclonal Antibody, During the Phase 2 SAATELLITE study. *Open Forum Infect Dis* 2019;6:S733–S733.
- [152] Cross AS. What is a virulence factor? *Crit Care* 2008;12:196.
- [153] Tammi M. The Principles of Shotgun Sequencing and Automated Fragment Assembly, Center for Genomics and Bioinformatics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, April 13, 2003

- [154] Uritskiy GV, DiRuggiero J, Taylor J. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome* 2018;6.
- [155] Deng X, Naccache SN, Ng T, Federman S, Li L, Chiu CY, et al. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2015;43:e46.
- [156] Jolley KA, Maiden MCJ. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 2010;11:595.
- [157] Garnier F, Tristan A, François B, Etienne J, Delage-Corre M, Martin C, et al. Pneumonia and New Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clone - Volume 12, Number 3—March 2006 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*
- [158] 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* 1999;37:3556–63.
- [159] Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2020;75:3491–500.
- [160] Kaya H, Hasman H, Larsen J, Stegger M, Johannesen TB, Allesøe RL, et al. SCCmecFinder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. *MSphere* 2018;3.
- [161] Sealfon R, Gire S, Ellis C, Calderwood S, Qadri F, Hensley L, et al. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and the Dominican Republic. *BMC Genomics* 2012;13:468.
- [162] Motro Y, Moran-Gilad J. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology. *Biomol Detect Quantif* 2017;14:1–6.
- [163] Lipowski D, Popiel M, Perlejewski K, Nakamura S, Bukowska-Osko I, Rzakiewicz E, et al. A Cluster of Fatal Tick-borne Encephalitis Virus Infection in Organ Transplant Setting. *J Infect Dis* 2017;215:896–901.
- [164] Nakamura S, Yang C-S, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, et al. Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Nasal and Fecal Specimens Using an Unbiased High-Throughput Sequencing Approach. *PLOS ONE* 2009;4:e4219.
- [165] Chiu CY, Coffey LL, Murkey J, Symmes K, Sample HA, Wilson MR, et al. Diagnosis of Fatal Human Case of St. Louis Encephalitis Virus Infection by Metagenomic Sequencing, California, 2016 - Volume 23, Number 10—October 2017 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC* n.d.
- [166] Rijnders MIA, Deurenberg RH, Boumans MLL, Hoogkamp-Korstanje JAA, Beisser PS, Stobberingh EE. Population Structure of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Intensive Care Unit Patients in The Netherlands over an 11-Year Period (1996 to 2006). *J Clin Microbiol* 2009;47:4090–5.
- [167] Ilczyszyn WM, Sabat AJ, Akkerboom V, Szkarlat A, Klepacka J, Sowa-Sierant I, et al. Clonal Structure and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains from Invasive Infections in Paediatric Patients from South Poland: Association between Age, spa Types, Clonal Complexes, and Genetic Markers. *PLoS One* 2016;11:e0151937.
- [168] Etter D, Corti S, Spirig S, Cernela N, Stephan R, Johler S. *Staphylococcus aureus* Population Structure and Genomic Profiles in Asymptomatic Carriers in Switzerland. *Front Microbiol* 2020;11:1289.
- [169] Sakr A, Brégeon F, Mège J-L, Rolain J-M, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol* 2018;9:2419.

- [170] Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005;5:751–62.
- [171] Paling FP, Hazard D, Bonten MJM, Goossens H, Jafri HS, Malhotra-Kumar S, et al. Association of *Staphylococcus aureus* Colonization and Pneumonia in the Intensive Care Unit. *JAMA Netw Open* 2020;3:e2012741
- [172] Dancer SJ, Adams CE, Smith J, Pichon B, Kearns A, Morrison D. Tracking *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit using whole-genome sequencing. *J Hosp Infect* 2019;103:13–20.
- [173] Vincent J-L, Sakr Y, Singer M, Martin-Loeches I, Machado FR, Marshall JC, et al. Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA* 2020;323:1478–87.
- [174] Wang SK, Gilchrist A, Loukitcheva A, Plotkin BJ, Sagar IM, Gross AE, et al. Prevalence of a Cefazolin Inoculum Effect Associated with blaZ Gene Types among Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Four Major Medical Centers in Chicago. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62.
- [175] Chong YP, Park S-J, Kim ES, Bang K-M, Kim M-N, Kim S-H, et al. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2015;34:349–55.
- [176] Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, Burd EM, Jerris R, Wang YF, et al. Prevalence of blaZ gene types and the inoculum effect with cefazolin among bloodstream isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4474–7.
- [177] Gordon NC, Price JR, Cole K, Everitt R, Morgan M, Finney J, et al. Prediction of *Staphylococcus aureus* Antimicrobial Resistance by Whole-Genome Sequencing. *J Clin Microbiol* 2014;52:1182–91.
- [178] Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018;31.
- [179] Ransom EM, Potter RF, Dantas G, Burnham C-AD. Genomic Prediction of Antimicrobial Resistance: Ready or Not, Here It Comes! *Clin Chem* 2020;66:1278–89.
- [180] Babiker A, Mustapha MM, Pacey MP, Shutt KA, Ezeonwuka CD, Ohm SL, et al. Use of online tools for antimicrobial resistance prediction by whole-genome sequencing in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE). *J Glob Antimicrob Resist* 2019;19:136–43.
- [181] Bernardy EE, Petit RA, Raghuram V, Alexander AM, Read TD, Goldberg JB. Genotypic and Phenotypic Diversity of *Staphylococcus aureus* Isolates from Cystic Fibrosis Patient Lung Infections and Their Interactions with *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 2020;11.
- [182] McCarthy AJ, Lindsay JA. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiol* 2010;10:173.
- [183] Stegger M, Lindsay JA, Sørnum M, Gould KA, Skov R. Genetic diversity in CC398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of different geographical origin. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1017–9.
- [184] Gómez P, Lozano C, Camacho MC, Lima-Barbero J-F, Hernández J-M, Zarazaga M, et al. Detection of MRSA ST3061-t843-mecC and ST398-t011-mecA in white stork nestlings exposed to human residues. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:53–7.
- [185] Bouiller K, Bertrand X, Hocquet D, Chirouze C. Human Infection of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: A Review. *Microorganisms* 2020;8.

- [186] Uhlemann A-C, Hafer C, A. Miko B, G. Sowash M, Sullivan SB, Shu Q, et al. Emergence of Sequence Type 398 as a Community- and Healthcare-Associated Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in Northern Manhattan. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2013;57:700–3.
- [187] spa type t160. Ridom n.d. <https://spa.ridom.de/spa-t160.shtml>.
- [188] Amirsoleimani A. Investigation into the presence, persistence, and fate of *S. aureus*, and its mobile genetic elements, in wastewater and the surrounding environment. University of Kentucky Libraries, 2020.
- [189] Islam M, Abaragu A, Sistu H, Akins RL, Palmer K. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from the Dallas, Texas area. *BioRxiv* 2021:2021.02.16.431552.
- [190] Bae T, Baba T, Hiramatsu K, Schneewind O. Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence. *Mol Microbiol* 2006;62:1035–47.
- [191] Hau SJ, Sun J, Davies PR, Frana TS, Nicholson TL. Comparative Prevalence of Immune Evasion Complex Genes Associated with β -Hemolysin Converting Bacteriophages in MRSA ST5 Isolates from Swine, Swine Facilities, Humans with Swine Contact, and Humans with No Swine Contact. *PLoS One* 2015;10:e0142832.
- [192] Dann EJ, Weinberger M, Gillis S, Parsonnet J, Shapiro M, Moses AE. Bacterial laryngotracheitis associated with toxic shock syndrome in an adult. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1994;18:437–9.
- [193] MacDonald KL, Osterholm MT, Hedberg CW, Schrock CG, Peterson GF, Jentzen JM, et al. Toxic shock syndrome. A newly recognized complication of influenza and influenzalike illness. *JAMA* 1987;257:1053–8.
- [194] Khokhlova OE, Hung W-C, Wan T-W, Iwao Y, Takano T, Higuchi W, et al. Healthcare- and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Fatal Pneumonia with Pediatric Deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA's Multiple Virulence Factors, Genome, and Stepwise Evolution. *PLoS One* 2015;10:e0128017.
- [195] Krogman A, Tilahun A, David CS, Chowdhary VR, Alexander MP, Rajagopalan G. HLA-DR polymorphisms influence in vivo responses to staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 in a transgenic mouse model. *HLA* 2017;89:20–8.
- [196] DeLorenze GN, Nelson CL, Scott WK, Allen AS, Ray GT, Tsai A-L, et al. Polymorphisms in HLA Class II Genes Are Associated With Susceptibility to *Staphylococcus aureus* Infection in a White Population. *J Infect Dis* 2016;213:816–23.
- [197] Yamashita Y, Nagaoka K, Kimura H, Suzuki M, Fukumoto T, Hayasaka K, et al. Pathogenic Effect of *Prevotella intermedia* on a Mouse Pneumonia Model Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* With Up-Regulated α -Hemolysin Expression. *Front Microbiol* 2020;11:587235.

ANNEXES

Annexe 1 : Tableau recensant les 115 facteurs de virulence étudiés dans ce travail

Classe	Sous-classe	FDV	gène	Classe	Sous-classe	FDV	gène	Classe	Sous-classe	FDV	gène	
MOLECULES D'ADHESION	MSCRAMMs	Clumping Factor A	<i>clfA</i>	CYTOTOXINES	Protéines exotoxines-like	protéine exotoxine-like 1	<i>set1</i>	CYTOTOXINES (suite)	Entérotoxines	entérotoxine A	<i>sea</i>	
		Clumping Factor B	<i>clfB</i>			protéine exotoxine-like 2	<i>set2</i>			entérotoxine B	<i>seb</i>	
protéines liant le collagène	<i>cna</i>	protéine exotoxine-like 3	<i>set3</i>			entérotoxine C	<i>sec</i>					
protéines liant la fibonectine A	<i>fnbA</i>	protéine exotoxine-like 4	<i>set4</i>			entérotoxine D	<i>sed</i>					
protéines liant la fibonectine B	<i>fnbB</i>	protéine exotoxine-like 5	<i>set5</i>			entérotoxine E	<i>see</i>					
Sérine-aspartate repeat-containing protein C	<i>sdrC</i>	protéine exotoxine-like 6	<i>set6</i>			entérotoxine G	<i>seg</i>					
Sérine-aspartate repeat-containing protein D	<i>sdrD</i>	protéine exotoxine-like 7	<i>set7</i>			entérotoxine H	<i>seh</i>					
Sérine-aspartate repeat-containing protein E	<i>sdrE</i>	protéine exotoxine-like 8	<i>set8</i>			entérotoxine I	<i>sei</i>					
Sérine-aspartate repeat-containing protein F	<i>sdrF</i>	protéine exotoxine-like 9	<i>set9</i>			entérotoxine J	<i>sej</i>					
Sérine-aspartate repeat-containing protein G	<i>sdrG</i>	protéine exotoxine-like 10	<i>set10</i>			entérotoxine Yent1	<i>yent1</i>					
Sérine-aspartate repeat-containing protein H	<i>sdrH</i>	protéine exotoxine-like 11	<i>set11</i>			entérotoxine Yent2	<i>yent2</i>					
Protéine A	<i>spa</i>	protéine exotoxine-like 12	<i>set12</i>			entérotoxine-like K	<i>selk</i>					
autolysine majeure	<i>atl</i>	protéine exotoxine-like 13	<i>set13</i>			entérotoxine-like L	<i>sell</i>					
protéines liant l'élastine	<i>ebp</i>	protéine exotoxine-like 14	<i>set14</i>			entérotoxine-like M	<i>selm</i>					
extracellular adherence proteins / MHC II	<i>eap/map</i>	protéine exotoxine-like 15	<i>set15</i>			entérotoxine-like N	<i>seln</i>					
analogous proteins		protéine exotoxine-like 16	<i>set16</i>			entérotoxine-like O	<i>selo</i>					
protéines liant le fibrinogène	<i>efb</i>	protéine exotoxine-like 17	<i>set17</i>			entérotoxine-like P	<i>selp</i>					
BIOFILM	Opéron ica	protéine de liaison intercellulaire A	<i>icaA</i>			protéine exotoxine-like 18	<i>set18</i>			entérotoxine-like Q	<i>selq</i>	
		protéine de liaison intercellulaire B	<i>icaB</i>			protéine exotoxine-like 19	<i>set19</i>		entérotoxine-like R	<i>selr</i>		
EXOENZYMES	Dégradation de la Matrice Extracellulaire	protéine de liaison intercellulaire C	<i>icaC</i>			protéine exotoxine-like 20	<i>set20</i>		entérotoxine-like U	<i>selu</i>		
		protéine de liaison intercellulaire D	<i>icaD</i>			protéine exotoxine-like 21	<i>set21</i>		Exfoliatines	exfoliatine A	<i>eta</i>	
		protéine de liaison intercellulaire R	<i>icaR</i>			protéine exotoxine-like 22	<i>set22</i>			exfoliatine B	<i>etb</i>	
		cystéine protéase B	<i>sspB</i>			protéine exotoxine-like 23	<i>set23</i>			exfoliatine C	<i>etc</i>	
		cystéine protéase C	<i>sspC</i>			protéine exotoxine-like 24	<i>set24</i>		exfoliatine D	<i>etd</i>		
		hyaluronidase	<i>hysA</i>			protéine exotoxine-like 25	<i>set25</i>		Leucocidines	leucodidine F-like	<i>lukF-like</i>	
		lipase	<i>geh</i>			protéine exotoxine-like 26	<i>set26</i>			leucocidine M	<i>lukM</i>	
		lipase	<i>lip</i>			protéine exotoxine-like 30	<i>set30</i>			leucocidine D	<i>lukD</i>	
		sérine protéase V8	<i>sspA</i>			protéine exotoxine-like 31	<i>set31</i>			leucocidine E	<i>lukE</i>	
		sérine protéase A	<i>splA</i>			protéine exotoxine-like 32	<i>set32</i>			leucocidine de Panton-Valentine	<i>lukF-PV</i>	
		sérine protéase B	<i>splB</i>			protéine exotoxine-like 33	<i>set33</i>				<i>lukS-PV</i>	
		sérine protéase C	<i>splC</i>			protéine exotoxine-like 34	<i>set34</i>		Toxine du syndrome de choc toxique		<i>tsst</i>	
		sérine protéase D	<i>splD</i>			protéine exotoxine-like 35	<i>set35</i>					
		sérine protéase E	<i>splE</i>			protéine exotoxine-like 36	<i>set36</i>					
		sérine protéase F	<i>splF</i>			protéine exotoxine-like 37	<i>set37</i>					
		thermonucléase	<i>nuc</i>			protéine exotoxine-like 38	<i>set38</i>					
		Inducteurs enzymatiques	staphylocoagulase libre			<i>coa</i>	protéine exotoxine-like 39		<i>set39</i>			
			staphylokinase			<i>sak</i>	protéine exotoxine-like 40		<i>set40</i>			
ECHAPPEMENT REPONSE IMMUNE	Résistance à la phagocytose	capsule	<i>cap</i>			Hémolysines	hémolysine α - toxine a		<i>hla</i>			
		<i>second immunoglobulin protein</i>	<i>sbi</i>				hémolysine β		<i>hib</i>			
	Résistance aux PNN	adénosine synthase	<i>adsA</i>				hémolysine γ		<i>hlc</i>			
	Résistance à l'action du complément	<i>chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus</i>	<i>chips</i>	hémolysine δ - sous unité A	<i>hlgA</i>							
	<i>Staphylococcal complement inhibitor</i>	<i>scin</i>		hémolysine δ - sous unité B	<i>hlgB</i>							
				hémolysine δ - sous unité C	<i>hlgC</i>							

FDV : facteur de virulence, PNN = polynucléaire neutrophile

Annexe 2 : Résultats obtenus auprès de la base de données PHASTER

Isolat	ST	CC	IEC	Score d'identification excellent (score > 90)			Score d'identification moyen (score 70 - 90)		
Sa3	5	5	F	PHAGE_Staphy_phiN315					
Sa18	5	5	F	PHAGE_Staphy_phiN315	PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_SA97			
Sa21	5	5	A			PHAGE_Staphy_P282	PHAGE_Staphy_PT1028		
Sa29	5	5	B			PHAGE_Staphy_P282			
Sa35	5	5	-		PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_SA13			
Sa41	5	5	F	PHAGE_Staphy_phiN315	PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_88			
Sa9	6	5	D		PHAGE_Staphy_53		PHAGE_Staphy_AJ_2017		
Sa5	7		G			PHAGE_Staphy_phiJB	PHAGE_Staphy_P1105		
Sa4	8	8	D		PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_phiJB	PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_SA345	
Sa38	8	8	A		PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_SA345			
Sa7	15	15	C						
Sa12	15	15	B		PHAGE_Staphy_phi2958PVL		PHAGE_Staphy_AJ_2017		
Sa16	15	15	C		PHAGE_Staphy_phi2958PVL				
Sa27	15	15	C		PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_phiJB			
Sa30	15	15	B	PHAGE_Staphy_phiETA3		PHAGE_Staphy_AJ_2017			
Sa32	15	15	C		PHAGE_Staphy_YMC	PHAGE_Staphy_55			
Sa36	15	15	C		PHAGE_Staphy_phi2958PVL				
Sa37	15	15	C						
Sa2	30	30	A	PHAGE_Staphy_phiNM3			PHAGE_Staphy_PT1028		
Sa8	30	30	A			PHAGE_Staphy_AJ_2017	PHAGE_Staphy_PT1028		
Sa11	30	30	A	PHAGE_Staphy_phiNM3			PHAGE_Staphy_SPbeta_like		
Sa13	30	30	E		PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_SPbeta_like	PHAGE_Staphy_IME1361	
Sa17	30	30	A	PHAGE_Staphy_phiNM3	PHAGE_Staphy_phi2958PVL			PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_phiETA2
Sa20	30	30	A	PHAGE_Staphy_phiNM3	PHAGE_Staphy_53	PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_StB27		

<i>Sa22</i>	30	30	-			PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_StB27		
<i>Sa24</i>	30	30	A	PHAGE_Staphy_phiNM3	PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_StB27		
<i>Sa28</i>	30	30	-			PHAGE_Staphy_PT1028		PHAGE_Staphy_StB27	
<i>Sa34</i>	30	30	A	PHAGE_Staphy_phiNM3	PHAGE_Staphy_phi2958PVL	PHAGE_Staphy_phiJB	PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_StB27	
<i>Sa39</i>	34	30	-			PHAGE_Staphy_11	PHAGE_Staphy_StB27		
<i>Sa10</i>	45	45	B				PHAGE_Staphy_phiNM2	PHAGE_Staphy_AJ_2017	
<i>Sa26</i>	45	45	B			PHAGE_Staphy_P282			
<i>Sa31</i>	45	45	B				PHAGE_Staphy_SA345		
<i>Sa1</i>	398	398	C	PHAGE_Staphy_StauST398					
<i>Sa1bis</i>	398	398	C	PHAGE_Staphy_StauST398					
<i>Sa6</i>	398	398	C	PHAGE_Staphy_StauST398					
<i>Sa14</i>	398	398	C	PHAGE_Staphy_StauST398					
<i>Sa15</i>	398	398	C	PHAGE_Staphy_StauST398					
<i>Sa19</i>	512	15	C		PHAGE_Staphy_phi2958PVL				
<i>Sa25</i>	2416	8	D			PHAGE_Staphy_AJ_2017			
<i>Sa33</i>	3661	30	A			PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_AJ_2017	PHAGE_Staphy_StB27	
<i>Sa23</i>	4155	22	E		PHAGE_Staphy_phi2958PVL		PHAGE_Staphy_SA345		
<i>Sa23bis</i>	4155	22	E		PHAGE_Staphy_phi2958PVL		PHAGE_Staphy_SA345		
<i>Sa40</i>	New ST ?	New ST ?	G			PHAGE_Staphy_phiNM2	PHAGE_Staphy_PT1028	PHAGE_Staphy_P1105	

Annexe 3 : Données cliniques associées à chaque isolat

Isolat	ST	Sexe	Age	Box	Diagnostic d'admission	Intubation	Type prélèvement	Date d'isolat	Quantification <i>S. aureus</i> (UFC/ml)	Autres pathogènes	Infection	Respiratoire	PAVM	Trachéobronchite	Bactériémie	Colonisation respiratoire à <i>S. aureus</i>
Sa1	398	M	65	1	Neurologique	Oui	Cathéter distal protégé	30/06/2020	10*5	<i>K. pneumoniae</i> 10*3 <i>S. agalactiae</i> 10*5	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa1bis	398							30/06/2020	10*5	<i>K. pneumoniae</i> 10*3 <i>S. agalactiae</i> 10*5	Non	Non	Non			
Sa2	30	M	60	4	Digestif	Oui	Aspi bronchique	02/07/2020	10*6	<i>S. marcescens</i> > 10*6	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa3	5	M	65	5	Autre	Oui	AET	07/07/2020	10*6	<i>E. cloacae</i> 10*4 <i>E. aerogenes</i> 10*3	Oui	Non	Non	Non	Oui	Oui
Sa4	8	F	67	2	Neurologique	Oui	AET	19/07/2020	10*3	<i>S. pneumoniae</i> > 10*6	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa5	7	M	40	2	Neurologique	Oui	AET	30/07/2020	> 10*6	<i>H. influenzae</i> > 10*6	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa6	398	F	42	5	Autre	Oui	AET	31/07/2020	10*6	-	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa7	15	M	71	3	Neurologique	Oui	AET	10/08/2020	10*6	<i>S. marcescens</i> 10*6 <i>K. pneumoniae</i> 10*6	Oui	Non	Non	Non	Oui	Oui
Sa8	30	M	74	4	Neurologique	Oui	AET	10/08/2020	10*6	<i>K. pneumoniae</i> 10*6	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa9	6	M	23	2	Polytrauma	Oui	AET	21/08/2020	10*6	<i>E. coli</i> 10*4	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
Sa10	45	M	71	4	Cardiaque	Oui	AET	21/08/2020	> 10*6	-	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
Sa11	30	M	75	2	Cardiaque	Oui	AET	01/09/2020	10*6	<i>K. oxytoca</i> 10*3	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa12	15	M	37	4	Neurologique	Oui	AET	30/08/2020	> 10*6	<i>H. influenzae</i> > 10*6	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa13	30	F	71	4	Autre	Oui	AET	30/08/2020	> 10*6	-	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa14	398	M	71	2	Infectieux	Oui	AET	02/09/2020	> 10*6	-	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Sa15	398	F	57	2	Cardiaque	Oui	AET	06/09/2020	10*4	<i>E. coli</i> 10*3	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
Sa16	15	M	71	3	Neurologique	Oui	LBA	08/09/2020	10*5	<i>E. coli</i> 10*7 <i>P. aeruginosa</i> 10*3	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa17	30	M	53	1	Polytrauma	Oui	AET	03/10/2020	10*5	<i>E. cloacae</i> 10*4 <i>E. coli</i> 10*3	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa18	5	M	61	1	Neurologique	Oui	Cathéter distal protégé	05/10/2020	10*6	<i>H. influenzae</i> 10*2	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa19	582	M	70	1	Neurologique	Oui	AET	07/10/2020	10*4	-	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa20	30	M	64	1	Infectieux	Non	Aspi bronchique	07/10/2020	10*4	-	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Sa21	5	M	26	4	Polytrauma	Oui	AET	09/10/2020	> 10*6	<i>H. influenzae</i> > 10*6	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non

Isolat	ST	Sexe	Age	Box	Diagnostic d'admission	Intubation	Type prélèvement	Date d'isolat	Quantification S. aureus (UFC/ml)	Autres pathogènes	Infection	Respiratoire	PAVM	Trachéobronchite	Bactériémie	Colonisation respiratoire à S. aureus
Sa22	30	M	76	3	Cardiaque	Oui	AET	26/10/2020	10*5	<i>K. pneumoniae</i> 10*4 <i>C. koseri</i> 10*3	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa23	4155	M	##	1	Cardiaque	Oui	AET	11/09/2020	> 10*6	<i>E. vulneris</i> 10*6	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Non
Sa23bis	4155							11/09/2020	10*6	<i>E. vulneris</i> 10*6						
Sa24	30	M	69	5	Neurologique	Oui	AET	14/09/2020	> 10*6	<i>P. mirabilis</i> 10*4	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Sa25	2416	M	33	2	Neurologique	Oui	Aspi bronchique	15/09/2020	> 10*6	<i>H. influenzae</i> > 10*6	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa26	45	M	47	4	Polytrauma	Oui	AET	15/09/2020	10*6	<i>E. coli</i> 10*6 <i>S. marcescens</i> 10*6	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa27	15	F	26	2	Polytrauma	Oui	AET	19/09/2020	10*6	<i>P. mirabilis</i> 10*6	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa28	30	F	66	5	Neurologique	Oui	AET	23/09/2020	10*6	<i>P. mirabilis</i> 10*6	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa29	5	M	33	3	Infectieux	Oui	AET	23/09/2020	10*6	-	Oui	Oui	Non	Non	Oui	
Sa30	15	F	34	2	Infectieux	Oui	AET	27/09/2020	10*3	-	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Non
Sa31	45	M	63	4	Neurologique	Oui	AET	23/09/2020	10*4	<i>H. influenzae</i> > 10*6	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa32	15	M	69	1	Digestif	Oui	LBA	28/10/2020	10*5	<i>M. morgani</i> 10*3	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa33	3661	F	65	5	Digestif	Oui	AET	30/10/2020	10*2	-	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa34	30	M	71	4	Neurologique	Oui	AET	09/11/2020	10*3	<i>H. influenzae</i> > 10*6	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
Sa35	5	F	62	5	Autre	Oui	AET	13/11/2020	> 10*6	<i>S. dysgalactiae</i> > 10*6	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa36	15	M	33	4	Neurologique	Oui	AET	11/11/2020	10*5	<i>H. influenzae</i> > 10*6	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa37	15	M	74	2	Infectieux	Oui	AET	19/11/2020	10*6	-	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Sa38	8	M	57	4	Autre	Oui	AET	02/12/2020	10*4	-	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
Sa39	34	M	50	1	Cardiaque	Oui	AET	19/12/2020	10*6	<i>E. coli</i> 10*5	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sa40	Nouveau ST	M	48	5	Neurologique	Oui	AET	24/12/2020	> 10*6	<i>H. influenzae</i> > 10*6	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Sa41	5	M	67	5	Infectieux	Oui	Expectoration	29/12/2020	> 10*6	-	Oui	Non	Non	Non	Non	Non

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des 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.

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 et méprisé de mes confrères si j'y manque.

RESUME :

Staphylococcus aureus est fréquemment isolé chez les patients hospitalisés dans les services de Réanimation en raison de ses capacités à coloniser et envahir les tissus, produire du biofilm, échapper au système immunitaire et sécréter de nombreuses toxines. L'incidence des infections respiratoires basses y est élevée, en particulier chez les patients intubés-ventilés. La compréhension des mécanismes de virulence et le suivi de la diffusion de l'antibiorésistance sont devenus essentiels. La démocratisation des outils de séquençage haut-débit (NGS) permet de caractériser les génomes bactériens et de relier la présence d'un gène à un caractère phénotypique voire pathogénique. L'objectif de cette étude observationnelle prospective a été de décrire de façon exhaustive, par NGS, les populations de *S. aureus* isolées à partir de prélèvements respiratoires provenant du service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges sur une période de six mois.

Quarante-trois isolats de *S. aureus* issus de 41 patients ont été collectés et analysés par NGS. La caractérisation génotypique des isolats a permis de révéler une diversité clonale composée de 13 *Sequence Type* (ST) différents, regroupés en six complexes clonaux majeurs. Un nouveau ST a été identifié, phylogénétiquement proche des ST6 et 7. La présence de gènes de résistance, de 115 gènes de virulence et d'éléments génétiques mobiles (plasmides, phages) a été recherchée. Ces résultats ont été reliés à la fois aux données phylogénétiques, phénotypiques (antibiogramme) et aux données cliniques. Le gène *tst* codant la toxine du syndrome de choc toxique présent sur le CC30 a été associé à une fréquence plus importante d'infections respiratoires.

TITLE AND ABSTRACT:

Prospective analysis of respiratory *Staphylococcus aureus* isolates in the Intensive Care Unit Hospital of Limoges using next generation sequencing

Staphylococcus aureus is a frequently isolated pathogen in intensive care units (ICU) due to its high abilities to colonize, invade tissues, produce biofilm, escape immune response and secrete toxins. Incidence of low respiratory tract (LRT) infections remains high, especially in patients under mechanical ventilation. Understanding of the virulence mechanisms and resistance spread are key points. Whole Genome Sequencing (WGS) is an innovative tool, which allows the analysis of the bacterial genomic content and allows to link the presence of a gene to the phenotypic characteristics and the pathogenic abilities. This was a prospective observational monocentric study, in which all consecutive *S. aureus* isolates collected from LRT samples of ICU patients were analyzed using WGS. This study was conducted over a six months period at Limoges University Hospital.

A total of 43 isolates were collected from 41 patients. A clonal diversity was revealed with 13 different sequence types (ST) grouped in six major clonal complexes. One isolate showed a new ST, not previously reported and phylogenetically close to ST6 and ST7. Presence of resistance genes, 115 virulence genes and mobile genetic elements (plasmids, phages) were investigated. Those results were correlated with phylogenetic, phenotypic (antimicrobial susceptibility testing) and clinical data. The *tst* toxic shock syndrome gene, present on the CC30, was associated with a more frequent occurrence of respiratory infections.

DISCIPLINE : Biologie Médicale – Bactériologie

MOTS-CLES : *Staphylococcus aureus* – Réanimation – Séquençage haut-débit – Facteur de virulence – Facteur de résistance – Éléments génétiques mobiles – Analyse phylogénétique – Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Centre de Biologie et de Recherche en Santé – CHU de LIMOGES, 2 avenue Martin Luther King - 87042 LIMOGES