



THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE INTERNATIONALE



**UNIVERSITE DE STRASBOURG**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA  
VIE ET DE LA SANTE, FRANCE

EA7290 Virulence Bactérienne Précoce: Fonctions  
Cellulaires et Contrôle de L'infection Aiguë et Subaiguë

**UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI**

ECOLE DOCTORALE SCIENCE  
DE LA VIE ET DE LA TERRE, BENIN  
Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en  
Microbiologie

Présentée par :

**NANOUKON Chimène Nadège Mahoussi**

Pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'université de Strasbourg et de l'Université d'Abomey-Calavi**

**Discipline/ Spécialité : Vie et Santé/ Microbiologie et Biologie Moléculaire**

**Importance des staphylocoques à coagulase  
négative dans les infections primitives sévères :  
Recherche de nouveaux facteurs de virulence**

Soutenue le 25 Septembre 2017 devant le jury composé de :

**Dr. Gilles PRÉVOST**, MCU-PH, Université de Strasbourg

**Pr. Lamine BABA-MOUSSA**, Université d'Abomey-Calavi

**Dr. Agnès Delacroix-Buchet**, INRA

**Pr. Martine PESTEL CARON**, Université de Rouen

**Pr. Arnaud SAUER**, Université de Strasbourg

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

NANOUKON Chimène Nadège Mahoussi  
[chimnanouk85@yahoo.fr](mailto:chimnanouk85@yahoo.fr)

Université de Strasbourg, EA7290 Virulence Bactérienne Précoce : fonctions cellulaires  
et contrôle de l'infection aiguë et subaiguë, Institut de Bactériologie de la faculté de  
médecine, 3 rue koeberlé, 67000 Strasbourg, France

Université d'Abomey-Calavi, Laboratoire de Biologie et de Typage  
Moléculaire en Microbiologie de la faculté des Sciences et Techniques,  
05 BP 1604 Cotonou, Bénin

## DEDICACE

À  
Euloge,  
Arnel,  
Daren,

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse à l'éclairage de leur expertise. Je suis honorée et profondément reconnaissante de leur siège dans mon jury de thèse.

Les mots seront insuffisants pour exprimer ma gratitude à l'égard de Monsieur Gilles Prévost, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et dirigé cette thèse. Les discussions que j'ai pu avoir avec lui ont été d'un enrichissement incroyable pour le développement de ma réflexion. Je lui suis extrêmement reconnaissante des conseils qu'il m'a apporté pendant l'ensemble du travail de ma thèse, autant du point de vue de ses idées pour les expériences à mener que de son investissement pour mes articles. Merci de m'avoir offert des opportunités de présenter mon travail à des congrès régionaux, nationaux et internationaux.

Un grand merci au Pr Lamine Said BABA-MOUSSA, pour m'avoir recommandée à Mr Prévost et co-dirigé cette thèse. Il m'a appris les bases de la recherche scientifique lors de mon stage dans son laboratoire, et n'a ménagé aucun effort pour que je puisse poursuivre mes études de doctorat. Je le remercie pour les conseils qu'il m'a apportés pendant l'ensemble du travail de ma thèse et pour son implication dans la publication de mes articles.

Je remercie le professeur Anagonou Sévérin et le professeur Affolabi Dissou pour m'avoir permis de faire la collecte des souches de SCN dans le laboratoire de Bactériologie du CNHU.

Ma profonde reconnaissance va à l'endroit de la Banque Islamique de Développement (BID) pour avoir pratiquement entièrement financé cette thèse à travers son programme de Bourse de Mérite de doctorat.

Un très grand merci à Daniel Keller, pour son savoir-faire technique, sa disponibilité et pour avoir toujours le temps de répondre à mes innombrables questions. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a accordé et l'autonomie qu'il m'a inculqué au fil des années. Le travail avec lui fût un réel plaisir, toujours dans la joie et la bonne humeur.

Merci à tous les thésards et stagiaires de Masters de l'Institut de Bactériologie de l'Université de Strasbourg, pour leur apport et l'ambiance qu'ils ont mis durant ces 3 ans et particulièrement à Xavier Argémi pour son aide précieuse à l'assemblage du génome de *S. epidermidis*.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'Institut de Bactériologie de Strasbourg, EA7290 Virulence bactérienne Précoce, pour leurs différents apports dans la réalisation de ce travail.

Merci à tout le personnel du Laboratoire de Bactériologie du PTM de l'Hopital Universitaire de Strasbourg, pour son aide à l'identification des souches au MALDI-TOF.



Infiniment merci à tout le personnel du Laboratoire de Bactériologie du Centre National Hospitalier et Universitaire HKM de Cotonou (Bénin), pour son aide à la collecte des souches de SCN.

Aux thésards et Master du Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie de l'Université d'Abomey-Calavi, particulièrement à Aude, Christine, Josiane et Wassiath. Merci de m'avoir soutenu durant ces 3 années et d'avoir égaillé mes séjours au Bénin.

Je tiens à remercier mes parents et mes beaux-parents qui m'ont tant apporté par leur vision de la vie et par l'amour dont ils ont entouré mes fils en mon absence. Ils ont toujours été présents pour moi et m'ont constamment soutenue. Je remercie également mes sœurs, mes frères et beaux-frères pour leur accompagnement chaleureux.

Enfin, je m'en voudrais de ne pas remercier du fond de mon cœur, Euloge, mon époux, qui a rendu tellement plus simple les choses à travers son amour, son soutien indéfectible et sa patience.

# TABLE DES MATIERES

DEDICACE .....	ii
REMERCIEMENTS .....	iii
TABLE DES MATIERES .....	v
INDEX DES FIGURES .....	x
INDEX DES TABLEAUX.....	xi
ABREVIATIONS.....	xii
Chapitre 1 : INTRODUCTION.....	1
1. STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE.....	2
1.1. GENERALITE.....	2
1.2. IDENTIFICATION .....	4
1.3. EPIDEMIOLOGIE CHEZ L'HOMME.....	5
1.4. PATHOGENESE DES INFECTIONS A STAPHYLOCOQUE COAGULASE .....	7
1.4.1. Ecologie humaine.....	7
1.4.2. Transmission .....	9
1.4.3. Du commensalisme à la pathogénicité .....	9
1.5. POUVOIR AGRESSIF DES SCN .....	15
1.5.1. Enzymes extracellulaires.....	15
1.5.2. Toxines cytolytiques.....	17
1.5.3. Superantigènes .....	18
1.6. REGULATION DES PROCESSUS PATHOGENIQUES CHEZ LES SCN .....	19
1.6.1. Le « Quorum sensing » (QS).....	20
1.7. SIGNIFICATION CLINIQUE ET INFECTIONS ASSOCIEES .....	22
1.8. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	23
1.8.1. Résistance à la méticilline .....	23
1.8.2. Autres résistances .....	25
2. MOBILITE DES SUPPORTS GENETIQUES DES FACTEURS DE VIRULENCE : EMERGENCE DE NOUVELLES SOUCHES DE STAPHYLOCOQUE A COGULASE NEGATIVE PATHOGENES ? .....	28
2.1. TRANSFERT HORIZONTAL.....	28
2.1.1. Transformation .....	29
2.1.2. Conjugaison.....	29
2.1.3. Transduction .....	31
2.2. ELEMENTS GENETIQUES MOBILES .....	32

2.2.1. Ilots de pathogénicité .....	32
2.2.2. Plasmides .....	33
2.2.3. Les bactériophages .....	34
3. LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES .....	35
3.1. HISTORIQUE .....	35
3.2. STRUCTURE .....	35
3.3. PROPRIETE.....	37
3.4. DETERMINISME GENETIQUE ET REGULATION DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES .....	38
3.5. VOIES DE SIGNALISATION ET CIBLES CELLULAIRES .....	41
3.6. MODE D’ACTION .....	42
3.6.1. Activité superantigénique.....	42
3.6.2. Activité émétique.....	44
4. ENTEROTOXINE : ASPECTS CLINIQUES .....	46
4.1. PATHOGENICITE .....	46
4.2. PATHOLOGIES LIEES AUX ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES.....	47
4.2.1. Intoxications alimentaires.....	47
4.2.2. Le syndrome de Choc Toxique Staphylococcique.....	48
4.2.3. La maladie de Kawasaki .....	50
4.2.4. Dermatite atopique.....	50
4.2.5. Maladies auto-immunes .....	50
4.3. TRAITEMENT .....	52
5. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	54
Chapitre 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	56
1. MATERIELS .....	57
1.1. SOUCHES BACTERIENNES.....	57
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue .....	57
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> BL21 .....	57
1.2. MATERIELS GENETIQUES.....	58
1.2.1. Vecteur plasmidique (pGEX-6P-1).....	58
Figure 2.1 : Plasmide pGEX-6P-1 et les détails de la cassette de clonage (Manuel .....	58
GE healthcare life sciences) .....	58
1.2.2. Vecteur recombiné .....	59
1.2.3. Les amorces d’ADN utilisées pour l’amplification génétique (PCR).....	59
1.3. PRODUITS CHIMIQUES .....	60

1.4. TAMPONS ET SOLUTIONS USUELS .....	60
1.5. MILIEUX DE CULTURE ET DE STOCKAGE .....	61
1.6. REACTIFS .....	61
1.7. MATERIELS DE CHROMATOGRAPHIE ET DE WESTERN BLOT .....	62
1.8. MATERIELS DE DOSAGE MULTIPLEX .....	62
2. METHODES .....	63
2.1. EVALUATION DE LA PERTINENCE CLINIQUE DES SOUCHES .....	63
2.2. IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE (SCN).....	65
2.3. IDENTIFICATION DES ESPECES DE SCN .....	65
2.3.1. Identification des espèces de SCN par la galerie API® Staph .....	65
2.3.2. Identification des espèces de SCN par la spectrométrie de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of Flight (maldi-tof/ms).....	65
2.3.3. Identification des espèces de SCN par séquençage de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S).....	69
2.4. ANTIBIOGRAMME AVEC VITEK 2.....	70
2.5. PREPARATION DES SURNAGEANTS DE CULTURE BACTERIENNE .....	71
2.6. TEST D'ACTIVITE CYTOLYTIQUE.....	71
2.6.1. Test de leucotoxicité .....	71
2.6.2. Test d'hémolyse en point final.....	74
2.7. TEST D'ACTIVITE PROTEASE .....	75
2.8. TEST D'ACTIVITE ESTERASE .....	76
2.9. RECHERCHE DE GENES CODANT LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES ET LES COMPOSANTE GAMMA-HEMOLYSINE B.....	76
2.9.1. Extraction d'ADN génomique.....	76
2.9.2. Amplification d'ADN par la réaction en chaine de la polymérase (PCR).....	77
2.10. DETECTION DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINE .....	78
2.10.1. Test d'immunoprecipitation radiale .....	78
2.10.2. Test d'agglutination passive reverse au latex (RPLA) .....	79
2.10.3. Test du Western blot .....	80
2.11. CLONAGE, EXPRESSION ET PURIFICATION DU GENE CODANT L'ENTEROTOXINE STAPHYLOCOCCIQUE C DE <i>S. EPIDERMIDIS</i> (SEC <sub>epi</sub> ) .....	82
2.11.1. Clonage de <i>sec<sub>epi</sub></i> .....	82
2.11.2. Expression de la protéine de fusion à la GST par <i>E. coli</i> : méthode d'induction à l'Isopropyl-β- D-thiogalactopyranoside (IPTG).....	87
2.11.3. Purification de SEC <sub>epi</sub> fusionnée avec la GST.....	89
2.11.4. Contrôles qualité et quantité et de la protéine SEC <sub>epi</sub> purifiée .....	90

2.12. DETERMINATION DE LA STABILITE DE SEC <sub>epi</sub> .....	91
2.12.1. Test de stabilité à la chaleur .....	91
2.12.2. Test de stabilité aux enzymes gastro-intestinales .....	92
2.13. DETERMINATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE SEC <sub>epi</sub> .....	92
2.13.2. Test de prolifération lymphocytaire par la détermination en Colorimétrie de l'incorporation du 5-bromo-2'- déoxyuridine.....	92
2.13.3. Dosage multiplex de cytokines par Bio-Plex .....	93
2.14. SEQUENÇAGE DE GENOME ENTIER PAR LA METHODE ILLUMINA.....	95
2.15. OUTILS BIOINFORMATIQUES .....	96
2.15.1. Analyse d'homologie.....	96
2.15.2. Modélisation structurelle.....	97
2.15.3. Analyse du génome.....	97
2.16. ANALYSES STATISTIQUES.....	100
Chapitre 3 : TRAVAUX DE RECHERCHE .....	101
PARTIE 1 .....	102
1.1. ARTICLE N°1: PATHOGENIC FEATURES OF CLINICALLY SIGNIFICANT COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI IN HOSPITAL AND COMMUNITY INFECTIONS IN BENIN .....	102
1.1.1. Présentation du sujet.....	102
1.1.2. Résumé des résultats .....	103
1.2. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES.....	118
PARTIE 2 .....	119
2.1. ARTICLE 2: CHARACTERIZATION OF HUMAN TYPE C ENTEROTOXIN PRODUCED BY CLINICAL <i>S.</i> <i>EPIDERMIDIS</i> ISOLATES .....	119
2.1.1. Présentation du sujet.....	119
2.1.2. Résumé des résultats .....	119
2.1.3. Conclusion.....	120
2.2. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES.....	146
2.2.1. Recherche du peptide signal dans la séquence de SEC <sub>epi</sub> .....	146
2.2.2. Analyse phylogénétique de SEC <sub>epi</sub> .....	146
2.2.3. Recherche du gène <i>sec</i> dans des souches cliniques de <i>S. epidermidis</i> .....	147
PARTIE 3 .....	148
3.1. ARTICLE N°3 : SEPTICEMIE A <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> PRODUCTEUR D'ENTEROTOXINE C .....	148
3.1.1. Situation du sujet .....	148
3.1.2. Résumé des résultats .....	148

3.1.3. Conclusion .....	148
3.2. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES : Recherche de la production de Biofilm .....	160
PARTIE 4 .....	162
4.1. ARTICLE 4: IDENTIFICATION OF THE PATHOGENICITY ISLAND <i>SEPI-1</i> BEARING ENTEROTOXINS AND OTHER MOBILE GENETIC ELEMENTS IN A PATHOGENIC STRAIN OF <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> THROUGH WHOLE GENOME SEQUENCING .....	162
Statut : Article soumis dans « Clinical Microbiology and Infection » .....	162
4.1.1. Situation du sujet .....	162
4.1.2. Résultats.....	163
4.1.3. Conclusion .....	164
pSC-SNUDS-2-1 ( <i>S. cohnii</i> , 30 CDS, 29.4 kb) .....	188
Chapitre 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION .....	194
4.1. APPORTS DE LA THESE .....	195
4.2. PERSPECTIVES.....	200
4.3. CONCLUSION .....	201
Chapitre 5 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	202
Chapitre 6 : ANNEXES.....	I
6.1. SEQUENCES .....	II
6.2. LISTE DES COMMUNICATIONS .....	V
6.2.1. ARTICLES PUBLIES, ACCEPTES, SOUMIS OU EN COURS DE REDACTION .....	V
6.2.2. COMMUNICATION ORALE.....	VI
6.2.3. COMMUNICATIONS AFFICHEES .....	VI

## INDEX DES FIGURES

Figure 1.1 : Niche écologique humaine de quelques espèces de SCN.....	9
Figure 1.2 : Gélose au sang de mouton montrant une souche de <i>S. epidermidis</i> isogénique affichant à la fois le phénotype normal (à droite) et le phénotype SCV (à gauche) .....	12
Figure 1.3 : Etapes de formation de biofilm chez <i>S. epidermidis</i> .....	14
Figure 1.4 : Mécanisme d'action du capteur de peptide antimicrobien sepA .....	16
Figure 1.5 : L'alignement séquentiel des PSM de <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i> .....	17
Figure 1.6 : Activité cytolytique du PSM de type $\alpha$ de <i>S. epidermidis</i> .....	18
Figure 1.7 : Contrôle Agr chez les staphylocoques.....	21
Figure 1.8. Mécanisme de la transformation bactérienne.....	29
Figure 1.9 : Résumé du mécanisme de la conjugaison.....	30
Figure 1.10 : Schéma explicatif du mécanisme de la transduction.....	31
Figure 1.11 : îlot de pathogénicité de <i>S. epidermidis</i> FRI909 (SEPI).....	33
Figure 1.12 : Structure tridimensionnelle de l'entérotoxine de type C de <i>S. aureus</i> montrant les deux domaines.....	36
Figure 1.13 : Comparaison entre la liaison d'un antigène normal (vert) et la liaison d'un superantigène (rouge) avec le récepteur des lymphocytes T le complexe CMH de classe II de la cellule présentatrice d'antigène.....	43
Figure 1.14 : Cellules et cytokines participant à la toxicité des entérotoxines.....	47
Figure 1.15 : Conséquences pathologiques possibles à la suite de l'exposition aux superantigènes.....	52
Figure 2.1 : Plasmide pGEX-6P-1 et les détails de la cassette de clonage (Manuel .....	58
Figure 2.2 : Principe d'ionisation par la technique MALDI .....	66
Figure 2.3 : Technique Time of flight (TOF).....	67
Figure 2.4 : Résumé de l'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS .....	69
Figure 2.5 : Purification des cellules leuco-plaquettaires sanguines par centrifugation sur gradient de ficol + diatrizoate (milieu de séparation des lymphocytes) (Manuel Eurobio®).....	73
Figure 2.6 : Réactions chimiques impliquées dans le dosage de la LDH ( <a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88953">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88953</a> ).....	74
Figure 2.7 : Photo illustrant le test d'immunoprécipitation radiale.....	79
Figure 2.8 : Schéma illustrant les étapes de clonage du gène <i>sec</i> de <i>S. epidermidis</i> dans <i>E. coli</i> XL1.....	84
Figure 2.9 : Illustration de la technique de séquençage Sanger.....	86
Figure 2.10 : Synthèse de la méthode de purification de SEC <sub>epi</sub> .....	91
Figure 2.11 : Immuno-marquage en sandwich pour le dosage Bio-Plex (Manuel BioRad).....	94
Figure 2.12 : aperçu de l'amplification en pont de la technologie illumina® .....	96
Figure 3.1 : Électrophorèse sur gel d'agarose pour la détection par PCR du clfB (305 pb).....	118
Figure 3.2 : Site de clivage du peptide signal SEC <sub>epi</sub> .....	146
Figure 3.3 : Dendrogramme montrant la relation phylogénétique de SEC <sub>epi</sub> avec les autres types d'entérotoxines staphylococciques sur la base de l'algorithme BLAST.....	147
Figure 3.4: Cinétique de la formation de biofilm de par les souches de <i>S. epidermidis</i> SE90 et SE95 issues de bactériémie.....	161
Figure 6.1 : pGEX-6P-1 et détail de la cassette de clonage.....	II

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : espèces et sous-espèces du genre staphylococcus et hôtes associés (stepan et al., 2004).....	3
Tableau 1.2 : Epidémiologie des infections à staphylocoques à coagulase négative (SCN) : données multicentriques. ....	7
Tableau 1.3: Répartition des éléments SCC <sub>mec</sub> dans une sélection d'espèces de SCN d'origine humaine. ...	26
Tableau 1.4 : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches cliniques de SCN <b>Erreur ! Signet non défini.</b> .....	27
Tableau 1.5: Regroupement des SEs et SEIs basé sur des comparaisons de séquences d'acides aminés. ...	35
Tableau 1.6 : Activité superantigénique et émétique des entérotoxines staphylococciques.....	38
Tableau 1.7 : Support génétique des gènes d'entérotoxines staphylococciques. ....	40
Tableau 1.8 : Différence entre les superantigènes et les antigènes conventionels .....	44
Tableau 1.9 : Syndrome de choc toxique staphylococcique: critères cliniques de diagnostic.....	49
Tableau 2.1 : Souches de référence utilisées .....	57
Tableau 2.2 : amorces utilisées pour la PCR.....	59
Tableau 2.3 : critères utilisés pour la considération clinique des scn isolés de divers echantillons. ....	64
Tableau 6.1 : Références embl des séquences d'entérotoxines utilisées.....	II



## ABREVIATIONS

**AA** : Acide aminé

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléotidique

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BSA** : Albumine sérique bovine

**BrdU** : Bromodeoxyuridine

**Da** : Dalton (= g/mole)

**DO** : Densité optique

**EGTA** : Ethylène glycol-bis ( $\beta$ -amino éthyl éther) N, N, N', N' tétracétate

**ELISA** : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**ERK** : Extracellular signal regulated kinase

**MALDI-TOF-MS** : Spectrométrie de Masse à source d'ionisation ElectroSpray

**GS** : Gluthation réduit

**GST** : Gluthation S-Transférase

**hPMN** : Polymorphonucléaire humain

**IPTG** : Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside

**JNK** : cJun N-terminal kinase

**Kb** : kilobase

**kDa** : kilodalton

**LPV** : Leucocidine de Panton et Valentine

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase

**MM** : Masse moléculaire

**PAGE** : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**PMN** : Polymorphonucléaire (hPMN: humain)

**S. aureus** : *Staphylococcus aureus*

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline

**SCNRM** : Staphylocoque à coagulase négative résistant à la méricilline

**SCNSM** : Staphylocoque à coagulase négative sensible à la méricilline

**SDS** : Sodium dodécyl sulfate

**SDS-PAGE** : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

**TE** : Tris EDTA

**TSS** : Staphylococcal toxic shock ou choc toxique staphylococcique

**Tris** : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

**TSST-1** : Toxine du choc toxique staphylococcique de type 1

**TY** : Milieu TY x 2 (Trypcase-Yeast extract)

**TY-A** : Milieu TY x 2 - Ampicilline

# Chapitre 1 : INTRODUCTION

## 1. STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE

### 1.1. GENERALITE

Les Staphylocoques à coagulase négative (CNS) sont des commensaux de la peau et des muqueuses humaines. Ils ont été décrits la première fois en 1884 par Rodenbach comme *Staphylococcus albus*, un staphylocoque avirulent. Les SCN appartiennent au genre *staphylococcus* et sont ainsi appelés pour leur incapacité à produire de la coagulase, une enzyme qui provoque la coagulation du plasma sanguin par opposition aux staphylocoques à coagulase positive chez qui l'expression d'une activité enzymatique coagulase est un critère phénotypique majeur. Ils regroupent une cinquantaine d'espèces. Mais de nouvelles espèces isolées à partir d'échantillons cliniques humains, sont plus récemment décrites comme des SCN. Il s'agit de : *S. jettensis*, *S. massiliensis*, *S. petrasii*, *S. pettenkoferi*, *S. pseudolugdunensis* (De Bel et al., 2013, Pantucek et al., 2013, Tang et al 2008) (Tableau 1.1.). Ces microorganismes constituent un groupe très hétérogène en termes de patrimoine génétique, de facteurs de virulence, de capacités à accumuler les mécanismes de résistance.

TABLEAU 1.1 : ESPECES ET SOUS-ESPECES DU GENRE *STAPHYLOCOCCUS* ET HOTES ASSOCIES (STEPAN ET AL., 2004).

Espèces et sous-espèces à coagulase négative	Hôte et source
<i>S. agnetis</i>	
<i>S. arlettae</i>	Homme, primates
<i>S. auricularis</i>	Homme
<i>S. capitis subsp. Capitis</i>	Homme
<i>S. capitis subsp. Ureolyticus</i>	Homme, primates
<i>S. caprae</i>	Homme, caprins
<i>S. carnosus subsp. Carnosus</i>	Produits carnés
<i>S. carnosus subsp. Utilis</i>	Aliments
<i>S. chromogenes</i>	Animaux, lait
<i>S. cohnii subsp. Cohnii</i>	Caprin, volaille
<i>S. cohnii subsp. Urealyticum</i>	Homme
<i>S. condimenti</i>	Sauce au soja
<i>S. delphinii</i>	
<i>S. devrisei</i>	
<i>S. epidermidis</i>	Homme, animaux, environnement
<i>S. equorum subsp. Equorum</i>	Homme
<i>S. equorum subsp. Linens</i>	Chevaux, bétail
<i>S. fleurettii</i>	Animaux, rarement homme
<i>S. felis</i>	Chats
<i>S. gallinarum</i>	Surface fromage affiné
<i>S. haemolyticus</i>	Homme, animaux domestique
<i>S. hominis subsp. Hominis</i>	Environnement, animaux sauvages
<i>S. hominis subsp. Novobiosepticus</i>	Volailles, oiseaux
<i>S. intermedius</i>	
<i>S. kloosii</i>	Chèvre
<i>S. lentus</i>	Produits carnés
<i>S. lugdnensis</i>	Homme
<i>S. lutrae</i>	
<i>S. microti</i>	
<i>S. muscae</i>	Homme
<i>S. nepalensis</i>	Animaux
<i>S. pasteurii</i>	Mouches, porcs
<i>S. pettenkoferi</i>	
<i>S. piscifermentans</i>	Homme, animaux, aliments
<i>S. pseudointermedius</i>	
<i>S. rostri</i>	
<i>S. saccharolyticus</i>	Poisson fermenté
<i>S. schleiferi subsp. Schleiferi</i>	Homme
<i>S. saprophyticus subsp. Bovis</i>	Homme, animaux
<i>S. saprophyticus subsp. Saprophyticus</i>	Surface de fromage affiné
<i>S. sciuri subsp. Carnaticus</i>	Rongeurs, animaux

<i>S. sciuri subsp. Rodentium</i>	Homme, animaux
<i>S. sciuri subsp. Sciuri</i>	Animaux, aliments
<i>S. simulans</i>	Homme
<i>S. stepanovicii</i>	
<i>S. succinus subsp. casei</i>	Homme, animaux, environnement
<i>S. succinus subsp. succinus</i>	Fromage lait de chèvre
<i>S. xylosus</i>	Homme, animaux, environnement
<i>S. warneri</i>	Homme, mammifère

## 1.2. IDENTIFICATION

Avant 1975, les SCN étaient distingués de *S. aureus* par leur incapacité à coaguler le plasma sanguin et ont été classés dans différents biotopes, selon Baird-Parker. Kools et al. (1975) ont proposé un système d'identification des staphylocoques dans les laboratoires d'analyses de routine. Ce système est basé sur 13 éléments caractéristiques, dont l'activité de la coagulase, l'hémolyse, la réduction des nitrates et la production des hydrates de carbone (Kloos et Schleifer, 1975). Aujourd'hui, les tests basés sur la production de la coagulase et la réaction de la thermonucléase sont utilisés pour la différenciation rapide de *S. aureus* des autres espèces de staphylocoques (Huebner et Goldmann, 1999) et plusieurs méthodes phénotypiques (DB Phoenix, Api staphylocoque, VITEK 2 etc) et génotypiques (ARNr 16S, *sodA*, *gap*, *rpoB*, gène *tuf* de séquençage) (Heikens et al., 2005; Layer et al., 2006; Mellmann et al., 2006) sont développées pour l'identification des espèces. Une comparaison des identifications phénotypique et génotypique a montré que le séquençage du gène *tuf* est la meilleure méthode d'identification (5/57 isolats mal identifiés) (Heikens et al., 2005). La comparaison de trois kits commerciaux d'identification phénotypique a révélé que le test API®/ID 32 staphylocoques (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) semblait être une alternative fiable (23/27 des souches de référence et 19/20 des isolats cliniques sont bien identifiés). Le système BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Systems) semble le moins fiable (18/27 des souches de référence et 70/86 des isolats cliniques bien identifiés) quant au VITEK® 2 (BioMérieux) 20/27 de souches de référence et 80/86 de souches cliniques sont correctement identifiés (Layer et al., 2006). Ainsi, les méthodes génotypiques sont supérieures aux méthodes phénotypiques, mais certaines méthodes phénotypiques ont un niveau acceptable de précision de l'identification. Généralement, les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires de microbiologie sont des méthodes conventionnelles qui reposent

essentiellement sur des tests phénotypiques et/ou biochimiques et présentent un délai d'identification d'environ 1 à 3 jours. Ce qui peut retarder le diagnostic et la prescription d'une antibiothérapie adaptée. De plus, ces méthodes donnent seulement une identification au niveau du genre et/ou de l'espèce et ne sont souvent pas applicables pour une identification au niveau de la sous-espèce (typage), ce qui peut être important lors de la suspicion et du risque de situation épidémique dans le domaine médical. Bien que les méthodes génotypiques reposent sur les techniques de biologie très discriminantes favorisant des enquêtes épidémiologiques très fines, ils ont aussi leurs limites, à savoir la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire pour maîtriser ces systèmes, le coût des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidiques spécifiques pour chaque espèce, et enfin le délai important nécessaire pour l'identification. Ces difficultés ont favorisé le développement de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF qui est désormais utilisée comme une méthode d'identification de routine dans la plupart des laboratoires de microbiologie clinique des pays développés. Cette technique permet l'identification en quelques mins de la plupart des bactéries pathogènes à partir de colonies isolées, et a prouvé son efficacité et sa reproductibilité avec plus de 95% de bactéries bien identifiées (Mellmann et al., 2009). L'utilisation du MALDI-TOF/MS a récemment révélé la présence d'espèces de SCN telles que *S. pettenkoferi*, *S. condimentii*, et *S. piscifermentans*, jamais identifiées auparavant avec d'autres méthodes d'identification de routine (Argemi et al., 2015).

### **1.3. EPIDEMIOLOGIE CHEZ L'HOMME**

La plupart des infections à SCN sont nosocomiales, contractées, à l'hôpital ou sont en relation avec les soins de santé (Rupp et al., 1994, Huebner et al., 1999). Certains clones sont probablement endémiques dans le milieu hospitalier. Les SCN ont la capacité de survivre dans l'environnement de l'unité de soins intensifs sur les dispositifs médicaux ou du matériel médical pendant des semaines à des mois (Neely et al., 2000). Chez les nouveaux-nés, leur propagation est bien étudiée et ils sont le principal agent responsable des septicémies en Néonatalogie. Les bactériémies, liées ou non à une infection sur cathéter (Luzzaro et al., 2011, Wisplinghoff et al., 2004), et les endocardites associées à des matériels implantés (prothèse valvulaire, pacemaker, défibrillateur implantable) (Murdoch et al., 2009, Benito et al., 2007) sont les deux types d'infections nosocomiales ou associées aux soins au cours desquels les SCN sont les plus souvent isolés, à égalité de fréquence avec *S. aureus*. D'autre part, les

infections de port-a-cath et autres cathéters de longue durée chez les patients des services d'oncologie représentent une problématique émergente (Lebeaux et al., 2012). Enfin, les SCN sont couramment en cause dans les infections post-opératoires en Chirurgie Cardiaque (médiastinites post-sternotomie) (Lepelletier et al 2005), en Chirurgie Orthopédique (infections sur prothèses ou matériel d'ostéosynthèse) (Zimmerli et al., 2004, Sheehy et al., 2010) et en Neurochirurgie (méningites post-opératoires, en particulier sur cathéter de dérivation ventriculaire) (Korinek et al., 2005, Wang et al., 2005) (Tableau 1.2). En milieu hospitalier, la colonisation des patients et le personnel hospitalier par un *S. epidermidis* résistant aux antibiotiques précède l'infection par ces organismes (Nouwen et al., 1998; Widerstrom et al., 2006). Un type de séquence (ST) nommé ST27 est exclusivement contenu dans les isolats *ica*-positifs et MR et représente la majorité des souches cliniques au sein de différents hôpitaux et dans les installations médicales (Kozitskaya et al., 2005). La combinaison de la formation de biofilm, la résistance aux antibiotiques et la flexibilité génétique dans le clone ST27 peut expliquer sa prédominance dans les milieux hospitaliers. Il se pourrait que les patients qui sont admis à l'hôpital soient plus rapidement colonisés par ce clone et que l'acquisition de cette nouvelle microflore pourraient représenter l'origine des infections plus tard (Kozitskaya et al., 2005). Le port du gène *mecA* dans ces clusters est généralement très élevé, ce qui suggère que la résistance aux antibiotiques est l'une des grandes forces sélectives (Kredi et al., 2004). Quant aux infections communautaires à SCN, elles sont le plus souvent associées à des souches sensibles aux antibiotiques, mais la cause de leur survenue n'est pas encore clairement établie.



**TABEAU 1.2 : EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS A STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE (SCN) : DONNEES MULTICENTRIQUES.**

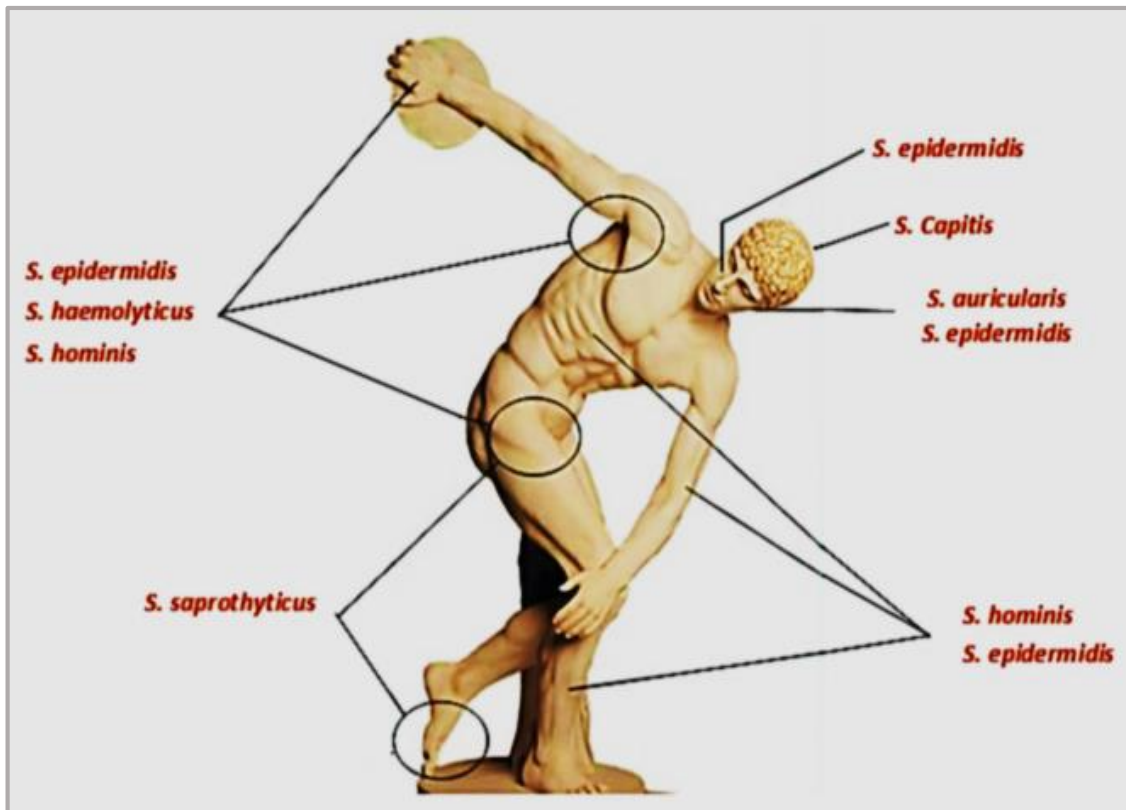
Types d'infection	Étude	Episodes, <i>n</i>	Infections à SCN, %	Références
<b>Bactériémie nosocomiale</b>	États Unis, 49 hôpitaux, 1995–2002	24179	31%	Wisplinghoff et al., 2004
<b>Bactériémie nosocomiale</b>	Italie, 20 hôpitaux, 2007–2008	7821	15 %	Luzzaro et al., 2011
<b>Bactériémie sur cathéter (réanimation)</b>	France, 196 réanimations, 2012	155	29%	Réseau REA-Raisin, 2014
<b>Infection de port-a-cath (oncologie)</b>	France, 3 services, 2009–2010	83	29 %	Lebeaux et al., 2012
<b>Endocardite sur prothèse valvulaire</b>	25 pays, 58 hôpitaux, 2000–2005	563	17%	Murdoch et al., 2009
<b>Endocardite sur pacemaker ou défibrillateur implanté</b>	28 pays, 61 hôpitaux, 2000–2006	177	32%	Athan et al., 2012
<b>Endocardite admise en réanimation (tous types)</b>	France, 33 réanimations, 2007–2008	225	7%	Sonneville et al., 2011
<b>Infection de dispositif d'assistance ventriculaire</b>	États-Unis, 3 hôpitaux, 2005–2011	78	25%	Nienaber et al., 2013
<b>Médiastinite post-sternotomie</b>	France, 1 centre, 1993–2003	316	13%	Benito et al., 2007
<b>Infection du site opératoire après neurochirurgie</b>	France, 1 centre, 1997–2001	527	21	Korinek et al., 2005

## 1.4. PATHOGENESE DES INFECTIONS A STAPHYLOCOQUE COAGULASE

### 1.4.1. Ecologie humaine

La peau constitue une barrière physique et une interface avec l'environnement extérieur et est physiologiquement colonisée par une multitude de micro-organismes (Grice et al., 2011). Les SCN représentent une partie régulière du microbiote cutané et muqueux des humains (Figure 1.1). Bien que la peau soit perçue comme le plus grand organe du corps humain, les différences entre l'épaisseur de celle-ci, les densités des follicules pileux et des glandes

définissent des habitats distincts de différents microbiotes, y compris les SCN. *S. epidermidis*, l'espèce majoritaire, colonise plus de 90 % des sujets de la population générale (Lina et al 2003). Des analyses métagénomiques récentes ont révélé que les staphylocoques préfèrent les zones d'humidité plus élevée (les aisselles, les régions fessière et inguinale, l'ombilic, les espaces antécubital et poplitéal, et la région plantaire) (Costello et al., 2009, Grice et al., 2009). En outre, la partie antérieure des narines, principal habitat de *S. aureus*, est aussi constamment colonisée par des SCN (Wos-Oxley et al., 2010). De même, la surface oculaire, est habituellement colonisée par ces bactéries (Willcox et al., 2013). Certains facteurs favorisent la colonisation, parmi lesquels : l'immunodépression (Vandenesch *et al.*, 1995), l'implantation de corps étrangers divers tels que les prothèses, les stimulateurs cardiaques, les cathéters vasculaires, les shunts de dérivation du LCR (Huebner et al., 1999) ou la multirésistance de certains SCN aux antibiotiques, la prématurité des nouveaux-nés (Vandenesch et al., 1995) et le contact avec le personnel médical ou le travail en milieu hospitalier (Kaur et al., 2014). D'autre part, l'élément génétique mobile ACME (Arginine Catabolic Mobile Element), initialement décrit chez le clone pandémique de *S. aureus* USA300, résistant à la méticilline (Diep et al., 2006), est présent chez plus de 70 % des souches commensales de *S. epidermidis* (Miraglia et al., 2009, Barbier et al., 2011). Il pourrait favoriser la dissémination de ces souches en améliorant leurs capacités de colonisation (amélioration du fitness et de résistance aux peptides cationiques antimicrobiens sécrétés par les cellules des muqueuses de l'hôte) (Diep et al., 2008). D'autres espèces sont couramment isolées dans le microbiome de la peau et des muqueuses, en particulier *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis* et *S. warneri*. Cependant, les densités de colonisation et les sites préférentiels de portage sont différents (visage et scalp pour *S. capitis*, ou mains pour *S. warneri*) (Kools et al., 1975; Kools et al., 1976).



**FIGURE 1.1 : NICHE ECOLOGIQUE HUMAINE DE QUELQUES ESPECES DE SCN.**  
([WWW://SLIDEPLAYER.FR/SLIDE/3519775/11/IMAGES/7/NICHES+ECOLOGIQUE](http://WWW://SLIDEPLAYER.FR/SLIDE/3519775/11/IMAGES/7/NICHES+ECOLOGIQUE)).

### 1.4.2. Transmission

Elle peut être :

**Directe** : A partir de lésions ouvertes ou d'un simple portage asymptomatique chez le sujet source ou par auto inoculation des fosses nasales. En milieu hospitalier, la transmission est essentiellement manuportée par le personnel soignant. La transmission croisée par l'intermédiaire des soignants favorisant la dissémination des clones les mieux adaptés à l'environnement hospitalier est aussi possible (Hira et al., 2010).

**Indirecte** : par voie aérienne (sécrétions de la sphère ORL), par les objets souillés ainsi que les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). La porte d'entrée est fréquemment cutanée. Une plaie, même minime, une excoriation, le point de pénétration d'un cathéter sont des portes d'entrée potentielles. Les muqueuses sont plus rarement en cause.

### 1.4.3. Du commensalisme à la pathogénicité

Les mécanismes par lesquels les SCN provoquent les infections ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant, dans des situations opportunistes (état

d'immunodépression de l'hôte), ces micro-organismes traversent les barrières de protection tels que la peau et les muqueuses et colonisent les sites adjacents à la flore normale à la recherche de stratégie de survie inhérente aux mécanismes de l'évolution. Ce qui les conduit vers la situation de pathogénicité qui représente du point de vue de la bactérie, une source intarissable de nutriments. Afin de profiter de cette source alimentaire, les SCN possèdent un arsenal de stratégie variable en fonction de l'espèce pour permettre l'évasion de l'immunité innée ou adaptative, l'adhésion, et l'agression par l'élaboration de facteurs de virulence qui font l'objet de cette étude.

### **1.4.3.1. Evasion du système immunitaire**

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme face à un agent pathogène au cours d'une infection. Elle est immédiate et active dès la naissance et repose sur trois mécanismes majeurs. a) Les enzymes et les peptides microbiens, b) le système du complément et c) la phagocytose (Rooijackers et al., 2005). La réponse immunitaire est induite par un « **signal danger** » émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs du soi appelés « Pattern Recognition Receptors » (PRR) et des molécules du non soi appelées « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMP) présents au niveau des microorganismes pathogènes (Kumar et al., 2011) ce qui déclenche la libération de composants antimicrobiens et chimioattractants permettant le recrutement des cellules immunitaires (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, épithéliales et endothéliales). Cependant, les SCN ont élaboré des stratégies pour échapper aux mécanismes de défense du système immunitaire à savoir l'internalisation et la persistance dans la cellule hôte et l'interférence avec le système immunitaire humain.

#### **1.4.3.1.1. Internalisation et persistance dans les cellules hôtes**

##### **1.4.3.1.1.1. Internalisation par les phagocytes non professionnels**

Les SCN peuvent être phagocytés par des cellules hôtes, menant à l'évasion à la défense immunitaire du patient et à la thérapie antibactérienne par « dissimulation » dans les phagocytes non professionnels. En effet, il a été récemment décrit que, l'AtIE (surface-associated autolysin/adhesin) de *S. epidermidis* se lie non seulement aux facteurs de l'hôte, mais aussi promeut l'adhésion et l'internalisation de la souche dans les cellules endothéliales humaines ; ce qui représente peut-être le premier et seul mécanisme d'internalisation employé par les SCN (Hirschhausen et al., 2010). Il peut aussi être internalisé dans les cellules

osseuses (Valour et al., 2013). Chez *S. saprophyticus*, l'internalisation par une lignée cellulaire de carcinome de vessie humaine a été rapportée (Szabados et al., 2008).

#### **1.4.3.1.1.2. Persistance intracellulaire : le concept de « Small Colony**

##### **Variante »**

Le terme "**small colony variant**" (SCV) reflète un phénotype spécifique résultant de la transformation du type sauvage (phénotype normal). Les SCVs ont été décrits chez plusieurs bactéries Gram-négatif et Gram-positif. Alors que la plupart des travaux ont été faits sur les SCVs de *S. aureus* (Proctor et al., 2006), les caractéristiques générales similaires des SCVs sont identifiées chez les SCVs des SCN (Proctor et al., 2006). Quelle que soit l'espèce, le phénotype du SCV est caractérisé par des changements drastiques dans le métabolisme cellulaire, reflété par une réduction du taux de croissance et des modifications quantitatives et qualitatives substantielles du transcriptome, du métabolome et du protéome (Biswas et al., 2006, Allignet et al., 2001). Ces changements déterminent l'auxotrophie exprimée par presque tous les isolats SCV (Besier et al., 2007). Les changements métaboliques aussi influencent le morphotype colonial des SCVs, qui sont caractérisés par des colonies minuscules (Figure 1.2) ou la perte de pigmentation et d'hémolyse comparées à leurs homologues de type sauvage (Proctor et al., 2006). Leur localisation intracellulaire fournit une niche de survie dans l'environnement de l'hôte, la résistance contre les défenses de ce dernier et contre les agents antimicrobiens (von Eiff et al., 1997, Tuchscher et al., 2010). Par ailleurs, la virulence et les caractéristiques pathogènes sont modifiées. Comme exemple, les souches de *S. epidermidis* mutantes présentant le phénotype SCV ont démontré une augmentation de l'expression du PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin) (Al Laham et al., 2007).



**FIGURE 1.2 : GELOSE AU SANG DE MOUTON MONTRANT UNE SOUCHE DE *S. EPIDERMIDIS* ISOGENIQUE AFFICHANT A LA FOIS LE PHENOTYPE NORMAL (A DROITE) ET LE PHENOTYPE SCV (A GAUCHE) (ONYANGO ET AL., 2008).**

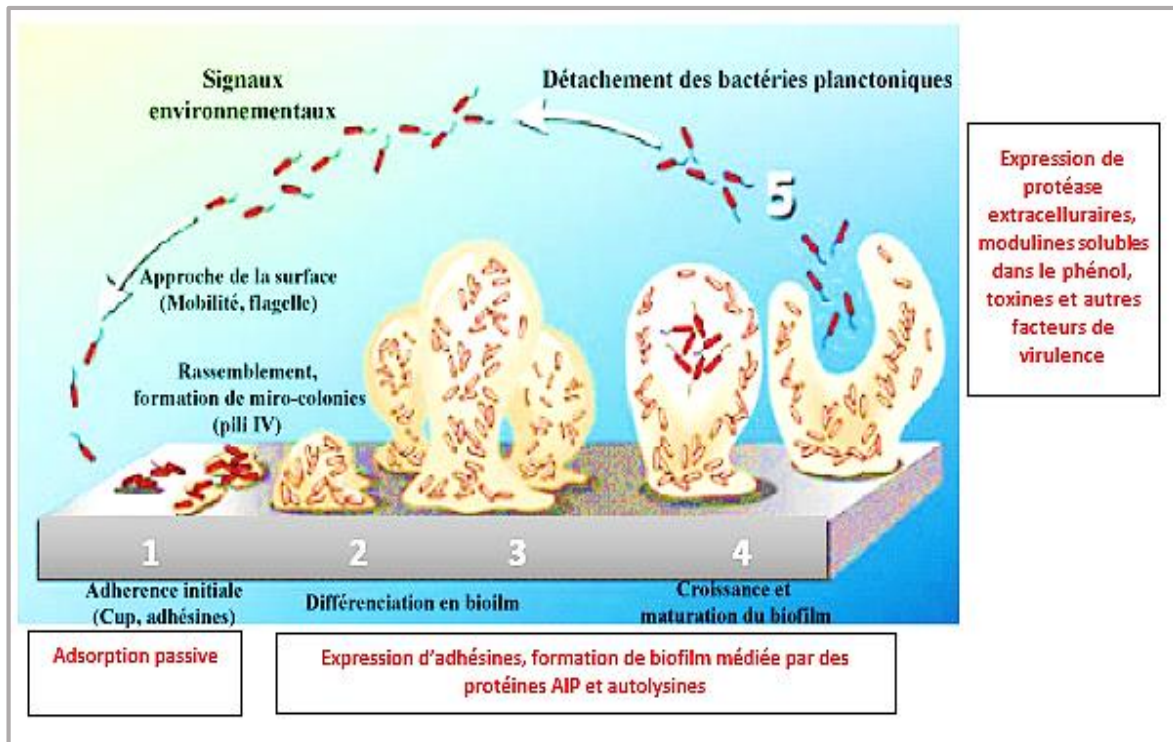
#### **1.4.3.1.2. Interférence avec le système immunitaire humain**

Une conséquence grave des infections à SCN est la septicémie. La production de cytokines, telles que les facteurs alpha de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ), les interleukines-1 et 6 (IL-1 et IL-6), joue un rôle majeur dans la physiopathologie des événements inflammatoires de la septicémie. En effet, Les SCN peuvent interférer avec le système immunitaire en libérant des composants de leur paroi cellulaire, tels que le peptidoglycane et l'acide téichoïque qui stimulent les lymphocytes humains à produire TNF $\alpha$ , l'IL-1 et IL-6 d'une manière dépendante de la concentration (Mattsson et al., 1993). Cette libération excessive entraîne le syndrome de choc toxique qui peut induire la mort du patient. D'autres études ont montré que le sérum humain augmente fortement la capacité du peptidoglycane à induire la libération TNF $\alpha$  par les cellules immunitaires humaines (Mattsson et al., 1994).

#### **1.4.3.2. L'adhésion aux surfaces et la persistance par la formation de biofilms**

La première phase critique de l'établissement d'une infection par des staphylocoques est l'adhésion à l'hôte ou à la surface d'un matériel biologique étranger. La colonisation de la surface polymère d'un dispositif médical par formation d'un biofilm multicouche est considérée comme le facteur critique dans la pathogenèse des infections à SCN associées aux corps étrangers (Peters et al., 1982). Parmi les SCN, *S. epidermidis* est le plus souvent l'espèce

responsable des infections associées à un biofilm. L'infection de la surface du polymère se produit probablement pendant l'insertion du dispositif, après l'inoculation d'un petit nombre de bactéries à partir des membranes muqueuses ou la peau du patient. Le biofilm est constitué d'énormes agglomérats de cellules bactériennes enfermées dans une matrice extracellulaire amorphe composée de produits bactériens, tels que : les acides téichoïques, des protéines, des polysaccharides, et de l'ADN extracellulaire (EdNA) (Izano et al., 2008). Les biofilms peuvent être formés sur les surfaces abiotiques des dispositifs médicaux ou sur des surfaces biotiques, tels que les tissus de l'hôte. La formation du biofilm peut être divisée en cinq étapes: (1) la fixation rapidement à la surface biotique ou abiotique par des interactions non spécifiques (hydrophobe, électrostatique et Van der Waals...) en plus des autolysines (Legeay et al., 2006), (2) la multiplication et l'accumulation des bactéries dans des agrégats de cellules à plusieurs couches est un processus actif médié par les « microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules » (MSCRAMMs) (Speziale et al., 2009) et par adhésion intercellulaire, (3) le développement ou la maturation du biofilm en une couche épaisse et (4) le détachement des cellules ou les agglomérats de cellules uniques du biofilm dans un état planctonique pour diffuser via la circulation sanguine ou (5) pour initier un nouveau cycle de formation de biofilm à un autre site (Figure I.3) (Costerton et al., 2005; AL-Fattani et al., 2004). Un biofilm mature contient des canaux qui sont remplis de fluide pour assurer la livraison d'oxygène et de nutriments aux cellules bactériennes qui se trouvent dans les couches plus profondes (Costerton et al., 1999). Pour adapter l'attachement à des surfaces, ainsi que pour faciliter l'adhésion intercellulaire, les espèces du genre *Staphylococcus* produisent divers adhésines protéiques et non protéiques (Heilmann, 2011). Les adhésines protéiques regroupent les autolysines (Atl) et les protéines membranaires (Foster et al., 2014). Les adhésines non protéiques comprennent l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA) ou le poly-N-acétylglucosamine (PNAG), ainsi que les acides téichoïque et lipotéichoïque. Les facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm font généralement partie du génome accessoire et ne sont donc pas communs à toutes les souches. En outre, les modèles *in vitro* de la formation de biofilms sont certainement loin de décrire les interactions complexes dans des conditions *in vivo*.



**FIGURE 1.3 : ETAPES DE FORMATION DE BIOFILM CHEZ *S. EPIDERMIDIS*.**

Les phases principales du développement du biofilm sont : l'attachement des cellules planctoniques à la surface, l'accumulation bactérienne, la maturation biologique et la dispersion. Les premiers événements impliquent l'expression d'adhésines, d'exopolysaccharides et de protéines impliquées dans l'agrégation. Lorsque le biofilm atteint sa phase finale de maturation, l'excès de peptide auto-inducteur (AIP) déclenche le début de la phase de dispersion, caractérisée par l'augmentation de l'expression de RNAIII avec production consécutive de protéases extracellulaires et de modulines solubles dans le phénol. Figure adaptée de (Arciola et al., 2012).

### 1.4.3.3. Production des lantibiotiques

Les lantibiotiques appartiennent à la classe des peptides antimicrobiens cationiques (PAC). Ces peptides antibiotiques contiennent de rares, acides aminés thioéther non protéinogénique (lanthionine et / ou méthyllanthionine), d'où leur désignation comme "antibiotique contenant des peptides de la lanthionine" : les lantibiotiques (Sahl et al., 1998). Ils sont regroupés en peptides de type A et de type B en fonction de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. En général, les lantibiotiques de type A sont des peptides cationiques allongés jusqu'à 34 résidus, et qui montrent des similitudes dans l'arrangement de leurs ponts. Ces peptides agissent principalement en perturbant l'intégrité de la membrane des organismes cibles par l'induction de pores dans la membrane cytoplasmique. Ils comprennent : la nisine, la subtiline, l'épidermine... (Jung et al., 1991). Les lantibiotiques de type B sont des peptides globuleux, constitués de 19 résidus d'acides aminés, et agissent par



la perturbation de la fonction enzymatique. Par exemple, l'inhibition de la biosynthèse des parois cellulaires (Hansen et al., 1993).

Les staphylocoques commensaux sont connus en particulier pour leur production de lantibiotiques (Götz et al., 2014). Leur production peut jouer un rôle considérable dans l'interférence ou l'antibiose bactérienne sur la peau et les muqueuses, créant ainsi une niche écologique pour *S. epidermidis* et autres les SCN. Les lantibiotiques produits par *S. epidermidis* sont les épidermines bien caractérisées, et les Pep5. Ensuite, l'épilancine K7, l'épidermicine NI01 et l'épicidine 280 ont été identifiées. D'autres lantibiotiques produits par les SCN ont été détectés chez *S. gallinarum* (gallidermine), *S. hominis* (hominicine), et *S. warneri* (nukacine ISK-1) (Götz et al., 2014).

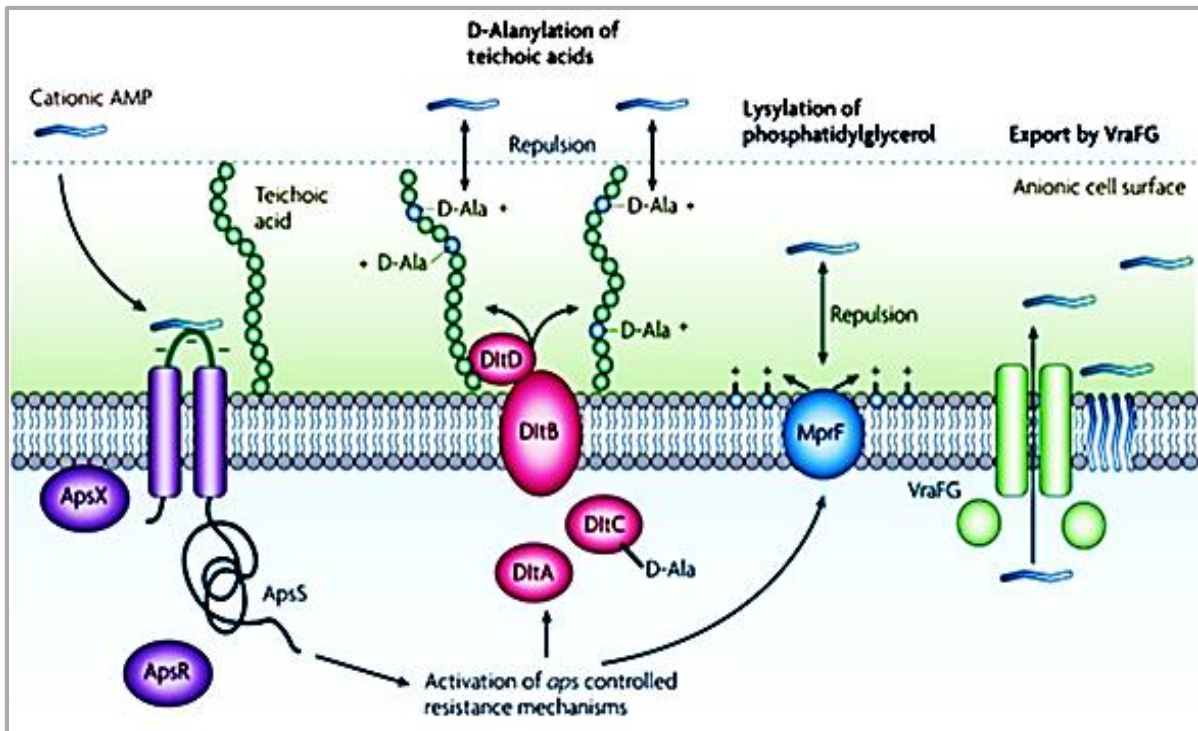
## 1.5. POUVOIR AGRESSIF DES SCN

Contrairement à *S. aureus*, les souches de SCN sont caractérisées par une faible agressivité. Ainsi peu de facteurs de virulence ont été décrits chez ces dernières. Cependant, ils ont développé des mécanismes multiples, y compris la production d'une variété d'enzymes extracellulaires, telles que des lipases, des protéases, des estérases et des phospholipases, ainsi que la production de toxines hémolysines et d'autres facteurs de virulence. Ces facteurs peuvent varier en fonction de l'espèce ou de l'origine de la souche. Dans la suite de ce travail, nous nous consacrerons à décrire les facteurs de virulence de *S. epidermidis* qui est l'espèce la plus fréquemment mise en cause dans les infections à SCN.

### 1.5.1. Enzymes extracellulaires

Les exoenzymes sont impliquées dans l'inactivation du système de défense de l'hôte en favorisant ainsi l'invasivité accrue des bactéries. *S. epidermidis* produit différentes exoenzymes dont les protéases et les lipases. Les protéases secrétées sont généralement :

**La métalloprotéase extracellulaire SepA** qui a une forte capacité à inactiver les peptides antimicrobiens (AMPs) par clivage protéolytique (Lai et al., 2007). Le mécanisme d'action de SepA est résumé par la figure 1.4.



**FIGURE 1.4 : MECANISME D'ACTION DU CAPTEUR DE PEPTIDE ANTIMICROBIEN SEPA (CHEUNG ET AL., 2010)**

En effet, les AMP sont des molécules cationiques qui s'attachent à la surface bactérienne chargée négativement et à la membrane par une interaction électrostatique, une condition préalable à l'activité antimicrobienne de ces peptides. Le récepteur de la protéase SepA de *S. epidermidis* comporte une boucle extracellulaire courte avec une forte densité de résidus d'acides aminés chargés négativement qui interagissent avec les AMP cationiques. La transduction de ce signal via ApsS et l'accessoire essentiel ApsX, qui a une fonction encore inconnue, déclenche l'expression de mécanismes de résistance AMP clés. La D-alanylation des acides teichoïques, codée par les produits de l'opéron *dlt*, et la lysylation du phosphatidylglycérol, catalysée par l'enzyme MprF, entraînent une diminution de la charge négative de la surface cellulaire et de la membrane, ce qui conduit à une diminution de l'attraction ou à la répulsion des AMPs cationiques. Le transporteur ABC VraFG favorise également la résistance aux AMPs et fonctionne probablement en tant qu'exportateur AMP. SepA favorise également, la résistance de *S. epidermidis* à la destruction par les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) (Cheung et al., 2010).

**La protéase extracellulaire ECP** (cell wall-associated cysteine protease) à une activité élastase capable de dégrader les protéines humaines telles que : l'élastine, le collagène, le fibrinogène

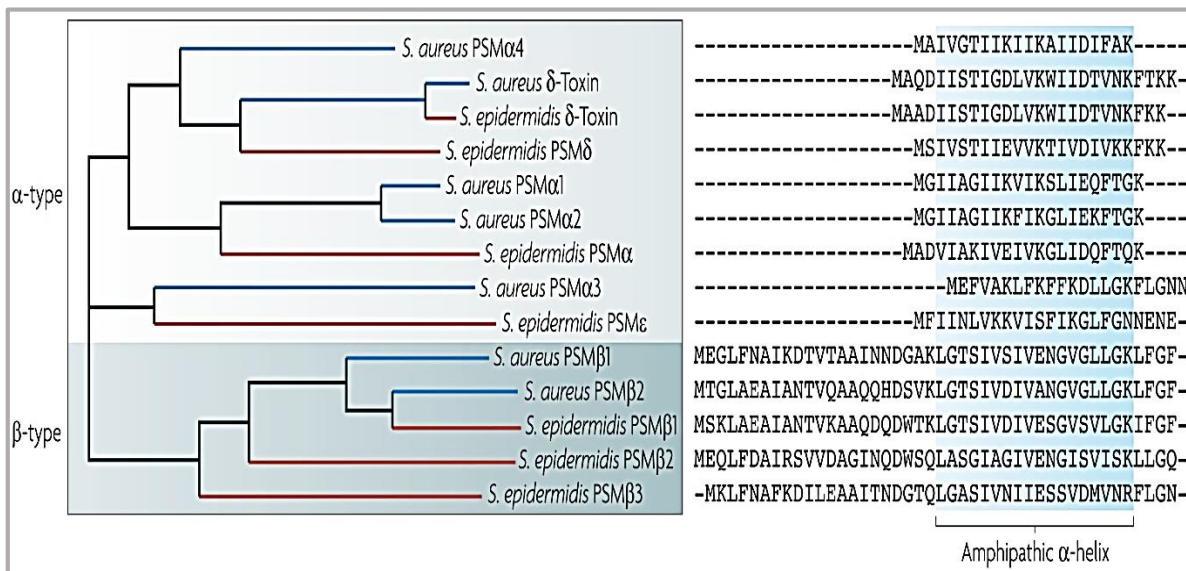
et la fibronectine. Il est considéré comme un facteur de virulence qui contribue à la colonisation et l'infection des tissus humains (von Eiff et al., 1999).

Deux gènes homologues codant la lipase sont décrits chez *S. epidermidis*. Il s'agit de: **gehC** et **gehSE1**. Récemment, un deuxième gène de lipase, *gehD*, de la souche *S. epidermidis* 9 a été caractérisée (Longshaw et al., 2000). Ces lipases seraient impliquées dans la colonisation de la peau (Simons et al., 1998).

### 1.5.2. Toxines cytolytiques

Les SCN ont en général, un potentiel cytolytique inférieur à *S. aureus*. Néanmoins, *S. epidermidis* produit des toxines cytolytiques telles que :

**Les PSMs** (Phenol-soluble modulins) de type alpha, beta et deta qui sont proches des PSMs de *S. aureus* (Figure 1.5) par leur capacité marquée à lyser les neutrophiles humains en formant des pores dans la membrane cellulaire, conduisant à la lyse des globules rouges et d'autres cellules des mammifères (McKevitt A., 1990). Les PSM sont également des chimioattracteurs pour les neutrophiles et les monocytes et induisent la libération de cytokines. Ils stimulent également la production de NF-KB dans les cellules de lignage des macrophages (Mehlin et al, 1999) (Figure 1.6). En raison de ces propriétés pro-inflammatoires prononcées, les toxines peuvent contribuer à la septicémie causée par les SCN.



**FIGURE 1.5 : L'ALIGNEMENT SEQUENTIEL DES PSM DE *S. EPIDERMIDIS* ET *S. AUREUS* (OTTO, 2009).**

Tous les PSM contiennent une  $\alpha$ -hélice amphipathique et une méthionine N-formyl en N-terminal. Les PSM du type  $\alpha$  sont relativement courts,  $\sim 20$  à  $25$  acides aminés. En particulier, les peptides PSM $\alpha$  1 à 4 de *S. aureus* sont fortement cytolytiques. Les PSM du type  $\beta$  sont plus longs avec  $45$  acides aminés,

et n'ont pas d'activité cytotolytique considérable. Seul les PSM de type  $\alpha$  avec une activité cytotolytique modérée, et les PSM de type  $\beta$  sont secrétées en grandes quantités par *S. epidermidis* (Otto, 2009).

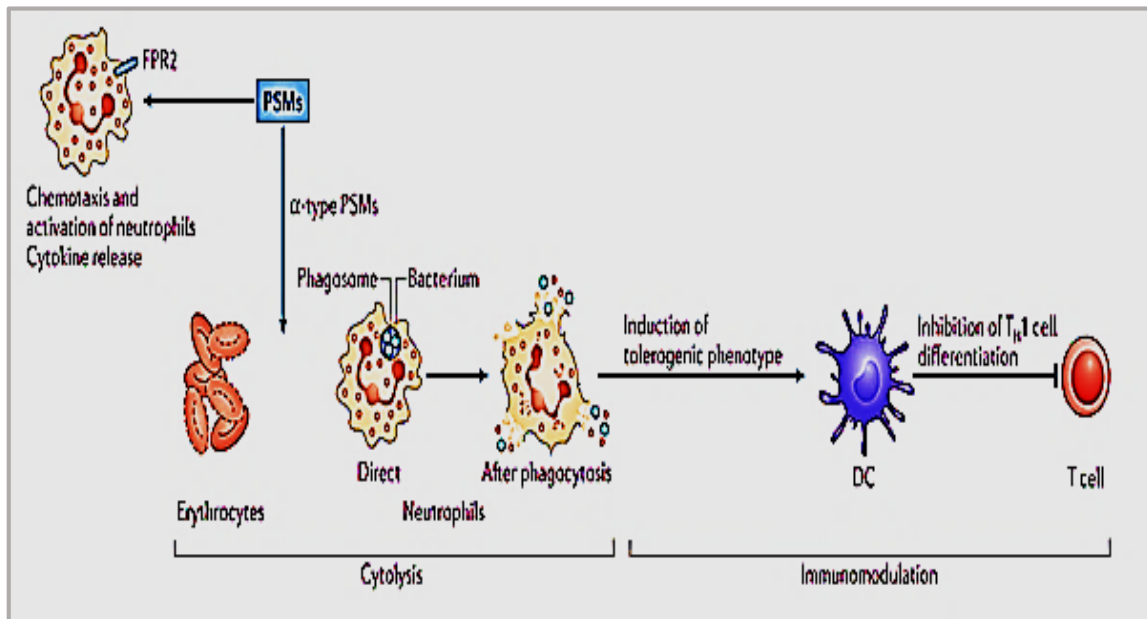


FIGURE 1.6 : ACTIVITE CYTOLYTIQUE DU PSM DE TYPE A DE *S. EPIDERMIDIS* (MEHLIN ET AL, 1999).

La delta like-toxin est impliquée dans l'entérocolite nécrosante des nouveau-nés (Scheifele et al., 1987). Elle diffère de la delta toxine de *S. aureus* par seulement trois acides aminés et est codée par le gène *hld* qui est le composant du système de régulation agr (McKevitt., 1990). Ainsi, *S. epidermidis* a le potentiel de produire des cytotoxines, cependant, la production de fortes doses de PSMs cytotolytiques est rare, expliquant pourquoi les surnageants de culture de *S. epidermidis* ont peu de capacité à lyser les PMN (Cheung et al., 2010).

### 1.5.3. Superantigènes

Chez *S. aureus*, les superantigènes (SAGs) sont des toxines de nature protéique d'une masse moléculaire d'environ 22-29 KDa, résistantes à la protéase et à la dénaturation par la chaleur, regroupant les entérotoxines staphylococciques (SE) et la toxine du choc toxique (« Toxic chock syndrome toxin-1 » ou TSST-1) (Papageorgiou et al., 2008). Ils ont été initialement décrits chez *S. aureus* et présentent au moins trois propriétés biologiques : la pyrogénicité, la capacité d'accentuer l'endotoxicité chez le rat et la superantigénicité. Ces toxines dévient la réponse du système immunitaire de l'hôte de la réponse spécifique contre une infection et conduisent à un syndrome de choc toxique ou à des intoxications alimentaires.

La capacité des SCN à produire des SAGs, a été un sujet de débat depuis qu'un cas de TSS provoqué par une souche de SCN isolé de l'appareil génital d'une femme a été rapporté en 1986 (Kahler et al., 1986). Cependant, ces isolats et d'autres SCN présumés TSST-1 -positifs ont été plus tard révélés comme non producteurs de TSST-1 (Kreiswirth et al., 1987). Plus tard, lors de l'application de la technologie de la PCR, des isolats cliniques de SCN présumés positifs pour la production de SAGs, sont présentés comme non porteurs des gènes codant pour les SAGs classique (*sea - see* et *tst*) (Becker et al., 2001). Ainsi, jusqu'à présent, les données raisonnables font défaut pour confirmer la sécrétion de quantité détectable des SAGs classiques par des souches de SCN provenant d'échantillons humains, ou leur implication dans des cas cliniques de TSS ou d'intoxications alimentaires (Spaulding et al., 2013). Cependant, un isolat de *S. epidermidis* d'origine humaine a été récemment décrit pour abriter un îlot de pathogénicité (SEPI) contenant des gènes codant pour la variante SEC3 de SEC et la toxine SE-like L (SE/L) (Madhusoodanan et al., 2011). Certains rapports sur la production de SAGs des SCN ont été publiés pour des isolats provenant de spécimens d'animaux ou de denrées alimentaires (Park et al., 2011). En général, les réactivités croisées de dosages immunologiques et d'éventuels mépris à l'époque pré-moléculaire peut entraver une évaluation précise des résultats des études respectives. Bien que plusieurs auteurs s'interrogent encore sur le potentiel toxigénique des SCN, la présence des gènes codant des entérotoxines SEA, SEB, SEC et TSST-1 est démontrée chez certaines souches cliniques et alimentaires comme : *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. haemolyticus* et *S. schleiferi*. (Da-Cunha et al., 2006, Madhusoodanan et al., 2011). Dans la deuxième partie de la généralité, nous aborderons plus en détails, les propriétés des entérotoxines.

## 1.6. REGULATION DES PROCESSUS PATHOGENIQUES CHEZ LES SCN

Les connaissances relatives à la régulation des facteurs de virulence des SCN ont considérablement augmenté ces dernières années. Deux systèmes de Quorum sensing (QS) ont été signalés : le régulateur de gène accessoire (*agr*) (Novick et al., 2003; Dufour et al., 2002) et le système *luxS/AI-2* (Xu et al., 2006). Un autre régulateur des facteurs de pathogénicité de *S. epidermidis* est le « staphylococcal accessory regulator (*sar*) locus ». L'expression de l'*agr* et de *sar* est influencée par le facteur de transcription alternatif B, qui est le régulateur global des réponses au stress dans un grand nombre d'espèces de bactéries.

### 1.6.1. Le « Quorum sensing » (QS)

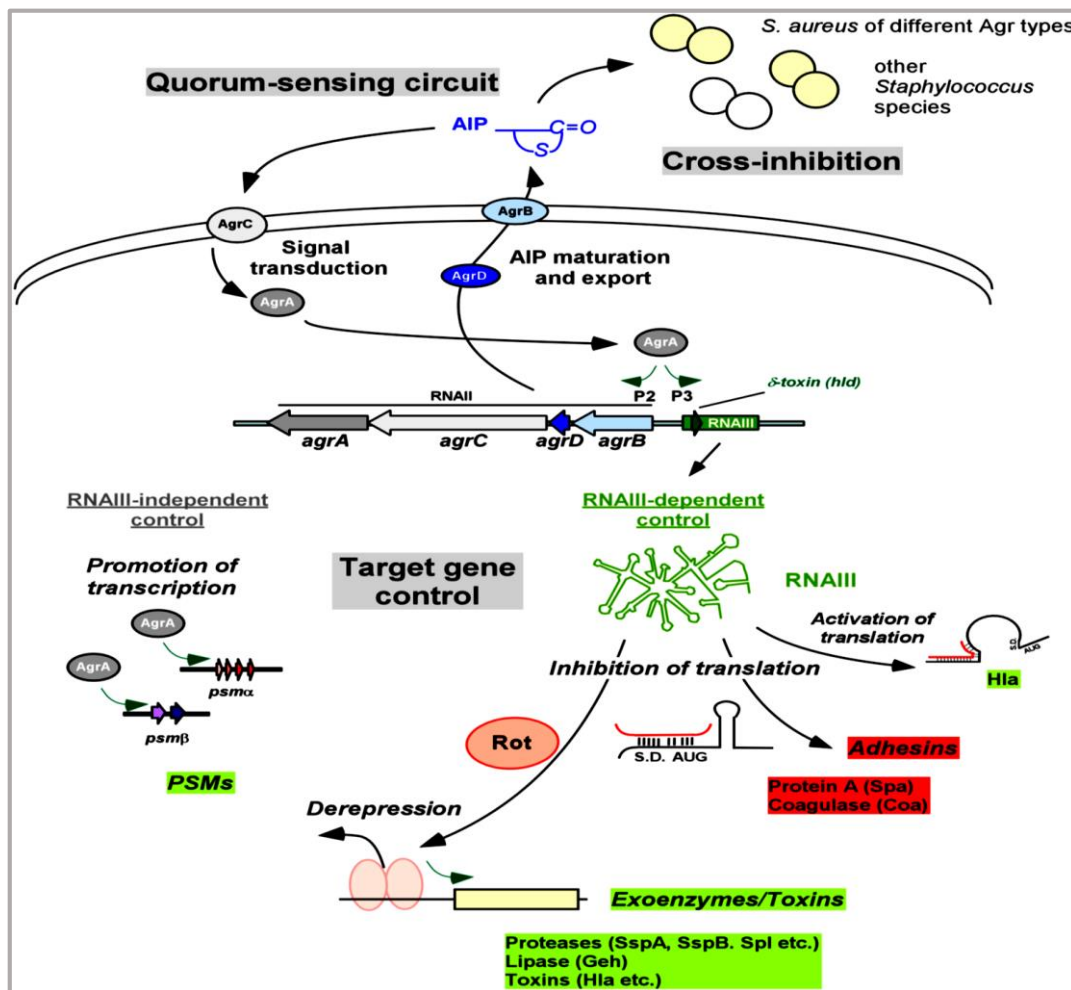
Les systèmes Quorum sensing sont des systèmes de communication entre les différentes cellules bactériennes qui font intervenir la production, la détection et la réponse à des auto-inducteurs, qui sont de petits peptides de phéromone ou des peptides d'auto-induction (PAIs) de signalisations extracellulaires sécrétés par les bactéries. Son principe repose sur la sécrétion d'un peptide auto-inducteur (PAI) dans le milieu externe qui, en s'accumulant pour atteindre une concentration seuil, va permettre l'expression de certains gènes de manière simultanée chez toute la population de bactéries. Le Quorum Sensing contrôle par exemple l'expression du biofilm staphylococcique. En effet à faible densité cellulaire la concentration des PRAs est faible. Avec l'augmentation de la densité cellulaire, la concentration des PAIs devient élevée. Le QS est induit par l'activation d'un régulateur transcriptionnel quand un certain seuil de concentration de PAI est atteint, qui généralement se produit dans la phase de croissance exponentielle tardive. Le régulateur transcriptionnel régule ensuite l'expression des gènes cibles, qui peuvent être réprimés ou stimulés.

#### 1.6.1.1. Le système Agr

Le facteur de régulation Agr du système QS staphylococcique se compose des transcrits ARNII (opéron *agrBDCA*) et ARNIII (régulation des gènes de virulence) (Otto, 2015) (Figure 1.7). L'opéron *agrBDCA* code quatre protéines : AgrB, AgrD, AgrC et AgrA (Kornblum et al., 1990). L'AgD code le peptide précurseur du signal quorum extracellulaire de l'Agr qui va être maturé par l'endopeptidase membranaire. L'AgrB est responsable de l'ajout d'une thiolactone, du clivage de la région C-terminale et de l'export vers le milieu extérieur. Le PAI va s'accumuler dans le milieu extérieur de la bactérie jusqu'à atteindre une concentration seuil. Ainsi, il va se fixer sur AgrC, une histidine kinase membranaire, ce qui va entraîner une cascade de phosphorylations, résultant en l'activation de l'AgrA. Enfin, la protéine AgrA se lie aux promoteurs d'ARNII et ARNIII pour induire leur transcription.

L'ARNIII régule la transcription des gènes de virulence, elle stimule l'expression des déterminants de la pathogénicité extracellulaires, telles que des enzymes, des toxines et les PSMs, et de plus régule l'expression des cell wall-anchored (CWA) protiens (Novick et al., 2003) ce qui facilite le maintien de l'infection. Des *agr* homologues ont également été identifiés dans d'autres SCN et SCP, tels que *S. intermedius*, *S. warneri* et *S. lugdunensis* (Novick et al., 2003, Otto et al., 1999). La similitude entre les systèmes *agr* de *S. aureus* et *S. epidermidis* est

considérable. Néanmoins, les séquences de *S. aureus*, *S. epidermidis*, et les AIPs de *S. lugdunensis* ne sont pas très semblables et diffèrent en longueur.



**FIGURE 1.7 : CONTROLE AGR CHEZ LES STAPHYLOCOQUES.**

Le signal PIP est produit à partir du précurseur AgrD par maturation et exportation d'AgrB. A une certaine concentration seuil, le PAI active le système à deux composants AgrC-AgrA et AgrA phosphorylé active la transcription à partir du promoteur P2 entraînant une régulation auto-réactive. Les RNAIII contrôlent les gènes cibles par appariement de bases avec les extrémités 5'UTRs en inhibant la traduction. Ils sont utilisés pour l'inhibition directe des gènes cibles inhibés par l'Agr. L'AgrA augmente aussi la transcription des opérons de PSM $\alpha$  et PSM $\beta$  codant les peptides PSM, dans un mode de régulation Agr indépendant de l'RNAIII (Novick et al., 2003).

### 1.6.1.2. Le système *luxS/AI-2*

Plusieurs bactéries Gram positif portent le système QS *luxS/AI-2*. Chez *S. epidermidis* comme *S. aureus*, *luxS* code la synthèse du dérivé appelé auto-inducteur 2 (AI-2) (Xu et al., 2006). L'AI-2 est synthétisé principalement dans la phase de croissance exponentielle. La mutation du gène *luxS* de *S. epidermidis* donne lieu à un phénotype similaire à celui observé avec la mutation d'*agr*. Le *luxS* mutant donne un biofilm plus épais que son homologue parental. Le



système *luxS* de *S. epidermidis* régule négativement la production de biofilm par la répression de l'opéron *icaADBC*. Par conséquent, le mutant *luxS* révèle une augmentation de synthèse du Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA)/poly-*N*-acetylglucosamine (PNAG) par rapport à sa souche parentale et une capacité prononcée à coloniser et à initier une infection (Xu et al., 2006). *luxS* commande également l'expression des facteurs liés à la pathogénicité, tels que PSMs et lipase, ce qui suggère que l'augmentation de la production de biofilm dans les mutants *luxS* peut être due, au moins partiellement, à la faible synthèse de PSMs et, par conséquent, une vitesse de détachement de biofilm diminuée. Le système QS *luxS* a un effet prononcé sur la production de biofilm et la virulence de *S. epidermidis*, mais pas chez *S. aureus* (Doherty et al., 2006). Par conséquent, au moins dans le cas de *S. epidermidis*, les systèmes QS connus (*agr* et *luxS*) répriment la formation de biofilm.

### 1.7. SIGNIFICATION CLINIQUE ET INFECTIONS ASSOCIEES

L'utilisation accrue de dispositif médical implanté en milieu hospitalier, a conduit à l'augmentation de la grande variété d'infection causée par les SCN. Cela a été confirmé par une multitude d'études cliniques dans certaines unités de soins et groupes de patients. Cependant, la plupart des études portent sur les SCN dans leur ensemble, et ne font pas la distinction entre les différentes espèces. Ainsi, l'impact réel des espèces moins fréquentes pourrait être sous-estimé. En outre, en raison de la difficulté dans la différenciation des SCN à l'époque pré-moléculaire/spectrométrie de masse, les données liées aux espèces sont interprétées avec prudence, notamment si les espèces moins fréquemment rencontrées sont impliquées. En dépit de tous les commensaux qui colonisent l'hôte ou la surface naturelle des aliments, la capacité de divers staphylocoques à provoquer une infection est différente. Outre *S. aureus* qui est hautement pathogène, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. capitis* et *S. saprophyticus* sont des exemples de staphylocoques pathogènes. Les staphylocoques relativement non pathogènes sont représentés par les espèces saprophytes associées aux aliments et celles d'origine animale (von Eiff et al., 2006). Les caractéristiques spécifiques des souches et les capacités spécifiques de l'hôte d'une espèce donnée de staphylocoque doivent également être prises en considération. Ainsi, les espèces encore moins virulentes peuvent provoquer des infections, en particulier si les cofacteurs (corps étrangers et/ou immunosuppresseurs) qui favorisent son développement sont présents. En général, *S. epidermidis* est l'espèce la plus fréquente dans les infections à SCN suivi de *S. hominis*, *S.*



*haemolyticus* et *S. capitis* (Shin et al., 2011). En revanche, dans une étude globale réalisée sur l'endocardite, *S. lugdunensis* a été rapporté comme le deuxième pathogène le plus fréquent (Petti et al., 2008). La pathologie clinique la plus importante associée aux SCNs est l'infection liée au corps-étrangers. Ces souches sont le plus souvent isolées de la circulation sanguine et produisent dans des circonstances données des facteurs pouvant influencer leur pouvoir pathogène.

## 1.8. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Les staphylocoques sont capables de coloniser rapidement l'organisme humain et de s'adapter à son système immunitaire. L'avènement des médicaments antibiotiques a permis de traiter des maladies staphylococciques pouvant devenir mortelles. Mais très tôt, les staphylocoques ont développé des mécanismes de résistance pour contourner ces substances. Ainsi, l'un des problèmes dans le traitement des infections à SCN est leur résistance à de nombreux antibiotiques. En particulier, la résistance à la méticilline.

### 1.8.1. Résistance à la méticilline

La méticilline est un dérivé de la pénicilline de la classe des  $\beta$  lactamines. Son utilisation massive a rapidement causé l'apparition de souches de SCN résistantes à la méticilline (SCNRM). Cette résistance est induite par l'expression d'une nouvelle « penicillin binding protein » appelée PBP2 par ces souches. PBP2 est une protéine de remplacement à la protéine de liaison à la pénicilline qui possède une affinité réduite à la méticilline et à toutes les autres  $\beta$ -lactamines, conduisant à une résistance à tous les antibiotiques de cette classe (Zapun et al., 2008). PBP2 est codée par le gène *mecA*, porté par un élément génétique mobile appelé cassette chromosomique staphylococcique *mec* (SCC*mec*). Les éléments SCC*mec* sont classés en fonction de la différence de leur complexe de gènes *mec*, du gène recombinaison (*ccr*) et d'autres composantes génétiques. Certains types de SCC*mec* contiennent également des gènes de résistance aux métaux lourds et à d'autres antibiotiques pouvant expliquer le caractère souvent multi-résistant des souches nosocomiales de SCNMR, comme SCC*mec* type II ou III (Ito et al., 2009).

Bien que l'origine des éléments SCC*mec* soit inconnue, plusieurs sources de données indiquent qu'ils proviennent des SCN. Le schéma évolutif proposé est ce qui suit: le gène *mecA* semble avoir un ancêtre commun aux staphylocoques. Cet ancêtre était à l'origine supposé être *S.*

*sciuri* (Wu et al., 1996), alors que des résultats plus récents indiquent que c'est plutôt *S. fleuretti* (Tsubakishita et al., 2010). Les gènes *mec* et les complexes *ccr* ont probablement été assemblés chez les SCN, mais les sources ne sont pas connues. Quelques modifications ont eu lieu au sein des SCN, par exemple, la déletion du complexe *mec*, sur lesquels les éléments SCCmec ont été transférés vers *S. aureus*. L'évidence d'un transfert d'éléments SCCmec spécifiquement de *S. epidermidis* vers *S. aureus* est très plausible pour plusieurs raisons :

- Le degré d'homologie entre les séquences d'ADN des éléments SCCmec de *S. aureus* et *S. epidermidis* est très élevé (Barbier et al., 2010). Par exemple, le gène SCCmec de type IV de *S. epidermidis* présente 98 à 99% d'homologie avec SCCmec IV de *S. aureus*, alors que l'ensemble des similitudes des séquences génomiques des deux espèces est beaucoup plus faible (Wisplinghoff et al., 2004). De plus, ce gène a également été beaucoup plus tôt identifié chez *S. epidermidis*, dans les années 1970, que chez *S. aureus* (Wisplinghoff et al., 2004).
- L'élément génétique mobile IS1272 (autre élément variant de SCCmec) se retrouve plus souvent dans *S. epidermidis* et *S. haemolyticus* que dans *S. aureus* (Archer et al., 1996). Enfin, la résistance à la méthicilline est beaucoup plus fréquente chez *S. epidermidis* que chez *S. aureus* (Schmitz et al., 1999). Toutes ces observations indiquent que les éléments SCCmec ont été transférés de *S. epidermidis* à *S. aureus*, bien que certaines parties puissent provenir d'autres SCN avant leur transfert à *S. epidermidis*.

À ce jour, 11 types et plusieurs sous-types d'éléments SCCmec ont été rapportés. Chez les SCN, les SCCmec de types III, IV et V, seuls ou en diverses combinaisons, sont les plus répandus (Zong et al., 2011; Miragaia et al., 2005) (Tableau 1.3.). Une population très diversifiée d'éléments SCCmec a été découverte pour les SCN-MR en particulier, et l'on peut supposer que la liste de types et de sous-types de SCCmec sera davantage élargie dans ce groupe.

L'inquiétude aujourd'hui réside dans le fait qu'à la suite de pressions de sélection énormes, les SCN isolés des échantillons cliniques sont nettement plus résistants aux antibiotiques et biocides simples, apparaissant souvent comme des souches multirésistantes et les isolats de *S. epidermidis* et de *S. haemolyticus* sensibles à la méthicilline se font très rares (<10%) parmi les souches isolées des patients hospitalisés (Kresken et al., 2011). Il a été estimé que plus de

75% des souches issues de milieux hospitaliers à travers le monde sont résistantes à la méticilline (Diekema, et al., 2001 ; Stefani et Varaldo, 2003).

### 1.8.2. Autres résistances

En plus de la résistance contre la méticilline largement utilisée, il existe des souches qui sont résistantes à d'autres groupes de produits antimicrobiens, tels que les macrolides, les aminoglycosides et les tétracyclines. Il y a également des souches multirésistantes, et de nouvelles mutations peuvent conduire à la naissance de nouvelles résistances et des combinaisons de multirésistance (Carbon 2000, Fey et al., 2009, Otto, 2012). Les SCN ont développé également une résistance intermédiaire à la vancomycine (antibiotique bactéricide de la classe des glycopeptides) codée par le gène **vanA**, un phénomène qui est particulièrement problématique parce que la vancomycine est l'agent antimicrobien le plus utilisé pour lutter contre les infections sévères provoquées par des bactéries à Gram (+) (Jones 2006, Fey et al. 2009). Une augmentation parfois dramatique des pourcentages de résistance des isolats est notée en particulier pour la pénicilline, l'oxacilline, la ciprofloxacine, la clindamycine, l'érythromycine et la gentamicine (Kresken et al., 1999, Lyytikäinen et al., 1996). Des études récentes montrent des pourcentages de résistance des SCN (tableau 1.4). Bien que la résistance aux antibiotiques soit très répandue dans les isolats nosocomiaux, elle est beaucoup moins fréquente dans les souches communautaires (Witte et al., 2008, Fey et al., 2009).

En outre, la formation de biofilm en soi est un mécanisme non spécifique de résistance aux antibiotiques (Otto, 2012). Par exemple, la matrice du biofilm représente une barrière physique et chimique contre la pénétration des antibiotiques (Stewart, 2002). Ainsi, des données démontrent que les cellules bactériennes planctoniques pourraient être sensibles à un certain traitement, pendant que celles en biofilm ne pourraient pas être traitées par le même composé (Van Mellaert et al., 2012, Chua et al., 2014), ce qui constitue un autre obstacle dans la lutte contre les infections à staphylocoques. Le challenge de l'antibiothérapie et l'augmentation de la virulence de certaines souches pourraient accroître la morbidité et la mortalité liées aux infections aux SCN multirésistants ou non. De nouveaux anti-staphylococciques comme le Linézolide (famille des oxazolidinones) et la Daptomycine (famille des lipopeptides cycliques) ont été mis sur le marché ces dernières années mais sont cependant très onéreux pour les populations à faibles revenus.

**TABLEAU 1.3: REPARTITION DES ELEMENTS SCC<sub>MEC</sub> DANS UNE SELECTION D'ESPECES DE SCN D'ORIGINE HUMAINE.**

Espèces de SCN	Types et sous-types d'SCC <sub>mec</sub>	Références
<i>S. capitis</i>	I, IA, II, III, IV, IVa, V, ND	Al-Bakri et al., 2013
<i>S. cohnii</i>	NT	
<i>S. chromogenes</i>	IV	Al-Bakri et al., 2013
<i>S. epidermidis</i>	I, IIa, IIb, III, III (variant), IV, IVa, IVb, IVc, IVd, IVe, IVg, V, VI, ND	Jamaluddin et al., 2008, Ruppé et al., 2009; Mombach et al., 2007, Garza-González et al., 2010
<i>S. haemolyticus</i>	I, II, II.1, III, III (variant), IV, V, ND	Mombach et al., 2007, Ruppé et al., 2009
<i>S. hominis</i>	I, III, IV, ND	Mombach et al., 2007, Al-Bakri et al., 2013, Garza-González et al., 2010
<i>S. saprophyticus</i>	III, NT	Söderquist et al., 2009, Higashide et al., 2008
<i>S. sciuri</i>	I, III, IIIA, V, VII, NT	Harrison et al., 2014, Mombach et al., 2007
<i>S. xylosus</i>	III, XI	Harrison et al., 2013

ND, types non dénommés et / ou nouveaux types non désignés.

TABLEAU 1.4 POURCENTAGE DE RÉSISTANCE AUX ANTI-BIOTIQUES DES SOUCHEs CLINIQUES DE *S. SCN*.

Auteurs	Hellmark 2009	Mendes 2010	Mendes 2011	Kresken 2011	Mendes 2012	Gordon 2012	Barros 2012	Flamm 2013	Zhanel 2013
<b>Souche</b>	<i>S. epidermidis</i>	SCN-SM SCN-RM	SCN-RM	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hemolyticus</i>	SCN-MS SCN-MR	SCN-SE SCN-RM
<b>Paramètres</b>									
<b>Pays</b>	Sweden	Europe	Europe	Allemagne	Allemagne	Etats-Unis	Brésil	Etats-Unis	Canada
<b>Sources</b>	IP	Diverse	Diverse	Diverse	Sang	Diverse	sang	Diverse	Diverse
<b>% de résistance</b>									
<b>Penicilline</b>	NF	NF	91.1/88/94	95.9/93.9/93.1	NF	98.0	95.3	ND	NF
<b>Oxacilline</b>	84	0.0	82.7/83.1/85.5	90.4/90.9/89.2	73.2	79.0	87.5	0.0	100.0
<b>Gentamicine</b>	79	5.5	65.5/56.3/60.8	80.8/84.8/87.3	40.8	46.0	73.4	3.6	24.6
<b>Erythromycine</b>	67	35.7	72.3	NF	69.0	86.0	64.1	39.9	68.3
<b>Clindamycine</b>	67	5.5	37.3	NF	40.9	74	46.9	13.0	34.6
<b>Ciprofloxacine</b>	79		NF	NF	ND	70.4	71.9	23	61.1
<b>Levofloxacine</b>	ND	8.6	67.9	NF	NF	77.0	NF	21.9	59.6
<b>SXT</b>	82	9.1	48.6	NF	47.9	73.0	53.1	20.1	44.7
<b>Acide fusidique</b>	39	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
<b>Linezolid</b>	0	0.2	0.4	0.0/0.0/0.0	18.3	2.0	NF	0.4	1.7
<b>Vancomycine</b>	0	0.0	0.0	0.0/0.0/0.0	0.0	NF	NF	0.0	0.0
<b>Teicoplanine</b>	NF	3.3	12.5	NF	NF	NF	NF	0.0	NF

NF, Non fait/D, quinoprisme-dalfoprisme, SXT, Trimethoprime-sulfamethoxazole, E, *S. epidermidis*; M, insensibilité à métiliciline, RM, métiliciline, P, infection sur prothèses, *S*, table adapté de Becker et al., (2014).

## 2. MOBILITE DES SUPPORTS GENETIQUES DES FACTEURS DE VIRULENCE : EMERGENCE DE NOUVELLES SOUCHES DE STAPHYLOCOQUE A COGULASE NEGATIVE PATHOGENES ?

Les données de la génomique soulignent la présence de certains gènes de virulence originellement retrouvés chez *S. aureus* dans le génome des SCN. La comparaison des séquences du gène *bap* codant une protéine de surface impliquée dans la formation de biofilm, par différentes espèces de SCN comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus simulans* et *Staphylococcus hyicus* a révélé une très grande similitude de séquence. D'autre part, une analyse comparative interspécifique du génome de *S. xylosus* DMB3-Bh1 et du génome de *S. aureus* RF122 a révélé que 42 gènes sont présents au niveau des deux souches dont 41 codent des facteurs de virulence ou de défense et 1 gène pour un prophage (Kaur et al., 2014). De plus, une étude récente a comparé les génomes des souches de *S. hyicus* productrices et non productrices de l'épidermolysine impliquée dans l'épidermolyse exudative chez le porc et a trouvé que toutes les souches toxigéniques portaient au moins un gène codant l'une des 4 toxines exfoliatives ExhA, ExhB, ExhC ou ExhD produites par *S. aureus*. Toutes ces séquences de gène de virulence sont souvent portées par des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides, des transposons, des séquences d'insertion, ou des prophages chez *S. aureus*.

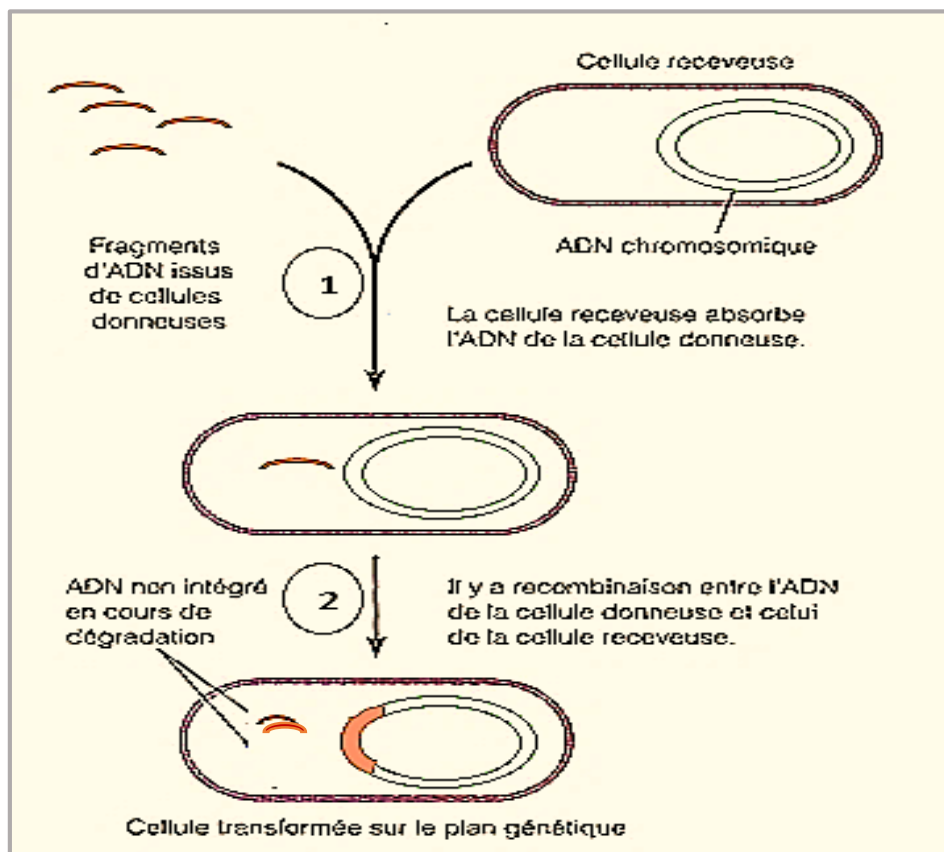
Ainsi, les souches de SCN pourraient avoir acquis des gènes de virulence par transfert horizontal de matériel génétique et l'émergence des isolats de SCN pathogènes résulterait de l'acquisition par une souche de SCN ancestrale commensale non pathogène de séquence codant les facteurs virulence originellement produits par de *S. aureus*.

### 2.1. TRANSFERT HORIZONTAL

Le transfert horizontal de gènes est un processus dans lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant. Chez les bactéries, le transfert horizontal joue un rôle majeur dans leur diversification. Ce processus est considéré comme un des facteurs principaux de l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques ainsi que la propagation des gènes de virulence chez les staphylocoques (Novick, 2003). Il existe trois mécanismes principaux pour expliquer les transferts horizontaux entre bactérie : la transformation, la conjugaison et la transduction.

### 2.1.1. Transformation

Elle consiste à l'intégration d'un fragment d'ADN étranger libre dans le milieu extérieur, résultant généralement de la mort d'un microorganisme dans une autre cellule. Cet ADN ingéré, intègre le génome de la cellule receveuse qui peut être tout à fait différente de la donneuse (Figure 1.8). Ceci peut entraîner un transfert de gène(s) de virulence et une transformation héréditaire du phénotype de l'organisme receveur si le système de restriction-modification n'a pas éliminé cet élément.



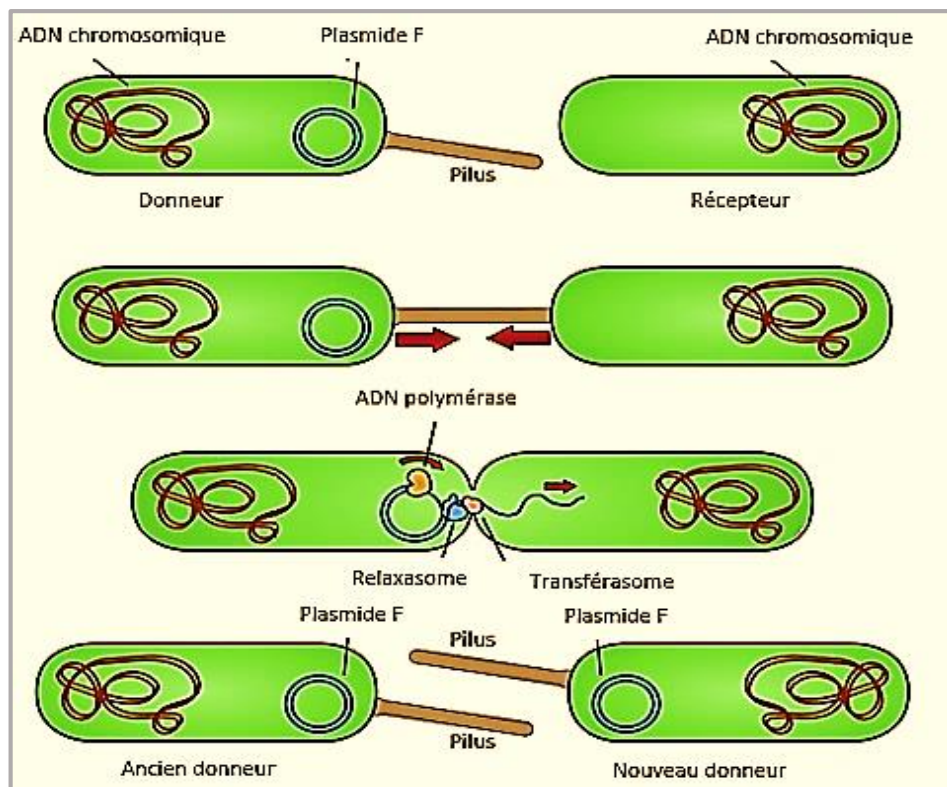
**FIGURE 1.8. MECANISME DE LA TRANSFORMATION BACTERIENNE.**

Figure adaptée de: <http://pages.infinit.net/p1nchtr3/mecanismes.htm>. La transformation a lieu lorsque l'ADN, libéré lors de la lyse d'une bactérie, est repris par une autre bactérie (1). Un gène de résistance aux antibiotiques ou de virulence peut alors être intégré dans le génome de la bactérie receveuse (2).

### 2.1.2. Conjugaison

C'est un mécanisme au cours duquel deux bactéries entrent en contact et s'échangent toute une partie de leur matériel génétique, en particulier des plasmides (Figure 1.9). En effet, pendant la conjugaison, le transfert de gène du donneur au receveur n'est possible qu'après

la formation de paires ou couples de bactéries donatrice-réceptrice. Ce mode de transfert est basé sur l'expression par un plasmide de gènes codant des protéines membranaires (facteur F) qui vont reconnaître la cellule receveuse. Il se forme un pont cytoplasmique (port congugatif) entre les deux bactéries par l'intermédiaire du pilus de la cellule donneuse permettant les échanges d'information génétique. Un processus de réplication asymétrique restaure le brin monocaténaire non transféré du donneur au niveau d'un site réplicateur spécifique proche du pont cytoplasmique ou du pilus. Le processus ultérieur de recombinaison entre certaines régions du brin monocaténaire exogène du plasmide et celles de l'ADN receveur est mal connu. Ce mécanisme est particulièrement important entre les souches de *S. aureus*, mais le phénomène de conjugaison peut également avoir lieu entre des souches de différentes espèces (Ubeda et al., 2008).



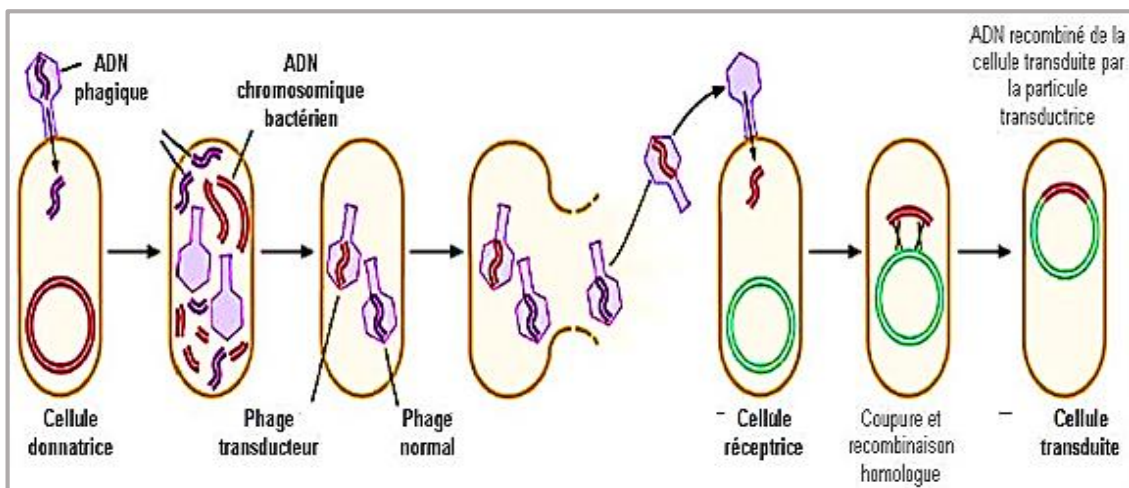
**FIGURE 1.9 : RESUME DU MECANISME DE LA CONJUGAISON.**

<http://www.jpboiseret.eu/biologie/index.php/microbiologie/80-transformation-conjugaison-et-transduction>. La conjugaison nécessite le contact entre 2 bactéries : l'échange de l'ADN est effectué par l'intermédiaire d'un plasmide. Le transfert d'un monobrin du plasmide F vers la cellule réceptrice est fait par l'intermédiaire d'un port congugatif suivi de la réplication chez le donneur et l'accepteur.



### 2.1.3. Transduction

La transduction est le transfert d'ADN bactérien d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un bactériophage à ADN bicaténaire dont le rôle est passif. Les bactériophages sont des virus qui se servent de bactéries pour se reproduire, ils existent sous la forme virulente ou tempérée. En effet, lors de la phase d'encapsidation, le phage incorpore de l'ADN bactérien fragmenté. Les bactériophages virulents sont répliqués par la bactérie et la lysent à la fin du cycle, libérant les nouvelles particules virales (virions). Ce cycle est appelé cycle lytique. Les bactériophages tempérés quant à eux, après infection établissent une association stable avec la bactérie infectée en s'intégrant dans leur chromosome. Le bactériophage est alors appelé prophage et la bactérie qui en est porteuse, une bactérie lysogène. L'ADN viral est alors répliqué en même temps que le chromosome bactérien et il est transmis aux cellules filles de façon héréditaire. De temps en temps, dans une population de bactéries lysogènes, un prophage se libère du chromosome bactérien sous l'effet d'un stimulus, redevient virulent, se multiplie, provoque la lyse de la bactérie et peut infecter de nouvelles bactéries. Ce passage de la forme tempérée à la forme virulente peut être spontané ou provoqué (irradiation, UV...). Si, au cours de sa libération, le prophage emporte avec lui plusieurs gènes bactériens, il peut y avoir transfert par le bactériophage, de gènes bactériens d'une bactérie lysogène à une autre bactérie. C'est la transduction (Figure 1.10). Elle est l'un des mécanismes les plus utilisés par les staphylocoques pour le transfert horizontal de gènes accessoires (Tallent et al., 2007).



**FIGURE 1.10 : SCHEMA EXPLICATIF DU MECANISME DE LA TRANSDUCTION.**

<http://www.jpboseret.eu/biologie/index.php/microbiologie/80-transformation-conjugaison-et-transduction>. Dans la transduction, les gènes d'une bactérie sont transmis à d'autre bactérie par l'intermédiaire d'un bactériophage, et s'intègrent dans le génome de la bactérie receveuse.

## 2.2. ELEMENTS GENETIQUES MOBILES

Ce sont des fragments d'ADN qui sont insérés dans le génome d'un organisme hôte et qui ont la propriété remarquable de se déplacer d'un point à un autre du génome, on dit « de transposer », à l'intérieur une même bactérie ou d'une bactérie à une autre. On peut les classer en deux grands groupes : les transposons d'une part les phages, les plasmides et les îlots de pathogénicité d'autre part. Les transposons ne peuvent quitter leur cellule hôte et ne peuvent se transmettre que par division (mitose, méiose) ou fusion (fécondation) de celle-ci ou après la mort de la bactérie. En ceci, ils diffèrent des éléments du second groupe qui sont capables de s'insérer dans l'ADN de l'hôte mais aussi capables de passer d'une cellule à l'autre ou d'un organisme vivant à l'autre. Toutes ces unités de transferts de l'information génétique sont impliquées dans l'évolution du génome des souches et constituent une grande partie du génome accessoire contrairement au corps du génome qui est quant à elle bien conservée d'une souche à l'autre ou au sein des souches d'une même espèce. Nous nous intéressons ici aux phages, plasmides et îlots de pathogénicité.

### 2.2.1. Îlots de pathogénicité

Les îlots de pathogénicité (IP) sont des fragments linéaires d'ADN double-brin d'une taille variant entre 10 et 200 kilobases qui sont intégrés dans le chromosome bactérien ou, plus rarement, sur un plasmide de grande taille. Ils présentent un pourcentage de G+C différent du reste du chromosome et sont situés à proximité de *loci* codant pour des ARNt au niveau de séquences d'insertion. Ces îlots de pathogénicité sont porteurs de gènes qui codent des propriétés de virulence prouvées ou suspectées, ainsi que des intégrases d'origine phagique, des transposases et des origines de répllication plasmidiques et sont absents chez les souches de faible virulence. Leur acquisition, semble jouer un rôle primordial dans l'émergence des souches virulentes.

Plusieurs IP ont été retrouvés dans le génome des souches de *S. aureus* et une transmission interspécifique serait possible. Par contre, ils sont rarement présents dans le génome des SCN séquencés. Cependant, de récentes études ont identifié des structures proches d'un îlot de pathogénicité de *S. aureus* (SaPI) dans le génome de *Staphylococcus haemolyticus* (Novick et al., 2007; Takeuchi et al., 2005), *Staphylococcus saprophyticus* (Kuroda et al., 2005) et *S. epidermidis* (Madhusoodanan et al., 2011; Podkowik et al., 2016). L'IP retrouvé chez *S.*

*epidermidis* FRI909 (SEPI) porte les gènes qui codent des entérotoxines staphylococciques génétiquement très proches de SEC3 et SEL-like (Figure 1.11).

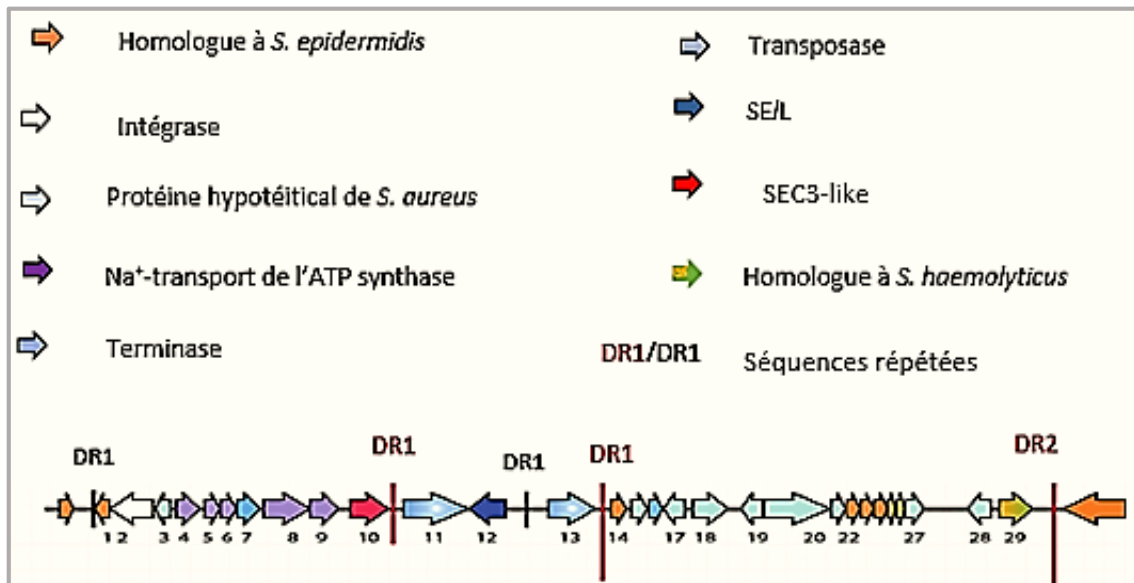


FIGURE 1.11 : ILOT DE PATHOGENICITE DE *S. EPIDERMIDIS* FRI909 (SEPI).

### 2.2.2. Plasmides

Le terme de plasmide a été créé en 1952 par Lederberg pour désigner tout élément génétique cytoplasmique, comme le facteur F. Les plasmides sont des petits fragments d'ADN bicaténaire, circulaires, de petite taille (5 à 4000 fois plus petits que le chromosome), présents dans le cytoplasme de la cellule bactérienne et dotés de répllication autonome. Le plasmide n'est pas indispensable à la cellule hôte, mais confère aux bactéries qui les hébergent de nombreux caractères génétiques par un mécanisme d'addition et non par un mécanisme de substitution. Leur transmission d'une cellule bactérienne à une autre peut s'effectuer par conjugaison ou transduction. Les plasmides de résistance aux antibiotiques ont été découverts en 1956 au Japon à l'occasion d'une épidémie de dysenterie bacillaire (*Shigella dysenteriae*) à bacilles résistants aux antibiotiques. Deux plasmides non transmissibles  $\pi$ Sh1 et  $\pi$ Sh2 ont été retrouvés dans le génome de *Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435.  $\pi$ Sh1 code pour des gènes de résistance aux macrolides (*msrSA* and *mphBM*) et au cadmiun (*cadD* and *cadX*) (Takeuchi et al., 2005).  $\pi$ Sh2 abrite des gènes de transporteurs ABC, qui constituent peut-être une pompe à effluents multidrogues. D'autres plasmides portant des marqueurs de gène de résistance à la fosfomycine et au lincosamide sont aussi retrouvés dans ce génome. Ainsi, l'accumulation de ces plasmides a contribué à la résistance aux antibiotiques de la souche *S.*

*haemolyticus* JCSC1435. Un plasmide non transmissible (PLU10) a été également identifié chez *S. lugdunensis*. Ces plasmides ne peuvent pas être transférés par conjugaison, mais il semble que d'autres mécanismes comme la transformation ou la cointégration peuvent assurer leur mobilisation.

### **2.2.3. Les bactériophages**

La notion de bactériophage a été décrite dans la section précédente (2.1.3). Tous les génomes de *S. aureus* comportent au moins un phage. Chez les SCN, il existe quelques souches qui en possèdent, mais ces phages ne portent souvent pas de facteurs de virulence. Ces éléments génétiques mobiles ont été principalement décrits chez *S. haemolyticus* ( $\phi$ Sh1) et présentent les mêmes caractéristiques que celles portées par *S. aureus*. Une séquence codant éventuellement un phage ( $\Phi$ SL1) a été également identifiée dans le génome d'une souche de *S. lugdunensis* (souche N920143).

### 3. LES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

#### 3.1. HISTORIQUE

Les entérotoxines staphylococciques (SEs) ont été initialement décrites en 1914 par Barber après la consommation du lait de vache contaminé par des staphylocoques ayant conduit à des vomissements et la diarrhée chez les personnes qui les ont ingérées. Mais les premières études qui ont clairement identifiées les entérotoxines produites par *S. aureus* comme la cause d'intoxication alimentaire, ont été réalisées en 1930 (Dack *et al.*, 1939). Les SEs comprennent SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SER et SET. Lorsque l'activité émétique n'est pas démontrée pour une SE, elle est considérée comme une entérotoxine-like : c'est le cas de SE/J, SE/K, SE/L, SE/M, SE/N, SE/O, SE/P, SE/Q, SE/R, SE/S, SE/T, SE/U, SE/V, SE/W, SE/X, SE/Y et SE/Z (McCormick, 2001). Toutes ces entérotoxines partagent des similarités d'homologie de séquence en acides aminés allant de 15,5% (entre SEB et SEK) à 81% (entre SEA et SEE) ce qui, peut engendrer des manques de spécificité des outils utilisés des outils de détection (Ono *et al.*, 2015). Ainsi, ces toxines peuvent être divisées en cinq groupes sur la base de leurs homologies de séquences (**Tableau 1.5**) (Vasconcelos *et al.* 2014, Da Cunha, 2007).

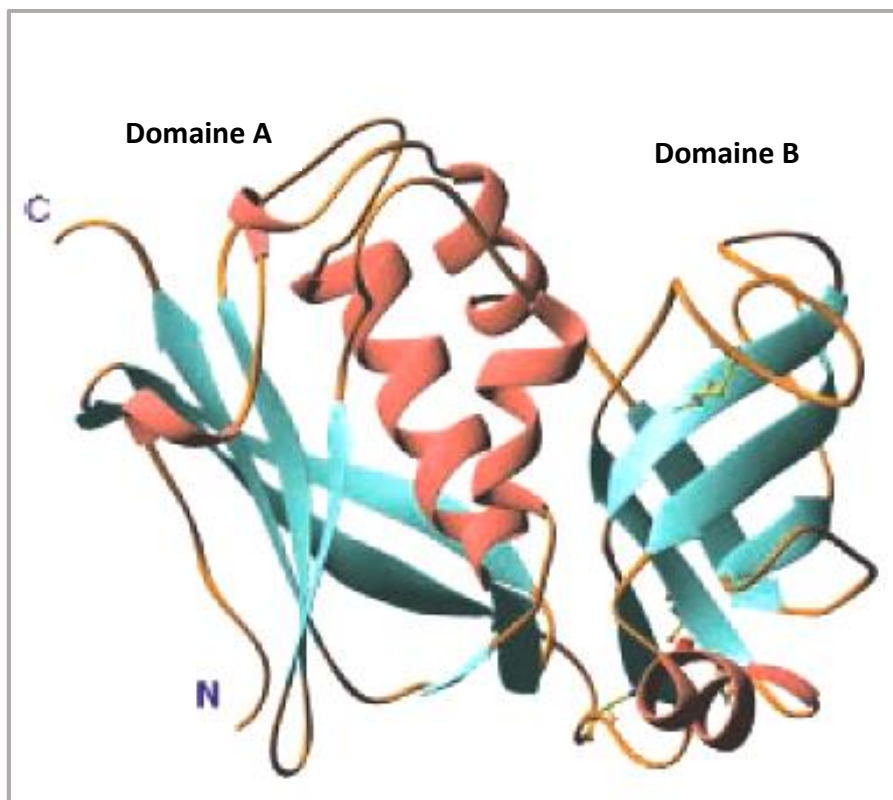
**TABLEAU 1.4: REGROUPEMENT DES SEs ET SELs BASE SUR DES COMPARAISONS DE SEQUENCES D'ACIDES AMINES.**

Groupes	SEs et Sel/s
<b>Groupe 1</b>	SEA, SED, SEE, (SEH), SE/J, SE/N, SE/O, SE/P, SE/S
<b>Groupe 2</b>	SEB, SEC, SEG, SER, SE/U, SE/U2
<b>Groupe 3</b>	SEI, SE/K, SE/L, SE/M, SE/Q, SE/V
<b>Groupe 4</b>	SET
<b>Groupe 5</b>	SEH

#### 3.2. STRUCTURE

Les SEs sont des protéines globulaires hydrosolubles et monomériques à faible poids moléculaire (26900-29600 Da) qui présentent des similarités structurales, riches en lysine, acide aspartique, glutamique et cystéines formant des ponts disulfures. La structure en trois dimensions de plusieurs SEs a été déterminée par cristallographie (Papageorgiou *et al.*, 1999). Elles ont une forme elliptique et ont deux grands domaines inégaux composés essentiellement de brins  $\beta$  et quelques hélices. Les deux domaines sont séparés par une cavité peu profonde.

Le plus grand des deux domaines contient à la fois les extrémités aminée et carboxylique (Figure 1.12). Plusieurs entérotoxines ont un site  $Zn^{2+}$  contraignant qui contribue à leur interaction avec les molécules de classe II du CMH (Sundstrom., 1996). Une suite d'acides aminés (aa 118-175) situés aux deux tiers de la longueur de la séquence protéique des entérotoxines est similaire à l'extrémité COOH-terminale de la protéine CD74 de l'être humain et de la souris (Marrack., 1990), qui se lie aux molécules du CMH de classe II au début de leur synthèse dans le réticulum endoplasmique et sert d'échafaudage pour leur assemblage. Le CMH de classe II le mieux étudié pour la liaison des entérotoxines staphylococciques est l'allèle HLA-DR1 (Bohach., 1997). HLA-DR a deux chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$ , auxquelles les entérotoxines staphylococciques peuvent se lier. Certaines se lient aux deux chaînes, comme SEA et SED, tandis que les autres se lient à l'une ou l'autre (Hudson et al., 1995; Kim et al., 1994 ; Redpath., 1999).



**FIGURE 1.12 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'ENTEROTOXINE DE TYPE C DE *S. AUREUS* MONTRANT LES DEUX DOMAINES. (ADAPTEE DE CHI ET AL. 2002).**

### 3.3. PROPRIETE

Les entérotoxines sont caractérisées par leur résistance à la chaleur et aux enzymes protéolytiques trypsine, la pepsine, la rénine, ce qui permet leur passage à travers le tractus gastro-intestinal, sans perte d'activité (Bergdoll, 1871). Cette famille de protéines présente des propriétés biologiques communes : pyrogénicité (élévation de la température corporelle) et activation des lymphocytes T (action superantigénique). Les entérotoxines activent la réponse immunitaire en recrutant 30 % des lymphocytes T du système immunitaire (versus 1 % pour un antigène classique) d'où leur appellation de superantigènes. Ces superantigènes se distinguent par leur capacité de provoquer des vomissements suite à l'ingestion d'une ou plusieurs SE présentes dans les aliments qui sont contaminés par des staphylocoques dorés. Certaines entérotoxines peuvent également jouer un rôle dans le TSS aux formes intermédiaires (Dinges et al., 2000). Les protéines « entérotoxin-like » (SE/s) sont des homologues de SEs avec qui elles partagent de nombreuses activités biologiques, y compris la superantigénicité, la pyrogénicité chez le lapin, la capacité d'amplifier le choc endotoxinique et la létalité lorsqu'elles sont administrées à travers des pompes mini-osmotiques sous cutanées (Orwin et al., 2002). Récemment, le potentiel émétique de SE/K, SE/L, SE/M, SE/N, SE/O, SE/P, SE/Q, a été démontré sur un modèle de primate (Omoe et al., 2013) (Tableau 1.6). Parmi les staphylocoques à coagulase positive, plusieurs espèces peuvent sécréter des SEs, c'est le cas de *Staphylococcus aureus* (espèce majoritairement retrouvée dans les épisodes toxiques) et de *Staphylococcus intermedius* dont une souche est impliquée dans un cas d'intoxication alimentaire aux Etats-Unis (Becker et al., 2001 ; Khambarty et al., 1994). Quelques espèces de SCN comme *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus haemolyticus* peuvent également porter des gènes codant des SEs (Bautista et al., 1988 ; Cunha et al, 2007 ; Veras et al., 2008 ; Zell et al., 2008).

**TABEAU 1.5 : ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE ET EMETIQUE DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES.**

Type de toxine	Liaison aux chaînes $\alpha$ et $\beta$ du CMH II	Pouvoir émétique chez le singe
SEA	+ / +	+
SEB	+ / -	+
SEC1	+ / -	+
SEC2	+ / -	+
SEC3	+ / -	+
SED	+ / -	+
SEE	+/-	+
SEG	+ / -	+
SEH	+ / -	+
SEI	Non réalisé / +	+
SEJ	Non réalisé / +	Non réalisé
SEK	Non réalisé / +	Non réalisé
SEL	Non réalisé / +	-
SEM	Non réalisé / +	Non réalisé
SE/N	Non réalisé	Non réalisé
SE/O	Non réalisé	Non réalisé
SE/P	Non réalisé	Non réalisé
SE/Q	Non réalisé	-
SER	Non réalisé	+
SES	Non réalisé / +	+
SET	Non réalisé / +	+
SE/U	Non réalisé	Non réalisé
SE/U2	Non réalisé	Non réalisé
SE/V	Non réalisé	Non réalisé

### 3.4. DETERMINISME GENETIQUE ET REGULATION DES GENES CODANT LES ENTEROTOXINES

La plupart des gènes qui codent les facteurs de virulence sont localisés sur les éléments génétiques comme : les plasmides, les transposons, les bactériophages et plus récemment les îlots de pathogénicité. Ainsi, selon l'entérotoxine, le gène codant celle-ci peut se trouver sur le chromosome, sur un prophage ou sur un plasmide (Tableau 1.7). SEA est codée par un bactériophage de *S. aureus* (Zhang et al. 1998) et SED par un plasmide (Betty et al. 1992). SEE est codée par un bactériophage qui code la SEA (Gilligan et al 2000). Les gènes codant SEB,



SEC, SEG, SEG, SEH et SEI sont chromosomiques (Gilligan et al 2000). Pour les souches productrices de l'entérotoxine D, un cadre de lecture ouvert codant SEJ se trouve sur le plasmide codant SED (Zhang *et al.*, 1998). Les résultats d'amplification par PCR, suggèrent que le cadre de lecture ouvert codant SEJ se trouve sur tous les plasmides codant SED (Balaban et Rasooly, 2000). Selon l'origine de la souche, le gène *sec* peut se trouver sur un plasmide ou un îlot de pathogénicité (Balaban & Rasooly, 2000). L'entérotoxine gène cluster (*egc*) code pour plusieurs entérotoxines, dont SEG, SEI, SEM, SEN et SEO (Jarraud *et al.*, 2001 ; Orwin *et al.*, 2001). SEU par contre, résulte de la divergence des séquences de deux pseudo-gènes codés par un opéron *egc* (Jarraud *et al.*, 2001). La localisation de ces gènes sur des éléments génétiques mobiles peut entraîner un transfert génétique horizontal entre les souches de *S. aureus*. Par exemple, le gène *seb* est situé sur le chromosome chez certains isolats cliniques (Shafer et Iandolo, 1978), alors qu'il a été localisé sur un plasmide chez d'autres souches de *S. aureus* (Shalita et al., 1977). Cependant, le transfert horizontal de ces gènes peut aussi se faire de *S. aureus* vers les SCN surtout dans les situations de co-infections. C'est ainsi que le *S. epidermidis* FR909, une souche clinique, a été identifiée comme porteuse d'un îlot de pathogénicité portant le gène codant l'entérotoxine *sec*.

L'expression de ces gènes varie selon leur mode de régulation. Le régulon le mieux connu chez *S. aureus* est le système *agr* (accessory gene regulator) (Peng *et al.*, 1988). La synthèse de SEB et de SED est régulée par le système *agr* de *S. aureus* et l'expression du gène *sed* est induite pendant la phase stationnaire de croissance (Zhang *et al.*, 1998 ; Schmitz *et al.*, 2004). Le gène *sec* utilise aussi un *agr* fonctionnel pour une expression maximale (Betley et al., 1992). Certains sous-types de souches *agr*<sup>+</sup> exprimant une quantité importante de SEA à partir du milieu de la phase exponentielle de croissance (160 min), semblent être indépendants du système régulateur *agr* (Rasooly *et al.* 1998). Cependant, les souches de staphylocoques *sea*<sup>+</sup>/*agr*<sup>+</sup> ont une activité superantigénique plus importante (Mullarky et al., 2001).

TABLEAU 1.6 : SUPPORT GENETIQUE DES GENES D'ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES.

Gènes	Localisation génétique	Références
<i>sea</i>	Prophage	Betley et Mekalanos, 1985; Bor et al., 1994
<i>seb</i>	Chromosome, plasmide, transposon	Shafer et landolo, 1978 Shalita et al., 1977; Altboum et al., 1985
<i>sec1</i>	plasmide	Altboum et al., 1985
<i>secbov</i>	llet de pathogénicité	Fitzgerald et al., 2001
<i>sed</i>	Plasmide	Bayles et landolo, 1989
<i>see</i>	Phage défectif	Couch et al., 1988
<i>seg</i>	Enterotoxin gene cluster ( <i>egc</i> )	chromosome Jarraud et al., 2001
<i>seh</i>	élément génétique mobile putatif	Noto et Archer, 2006
<i>sei</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>sej</i>	Plasmide (pIB485)	Zhang et al., 1998
<i>sek</i>	llet de pathogénicité	Orwin et al., 2001
<i>sel</i>	llet de pathogénicité	Fitzgerald et al., 2001
<i>sem</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>sen</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>seo</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>sep</i>	prophage (Sa3n)	Omoe et al., 2005
<i>seq</i>	îlot de pathogénicité	Jarraud et al, 2002
<i>ser</i>	Plasmide (pIB485)	Omoe et al., 2003
<i>ses</i>	Plasmide (pIB485)	Ono et al, 2008
<i>set</i>	Plasmide (pIB485)	Ono et al, 2008
<i>seu</i>	<i>egc</i> , (fusion entre <i>ent1</i> et <i>ent2</i> ), chromosome	Letertre et al, 2003a
<i>seu2</i>	<i>egc</i> , (délétion partielle dans les pseudogènes <i>ent1</i> et <i>ent2</i> ), chromosome	Thomas et al., 2006
<i>sev</i>	<i>egc</i> , (recombinaison entre <i>selm</i> et <i>sei</i> ), chromosome	Thomas et al., 2006

### 3.5. VOIES DE SIGNALISATION ET CIBLES CELLULAIRES

Les entérotoxines en tant que superantigènes interagissent aussi bien avec les lymphocytes T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) que les Phagocytes mononucléaires exprimant les molécules du CMH de classe II. Il existe 3 signaux pour l'activation des lymphocytes T (Carlsson et al., 1998). Le premier signal est transmis par l'interaction du superantigène avec le TCR. Comme pour les antigènes classiques, le second signal provient de l'engagement des molécules co-stimulatrices sur les CPA et les cellules T lors de la liaison du superantigène et optimise l'activation des lymphocytes T (Krakauer et al., 1994). L'expression de la CD28, une molécule d'adhésion intercellulaire (MAIC) sur la CPA favorise la formation de conjugués cellulaires stables et permet la mise en place d'une synapse immunologique. La co-stimulation CD28 améliore la stabilité de l'ARNm, de l'IL-2 et de la survie des lymphocytes T par l'expression accrue d'anticorps anti-apoptotiques Bcl-xl (Boise et al., 1995). D'autres molécules de surface cellulaire telles que CD2, CD11a / ICAM-1 et ELAM facilitent l'activation optimale des cellules endothéliales et des cellules T par les entérotoxines (Krakauer et al. 1994). La polymérisation de la F-actine et l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, accompagnent cette activation des lymphocytes T. Les récepteurs TCR et les costimulateurs activent la protéine tyrosine kinase (PTK), la LCK et la ZAP-70, entraînant l'activation de la gamma-phospholipase C (PLC), la libération de seconds messagers intracellulaires et l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PTK et de la PKC conduit aux voies MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK (extracellular signal regulated kinase) et JNK (cJun N-terminal kinase) qui activent à leur tour, la transcription des facteurs NF-κB, NF-AT et AP-1 (Isakov et al., 2012). L'activation de PKCθ conduit aux complexes CARMA1, Bcl10 et MALT1 (CBM) qui provoquent l'activation transcriptionnelle de NF-κB et contrôlent la prolifération des lymphocytes T (Paul et al 2013). Plusieurs gènes codant les cytokines pro-inflammatoires contiennent le site de liaisons au NF-κB dans leur région promotrice, et sont induites par la NF-κB. La cascade de NF-κB est une transduction de signal majeure pour de nombreux récepteurs de reconnaissance de formes et les récepteurs des cytokines pro-inflammatoires (Takeuchi et al., 2010). Les cytokines : interleukines (IL) -1, -2, -6, facteurs de nécrose tumorale alpha (TNFα), interférons gamma (IFNγ) et les chimiokines sont induites par des superantigènes (Krakauer et al., 1998, Tiedemann et al., 1996). L'IL-1 et le TNFα activent également les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales à produire le NFκB ainsi que les médiateurs additionnels, les molécules d'adhésion cellulaire, et

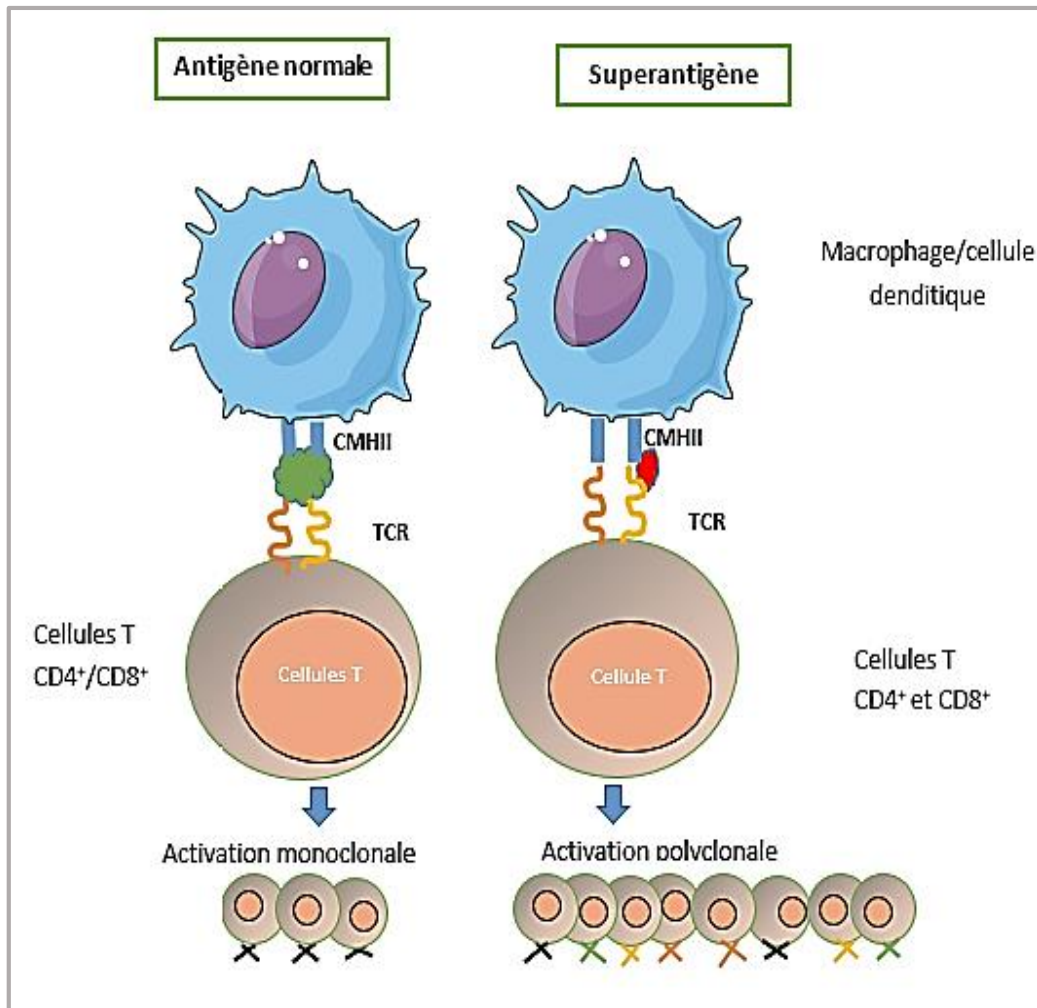
les protéases tissulaires (DiDonato et al., 2012). L'environnement inflammatoire fourni par ces médiateurs pro-inflammatoires représente le troisième signal d'activation des lymphocytes T.

Les Médiateurs produits par les entérotoxines exercent d'importants effets nocifs sur le système immunitaire et cardiovasculaire, impliqués dans le dysfonctionnement multi-organique et le choc léthal. Les PTKs et les cytokines produites par les lymphocytes T activent également en aval la Phosphoinositide 3 kinase (PI3K), la protéine de signalisation kinase B (Akt) et le complexe de la rapamycine 1 de mammifère (mTORC1) (Deane et al., 2004). Les deux molécules de signalisation, NFkB et mTORC1, représentent les principaux centres médiateurs des principales réactions biologiques aux SE, les TCR, le co-stimulateur CD28 et de la signalisation des cytokines.

### **3.6. MODE D'ACTION**

#### **3.6.1. Activité superantigénique**

L'activité superantigénique résulte de l'interaction directe des ES avec les cellules T réceptrices d'antigène (TCR) et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les superantigènes dévient la réponse du système immunitaire de l'hôte de la réponse spécifique contre une infection. En effet, dans le cas d'un antigène conventionnel, la réponse immunitaire des lymphocytes T est initiée suite à l'interaction d'un complexe du récepteur de la cellule T (TCR) et d'un antigène peptidique présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) (Garcia et Adams., 2005). La formation d'un complexe trimoléculaire (TCR + antigène étranger + CMHII) induit par conséquent l'activation ciblée de ces lymphocytes T (Figure 1.13). En revanche, les toxines superantigéniques se lient au CMHII des cellules présentatrices d'antigène et au domaine hypervariable V $\beta$  des récepteurs cellulaires des cellules T, mais au niveau de sites externes à celui de l'antigène et avec une affinité importante (Scholl et al., 1989). Grâce à cette interaction, plus longue, les superantigènes activent 10 à 30% des lymphocytes T périphériques contre 0,001% pour un antigène (Givan et al., 1999).



**FIGURE 1.13 : COMPARAISON ENTRE LA LIAISON D'UN ANTIGÈNE NORMAL (VERT) ET LA LIAISON D'UN SUPERANTIGÈNE (ROUGE) AVEC LE RECEPTEUR DES LYMPHOYTES T LE COMPLEXE CMH DE CLASSE II DE LA CELLULE PRÉSENTATRICE D'ANTIGÈNE.**

Cette hyperactivation des cellules T a pour conséquence la libération massive de cytokines (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-1, 2 et 6, interféron  $\gamma$ ), la sensibilisation des monocytes aux endotoxines et les lésions endothéliales (Dinge et al., 2000) expliquant l'hypotension et la survenue du choc toxique pouvant être fatal (Mac Cormick et al., 2001). De nombreuses études génétiques et cristallographiques ont permis de caractériser les domaines des ES impliqués dans ces interactions. Certaines configurations anormales de V $\beta$  sont trouvées chez des patients atteints de pathologies digestives (Shiobara et al., 2007) et des recherches ont mis en évidence une signature pronostique des pathologies digestives dont l'intoxication alimentaire staphylococcique.

De plus, l'examen d'un certain nombre de patients souffrant de choc toxique staphylococcique révèle qu'ils présentaient un dysfonctionnement de certains lymphocytes, voire une diminution de leur nombre due à une immunosuppression provoquée par le superantigène.

Les mécanismes responsables de l'immunosuppression lymphocytaire T et B sont multiples. Ils comprennent la stimulation des lymphocytes T suppresseurs, la destruction ou l'inactivation des lymphocytes T helper (apoptose et anergie Fas-dépendant), une déplétion en lymphocytes B (Dellabona et al., 1990). Ainsi, l'ensemble des effets biologiques induits par les superantigènes apparaît comme délétère pour la réponse immunitaire de l'hôte contre les staphylocoques.

Les superantigènes et leurs homologues conventionnels diffèrent également par plusieurs éléments: (1) Le superantigène se lie à la région V $\beta$  du récepteur des cellules T (principalement des T CD4<sup>+</sup>) en dehors du site normal de reconnaissance du peptide (antigène dénaturé) ; (2) le superantigène se lie aux différents allèles des molécules de classe II; (3) les effets superantigéniques se produisent sans intériorisation et traitement de l'antigène, et (4) la reconnaissance de ces derniers par le récepteur des cellules T (TCR) nécessite le CMH de classe II ainsi que la région variable de la chaîne  $\beta$  (v $\beta$ ) du TCR et non les chaînes V $\alpha$ -V $\beta$  utilisées par les antigènes classiques (Smith-Garvin *et al.*, 2009) (Tableau 1.8).

**TABLEAU 1.7 : DIFFERENCE ENTRE LES SUPERANTIGENES ET LES ANTIGENES CONVENTIONNELS (SOLANKI ET AL., 2008).**

Superantigènes	Antigènes conventionnels
Se lie en dehors du site de reconnaissance des antigènes	Se lie avec le site de reconnaissance des antigènes du CMHII
Pas de transformation en oligopeptide, action immédiate sans dégradation	Transformation en oligopeptide nécessaire
Stimulent les cellules T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup>	stimulent les cellules T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup>
Stimulent 30% du nombre total des cellules T	Stimulent seulement 0,001% du nombre total des cellules T
La réponse immunitaire est sévère dès le premier contact	Un premier contact est nécessaire pour avoir des réponses immunes sévères plus tard
Ne provoquent pas de réponse mémoire Activation non spécifique des lymphocytes T	Provoquent une réponse immune mémoire Activation spécifique des lymphocytes T

### 3.6.2. Activité émétique

L'activité émétique des ES repose sur leur capacité à provoquer un vomissement. Elle est très peu caractérisée, probablement à cause de l'absence de modèle animal capable de reproduire les manifestations cliniques de la toxi-infection staphylococcique. Il est plus approprié

d'utiliser des singes (rhésus ou cynopithèque) qui présentent les symptômes émétiques reproduisant ceux de l'Homme après administration orale, gastrique, intraveineuse ou péritonéale (Sugiyama et Hayama, 1964). Mais les études sur les primates sont très restreintes pour des raisons de coût et d'éthique. Beaucoup de données sont disponibles sur les relations structuro-fonctionnelles de l'activité superantigénique, mais l'activité émétique n'est, quant à elle, pas précisément localisée. D'après des études de mutagenèse dirigée, la présence d'un pont disulfure, serait importante pour l'activité émétique (Dinges et al., 2000). Cependant, SEI n'a pas de pont disulfure, mais est douée, à la fois, d'activité superantigénique et émétique. Certaines études suggèrent que les ES agissent directement sur l'épithélium intestinal et sur le nerf vague provoquant une stimulation des centres émétiques et du transit intestinal (Arbuthnott et al., 1990; Bergdoll, 1983). Plusieurs auteurs se sont penchés sur les mécanismes d'action déclenchant les vomissements pour étudier le pouvoir émétique de certaines entérotoxines (Wright et al., 2000, Ono et al., 2008). Ils ont ainsi démontré que SEA induisait la libération de sérotonine (5-hydroxytryptamine 5-HT) dans l'intestin suite à une injection intrapéritonéale (Hu et al. 2007). En effet, la sérotonine se fixe sur les récepteurs de type 5-HT3 présents sur le nerf vague conduisant à une activation des centres émétiques. De plus, les expérimentations de dénervation ont démontré que les SEs n'induisaient plus de vomissement suite à utilisation d'analogues de la 5-HT comme les carbanoïles de type 1.

## 4. ENTEROTOXINE : ASPECTS CLINIQUES

### 4.1. PATHOGENICITE

En présence d'entérotoxine, les mastocytes synthétiseraient des dérivés de l'acide arachidonique, qui agissent directement sur les récepteurs neuronaux du système gastro-intestinal, conduisant ainsi à une stimulation des centres nerveux responsables du vomissement et de la diarrhée. Des rapports épidémiologiques ont conclu qu'un adulte doit ingérer environ 10-20 µg d'entérotoxine pour que des symptômes soient obtenus. Cependant, d'autres auteurs considèrent que moins de 1 µg de SE peut provoquer une diarrhée et des symptômes d'intoxication chez des sujets sensibles (Martin *et al.* 2001). Au Japon, on a estimé à 0,002-0,1µg la dose de SEA consommée dans du lait demi-écrémé pendant l'épidémie de juin 2000 (Asao *et al.* 2003). La physiopathologie des symptômes n'est que partiellement comprise. Les SEs peuvent pénétrer la muqueuse intestinale et avoir accès aux tissus immunitaires locaux et systémiques. Dans ces zones, un afflux de polynucléaires dans l'épithélium peut être observé. L'activation du système immunitaire local par les SEs pourrait être responsable des dommages gastro-intestinaux observés ainsi que l'activation des mastocytes (Shanahan *et al.*, 1994). La libération de médiateurs inflammatoires et peptides neurentériques (substance P) lors de l'activation des SEs pourrait entraîner des dommages du tractus gastro-intestinal. La diarrhée en cas d'intoxication alimentaire staphylococcique serait due à l'inhibition de la réabsorption de l'eau et d'électrolytes dans l'intestin grêle comme observé à la fois *in vitro* et dans un modèle animal. Ces toxines produites par les souches de staphylocoques sont thermostables, résistent à la cuisson et aux enzymes du tube digestif. Elles contaminent le plus souvent les produits laitiers et la viande. L'intoxication est caractérisée par une incubation courte (1 à 6 heures après l'ingestion), des crampes abdominales douloureuses, des vomissements, des diarrhées et l'absence de fièvre. Ces signes apparemment graves sont en fait d'évolution rapide et généralement bénigne, sauf chez les individus « fragiles », voire particulièrement exposés en fonction de l'expression Vβ. L'évolution est le plus souvent favorable en l'absence de traitement, mais la survenue d'un choc toxique staphylococcique est possible en cas d'intoxication massive (Prévost, 2004) (Figure 1.14).



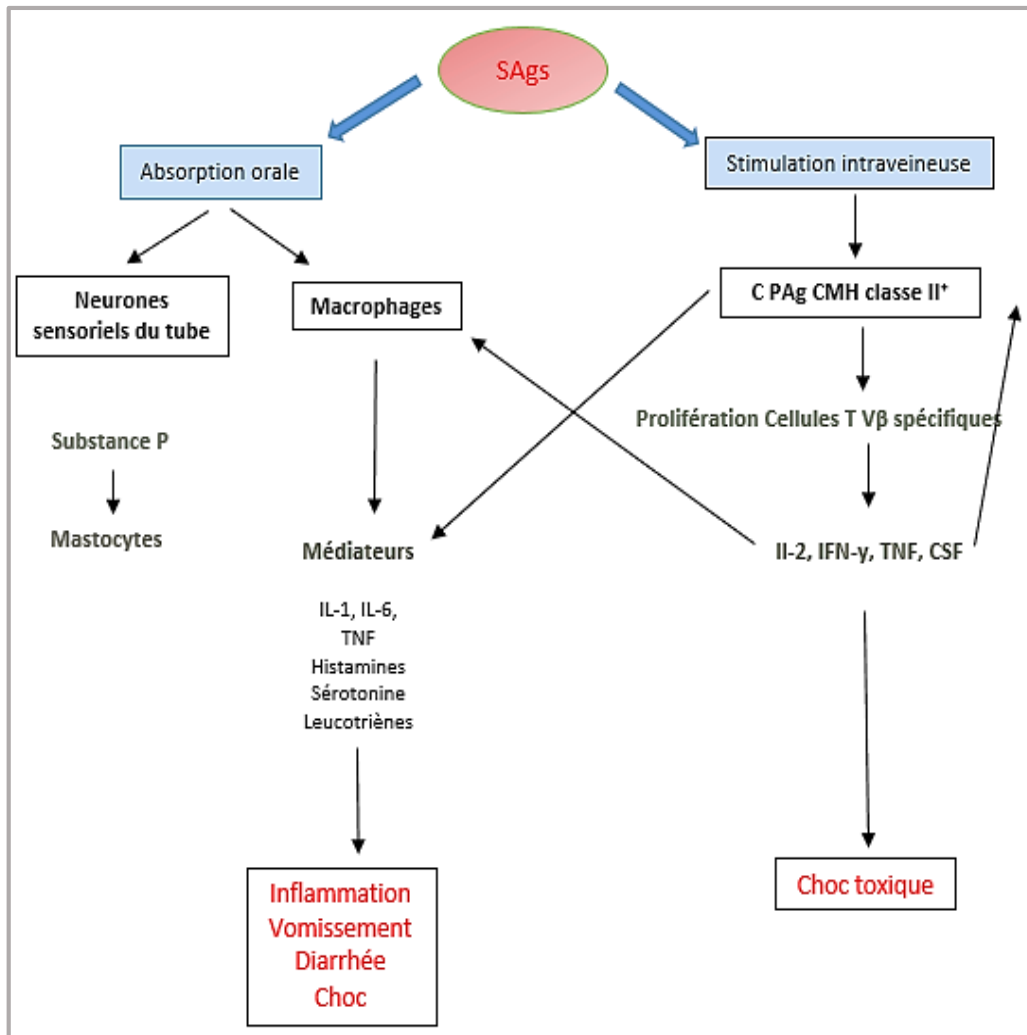


FIGURE 1.14 : CELLULES ET CYTOKINES PARTICIPANT A LA TOXICITE DES ENTEROTOXINES.

## 4.2. PATHOLOGIES LIEES AUX ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

### 4.2.1. Intoxications alimentaires

L'intoxication alimentaire par *S. aureus* est l'une des causes les plus fréquentes des maladies d'origine alimentaire et représente 15 à 30 % des toxi-infections alimentaires collectives. Elle est due à la l'ingestion d'une ou plusieurs entérotoxines staphylococciques préalablement développées dans l'aliment. Bien que certains produits alimentaires contaminés par un faible taux de *S. aureus* soient consommés sans risque, des facteurs de risques comme la rupture prolongée de la chaîne de conservation et la chaleur pourraient aboutir à une croissance suffisante de *S. aureus* pour la production des entérotoxines. La présence d'une population importante de souches de staphylocoques entérotoxigènes dans un échantillon est un fort risque de la présence de toxine dans l'aliment. Néanmoins, leur absence n'est pas un signe de l'absence de toxines, du fait que la charge bactérienne était probablement réduite ou éliminée

pas des manipulations antimicrobiennes qui n'altèrent pas la concentration d'entérotoxine, ni son activité biologique. Les aliments qui sont le plus souvent impliqués dans une intoxication alimentaire staphylococcique diffèrent largement d'un pays à l'autre. En France, par exemple, parmi les intoxications alimentaires à staphylocoques signalées sur une période de deux ans (1999-2000), les produits laitiers et surtout les fromages étaient responsables de 32% des cas, les viandes pour 22%, des saucisses et tartes pour 15%, les poissons et fruits de mer pour 11%, les œufs et les produits d'œufs pour 11% et la volaille 9,5% (Haeghebaert et al., 2002). Aux États-Unis, parmi les cas d'intoxication alimentaire staphylocoques signalés entre 1975 et 1982, 36% étaient dus à la viande rouge, de 12,3% pour les salades, 11,3% à la volaille, de 5,1% pour les pâtisseries et seulement 1,4% pour les produits laitiers et les fruits de mer. Au Brésil, 16 foyers d'intoxication alimentaire dû à la consommation de produits laitiers ont été identifiés entre 1998-2002 (Veras et al., 2008). Au Royaume-Uni, par exemple, 75% des intoxications alimentaires staphylocoques rapportées entre 1969 et 1990 étaient dus à des produits à base de viande, 8% à des produits laitiers, 7% pour les poissons et fruits de mer et de 3,5% pour les œufs (Wieneke et al., 1993). Ainsi, les origines de l'intoxication alimentaire staphylococcique diffèrent largement entre les pays. Cela peut être dû à des différences dans la consommation et les habitudes alimentaires dans chacun des pays. Cependant à ce jour, un seul épisode de toxiinfection alimentaire collective impliquant des SCN a été rapporté au Brésil (Veras et al., 2008).

SEA est la cause principale des toxiinfections alimentaires à staphylocoque (79%) (Wieneke et al., 1993), probablement en raison de son extraordinaire résistance aux enzymes protéolytiques (Balaban et al., 2000). SED est la deuxième cause d'intoxication alimentaire (37,5%) suivi de SEB (10%), SEC, et exceptionnellement SEE (Balaban et Rasooly, 2000 ; Floret et al., 2000).

#### **4.2.2. Le syndrome de Choc Toxique Staphylococcique**

Le syndrome de choc toxique (SCT) staphylococcique est provoqué par la diffusion dans l'organisme de toxines bactériennes dont certaines entérotoxines staphylococciques (B, C, etc.) (McCormick *et al.*, 2001). Bien qu'il soit relativement rare, il consiste en une défaillance multiviscérale d'évolution souvent foudroyante et est associé à une morbidité et à une mortalité élevée (Hajjeh et al., 1999). Les entérotoxines jouent un rôle central dans la pathogénèse du SCT staphylococcique. Ces exotoxines agissent comme des superantigènes,

qui provoquent rapidement une activation massive du système immunitaire (Balaban and Rasooly, 2000). Le SCT staphylococcique est à l'origine de plus de 90% des chocs toxiques menstruels et 50% des chocs toxiques non menstruels (Issa et Thompson, 2001), ceci est dû à son pouvoir de traverser les muqueuses. De nos jours, elle est acceptée comme responsable de 75% des syndromes du choc toxique staphylococcique. Dans la pratique clinique quotidienne, la pose précoce du diagnostic ou du diagnostic de suspicion et l'initiation immédiate d'un traitement (antibiotiques, si nécessaire chirurgie, traitement intensif de la défaillance multiviscérale) sont essentielles (Tableau 1.9). Actuellement, il n'existe encore aucun traitement causal capable de neutraliser l'activité superantigénique. D'autres formes cliniques incomplètes sont décrites : la scarlatine staphylococcique, le NTED (neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease) et le REDD syndrome (recalcitrant erythematous desquamating disorder) (Prevost, 2004).

**TABLEAU 1.8 : SYNDROME DE CHOC TOXIQUE STAPHYLOCOCCIQUE: CRITERES CLINIQUES DE DIAGNOSTIC (SCHRAG ET AL., 2011).**

Critères cliniques de diagnostic
1) Fièvre >38,9 °C
2) Eruption cutanée: érythrodermie maculeuse diffuse
3) Hypotension: pression artérielle systolique < 90 mm Hg chez l'adulte
4) Atteinte multisystémique (3 ou plus) - Gastro-intestinale: vomissements ou diarrhée au début de la maladie - Musculaire: myalgies sévères ou élévation de la CK - Muqueuse: hyperémie vaginale, oro-pharyngée et conjonctive - Rénale: concentrations d'urée ou de créatinine deux fois supérieures à la normale - Hépatique: concentrations de bilirubine totale deux fois supérieures à la normale - Hématologique: thrombocytes < 100g/l
5) Desquamation: 1 à 2 semaines après le début de la maladie (particulièrement au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds)
6) Résultats négatifs pour les tests suivants (si pratiqués): - sang, pharynx - Cultures du liquide céphalo-rachidien (les hémocultures peuvent être positives pour <i>S. aureus</i> ) - Fièvre pourprée des montagnes Rocheuses, leptospirose, rougeole

SCT probable si cinq des six critères sont remplis, SCT certain si l'ensemble des six critères sont remplis.

### 4.2.3. La maladie de Kawasaki

La maladie de Kawasaki, ou « syndrome lympo-cutanéomuqueux », est une vascularite infantile des artères de moyen et petit calibre (Prévost, 2004). Il n'existe pas de marqueur spécifique de la maladie, mais un faisceau d'arguments cliniques permettant d'évoquer le diagnostic. Il s'agit d'une maladie touchant principalement les enfants de moins de cinq ans et plus fréquemment ceux d'origine asiatique. La maladie de Kawasaki associe une hyperthermie franche d'installation aiguë, une conjonctivite, un érythème, une chéilite, des adénopathies cervicales, une éruption et un érythème palmo-plantaire suivi d'une desquamation. Il peut exister des anévrysmes coronaires, mis en évidence par échographie cardiaque ou coronarographie. La production de superantigènes staphylococciques à la phase aiguë a été incriminée dans la genèse de la maladie de Kawasaki. Cependant, aucun lien n'a pu être établi jusqu'à ce jour entre une toxine staphylococcique spécifique, présente chez l'enfant ou la mère, et la survenue de la maladie.

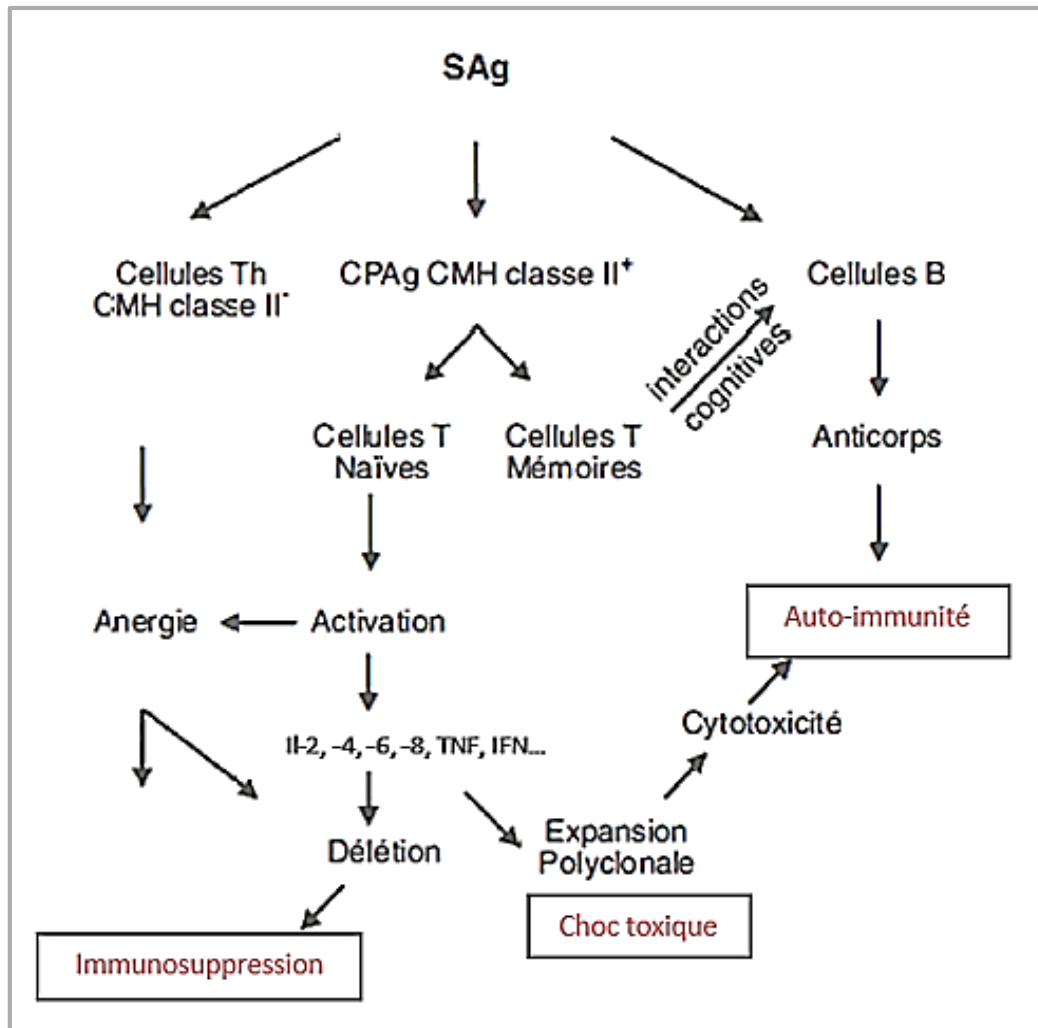
### 4.2.4. Dermatite atopique

La suppression de l'immunité innée observée au niveau de la peau, lors de la dermatite atopique, explique la fréquence élevée de la colonisation cutanée par les staphylocoques (jusqu'à 90 %) des patients souffrant de dermatite atopique (Prévost, 2004). Les lésions de grattage secondaires au prurit favorisent leur adhérence. Celui-ci va participer aux mécanismes de sensibilisation et d'inflammation. La production de céramidase augmente la perméabilité de l'épiderme. Les entérotoxines vont agir comme des superantigènes, activant les lymphocytes T et altérant leur fonction de régulation. Elles favorisent par ailleurs la production de chémokines par les kératinocytes, qui vont attirer des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire et favoriser la production de l'interleukine 3.1, dont le rôle dans le prurit a été démontré. En induisant la synthèse de l'isoforme bêta du récepteur aux glucocorticoïdes, les entérotoxines vont également diminuer la réponse au traitement corticoïde local. Enfin, la liaison des IgE spécifiques de *S. aureus* aux cellules dendritiques est susceptible d'initier une réaction d'hypersensibilité (Prevost, 2004).

### 4.2.5. Maladies auto-immunes

L'auto-immunité exprime la rupture de la tolérance accordée aux cellules du système immunitaire susceptibles de mobiliser les réactions contre le « soi ». Bien qu'aucune preuve

directe ne relie les entérotoxines aux maladies auto-immunes, plusieurs faits évidents laissent penser maintenant que ces superantigènes sont associés à leur développement (Grossman et al., 1991) . Les processus auto-immuns telles que l'arthrite est inconnue, mais il est probable que les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines produites en réponse aux superantigènes facilitent le recrutement spécifique et la migration des lymphocytes T autoréactifs dans le tissu synovial et les articulations. Ainsi, suite à l'exposition à une entérotoxine, une présence accrue des cellules immunitaires pourrait initier une réaction auto-immune destructrice. Le psoriasis et la dermatite atopique représentent également des maladies auto-immunes liées à la colonisation de la peau par les staphylocoques et la production excessive de superantigènes (Valdimarsson *et al.*, 1995). Les cellules T des patients atteints de dermatite atopique sévère sont apoptotiques. Ce qui peut conduire à des infections chroniques et l'aggravation ultérieure de la maladie (Yoshino *et al.*, 2000).



**FIGURE 1.15 : CONSEQUENCES PATHOLOGIQUES POSSIBLES A LA SUITE DE L'EXPOSITION AUX SUPERANTIGENES.**  
FIGURE ADAPTEE DE (GENESTIER ET AL., 2001).

### 4.3. TRAITEMENT

Actuellement, il n'y a aucune thérapeutique disponible pour le traitement du choc toxique induit par les superantigènes (Darebberg et al., 2004). Le ciblage et la neutralisation directe du superantigène est le plus approprié aux premiers stades de l'exposition avant l'activation cellulaire et l'initiation de la production en cascade des cytokines proinflammatoires. Les traitements ciblant les superantigènes au niveau des récepteurs ont été largement étudiés, et comprennent des peptides bloquant les récepteurs dérivés de toxines, qui sont des inhibiteurs chimériques composés des domaines V $\beta$  et CMH de classe II, comme les inhibiteurs synthétiques du récepteur de co-stimulation CD28 (Krakauer, 2016). Cependant, la prévention de l'interaction toxine-récepteur est inefficace après l'exposition à la toxine surtout que chaque inhibiteur doit être adapté pour cibler des toxines individuelles. L'échec des essais

cliniques sur le traitement du sepsis par un anti-endotoxine, un médicament qui empêche les étapes précoces de l'interaction avec le récepteur, suggèrent que le blocage des interactions superantigène-récepteur ne saurait probablement pas protéger contre les chocs induits par SEB (Opal et al., 2013).

Des études *in vitro* indiquent que de nombreux gènes codant des molécules d'adhésion cellulaire, des cytokines, des chimiokines et des protéines de phase aiguë sont impliqués dans l'état de choc létale induit par les superantigènes et contiennent des sites de liaison aux NFκB dans leur région promotrice (Didonato et al., 2012). L'activation des NFκB conduit à l'expression inductible de nombreux médiateurs impliqués dans l'inflammation et les blessures observées dans les lésions pulmonaires et les modèles de choc toxique induit par les entérotoxines. L'inhibition de la NFκB a été bénéfique ou non dans la prévention du choc toxique chez la souris (Krakauer., 2006 ; Tilahun et al., 2010). Ce type de thérapie pourrait être aussi envisagé chez l'homme. Cependant, un inhibiteur de NFκB doit être donné au début de l'injection de la toxine et pendant une longue durée pour obtenir une protection (Krakauer, 2009). La seule recommandation reste l'administration d'un antibiotique qui bloque la synthèse des protéines bactériennes.

## 5. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Les staphylocoques à coagulase négative ont été longtemps considérés comme inoffensifs pour l'homme ou comme de rares opportunistes de faible virulence (Huebner *et al.*, 1999), mais leur rôle croissant en tant que pathogènes a été reconnu et étudié ces dernières années (Fomba, 2006). Ils sont responsables d'infections nosocomiales et communautaires pouvant évoluer vers un niveau de sévérité comparable à celui de *S. aureus*, qui reste considéré comme le plus virulent des staphylocoques (Fluit *et al.*, 2001, Pfaller, *et al.*, 1999). L'immuno-incompétence chez le nouveau-né prématuré, les cancers ou les affections hématologiques sont les facteurs favorisant ces infections (Vandenesch *et al.*, 1995). Une autre situation entraînant une sensibilité accrue aux infections à SCN est l'implantation de corps étrangers divers tels que les prothèses, les stimulateurs cardiaques, les cathéters vasculaires, les shunts de dérivation du LCR. (Huebner *et al.*, 1999), et la multirésistance de certaines souches aux antibiotiques. Ainsi, ces différentes caractéristiques confirment le potentiel invasif et destructeur de certaines souches et imposent de leur accorder une attention particulière. Or, la liste et le rôle exact des facteurs de virulence impliqués dans la pathogénie des souches cliniques de SCN ne sont toujours pas connus avec précision. A l'heure actuelle il est encore difficile d'estimer le pouvoir pathogène réel de plusieurs souches et d'établir une corrélation clinico-biologique entre un phénotype clinique donné et la présence d'un facteur de virulence. Aussi, l'approfondissement des connaissances scientifiques liées à ces bactéries et l'établissement de leur prévalence sont des préalables indispensables à l'estimation et finalement à l'appréciation du risque sanitaire lié à l'existence de SCN virulentes dans les milieux hospitaliers ou communautaires.

De plus, la diversité des souches de *S. aureus* pathogènes est couramment expliquée par l'acquisition de gènes de virulence par transferts verticaux successifs. Cependant, la cohabitation de plusieurs espèces de staphylocoques sur la peau et les muqueuses de l'homme, peut favoriser le transfert horizontal de gènes de virulence de *S. aureus* vers les espèces moins virulentes comme *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ou *S. capitis* provoquant ainsi l'émergence des souches de SCN pathogènes. Bien que la présence de ces facteurs de virulence soit nécessaire à la virulence des souches de SCN pathogènes, un « fond » génétique spécifique serait à l'origine de leur intégration, de leur stabilité et de leur expression. L'étude des SCN d'origine clinique possédant des facteurs de virulence connus devrait permettre



d'aider à mieux comprendre les mécanismes d'émergence de nouveaux isolats pathogènes, en particulier en milieu hospitalier.

Ce projet a pour originalité de rechercher de possibles caractères pathogènes de staphylocoques à coagulase négative associés des infections confirmées.

De façon spécifique, notre thèse vise à :

- **Evaluer le potentiel pathogène des souches cliniques de SCN**
  - ✓ Etablir la présence et la variabilité des souches de SCN dans les échantillons d'origine clinique au Bénin
  - ✓ Déterminer l'antibiorésistance de ces souches
  - ✓ Rechercher les facteurs de virulence justifiant une pathogénie.
  
- **Caractériser les propriétés moléculaire, structurale et fonctionnelle de l'un des facteurs de virulence : l'entérototoxine staphylococcique C produite par *S. epidermidis* (SEC<sub>epi</sub>)**
  - ✓ Déterminer la structure la toxine
  - ✓ Cloner et purifier la protéine recombiante
  - ✓ Déterminer la fonction de SEC<sub>epi</sub> dans la pathogénie de *S. epidermidis*
  
- **Evaluer la corrélation entre le phénotype clinique et la production de SEC<sub>epi</sub>**
- **Faire un aperçu sur l'évolution de la virulence des souches de *S. epidermidis* entérotoxigènes par l'analyse approfondie de leur génome.**

La présente thèse est subdivisée en six chapitres de façon à faciliter une bonne compréhension de la méthodologie adoptée et une meilleure présentation du document.

Le premier chapitre est consacré à l'introduction générale qui comprend une revue de littérature sur les SCN et leur virulence ainsi que la problématique et les objectifs de l'étude. Avant de présenter les résultats des différents aspects étudiés, nous avons développé dans le second chapitre l'ensemble de la démarche méthodologique qui a été adoptée pour atteindre nos objectifs. Le troisième chapitre regroupe les résultats expérimentaux et est subdivisé en quatre parties (article 1-4). Dans le quatrième chapitre nous avons discuté les résultats obtenus et proposé de nouveaux axes de recherche pour améliorer la qualité scientifique de ce travail. Enfin, les chapitres cinq et six comportent respectivement la liste des références utilisées et les annexes.

## **Chapitre 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 1. MATERIELS

### 1.1. SOUCHES BACTERIENNES

Les souches bactériennes utilisées dans notre projet de recherche sont constituées de : 99 souches de SCN cliniquement significatives, collectées à CNHU-HKM du Bénin, 30 souches de *S. epidermidis* collectées à l'hôpital Universitaire de Strasbourg et des souches de *S. aureus* de référence figurées dans le tableau ci-après.

TABLEAU 2.1 : SOUCHES DE REFERENCE UTILISEES

Souches de référence	Génotype	Origine
<i>S. aureus</i> SCP FRI 722	<i>sea</i> +	De Buyser
<i>S. aureus</i> SCP FRI 341	<i>seb</i> +	De Buyser
<i>S. aureus</i> SCP FRI 361	<i>sec</i> +	AFSSA
<i>S. aureus</i> SCP FRI 137	<i>seg</i> +	AFSSA
<i>S. aureus</i> SCP FRI 569	<i>seh</i> +	AFSSA

#### 1.1.1. *Escherichia coli* XL1-Blue

**Génotype** : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac1*<sup>q</sup>ZM15 Tn10 TeT<sup>r</sup>].

**Intérêt** : Ces bactéries ont une grande aptitude à la transformation, ce qui permet d'obtenir des clones recombinants à partir de faibles quantités d'ADN. La mutation *endA1* supprime l'activité endonucléase I, aspécifique, ce qui améliore la qualité des préparations plasmidiques. La mutation en *hsd17* est située dans les systèmes de méthylation et de restriction qui permettent de reconnaître les ADN étrangers.

#### 1.1.2. *Escherichia coli* BL21

**Génotype**: B F-*dcm ompT, hsdS* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal*.

**Intérêt** : Cette souche est utilisée pour l'expression des protéines de fusion à partir du plasmide pGEX-6P-1 (GE Healthcare), car déficiente en protéases. De plus, la mutation *hsdS* améliore l'efficacité de la transformation à partir de plasmide non modifié. Cette souche a un niveau d'expression protéique élevé, autorisant des rendements supérieurs à 5 mg/L de culture dans le cas des entérotoxines. Les cellules compétentes peuvent être conservées pendant plusieurs semaines dans du glycérol 10% (V/V) à -80°C.

## 1.2. MATERIELS GENETIQUES

### 1.2.1. Vecteur plasmidique (pGEX-6P-1)

C'est un vecteur de 4980 pb (Figure 2.1) contenant un gène de résistance à l'ampicilline, un gène codant la glutathion-S-transférase (GST) et une cassette de clonage située en 3' de ce gène. Les séquences clonées dans les sites de restriction/insertion multiples du vecteur pGEX-6P-1 peuvent être exprimées sous forme de protéines de fusion avec la GST située à leur extrémité N-terminale (Smith et Johnson, 1988). Cette expression est effectuée grâce à l'induction du promoteur *ptac* en amont du gène codant la GST par l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). La protéine de fusion exprimée dans le vecteur pGEX-6P-1 peut être facilement purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare, Orsay). La protéine de fusion contient un site spécifique reconnu par la PreScission™ Protéase (GE Healthcare, Orsay), et est située entre la GST et son partenaire de fusion.

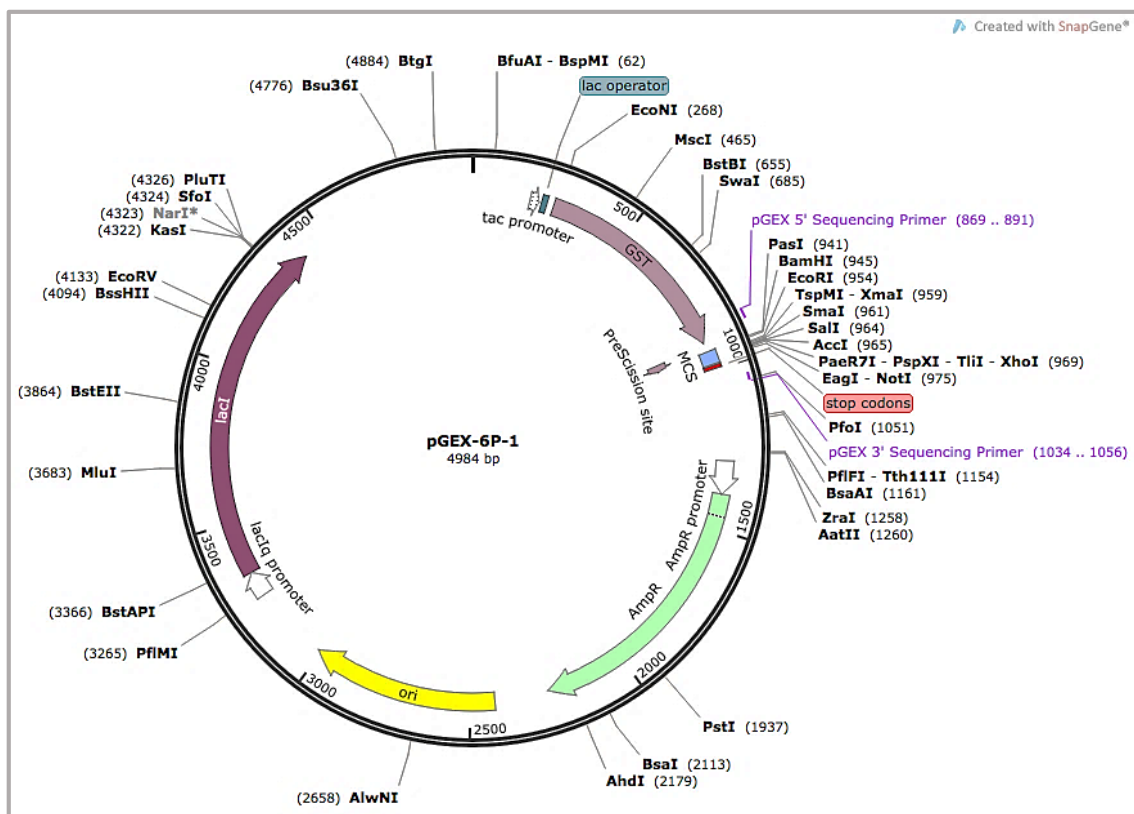


Figure 2.1 : Plasmide pGEX-6P-1 et les détails de la cassette de clonage (Manuel GE healthcare life sciences)

### 1.2.2. Vecteur recombiné

Le vecteur recombiné utilisé dans cette étude est le plasmide d'*E. coli* pGEX-6P-1 portant le gène *sec3* de *S.epidermidis* (ce travail).

### 1.2.3. Les amorces d'ADN utilisées pour l'amplification génétique (PCR)

Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification génétique des gènes codant les entérotoxines staphylococciques sont présentés dans le tableau ci-après.

**TABEAU 2.2 : AMORCES UTILISEES POUR LA PCR.**

Amorces	Gènes	Séquence nucléotidique 5' → 3'	Taille de l'amplicon size (bP)
<i>sea-1</i>	Entérotoxine A	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120
<i>sea-2</i>		GAACCTTCCCATCAAAAACA	
<i>seb-1</i>	Entérotoxine B	TCGCATCAAACGACAAACG	478
<i>seb-2</i>		GCAGGTACTCTATAAGTGCC	
<i>Sec-1</i>	Entérotoxine C	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257
<i>Sec-2</i>		AAATCGGATTAACATTATCC	
<i>seg-1</i>	Entérotoxine G	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC	642
<i>seg-2</i>		AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC	
<i>seh-1</i>	Entérotoxine H	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	372
<i>seh-2</i>		CATCTACCCAAACATTAGCACC	
<i>clfB-1</i>	Clumping factor	ATTAGTGCAAACACAAACAGTGCG	305
<i>clfB-2</i>		AGTTCCTTGCGCATTGGAAATCGT	
<i>hlgB-1</i>	composante Gamma-hémolysine B	AGATAAAAGTTATGATAAAGATACT	267
<i>hlgB-2</i>		AGTCCACCAGATAAACCATTAGAGA	
<b>Site EcoRI-sec</b>	Entérotoxine C	<u>GAA TTC</u> GACATAAAAGCTAGGAATTT	807
<b>Site BamHI-sec</b>		<u>GGA TCC</u> AAATCGGATTAACATTATCC	

### 1.3. PRODUITS CHIMIQUES

Phénol-chloroforme

Beta-mercaptoéthanol

Triton X100

Acide sulfurique

Acide chlorhydrique

Acétate de sodium

Acétonitrile

### 1.4. TAMPONS ET SOLUTIONS USUELS

**TBE 10x** : 0,89 M Tris-base, 0.89 M acide borique, 25 mM EDTANa<sub>2</sub>, pH 8,3.

**TE** : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTANa<sub>2</sub>, pH 8.0.

**PBS** : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5mM, NaCl 0,150 mM, PH 7,0.

#### PURIFICATION CELLULAIRE :

- **DEXTRAN** : 6 % (p/v) Dextran Leuconostoc (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 0,9 % (p/v) NaCl
- **TAMPON EGTA** : 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM Hepes, 0,1 mM EGTA, pH 7,3 (Tris-base)
- **Tampon HBSS** (Hanks' Balanced Salt solution):

#### PURIFICATION DE SEC<sub>epi</sub> :

- **Tampon A**: HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTANa<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,2 (NaOH)
- **Tampon B** : Tris-Base 50 mM, GSH 30 mM, NaCl 500 mM, pH 8 (HCl)
- **Tampon C** : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM, NaCl 2 M, pH 6, 5 (NaOH)

#### SDS-PAGE :

- **Tampon de migration** : Tris 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1% pH 8.8
- **Solution mère de coloration au bleu de coomassie** : **bleu de Coomassie G250R** (GE Healthcare) 2g/L, méthanol 60% (v/v), H<sub>2</sub>O QSP 1 L.
- **Solution fille de coloration au bleu de Coomassie** : Solution mère filtrée 50% (v/v), acide acétique 10% (v/v), QSP H<sub>2</sub>O.
- **Solution de décoloration** : acide acétique 10% (V/V), méthanol 30% (v/v), QSP H<sub>2</sub>O.
- **Réactif de Bradford** : bleu de Coomassie G-250 (Serva) 0,01% (p/v), éthanol 4,7% (v/v), acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 8,5% (p/v), QSP H<sub>2</sub>O.

## 1.5. MILIEUX DE CULTURE ET DE STOCKAGE

**Gélose à 5% de sang de mouton**, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France.

**Milieu Broth Heart Infusion (BHI)** (25 g/L), Becton, Dickinson and company-USA: Beef Heart Infusion 10 g, Tryptone 10 g, NaCl 5 g.

**Milieu TY x 2** (Tryptase-Yeast extract) : milieu de culture très riche, utilisé pour récupérer une quantité importante de bactéries. Composition : 1,7% (p/v) bio-tryptase, 1% (p/v) extraits de levure, 0,5% (p/v) NaCl pH 7,4. Le milieu gélosé contient 1,5% (p/v) d'agar bactériologique.

**Milieu TY x 2 – Ampicilline (TY-A)** : milieu sélectif des bactéries résistantes à l'ampicilline, un antibiotique à spectre d'action large. Composition : milieu TY x 2 additionné de 100 µg/mL d'ampicilline (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

**Milieu de congélation des souches** : 90% (v/v) Brain Heart Infusion (BHI), 10% (v/v) glycérol (100%).

**Agarose type D-5**, Euromedex): T° de gélification 36°C, T° d'infusion 89,3 °C.

**BD BACTEC™ Peds Plus/F**, Becton Dickinson, Meylan, France : Milieu pour la recherche et la mise en culture de microorganismes provenant d'enfants pour lesquels le volume de prélèvement est inférieur à 3 mL. Ils contiennent de la résine : 40 mL de bouillon Trypticase-soja enrichi.

**BD BACTEC™ Plus Aerobic/F**, Becton Dickinson, Meylan, France. Milieu pour la recherche et la mise en culture de microorganismes, principalement aérobies. Ces milieux contiennent des résines pour l'inhibition des antibiotiques : 25 mL de Trypticase Soja enrichi.

## 1.6. REACTIFS

**Matrice** : alpha-cyano-4 acide hydroxycinnamique ( $\alpha$ -HCCA): 3 mg/mL dans 50% (v/v) acetonitrile 2,5% acide trifluoroacétique (v/v).

**Api STAPH**, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France.

**CytoTox 96®Cytotoxicity Assay**, Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA

**Cartes VITEK AST-P631** pour l'antibiogramme

**Bioplex Pro™Human Cytokine 8 plex Assay**, BioRad, France

**Cell proliferation ELISA**, BrdU (colorimetric), Roche, France

## 1.7. MATÉRIELS DE CHROMATOGRAPHIE ET DE WESTERN BLOT

**La Sépharose 4B GSH (GE Healthcare)** a servi de matrice pour la chromatographie d'affinité de la protéine de fusion GST-SEC<sub>epi</sub>. La glutathion réduite est utilisée pour l'éluion de SEC<sub>epi</sub>.

**La colonne PD-10 (GE Healthcare)** pour le dessalage de la protéine purifiée.

**Trans-blot® Turbo™ Transfert System** pour le transfert de protéine du gel vers l'Immobilon®.

**Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems** pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium.

## 1.8. MATÉRIELS DE DOSAGE MULTIPLEX

**L'automate Bio-Plex™ 100 (BioRad)** a été utilisé pour le dosage multiplex et simultané de cytokines. Cet appareil est un compteur de particules en flux utilisant la technologie XMAP de Luminex (Multi- Analyte Profiling) avec des microsphères de fluorescence différentes. Il est doté d'un laser à diode rouge (635 nm) qui excite des billes bicolores et d'un laser Nd-YAG à diode verte (532 nm) qui excite la streptavidine-phycoérythrine qui est un indicateur de la liaison spécifique du ligand aux billes. Le système est piloté par un ordinateur muni d'un logiciel dédié (BioPlex Manager™) d'acquisition, d'intégration et d'analyse des données.



## 2. METHODES

### 2.1. EVALUATION DE LA PERTINENCE CLINIQUE DES SOUCHES

La pertinence clinique des souches est déterminée par des médecins qualifiés en utilisant le dossier médical de chaque patient contenant les données cliniques, socio-démographiques et de laboratoires. Les souches sont considérées comme ayant une signification clinique lorsque les critères suivants sont observés : 1) souches issues de culture pure, 2) présence de facteurs de risque infectieux (traitements immunosuppresseurs et portes d'entrées), 3) présence de signes cliniques classiques d'infection (hyperthermie  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ , hypotension, tachycardie, polypnée), 4) résultats de laboratoires associés à un syndrome infectieux clinique (fièvre, signes cardiaques, respiratoires, digestifs, neuropsychiques, cutanéomuqueux, des hypertrophies des ganglions lymphatiques) (Mohammad *et al.*, 2014). Dans notre étude, seules les souches ayant une pertinence clinique sont prises en compte.

**TABLEAU 2.3 : CRITERES UTILISES POUR LA CONSIDERATION CLINIQUE DES SCN ISOLES DE DIVERS ECHANTILLONS.**

Type d'échantillon	Résultat de l'examen direct	Résultat de la culture	Flore associée	Signes cliniques associés	Signification clinique
<b>Sang</b>	Résultat positif avec BACTEC	1 échantillon positif	1 espèce	Présence de syndrome infectieux	Oui
	Résultat positif avec BACTEC	1 échantillon positif	1 espèce	Présence de syndrome infectieux	Non
	Résultat positif avec BACTEC	1 échantillon positif	1 espèce	Présence de syndrome infectieux	Non
<b>Urines</b>	leucocytes/mL $\geq 10^4$ /mL	$\geq 10^5$ CFU/mL	1 espèce	Présence de syndrome infectieux	Oui
	Autres résultats	Autres résultats	1 espèce	Présence ou absence de syndrome infectieux	Non
<b>Superficiels</b>	Cocci Gram positif	1 échantillon positif	1 espèce	Présence de syndrome infectieux	Oui
	Autres résultats	Autres résultats	1/ 2 espèce	Présence ou absence de syndrome infectieux	Non
<b>Profonds</b>	Cocci Gram positif	1 échantillon positif	1 espèce	Présence de syndrome infectieux	Oui
	Autres résultats	Autres résultats	1/2 espèce	Présence de syndrome infectieux	Non
<b>Cathéters Intravasculaires</b>	Cocci Gram positif	1 positive	1 espèce	Présence de syndrome infectieux	Oui
	Autres résultats	Autres résultats	1/ 2 espèce	Présence de syndrome infectieux	Non

## 2.2. IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE (SCN)

Les souches sont phénotypiquement identifiées par les méthodes standards d'identification basées sur la coloration de Gram, la morphologie, la catalase positive (ID color Catalase ; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), la non agglutination des colonies avec le test Pastorex Staph Plus (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), et la non production de la staphylocoagulase libre en présence du plasma lyophilisé de lapin.

## 2.3. IDENTIFICATION DES ESPECES DE SCN

### 2.3.1. Identification des espèces de SCN par la galerie API® Staph

API® Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

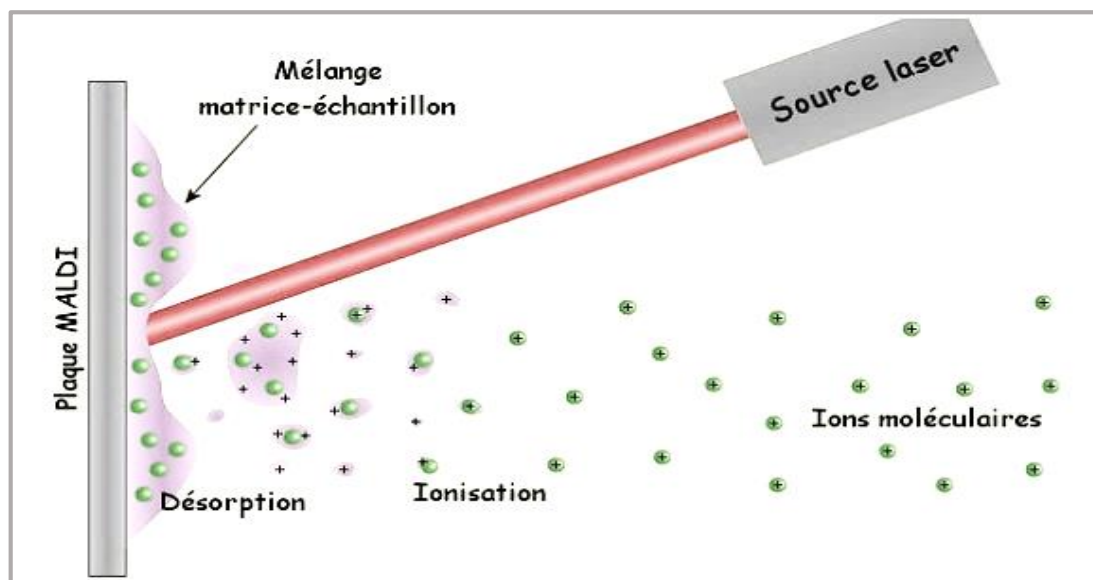
**Principe :** La galerie API® Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui réhydrate les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

**Méthode :** Les souches sont ensemencées sur gélose au sang et le lendemain une suspension bactérienne homogène d'opacité 0,5 McFarland est préparée en émulsifiant une colonie de 18-24h dans une ampoule d'Api Staph Medium. Les tubes de la galerie sont ensuite remplis avec l'Api Staph Medium ensemencé. Une anaérobiose est créée dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe. Les boîtes d'inoculation sont fermées et incubées à 37°C pendant 18H. Après l'incubation, les réactions sont lues conformément au tableau de lecture en ajoutant une goutte de chacun des réactifs VP, NIT et PAL aux cupules correspondantes.

### 2.3.2. Identification des espèces de SCN par la spectrométrie de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of Flight (maldi-tof/ms)

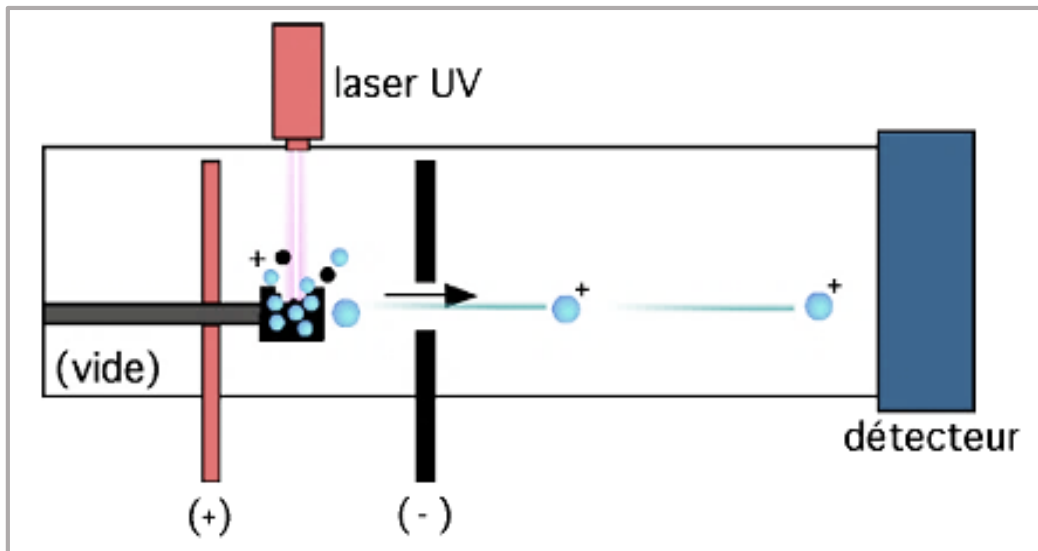
**Principe :** Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) (Figure 2.2.) et un analyseur à temps de vol (TOF : Time-Of-Flight)

(Figure II.3) (Bienvenu et al., 2002). Il est basé sur l'ionisation sans dégradation des molécules de grande taille, peu volatile, et sensibles à la chaleur (Andrade et al., 2008). Un échantillon couvert d'une matrice ionisante est bombardé par un laser (337 nm, 20 Hz). En étant volatilisé de la plaque inerte, les particules ionisables sont accélérées dans un champ électrique (19 kV) en leur imprimant un temps de vol dans un tube où un vide poussé est maintenu. La molécule désorbée est projetée vers un détecteur. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. Le temps de vol de chaque particule est proportionnel à sa masse ( $m$ ) et sa charge ( $z$ ). Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre.



**FIGURE 2.2 : PRINCIPE D'IONISATION PAR LA TECHNIQUE MALDI ([HTTP://CBM.CNRS-ORLEANS.FR/SPIP.PHP?ARTICLE129](http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?article129)).**

L'analyte (en vert) est cristallisé dans la matrice (en violet). Un laser UV (337 nm de longueur d'onde) d'azote est pulsé en direction de la cible. La matrice se vaporise libérant les peptides (désorption) et transfère ensuite ses protons à l'analyte qui s'ionise. Les protéines sont ionisées positivement tandis que les oligonucléotides et les saccharides sont ionisés négativement.



**FIGURE 2.3 : TECHNIQUE TIME OF FLIGHT (TOF).**

Les substances ionisées sont séparées entre une anode et une cathode dirigeant ainsi les molécules ionisées vers l'électrode portant la charge inverse des ions à analyser. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique accélérant leur progression. Les grosses molécules mettent plus de temps à atteindre le détecteur que les petites molécules. Ce temps est calculé par le spectromètre. Les molécules sont ainsi séparées en fonction de leur rapport masse/charge (Tonella et al., 2011).

**Méthode :** Les souches de SCN sont mises en culture sur la gélose Columbia à 5% de sang de mouton (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et incubées pendant 24h à 37° C. Une vingtaine de colonies de chaque souche sont mises en suspension dans 300  $\mu$ L d' $H_2O$  distillée stérile et 900 $\mu$ L d'éthanol à 70 °C. Le mélange est bien homogénéisé et centrifugé à 13000 x *g* pendant 2 min. Le surnageant est ensuite éliminé et remis en suspension dans 50  $\mu$ L d'acide formique à 70% pour la lyse des bactéries et la libération des protéines intracellulaires. Le mélange est homogénéisé pendant 2 min et 50  $\mu$ L d'acétonitrile sont enfin ajoutés. Après une centrifugation de 2 min à 13000 x *g*, le surnageant contenant les protéines est recueilli dans un microtube pour être analysé par la spectrométrie de masse. Un microlitre d'extrait protéique de chaque souche est déposé en double sur l'un des spots de la plaque cible et mise à sécher à température ambiante. Ensuite un microlitre de la matrice (3 mg/mL d'acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique dans 50% [vol/vol] acétonitrile-2,5% d'acide trifluoroacétique [v/v]) est déposé sur l'échantillon séché et laissé sécher de nouveau. Les échantillons sont ensuite traités dans le spectromètre MALDI-TOF-MS. Les spectres des souches à identifier sont obtenus avec l'appareil LT Microflex en utilisant le logiciel FLEXCONTROL 3.0 (Bruker Daltonics) puis comparés avec les spectres de masse enregistrés. L'analyse automatique des spectres bruts obtenus, est réalisée par le logiciel MALDI Biotype™. Un score d'identification

supérieur à 2 est considéré comme une identification de haute confiance au niveau de l'espèce, tandis que les scores compris entre 1,7 à 1,99 sont considérés comme une identification de confiance intermédiaire au niveau du genre seulement. Les scores inférieurs ou égaux à 1,7 sont considérés comme une identification inacceptable, conformément aux recommandations du fabricant. Dans cette étude, seules les souches avec un score d'identification de 2 ou plus ont été prises en compte.

**Traitement des données avec le logiciel Biotyper™ (Bruker):** Le Biotyper™ est un logiciel pour l'analyse des spectres dans le contexte d'une identification microbienne. Ces spectres peuvent être générés avec des spectromètres de masse Bruker de type Biflex® ou Refelex®, Omniflex®, Microflex®, Autoflex® ou Ultraflex®. AXIMA@SARAMIS assurance, AXIMA@SARAMIS confidence, AXIMA@SARAMIS performance (Shimadzu™).

Le Biotyper™ est basé sur MATLAB 7.1, il permet de générer différentes banques de données pour produire à partir des spectres, des listes de pics ou des références de spectres. L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance utilisant les positions de pics, leurs intensités autant que leurs fréquences d'apparition. De plus, le logiciel permet l'analyse de pics basée sur la génération des principaux composants et sur l'indice de corrélation des composants. Il incorpore toutes les fonctionnalités pour réaliser l'acquisition du spectre de masse, comme aussi pour l'identification et la classification des microorganismes. Les paramètres de procédure sont définis par l'utilisateur, et les résultats sont déduits par la liste des pics. Le modèle assorti "pattern matching", pour l'identification d'un microorganisme inconnu est réalisé par la comparaison de la liste de pics générés avec la banque de données contenant les informations caractéristiques du spectre de différentes espèces. La banque des spectres est générée par plusieurs mesures d'une espèce ou d'une souche bactérienne connue, puis les informations spécifiques du pic sont extraites. Un profil moyen est obtenu après la mesure de 20 spectres. Le logiciel génère automatiquement les listes des pics à partir de tous les spectres et extrait les pics typiques qui sont présents dans les spectres d'une seule espèce. Les microorganismes inconnus sont identifiés en comparant leurs pics individuels à la banque de données. Le "matching score", basé sur les masses identifiées et la corrélation de leurs intensités, est généré et utilisé pour classer les résultats. Pour augmenter la fiabilité des données recherchées, le Biotyper™ est capable de corriger les déviations de masses des pics à partir d'un algorithme de re-calibration sophistiqué. Le logiciel

peut adapter la calibration d'une nouvelle liste de pics à une liste de pics connue dans des limites ajustables. Cette fonctionnalité rend l'identification de Biotyper™ particulièrement robuste et fiable.

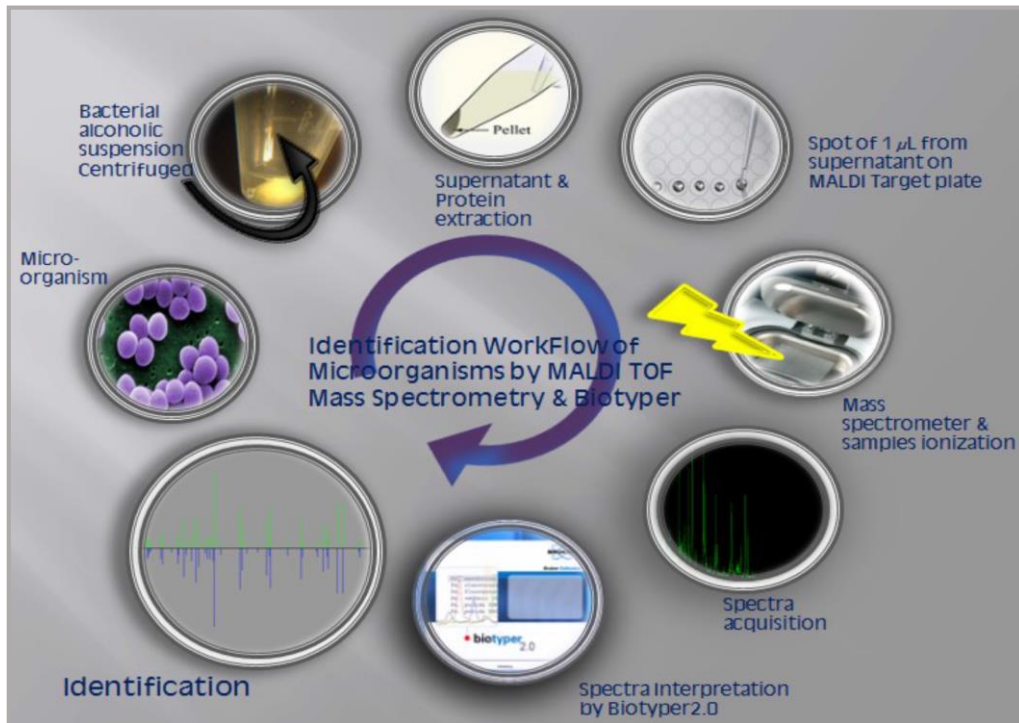


FIGURE 2.4 : RESUME DE L'IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR MALDI-TOF/MS (ADAPTEE DE MOUSSAOUI WARDI ET AL., 2009).

### 2.3.3. Identification des espèces de SCN par séquençage de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S)

L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) est l'ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes. Les gènes codant cet ARN sont appelés ADNr 16S (*16S rDNA* en anglais) et leur séquence est très utilisée en phylogénie pour reconstruire l'histoire évolutive des organismes dans la mesure où sa vitesse d'évolution relativement lente permet d'établir des divergences génétiques anciennes (Carl et al., 1977). Ces gènes sont présents en plusieurs copies au sein de chaque organisme (Rébecca et al., 2007).

**Principe :** Le gène de l'ARNr 16S est le marqueur génétique le plus connu utilisé pour identifier et classer les bactéries, notamment parce qu'il se compose à la fois de régions très bien conservées et de régions hypervariables. Les régions conservées peuvent servir de sites de liaison d'amorces universelles pour l'amplification du gène entier ou de fragments du gène,

tandis que les régions hypervariables contiennent des séquences spécifiques à l'espèce qui peuvent faire la distinction entre différentes bactéries.

Avec plus de 100 000 séquences du gène de l'ARNr 16S disponibles dans les bases de données publiques, l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S peuvent décrire de manière semi-quantitative les bactéries présentes dans des échantillons biologiques complexes.

**Méthode** : Le gène est partiellement ou totalement amplifié avec des amorces universelles spécifiques aux régions conservées. Les jeux d'amorces sont conçus pour capturer le plus grand nombre possible de micro-organismes différents. Les fragments amplifiés sont ensuite analysés par séquençage à haut débit (NGS). Les lectures obtenues sont regroupées avec d'autres séquences associées suivant un niveau d'identité prédéfini puis quantifiées. Ces groupes de lectures de séquençage similaires sont appelés « unités taxonomiques opérationnelles » (OTU). Le comptage des OTU est résumé dans un tableau répertoriant l'abondance relative pour chacune des bactéries dans chaque échantillon et les données sont exploitées pour un traitement en aval. Un niveau d'identité de séquence de 97% est fréquemment choisi pour représenter l'espèce et de 95% pour représenter le genre. L'identification microbienne s'effectue par rapport aux séquences de bases de données de référence comme le RDP (Ribosomal Database Project). En raison de la nature de leur séquence de gène d'ARNr 16S, certaines bactéries ne peuvent être classées que jusqu'à l'échelon du genre ou de la famille. Dans ce projet, le séquençage de l'ARNr a été réalisé par GATC Biotech, France.

## 2.4. ANTIBIOGRAMME AVEC VITEK 2

**Principe** : Le principe de l'antibiogramme de Vitek®2 repose sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la colorimétrie. Chaque carte AST de Vitek®2 contient 64 micropuits. Un puits de contrôle contenant uniquement un milieu de culture est présent sur toutes les cartes. Les autres puits contiennent des concentrations préétablies d'un antibiotique donné et un milieu de culture. L'instrument Vitek®2 contrôle la croissance dans chaque puits présent sur la carte pendant un délai défini (jusqu'à 18 heures pour les bactéries). Au terme du cycle d'incubation, les valeurs de CMI sont déterminées pour chaque antibiotique présent sur la carte par la colorimétrie.



**Méthode et analyse des données :** Quelques colonies de 24 heures de la souche à tester sont mise en suspension dans 3 mL d'eau déminéralisée jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) comprise entre 0,55 et 0,62. L'inoculum et la carte d'antibiogramme AST-P631 sont ensuite placés dans le VITEK 2. Les antibiotiques testés sont les suivants : Céfoxitine (FOX), Benzylpénicilline (P), oxacilline (OXA), Gentamicine (GEN), Kanamicine (K), Tobramicine (TM), Ofloxacine (OFX), Clindamycine (CL), Erythromycine (E), Lincomycine (L), Pristinamycine (PT), Linézoïde (LIZ), Tétracycline (TEC), Vancomycine (VA), Tétracycline (TE), Fosfomycine (FOS), Nitrofurantoïne (FT), acide fusidique (FA), Rifampicine (RA), Triméthoprim-sulfamides (SXT). Les résultats sont lus automatiquement entre 18 et 24 heures et l'interprétation de la sensibilité des souches aux antibiotiques est réalisée par le logiciel VITEK 2 selon les recommandations du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). La résistance à la méticilline est évaluée par la résistance des souches à la céfoxitine et à l'oxacilline.

## 2.5. PREPARATION DES SURNAGEANTS DE CULTURE BACTERIENNE

Après identification, chaque souche est initialement mise en culture sur de la gélose Muller Hinton (MH) enrichie à 5% de sang de mouton pendant 18 h à 37 °C et un clone est sélectionné et inoculé dans 10 mL de bouillon BHI (Brain Heart Infusion). La suspension est ensuite incubée sous agitation à 37 °C pendant 18 h et centrifugée à 10 000 x g pour 10 min. Le surnageant de culture est récupéré et filtré avec un filtre de 0,45 µm de diamètre. Chaque filtrat est enfin aliquoté dans un tube Eppendorf et congelé à -20 °C pour des tests ultérieurs.

## 2.6. TEST D'ACTIVITE CYTOLYTIQUE

### 2.6.1. Test de leucotoxicité

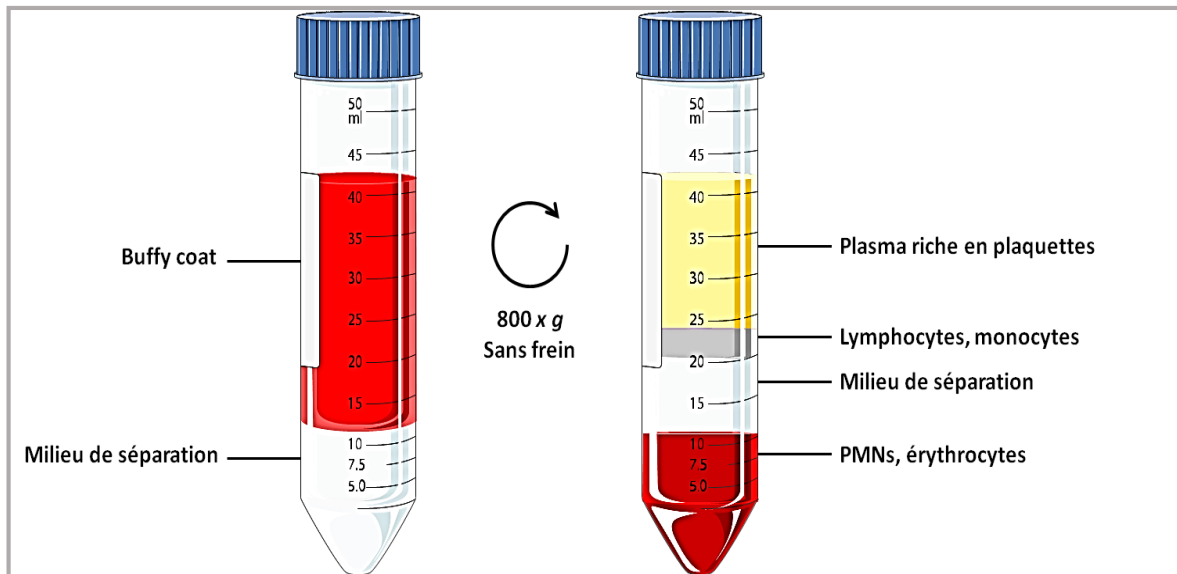
#### 2.6.1.1. Purification des neutrophiles, monocytes et lymphocytes

**Principe :** Les polynucléaires neutrophiles humains ( $h$ PMN), monocytes et lymphocytes encore appelés peripheral blood mononuclear cells (PBMC) sont préparés à partir de concentrés leuco-plaquettaires sanguins « buffy coat » (Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France) moins de 24h après le don de sang. La méthode est basée sur la séparation par centrifugation sur gradient de Ficoll + diatrizoate ( $d=1,077$ ) des monocytes et des lymphocytes d'une part et des polynucléaires neutrophiles et érythrocytes d'autre part. Les plaquettes sont éliminées avec le plasma et les érythrocytes par lyse osmotique.

**Méthode** : 30 mL de concentré sanguin sont dilués au 1/3 dans du NaCl 9 ‰ et sont déposés lentement sur 12 mL de milieu de séparation des lymphocytes J-Prep (TechGen International, Les Ullis, France). Après 20 min de centrifugation sans frein à 800 x *g* dans un rotor mobile, la couche lymphocytaire (Figure 2.5) est prélevée avec précaution dans un nouveau tube, et le culot (PMNs et érythrocytes) est resuspendu dans 30 mL de NaCl 9 ‰.

**Purification des lymphocytes** : les PBMCs sont lavés par centrifugation dans du tampon RPMI, 5 min à 400 x *g*, pour l'élimination de milieu de séparation. Les érythrocytes résiduels sont éliminés par lyse osmotique pendant 30 secondes en ajoutant 18 mL d'H<sub>2</sub>O. L'osmolarité est rétablie par l'addition de 2 mL d'une solution de NaCl 9% (p/v). Les cellules sont lavées 2 x par centrifugation dans du tampon RPMI, 5 min à 150 x *g* pour éliminer les plaquettes. Le culot contenant les monocytes et les lymphocytes est remis en suspension dans du RPMI enrichi (10% serum foetal de veau, 2mM glutaMax, 0,1% pénicilline/streptomycine) et le mélange est laissé à incubation dans une boîte de petri pendant toute une nuit, afin que les monocytes adhèrent à la plaque. Le surnageant riche en lymphocytes est enfin récupéré pour le test de mitogénicité.

**Purification des PMNs** : les 30 mL de suspension de PMNs/érythrocytes sont additionnés de 10 mL de solution de Dextran 6% (p/v) (Sigma). Après 30 min de sédimentation, le surnageant qui contient les PMNs est récupéré à la pastette et centrifugé 5 min à 1200 x *g*. Le culot est resuspendu dans 500 µL de NaCl 9‰. Les érythrocytes résiduels sont éliminés par lyse osmotique en 45 sec en ajoutant 18 mL d'H<sub>2</sub>O. L'osmolarité est rétablie par l'addition de 2 mL d'une solution de NaCl 9% (p/v). Les PMNs sont de nouveau lavés par centrifugation 5 min à 1200 x *g* et resuspendus dans du tampon EGTA. Après 1h de repos, les PMNs sont filtrés sur un tamis cellulaire de nylon de 70 µm (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, France) pour éliminer les agrégats et remis dans du tampon HBSS.

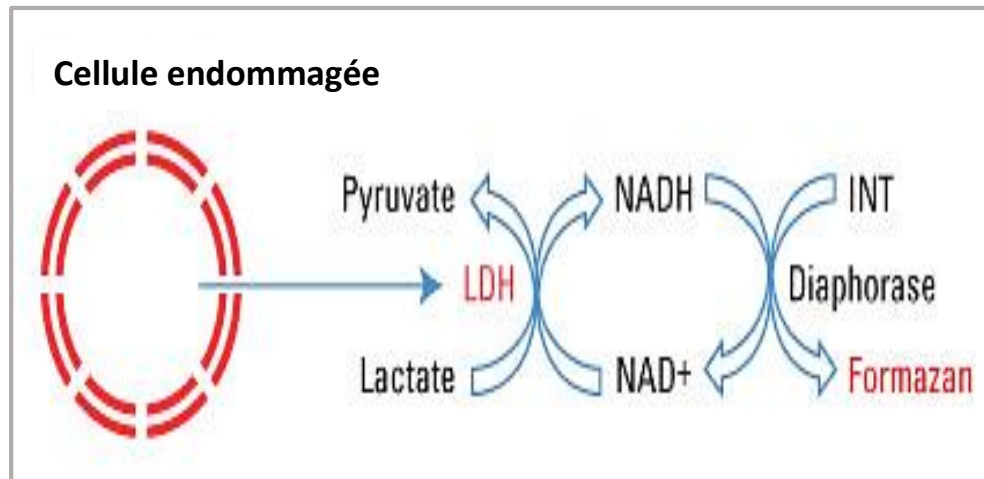


**FIGURE 2.5 : PURIFICATION DES CELLULES LEUCO-PLAQUETTAIRES SANGUINES PAR CENTRIFUGATION SUR GRADIENT DE FICOLL + DIATRIZOATE (MILIEU DE SEPARATION DES LYMPHOCYTES) (MANUEL EUROBIO®).**

La séparation des différents types cellulaires contenus dans le « buffy coat » est réalisée sur un gradient de Ficoll® et de diatrizoate. Le culot est constitué des PNN et des érythrocytes, puis vient le milieu de séparation, les cellules mononuclées et enfin le plasma.

### 2.6.1.2. Détermination de l'activité leucotoxique des SCN

**Principe :** Le test de cytotoxicité des SCN sur les hPMNs est réalisé avec le réactif CytoTox 96® (Promega). Le principe repose sur le dosage quantitatif de la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme cytosolique stable qui est libérée lors de la lyse cellulaire. La LDH libérée dans le surnageant de culture est dosée avec un substrat contenant du lactate, du Nicotinamide adenine dinucleotide oxydé (NAD<sup>+</sup>) et du iodinitro-tétrazolium (INT) en présence de diaphorase, ce qui se traduit par la réduction du sel de tétrazolium (INT) en un produit formazan rouge (Figure 2.6). La quantité de couleur formée est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm et est proportionnelle au nombre de cellules lysées.



**FIGURE 2.6 : REACTIONS CHIMIQUES IMPLIQUÉES DANS LE DOSAGE DE LA LDH**  
 ([HTTPS://WWW.THERMOFISHER.COM/ORDER/CATALOG/PRODUCT/88953](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88953)).

Le LDH libéré dans le surnageant de culture par les cellules endommagées est mesuré en fournissant du lactate, de  $\text{NAD}^+$  et du iodonitro-tétrazolium violet (INT) comme substrat en présence de la diaphorase. La production d'un produit rouge (formazan) est proportionnelle à la quantité de LDH libérée et donc au nombre de cellules lysées.

**Méthode** : L'activité cytotoxique du surnageant de culture est déterminée en utilisant le kit commercial (CytoTox 96® Essai de cytotoxicité, Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA). Cent microlitres de PMNs humains ajustés à une concentration de  $6 \times 10^5$  cellules/mL sont incubés avec 5  $\mu\text{L}$  de surnageant de culture pendant 30 min. Le mélange est centrifugé et 50  $\mu\text{L}$  du surnageant sont mis en incubation avec 50  $\mu\text{L}$  de réactif pendant 30 min. La cytotoxicité est représentée comme le pourcentage de libération de la LDH totale détectée par la lyse des cellules avec 0,1% (v/v) de Triton X-100. Les souches qui ont lysées au moins 50% de PMNs sont considérés comme cytotoxiques (Scheifele et al., 1987).

### 2.6.2. Test d'hémolyse en point final

**Principe** : Ce test permet d'évaluer l'activité hémolytique des surnageants de culture des souches. Il peut constituer une évaluation de toxicité d'une molécule. Le principe repose sur le relargage de l'hémoglobine par les érythrocytes lysés. Après centrifugation l'absorbance de l'hémoglobine est proportionnelle à la lyse.

**Méthode** : L'activité hémolytique des souches sur des globules rouges (GR) humains est déterminée par la méthode semi-quantitative. Pour se faire, 1 mL de globules rouges humains sont lavés 3 fois avec 10 mL de Phosphate Buffered Saline (PBS :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10,1 mM ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM ; KCl 2,7 mM ; NaCl 140 mM pH 7,3 à 7,4) et centrifugés à  $1000 \times g$  pendant 15 min.

Les globules rouges sont dilués à 50% (v/v) et une suspension à 0,4% de PBS (DO 414 nm) est réalisée. Les surnageants de culture des souches à tester sont dilués dans du PBS sur un intervalle de concentration, de 2 en 2 dans une plaque de 96 puits à fond rond. Cent  $\mu\text{L}$  de suspension de globules rouges à 0,4% sont ajoutés à chaque puits. Un témoin négatif (100  $\mu\text{L}$  GR 0,4% + 100 $\mu\text{L}$  PBS) et un témoin positif (100  $\mu\text{L}$  PBS + Saponine 1%) + (100%  $\mu\text{L}$  GR 0,4%) sont utilisés. La plaque est recouverte de parafilm et incubée pendant 45 min à 37 °C. Elle est ensuite centrifugée sur Jouan BR4i multifonction rotor S20 (rotor avec des nacelles) à 1500 x  $g$  pendant 3 min. Enfin 100  $\mu\text{L}$  du surnageant sont transférés dans une plaque de 96 puits à fond plat (PS- microplaque Greiner bio-one Ref 655101) à l'aide de la pipette multi-canaux. La DO est lue avec Titertek Multiskan MC à 414 nm. La moyenne des valeurs de la DO des contrôles négatifs est calculée et soustraite de la moyenne des valeurs de DO de chaque souche testée. Le pourcentage d'hémolyse des globules rouges par chacune des souches est ensuite calculé. Nous avons considéré comme hémolytiques, les souches ayant hémolysées au moins 50% de globules à une dilution  $\geq$  supérieure ou égale au quart.

## 2.7. TEST D'ACTIVITE PROTEASE

L'activité protéasique des souches est recherchée en utilisant l'azocaséine comme substrat selon la méthode décrite par le fournisseur (Sigma). Le milieu réactionnel est constitué de 600  $\mu\text{L}$  de tampon (Tris-HCl 0,2 M, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8,0), 200  $\mu\text{L}$  d'asocaséine (25 g/mL) et 200  $\mu\text{L}$  de surnageant de culture de chaque souche. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 3 h. Deux cent  $\mu\text{L}$  d'acide trichloracétique (TCA) à 100% (p/v) sont ajoutés et le mélange est centrifugé pendant 5 min à 10000 x  $g$ . Un mL du surnageant est ensuite décanté dans une cuve puis 200  $\mu\text{L}$  d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 7,5 M sont ajoutés. La densité optique (DO) de la protéase colorée est déterminée par la mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 440 nm. La souche *S. lugdunensis* AACC51874 est utilisée comme témoin positif et du bouillon cœur cerveau sans culture bactérienne comme contrôle négatif. La moyenne des valeurs de la DO des contrôles négatifs est calculée et soustraite à la moyenne des valeurs de DO de chaque souche testée (DO spécifique). Les souches sont classées en quatre catégories selon la classification utilisée par Stepanovic et al. en 2000: non protéasique ( $\text{DOs} \leq \text{LD}$ ), faiblement protéolytique ( $\text{LD} < \text{DOs} \leq 2\text{LD}$ ), modérément protéolytique ( $2\text{LD} < \text{DOs} \leq 4\text{LD}$ ), très protéolytique ( $\text{DOs} > 4\text{LD}$ ). La limite de détection (LD) pour ce test est défini comme égale à 3x

\*Ecart-type de la moyenne des contrôles négatifs. Le test est répété trois fois pour chaque souche.

## **2.8. TEST D'ACTIVITE ESTERASE**

L'activité estérasique est recherchée sur une plaque contenant à la base, de la gélose d'extrait de levures enrichie à 1% de Tween 80, 0,1 g/l de CaCl<sub>2</sub>, 10 g/l de casaminoacides et du NaCl 5 g/l. Les souches à tester sont ensemencées en stries sur la gélose et incubées à 37 °C pendant 48 h. La formation d'un précipité blanc autour de la strie représente la précipitation de l'acide oléique libéré en présence de calcium. Ceci justifie de la production d'une estérase par la souche.

## **2.9. RECHERCHE DE GENES CODANT LES ENTEROTOXINES**

### **STAPHYLOCOCCIQUES ET LES COMPOSANTE GAMMA-HEMOLYSINE B**

#### **2.9.1. Extraction d'ADN génomique**

L'ADN est extrait à partir des souches de SCN cultivées sur gélose au sang et inoculées individuellement dans un bouillon BHI à 37 °C pendant 24 h. Le kit de purification d'ADN MasterPure™ (Epicentre, Le Perray en Yvelines, France) est utilisé pour l'extraction. Le surnageant de culture est éliminé et 150 µL de tampon TE sont ajoutés pour remettre en suspension le culot cellulaire. Un microlitre de Ready-Lyse lysozyme est ensuite ajouté et incubé à 37 °C pendant 30 min. Un microlitre de Proteinase K (50 µg/µL) et 150 µL de la solution Gram positif Lysis sont complétés aux 150 µL. Le mélange est mis en incubation à 65-70 °C pendant 15 min, puis vortexé brièvement toutes les 5 min. La mixture est refroidie à 37 °C et placée sur la glace pendant 3-5 min. Pour la précipitation des protéines, 175 µL de réactif de précipitation de protéines MPC sont ajoutés aux 300 µL d'échantillon lysés et le mélange est vortexé vigoureusement pendant 10 sec. Les débris sont sédimentés par centrifugation à 4 °C pendant 10 min à 12 000 x g dans une microcentrifugeuse. Le surnageant est transféré dans un microtube propre et 1 µL de RNase (5 µg/µL) est ajouté à chaque échantillon et incubé à 37 °C pendant 30 min. Cinq cents microlitres d'isopropanol sont ensuite ajoutés au surnageant pour la précipitation de l'ADN et le mélange est centrifugé à 4 °C pendant 10 min à 12 000 x g. Enfin, le culot est rincé avec 70% d'éthanol et laissé séché avant d'être remis en suspension dans 35 µL de tampon TE. La concentration et la pureté de l'ADN extrait est

déterminée au Nanodrop (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) par la lecture de l'absorbance à 260 et 280 nm grâce à la formule :

$$[\text{ADN}] (\mu\text{g} / \mu\text{L}) = A_{260} \times 0,0629 - A_{280} \times 0,036 \times \text{Facteur de dilution}$$

Le rapport de  $DO_{260 \text{ nm}} / DO_{280 \text{ nm}}$  doit être supérieur ou égal à 1,8. Un rapport de  $DO < 1,8$  indique une contamination par des protéines. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, Ce ratio  $A_{260}/A_{230}$  devrait être d'environ 2,2. Les ADN sont stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.9.2. Amplification d'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

**Principe :** La méthode d'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne a été mise au point par Saiki et collaborateurs (Saiki *et al.*, 1985). Elle permet la synthèse rapide et fidèle de copies multiples d'un ADN dit « matriciel » à partir d'un couple d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de l'ADN à amplifier. L'ADN contenant le fragment à amplifier est porté à une température supérieure à sa température de dénaturation ( $94-95^{\circ}\text{C}$ ) pour une durée de 30 s à 1 min, en présence des composés nécessaires à la réplication (amorces, Taq DNA Polymérase, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$ ). Cette température est ensuite abaissée pendant 30 sec à une min, à une valeur inférieure à la température de dénaturation de l'amorce possédant la plus faible température de dénaturation ( $45-68^{\circ}\text{C}$ ), afin que celle-ci puisse s'hybrider avec l'ADN dénaturé. La température est ensuite augmentée à  $72^{\circ}\text{C}$  pour permettre à l'ADN polymérase d'entamer l'élongation des amorces. La durée de cette étape varie en fonction de la longueur de la séquence à amplifier. Ces trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) constituent un « cycle » au cours duquel la quantité d'ADN ciblé a doublé. Ce cycle peut être répété 30 à 40 fois en fonction de la quantité d'ADN de départ et la longueur du fragment à amplifier.

**Méthode :** Les réactions sont effectuées dans un milieu contenant  $0,2 \mu\text{mol}$  de chaque amorce,  $1,25 \text{ U}$  de la Taq polymerase,  $200 \mu\text{M}$  de dNTP, du tampon de réaction  $10\text{X Taq}$  standard contenant  $200 \mu\text{M}$  de désoxyribonucléotide triphosphate,  $20 \text{ mM}$  de Tris-HCl (pH 8,4),  $1,5 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$  et  $500 \text{ ng}$  d'ADN de l'échantillon. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur (TC-3000X) programmé comme suit : un cycle de dénaturation initiale à  $92^{\circ}\text{C}$

pendant 2 min, trente-cinq cycles comprenant une dénaturation à 92 °C pendant 2 min, une hybridation d'amorce à 50 °C pendant 1 min et l'extension à 72 °C pendant 3 min. Un cycle d'extension finale à 72 °C pendant 1 min. Les produits d'amplification sont séparés sur un gel d'agarose à 2% (p/v) et colorés avec 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium avant l'observation des bandes aux UV en utilisant GelDoc2000 (Bio-Rad).

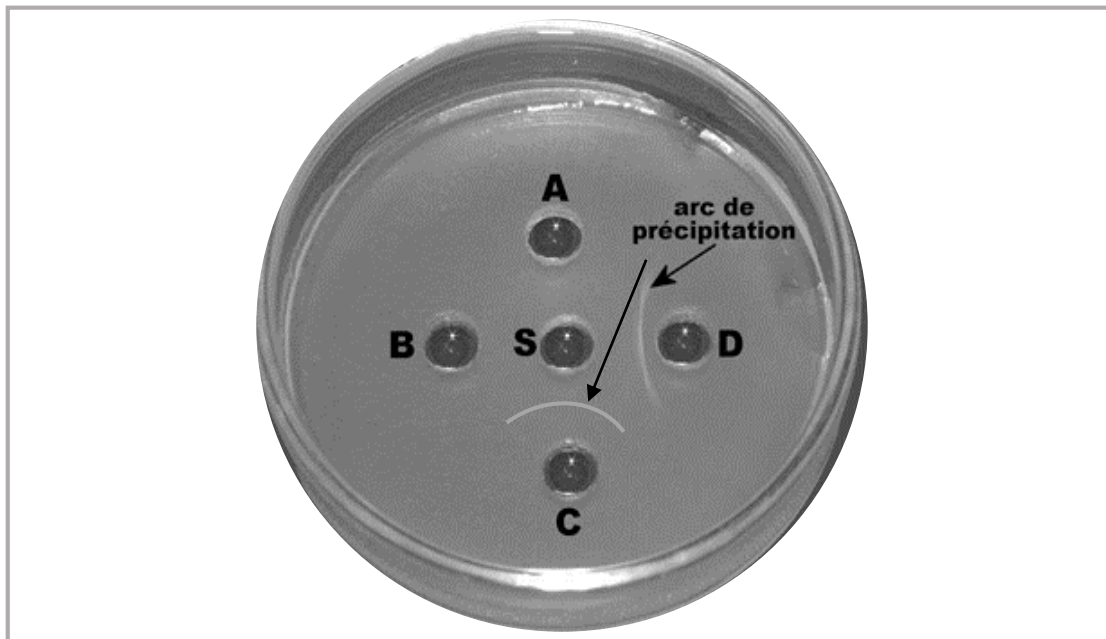
## 2.10. DETECTION DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINE

### 2.10.1. Test d'immunoprécipitation radiale

**Principe** : La méthode de double diffusion en gel d'Ouchterlony est une méthode d'immunoprécipitation fondée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu gélifié (gel d'agarose) à partir de puits placés en vis à vis. Lorsque les molécules d'anticorps rencontrent les molécules d'antigènes, la liaison antigène-anticorps conduit à la précipitation des complexes immuns dans la zone de rencontre si l'anticorps reconnaît l'antigène. Le précipité se forme dans la zone où les concentrations des deux solutions sont optimales pour que la quantité d'anticorps sature les sites antigéniques, c'est à dire la zone d'équivalence. Les précipités se présentent sous la forme d'un arc blanchâtre visible à l'œil nu (Figure 2.7). Le gel peut aussi être coloré au bleu de Coomassie pour une meilleure observation des arcs de précipitation.

**Méthode** : Les colonies fraîches de chaque échantillon sont mises en culture dans 500 µL d'YCP à 37 °C pendant 18h. Les surnageants de culture bactérienne sont récupérés après centrifugation à 5000 x *g* et déposés dans des puits préalablement creusés en rosaces dans du gel d'agarose à 0,6% PBS coulé dans une boîte de Petri. Quarante µL (2,25 µg/mL) d'anticorps polyclonal de lapin purifié par affinité anti SEC sont déposés dans le puits central et 40 µL (100 µg/mL) d'antigène SEC de *S. aureus* purifiés (témoin positif) déposés dans l'un des puits opposés à celui de l'anticorps. 40 µL de l'échantillon à analyser sont enfin posés dans le second puits face à celui de l'anticorps. La boîte est incubée toute une nuit à 4 °C. La présence ou non d'un arc de précipitation entre le puits de l'anticorps et celui de l'échantillon témoigne de la présence ou non de cette toxine dans le surnageant testé. Si les arcs de précipitation sont faibles, une coloration au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie R-250 0,1%, acide acétique 10%, méthanol 50%) suivi d'un bain de décoloration (acide acétique 10%, méthanol 50%) permet d'améliorer la lisibilité.





**FIGURE 2.7 : PHOTO ILLUSTRANT LE TEST D'IMMUNOPRECIPITATION RADIALE.**

Les puits A et B contiennent les surnageants de culture des bactéries ne produisant pas l'antigène recherché. Le puits C contient l'antigène SEC témoin. Le puits S, l'anticorps spécifique de l'antigène (anticorps anti-SEC) et le puits D, le surnageant de culture positive pour l'antigène testé. La présence d'arcs de précipitation entre les puits S et C d'une part et les puits S et D d'autre part est la preuve de la reconnaissance de l'antigène recherché par l'anticorps de détection.

### 2.10.2. Test d'agglutination passive reverse au latex (RPLA)

**Principe :** Il est basé sur l'agglutination des particules de latex sensibilisées par un antiserum de lapin anti-entérotoxines A, B, C ou D en présence de l'entérotoxine correspondante.

**Méthode :** Des puits de microplaques à fond conique sont inoculés avec 25  $\mu$ L du surnageant de culture. Ensuite, 25  $\mu$ L de solution de latex sensibilisé avec des anti-entérotoxine A, B, C ou D sont rajoutés. Des toxines standards sont utilisées comme témoins positifs. Les plaques sont finalement recouvertes de cellophane et les réactifs homogénéisés dans un micromélangeur pendant 3 min. Après incubation pendant 20 à 24 h à la température ambiante, les résultats sont observés à l'aide d'une loupe. Une réaction positive est observée par la présence d'une agglutination tapissant le fond du puits. La formation d'un bourgeon rose a été interprétée comme un résultat négatif.

### 2.10.3. Test du Western blot

**Principe :** Le Western blot, ou immunoblot, est une méthode de Biologie Moléculaire qui permet la détection de protéines spécifiques sur une membrane. La méthode est basée sur la construction d'un complexe anticorps-protéine par l'intermédiaire d'une liaison spécifique d'anticorps à des protéines immobilisées sur une membrane après leur transfert par SDS-PAGE sur cette dernière. L'anticorps lié est détecté avec l'une des méthodes de détection.

#### 2.10.3.1. Etape 1 : Dosage des protéines totales dans les surnageants de culture de *S. epidermidis* par la méthode de Bradford

**Principe :** C'est une méthode de dosage colorimétrique des protéines qui est basée sur la propriété du bleu de Coomassie de se lier spécifiquement aux protéines. Le bleu de Coomassie voit son absorbance maximale passer de 465 nm à 595 nm lorsqu'il est lié à une protéine. C'est une méthode rapide et facilitée par la stabilité de la densité optique du complexe colorant-protéine.

**Méthode :** Cent  $\mu\text{L}$  de surnageant de culture sont ajoutés à 700  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  et 200  $\mu\text{L}$  du réactif de Bradford (Bio-Rad). Une gamme d'étalon constituée d'une solution d'albumine sérique bovine (BSA) (0 / 2 / 7 / 10 / 12 / 17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a permis de tracer une courbe d'étalonnage. La densité optique à 595 nm de l'échantillon est mesurée au spectrophotomètre dans les 30 min après l'ajout du réactif de Bradford. La concentration totale en protéines de l'échantillon est estimée en utilisant la droite de régression  $y = ax + b$ . Avec "y" l'absorbance à 595 du bleu de Coomassie, "x" la concentration en SEC et "b" la valeur de l'ordonnée à l'origine.

#### 2.10.3.2 Etape 2 : SDS-PAGE

**Principe :** L'électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium ou Polyacrylamide gel electrophoresis sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) est une technique qui permet de séparer des protéines selon leur masse moléculaire. Le SDS est un détergent anionique qui se lie par interaction hydrophobe aux protéines et leur confère une charge nette négative, avec une densité de charge homogène (1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). La migration électrophorétique en SDS-PAGE devient donc uniquement fonction de la masse moléculaire. La matrice est constituée d'un gel d'acrylamide et de bis-acrylamide polymérisés. Une concentration élevée en acrylamide crée une maille serrée adaptée à la séparation de protéines de faible masse moléculaire, et inversement. Un gel de concentration (« stacking gel

»), au niveau des puits de dépôt des échantillons, permet une concentration de protéines, et ainsi d'augmenter la résolution de la séparation. La présence de SDS dénature aussi les protéines et facilite leur migration. La sensibilité de la méthode est de l'ordre de 10 ng colorée au bleu de Coomassie.

**Méthode** : 60 ng du surnageant de culture sont chauffées au bain-marie 5 min à 95 °C en présence du tampon (contenant 2.5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol) et de H<sub>2</sub>O qsp 50  $\mu$ L. La SEC de *S. aureus* est utilisée comme témoin positif. Le SDS-PAGE est assisté par un système « Mini Protean® Tetra Electrophoresis Cell ». Seize  $\mu$ L des échantillons et 10  $\mu$ L du marqueur de masse moléculaire sont déposés sur un gel prêt à l'emploi composé de 12% polyacrylamide (Ready gel® precast gels, BioRad) pendant 30-35 min de migration à 200 V. Après le SDS-PAGE, on note la présence d'une échelle du marqueur de masse moléculaire.

### 2.10.3.3 Etape 3 : Transfert de la protéine du gel vers la membrane

Le transfert électrique de la protéine du gel à la membrane (Immobilon®) se fait selon les instructions du fabricant de la cuve de transfert (Trans-blot® Turbo™ Transfert System, BioRad). Le sandwich de transfert est assemblé dans la cassette de transfert de manière à ce que la membrane soit placée sur l'anode et le gel sur la cathode. La cassette est introduite dans le réservoir de transfert pendant 7 min sans tampon (transfert semi-sec).

### 2.10.3.4. Etape 4 : Incubation des anticorps ou immunoBlot

Après le transfert, la membrane est saturée dans du PBS 1X-Tween 20 à 0,05%-BSA 3% pendant au moins une heure et lavée au PBS 1X-Tween 0,05% pendant 5 min sous agitation. Elle est ensuite incubée dans 30 mL d'une solution de PBS 1X contenant 2  $\mu$ g/mL d'anticorps primaire de lapin anti-SEC de *S. aureus*, purifiés par affinité et 1% de BSA pendant 2 h sous agitation. Après trois lavages au PBS-Tween 0,05% la membrane est replongée dans 20 mL de PBS 1X contenant des anticorps secondaires de chèvre anti lapin couplés à la peroxidase (Sigma), dilués au 1/500<sup>e</sup> mL et 1% de BSA pendant 2 heures sous agitation.

### 2.10.3.5. Etape de révélation

Après trois rinçages de 5 min de la membrane au PBS-Tween 0,05%, l'anticorps secondaire marqué par la peroxidase et lié à la protéine d'intérêt est détecté par une technique de colorimétrie avec une solution de 2,5 mL de chloro 4-naphthol (4CN) diluée dans 12,5 mL de

PBS 1X et 15  $\mu\text{L}$  d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La lecture des bandes est faite après 30 min. Cette réaction est stoppée par le rinçage de la membrane à l'eau.

## 2.11. CLONAGE, EXPRESSION ET PURIFICATION DU GENE CODANT

### L'ENTEROTOXINE STAPHYLOCOCCIQUE C DE *S. EPIDERMIDIS* ( $\text{SEC}_{\text{epi}}$ )

#### 2.11.1. Clonage de $\text{sec}_{\text{epi}}$

**Choix du vecteur :** Le plasmide pGEX-6P-1 (GE Healthcare) a été choisi pour produire les protéines de fusion. Ce système utilise la Glutathion S-transférase (GST) pour permettre l'expression et la purification des protéines recombinantes produites dans *E. coli*. Le système est basé sur l'expression inductible de la protéine de fusion contenant la GST en N-terminal et la protéine d'intérêt en C-terminal. Cette dernière s'accumule en grande quantité dans le cytoplasme des cellules.

**Principe :** La protéine de fusion à la GST est construite en insérant un fragment de gène dans le site de clonage du vecteur pGEX-6P-1 (GE Healthcare). L'ADN est amplifié par PCR avec des amorces contenant des sites de restriction appropriés de façon à pouvoir cloner le gène d'intérêt entre ces sites dans le vecteur d'expression en phase avec la séquence codant la GST.

##### 2.11.1.1. Ligation de $\text{sec}_{\text{epi}}$ dans le plasmide pGEX-6P-1

**Principe :** Le principe est basé sur l'insertion du fragment d'intérêt dans le plasmide sous l'action de la ligase après son clivage par une ou plusieurs enzymes de restriction.

**Méthode :** Le gène  $\text{sec}_{\text{epi}}$  est amplifié par PCR avec des amorces contenant des sites de clivage des enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI pour faciliter son insertion dans le plasmide. Pour présenter des extrémités compatibles, les ADN (l'amplicon et plasmide) sont digérés avec *Bam*HI et *Eco*RI selon le protocole suivant :

2  $\mu\text{g}$  d'ADN

2  $\mu\text{L}$  *Eco*RI

2  $\mu\text{L}$  *Bam*HI

15  $\mu\text{L}$  du tampon compatible au deux enzymes (Tampon K)

150  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  qsp

Incubation 1h à 37 °C

Remettre : 43  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 5  $\mu\text{L}$  tampon K, 1 $\mu\text{L}$  *EcoRI*, 2  $\mu\text{L}$  *BamH1*. Incubation 1h à 37 °C. Pour empêcher le plasmide de se recirculariser sur lui-même après son traitement par les enzymes, une déphosphorylation est pratiquée par ajout d'un microlitre de phosphatase alcaline d'insertion de veau pendant 1h à 37 °C, CIP (Biolabs, NewsEngland) qui enlève les groupements 5'phosphate nécessaire à la liaison avec les extrémités 3'-hydroxylées.

L'amplicon digéré est ensuite purifié avec le kit de purification "EZ Spin Column PCR Produits" (Euromedex, France) selon les recommandations du fabricant et le plasmide digéré, déphosphorylé est purifié au phénol-chloroforme (200  $\mu\text{L}$  de phénol + 400 mM NaCl + 3 volumes d'éthanol froid, incubation à -20 °C pendant 20 min, centrifugation à 4 °C et 3 lavages à l'éthanol 70 °C, séchage et remise en suspension dans 20  $\mu\text{L}$  de TE).

**Ligation proprement dite :** La réaction est catalysée par la T4 ADN ligase, une enzyme capable de former une liaison phosphodiester entre les extrémités 5'-phosphate et 3'-OH des deux fragments d'ADN et mise en oeuvre dans un volume final de 15  $\mu\text{L}$  contenant 1,5  $\mu\text{L}$  de tampon de ligation, 0,2 unité (0,5  $\mu\text{L}$ ) de T4 ADN ligase, 1  $\mu\text{L}$  de pGEX (10 ng/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  d'insert (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) et 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Le mélange est incubé à 14 °C pendant 16 h avant d'être utilisé pour la transformation.

### 2.11.1.2. Transformation du pGEX recombiné dans *E. coli* XL1 Blue par la méthode de choc thermique

**Principe :** Les *E. coli* XL1 sont des bactéries rendues artificiellement compétentes, leur permettant d'être capable d'intégrer un ADN étranger. Un choc thermique est utilisé pour perforer la membrane pour le passage du plasmide.

**Méthode :** La suspension d'*E. coli* XL1 (Stratagène) est décongelée sur de la glace, et 60  $\mu\text{L}$  sont additionnées de 1,7  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercapto-éthanol à 1,4 M dans un tube de 1,5 mL. Le mélange est laissé à 4 °C pendant 10 min puis complété de 15  $\mu\text{L}$  du milieu de ligation puis de nouveau incubé à 4 °C pendant 30 min. Un choc thermique de 45 s à 42 °C au bain marie permet l'incorporation du plasmide par les bactéries, qui sont ensuite remises à 4 °C pendant 2 min, avant d'être étalées sur milieu gélosé TY supplémenté à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ampicilline. La boîte de Petri est incubée une nuit à 37 °C, éventuellement prolongée jusqu'à 24h en l'absence de colonies. Ces bactéries transformées permettront la multiplication du vecteur recombinant.

### 2.11.1.3. Criblage de transformant et contrôle de l'insert

Le criblage de transformant est réalisé par la restriction. Ainsi une dizaine de clones sont sélectionnés à partir desquels des mini-préparations d'ADN sont ensuite digérées avec les enzymes correspondant aux sites de restriction du clonage. Le produit de digestion est ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les clones ayant intégré un plasmide muni de l'insert souhaité montreront deux bandes après digestion. Une bande de 4984 bp représente le vecteur linéarisé et une autre de 807 bp représente le gène *sec*. Le sens d'insertion du fragment d'intérêt dans le vecteur est contrôlé par le séquençage du plasmide.

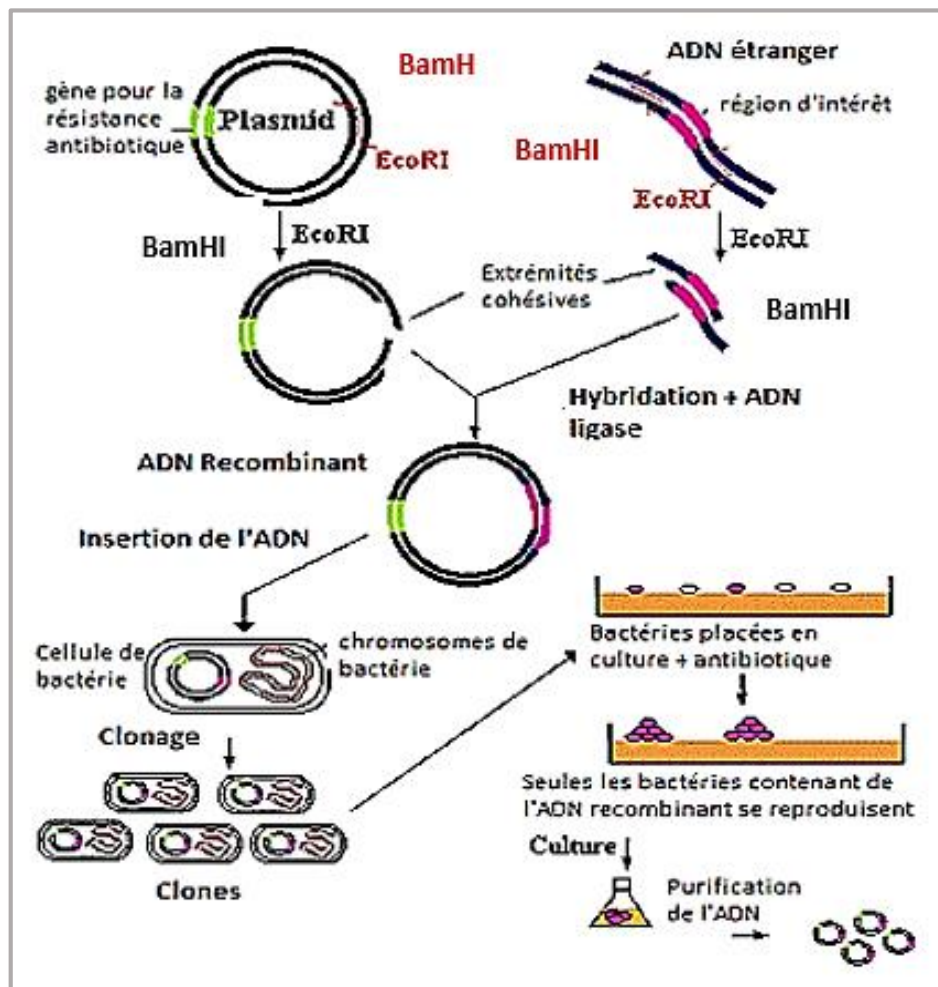


FIGURE 2.8 : SCHEMA ILLUSTRANT LES ETAPES DE CLONAGE DU GENE *SEC* DE *S. EPIDERMIDIS* DANS *E. COLI XL1*.

### 2.11.1.4. Mini-préparation d'ADN plasmidique

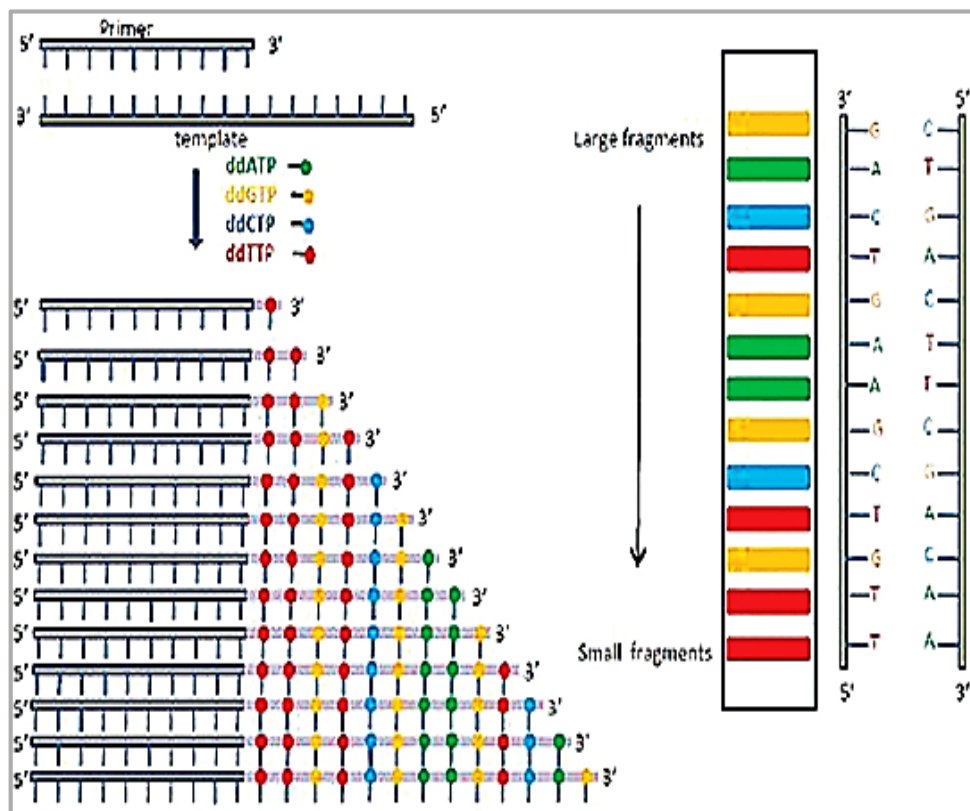
**Méthode :** Le protocole de mini-préparation d'ADN plasmidique est adapté de celui de Pelham (Pelham, 1985). Après transformation, les colonies sont inoculées dans 5 mL de milieu TYA contenant 100 µg/mL d'ampicilline, puis incubées 1 nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain,

chaque clone est repiqué sur boîte TY par sécurité. La suspension de bactéries est centrifugée 5 min à 5000 x *g*, puis le surnageant est éliminé. Le culot bactérien est resuspendu dans 100 µL de TEG (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, pH8.0, RNase A 20 µl/mL). Les bactéries subissent une lyse alcaline avec une solution de SDS+NaOH suivi d'une neutralisation et d'une précipitation du SDS par 120 µL chlorure d'ammonium-potassium. Après une centrifugation de 10000 x *g* pendant 5 min, trois cents µL du surnageant sont à nouveau transférés dans un microtube contenant 400 µL de phénol - chloroforme isoamyl alcool (24 :24:1), puis mélangés. Après centrifugation pendant 5 min à 10000 x *g*, la phase aqueuse est transférée dans un microtube contenant 800 µL d'éthanol 100 % à 4 °C, puis l'ADN est précipité à -20 °C pendant 2h. L'ADN plasmidique précipité est culoté par centrifugation 10 min à 10000 x *g*, et lavé trois fois par centrifugation dans 1 mL d'éthanol 70% à 4 °C, afin de le débarrasser des sels. Après une dernière centrifugation 10 min à 10000 x *g*, l'alcool est éliminé, et le culot séché à l'air libre avant d'être resuspendu dans 30 à 50 µL de TE. La concentration en ADN est estimée au NanoDrop (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) par lecture de l'absorbance à 260 et 280 nm.

### 2.11.1.5. Séquençage Sanger

**Principe** : Le séquençage de Sanger, également connu en tant que « séquençage par terminaison de chaîne » ou « séquençage dideoxy », fait référence en matière de séquençage de l'ADN depuis son invention dans les années 1970. La technique « dideoxy » est basée sur la synthèse du brin d'ADN complémentaire à un brin d'ADN matrice. La réaction de séquençage fait appel à des désoxynucléosides triphosphates (dNTP) normaux et à des didésoxynucléosides triphosphates (ddNTP) modifiés pour l'élongation de brin. Les ddNTP sont chimiquement modifiés par un marqueur fluorescent et par un groupement chimique inhibant la formation de liaisons phosphodiester, ce qui entraîne la fin de l'extension de l'ADN par l'ADN polymérase à chaque fois qu'un ddNTP est incorporé. Les fragments d'ADN obtenus sont soumis à une électrophorèse capillaire durant laquelle les fragments migrent à différentes vitesses à travers une matrice de gel en fonction de leur taille. Chacun des quatre ddNTP modifiés est porteur d'un marqueur fluorescent distinct. Le signal fluorescent émis par chaque colorant fluorescent excité détermine l'identité du nucléotide dans la matrice d'ADN d'origine (Figure 2.9).

**Méthode** : Dix µL de plasmide à 80-100 ng/µL sont préparés dans un microtube de 500 µL en présence 5 µL à 5 pM d’amorce spécifique du vecteur en vue d’obtention par amplification de plasmides simples brins. Le séquençage est réalisé par la plateforme de séquençage de GATC, France. Les plasmides sont séquencés, afin de vérifier la présence et le sens d’insertion du gène d’intérêt cloné. D’autre part, le gène *sec* porté par les SCN de notre étude est séquencé et comparé avec les séquences de référence. Les alignements multiples de séquences nucléotidiques et protéiques sont effectués avec le programme CLUSTALW disponible sur le site [www.infobiogen.fr/services/analyseseq](http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq).



**FIGURE 2.9 : ILLUSTRATION DE LA TECHNIQUE DE SEQUENÇAGE SANGER.**

Le séquençage de Sanger implique un oligonucléotide court qui agit comme amorce pour la synthèse de nouveaux brins d'acide désoxyribonucléique (ADN) complémentaire d'un modèle monocaténaire. Quatre ddNTP (chacun étiqueté avec une étiquette fluorescente de coloration différente) sont présents et l'allongement de la chaîne s'arrête lorsqu'un ddNTP est inséré. Un mélange de chaînes d'ADN avec différentes longueurs sera généré et suivi par la séparation de l'ADN, en fonction de sa taille en utilisant une électrophorèse sur gel. La séquence d'ADN est décodée à partir du motif de couleurs, ce qui correspond à la séquence nucléotidique).



## 2.11.2. Expression de la protéine de fusion à la GST par *E. coli*: méthode d'induction à l'Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)

### 2.11.2.1. Transformation d'*E. coli* BL21

**Principe** : La première étape consiste à utiliser le plasmide contenant le gène de l'entérotoxine d'intérêt pour transformer un *E. coli* adapté à la synthèse protéique : *E. coli* BL21. Ces bactéries sont rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium. En effet, en présence d'une solution concentrée en ions calcium, la structure des membranes cellulaires va être altérée entraînant la création de plusieurs micro-perforations par lesquelles de petites molécules d'ADN comme un plasmide pourront pénétrer les cellules.

**Méthode** : Une culture de 100 mL d'*E. coli* BL21 en milieu TY x 2 est incubée une nuit à 37 °C, sous agitation à 200 rpm jusqu'à DO600nm = 0,5 - 0,7. La culture est centrifugée 10 min à 2.500 x *g*. Le culot est resuspendu dans 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM stérile. Les bactéries sont de nouveau centrifugées à 2500 x *g* pendant 10 min à 4 °C. Le culot est remis dans 2,5 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Puis 1  $\mu$ g de plasmide pGEX-6P-1 est ajouté à 150  $\mu$ L d'*E. coli* BL21 compétentes. Les bactéries sont incubées 40 min à 4 °C, puis subissent un choc thermique de 2 min à 42 °C, et sont immédiatement refroidies pendant au moins 2 min à 4°C. Les bactéries transformées sont étalées sur milieu gélosé TY-ampicilline, puis incubées une nuit à 37 °C.

### 2.11.2.2: Expression cytoplasmique de la protéine de fusion

**Principe** : L'expression de la protéine de fusion (GST-SEC<sub>epi</sub>) est sous contrôle du promoteur *ptac*, situé en amont du gène codant la GST. Il s'agit du promoteur de l'opéron lactose, réprimé dans la souche *E. coli* BL21 par le gène *lacIq* (répresseur de l'opéron lactose) présent sur le plasmide. Mais l'inhibition peut être levée par induction avec un analogue structural du lactose : l'Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside (IPTG). Le niveau de surexpression est évalué dans un premier temps pour calculer le volume de culture nécessaire et dans un second temps pour la purification de la protéine de fusion.

**Méthode** : Une colonie d'*E. coli* BL21 transformée avec un pGEX-6P-1 recombiné est utilisée pour inoculer 100 mL de TY-A, puis cultivée sous agitation à 37 °C jusqu'à DO 600nm = 0,5 (environ 4 - 6h). La culture est alors en début de phase exponentielle, et la synthèse de la protéine de fusion est induite par l'ajout de 0,2 mM d'IPTG, et cultivée à 25-30 °C pendant 1

nuit. Après centrifugation 10 min à 5000 x *g*, le culot bactérien est remis dans 3 mL de tampon A (PBS-EDTA 1mM). Une étape de congélation à -20°C puis décongélation du culot fragilise les bactéries avant l'ajout de 1-3 mL du tampon A ou du PBSx1 et la lyse bactérienne aux ultrasons ou à la French Press (French Pressure Cell Press, SLM AMINCO®) sous une pression de 600 bars dans de la glace. Le lysat broyé est centrifugé 2 min à 10000 x *g*, puis l'estimation du niveau de production est réalisée par le dosage de GST.

**Dosage de l'activité enzymatique de la GST :** La construction plasmidique permet la production de SEC<sub>epi</sub> fusionnée à la GST. Le dosage par une méthode cinétique de la GST permet d'estimer la concentration en protéine de fusion. La GST catalyse une réaction de transfert du Glutathion (GSH) sur le CNDB (Chloro-1, 2, 4 dinitrobenzène, CNDB-GSH), dont l'absorbance peut être mesurée au spectrophotomètre à 340 nm (Habig *et al.*, 1974), tandis que le CNDB libre absorbe au maximum à 270 nm. La cinétique s'effectue dans une cuve spectrophotométrique. Le milieu réactionnel contient :

Eau distillée	880 µL
Tampon de réaction x 10 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M, pH 6,5)	100 µL
CNDB (100 mM dans de l'éthanol)	10 µL
Glutathion réduit (100 mM dans de l'eau distillée)	10 µL
Lysat dilué au 1/10 dans du tampon A, ajouté extemporanément	10 µL

L'absorbance à 340 nm est mesurée au spectrophotomètre M330 (CamSpec, Cambridge, GB) toutes les min pendant 5 min contre un témoin contenant tous les éléments sauf les 10 µL de lysat qui sont remplacés par 10 µL d'eau distillée (le blanc). Cette réaction est linéaire jusqu'à une DO<sub>340nm</sub> = 0,8. Si la réaction est trop rapide, la concentration en GST doit donc être ajustée en conséquence (diluer le lysat) pour que la réaction reste linéaire durant 5 min.

**Calcul de la concentration en GST :** la concentration en GST est proportionnelle, dans ces conditions, à la vitesse de réaction (DO/min) initiale selon la relation suivante :

$$[GST] = v \cdot k^{-1} \cdot FD$$

Avec :

[GST] = concentration en GST recherchée

v = pente de la DO= f (temps)

k = constante cinétique = 1/545 (DO/min/µg/mL)

FD = facteur de dilution

### 2.11.2.3. Surexpression de la protéine de fusion pour purification

Les conditions de culture sont les mêmes que pour l'estimation du niveau de production, seul le volume change. Deux Erlenmeyers de 2 L contenant 400 mL de milieu TY-A sontensemencés chacun par 100 mL d'une préculture d'*E. coli* BL21 transformé, puis incubés à 37°C sous une agitation à 200 rpm. Lorsque la DO 600nm atteint 0,5, l'expression du gène de fusion est induite avec 0,2 mM d'IPTG durant une nuit à température ambiante. Le lendemain, les bactéries sont centrifugées 10 min à 7000 x *g* à 4°C. Le culot est resuspendu dans 35 mL de PBS. Les bactéries sont ensuite lysées à la French Press (French Pressure Cell Press, SLM AMINCO®) sous une pression de 600 bars. Le lysat bactérien est centrifugé pendant 30 min à 29000 x *g* à 4°C dans un rotor JA20 (Beckman) et le culot est récolté et stocké à -20 °C jusqu'à sa purification. Un aliquote de 100 µL de surnageant servira à un dosage GST de contrôle.

### 2.11.3. Purification de SEC<sub>epi</sub> fusionnée avec la GST

#### 2.11.3.1. Etape 1 : Purification par chromatographie d'affinité à l'aide du glutathion Sepharose 4B GSH (GE Healthcare)

**Principe** : La chromatographie d'affinité discrimine les molécules en fonction de leur affinité pour le ligand fixé en phase stationnaire. La constante d'affinité,  $K_A$ , mesure l'affinité d'un ligand vis-à-vis d'une macromolécule :

$$K_A = \frac{\text{macromolécule-ligand}}{[(\text{macromolécule}) \cdot (\text{Ligand})]}$$

Dans ce contexte, le principe est basé sur l'affinité de la GST pour la GSH. La GST est couplée à une résine [glutathion réduit (GSH)-Sepharose 4B™ (GE Healthcare)].

**Méthode** : 4 mL de résine sont d'abord équilibrés avec 30 mL PBS. Le volume *V* de lysat à décongeler et à purifier est déterminé en fonction de la concentration obtenue lors du dosage de la GST. Le lysat clarifié est mélangé avec la résine (c'est-à-dire en batch), tel que la quantité de GST soit de 4 mg/mL de résine. Le batch est agité pendant 30 min à 4°C, puis centrifugé 10 min à 200 x *g* et ensuite décanté à 2 volumes de gel. Le gel est coulé dans une colonne d'affinité et lavé avec 20 mL de PBS ou de tampon A jusqu'à  $DO_{280} < 0,1$ . La protéine de fusion est éluée avec 2 volumes de gel avec du tampon B en fractions de 2 mL (5-6 fractions). Les

différentes fractions sont récoltées et leur densité optique est mesurée à 280nm. La  $DO_{280nm}$  des fractions permettra de sélectionner les fractions à conserver et à rassembler (généralement les fractions 2 à 4 pour les entérotoxines). La présence de la protéine d'intérêt peut être vérifiée par immunoprécipitation avec un anticorps anti-SEC de *S. aureus* disponible dans laboratoire. La résine est lavée par 2 volumes de tampon B, 2 volumes de tampon C, 2 volumes de tampon A, et enfin de 2 volumes d'éthanol 20% dans l'eau qui permettra de stocker la colonne à 4°C en évitant les contaminations microbiennes.

### 2.11.3.2. Etape 2 : clivage de la protéine de fusion par la PreScission®

#### Protease (GE Healthcare)

**Principe :** La PreScission® Protease (GE Healthcare) est une protéine constituée par la fusion de la protéase 3C du rhinovirus humain de type 14 et de la GST de *Shistosoma japonicum*. Cette protéase a une masse moléculaire de 46 kDa. La séquence reconnue par la PreScission® Protease est : Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro. Elle effectue une hydrolyse entre la Glutamine et la Glycine. Son maximum d'activité se situe entre pH 7,0 et 8,0 et à basse température (5 à 15 °C).

**Méthode :** La coupure endoprotéasique est réalisée par l'ajout de 10 µl (20u) de PreScission® Protéase pour 16 mg de protéine de fusion à incuber une nuit à + 4°C.

### 2.11.3.3. ÉTAPE 3 : DIALYSE

**Principe :** La protéine SEC<sub>epi</sub>, clivée de la GST, est séparée de celle-ci par une membrane semi-perméable dont les pores ont une taille inférieure à la taille de la protéine.

**Méthode :** l'éluât est dialysé contre 2 L de PBS pendant 2h au minimum à 4°C dans une membrane (Spectra/Por1, Spectrum Laboratories) de 1,7 mL/cm pour éliminer la GSH. Il est ensuite passé sur la même colonne utilisée pour la chromatographie pour séparer la GST de la protéine d'intérêt par élution isocratique. On obtient alors de la protéine SEC<sub>epi</sub> pure.

### 2.11.4. Contrôles qualité et quantité et de la protéine SEC<sub>epi</sub> purifiée

Le contrôle de la masse et de la pureté de la protéine est réalisé par SDS-PAGE. Son identité est confirmée par immunoprécipitation radiale ou par Western Blot tandis que la concentration de la protéine est déterminée par un dosage spectrophotométrique.

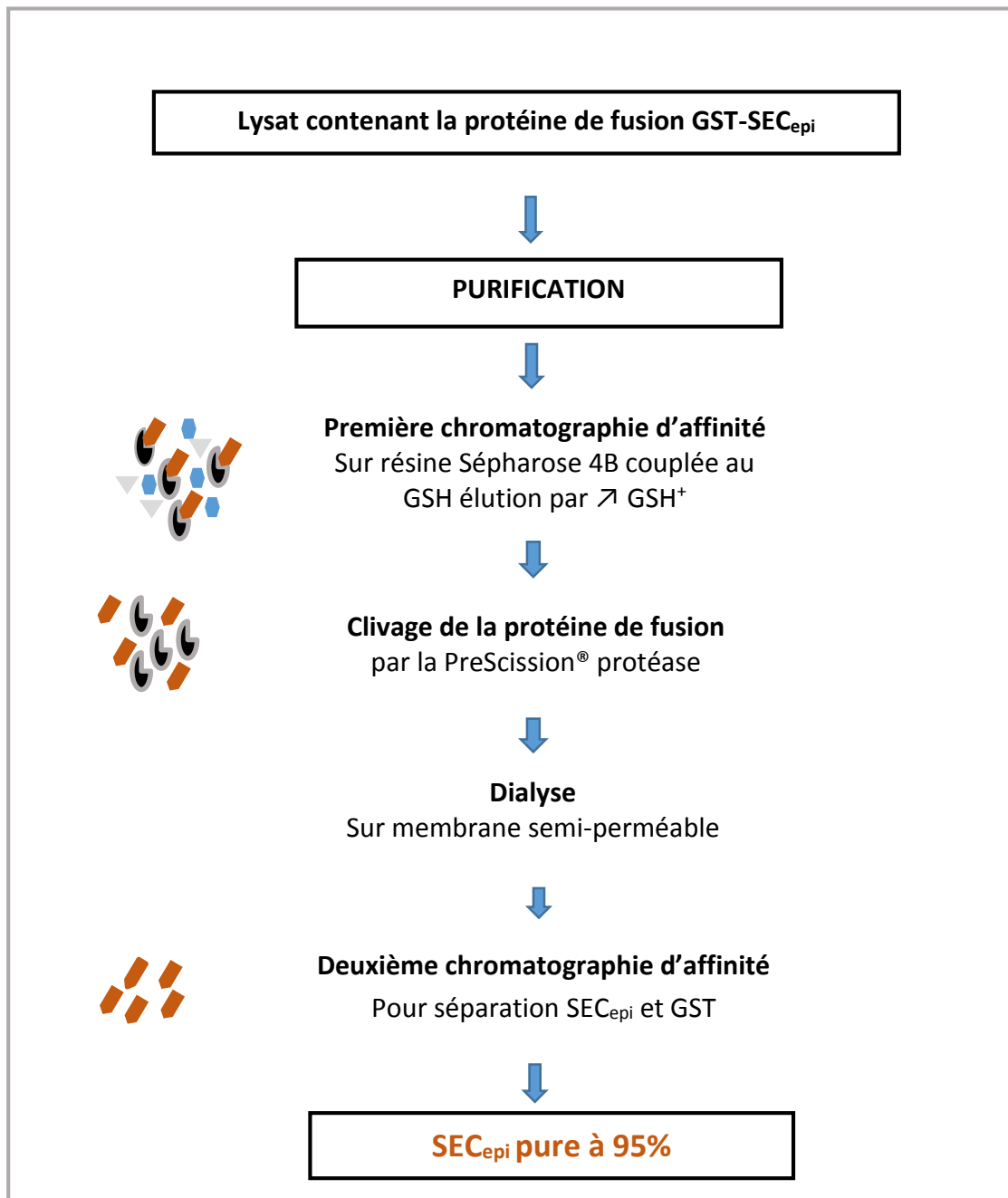


FIGURE 2.10 : SYNTHÈSE DE LA MÉTHODE DE PURIFICATION DE SEC<sub>EPI</sub>.

## 2.12. DETERMINATION DE LA STABILITÉ DE SEC<sub>EPI</sub>

### 2.12.1. Test de stabilité à la chaleur

Pour étudier la stabilité de la protéine purifiée en présence d'un traitement thermique, 300  $\mu$ L de la toxine à 100  $\mu$ g/mL dans du PBS sont maintenus à 100 °C sur une plaque chauffante, à des intervalles de temps désirés (1 à 10 h). Les tubes sont refroidis dans un bain de glace pendant 5 min puis placés à -20 °C. L'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma, St. Louis, MO) et

*S. aureus* SEC purifiée ont été utilisées respectivement comme témoin négatif protéique et témoin positif. Les produits de digestion sont enfin migrés en SDS-PAGE.

### 2.12.2. Test de stabilité aux enzymes gastro-intestinales

Chaque protéine (100 µg/mL) est incubée à 37 ° C avec de la trypsine (10 µg/mL) dans du Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 dans un volume final de 0,5 mL. Après l'incubation à des intervalles de temps allant de 1 à 10 h, la digestion est arrêtée par traitement des échantillons à 95 ° C pendant 5 min. Les tubes sont immédiatement stockés à -20 ° C. Les produits de digestion sont enfin migrés en SDS-PAGE.

SEC<sub>epi</sub> purifiée, SEC de *S. aureus* ou BSA sont incubées en présence de pepsine (Sigma-Aldrich, France). Chaque protéine à 100 µg/mL a été incubée avec de la pepsine (10 µg/mL) dans un volume final de 300 µL de tampon 0,1 M d'acétate de sodium, pH 4,0, à 37 °C. Après incubation pendant les périodes désirées d'intervalles de temps allant de 1 à 10 h. Les tubes sont enlevés et la digestion est arrêtée par traitement à 95 °C pendant 5 min. Les tubes ont été immédiatement stockés à -20°C.

## 2.13. DETERMINATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE SEC<sub>epi</sub>

### 2.13.2. Test de prolifération lymphocytaire par la détermination en

#### Colorimétrie de l'incorporation du 5-bromo-2'- déoxyuridine

**Principe :** La détection de l'incorporation du 5-bromo-2'- déoxyuridine dans les brins d'ADN néosynthétisés est basée sur une réaction ELISA utilisant un anticorps anti-BrdU couplé à la peroxidase. Le complexe immun formé est détecté par un substrat (tétraméthyl-benzidine) au spectrophotomètre.

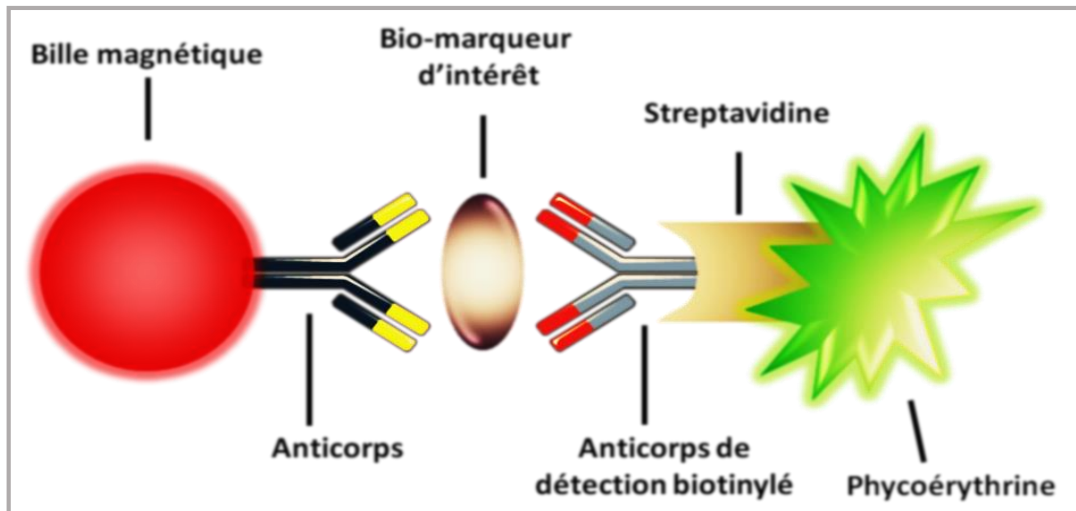
**Méthode :** Les hPMBCs purifiés ( $2 \times 10^6$  cellules/ mL, 0,2 mL) sont stimulés avec rSEC<sub>epi</sub> ou SEC<sub>aureus</sub> à une concentration de  $10^{-1}$  à  $10^3$  ng /mL à 37 °C dans un incubateur CO<sub>2</sub> à 5%. Après incubation pendant 48 h, 10 µM de BrdU sont ajoutés et les cellules sont réincubées (16-24h). La prolifération cellulaire est testée par la mesure du BrdU qui a été incorporée dans les brins d'ADN nouvellement synthétisés dans les cellules en division en incubant les cellules pendant 1h30 min avec un anticorps anti-BrdU-POD comme décrit par le fabricant. Après l'élimination de l'anticorps non fixé, 100 µl du substrat sont ajoutés pendant 10min et la réaction arrêtée

avec 25  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique. L'absorbance des échantillons est mesurée dans un lecteur ELISA à 450 nm /690 nm.

### 2.13.3. Dosage multiplex de cytokines par Bio-Plex

**Principe** : Le test de dosage de cytokines par Bio-Plex<sup>®</sup> est essentiellement un dosage immunologique effectué sur des billes magnétiques. Le principe du dosage est similaire à un ELISA en sandwich (Figure 2.11). Des anticorps dirigés contre le bio-marqueur d'intérêt sont couplés d'une manière covalente aux billes. Les billes couplées aux anticorps réagissent avec les molécules d'intérêt dans l'échantillon. Suite à une série de lavages pour éliminer les protéines non-liées, un anticorps de détection couplé à la biotine est ajouté pour former un complexe en sandwich. Le complexe de détection final est formé suite à l'addition d'un conjugué streptavidine-phycoérythrine (SA-PE). La phycoérythrine sert de marqueur fluorescent.

Les données des réactions sont acquises par un système Bio-plex 100. Un laser rouge (635 nm) illumine les marqueurs fluorescents de chaque bille pour effectuer une classification et une identification des billes. Parallèlement, un laser vert (532 nm) excite la PE pour générer un signal détecté par le tube photomultiplicateur (PMT). Un processeur numérique à grande vitesse gère les données de fluorescence, puis le programme Bio-Plex Manager<sup>™</sup> présente les résultats sous forme d'intensité médiane de fluorescence (MFI) et sous forme de concentration (pg/mL). La concentration de la molécule d'intérêt liée à chaque bille est proportionnelle à la MFI du signal fluorescent de la PE.



**FIGURE 2.11 : IMMUNO-MARQUAGE EN SANDWICH POUR LE DOSAGE BIO-PLEX (MANUEL BIORAD).**

**Méthode** : Les lymphocytes purifiés sont mis en suspension à  $2 \times 10^6$ /mL dans du RPMI complet et incubés en présence de différentes concentrations d'entérotoxines pendant 48h à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub>. La suspension cellulaire est centrifugée 6 min à 1 700 x g et les surnageants collectés sont congelés à -80°C jusqu'au dosage de cytokines.

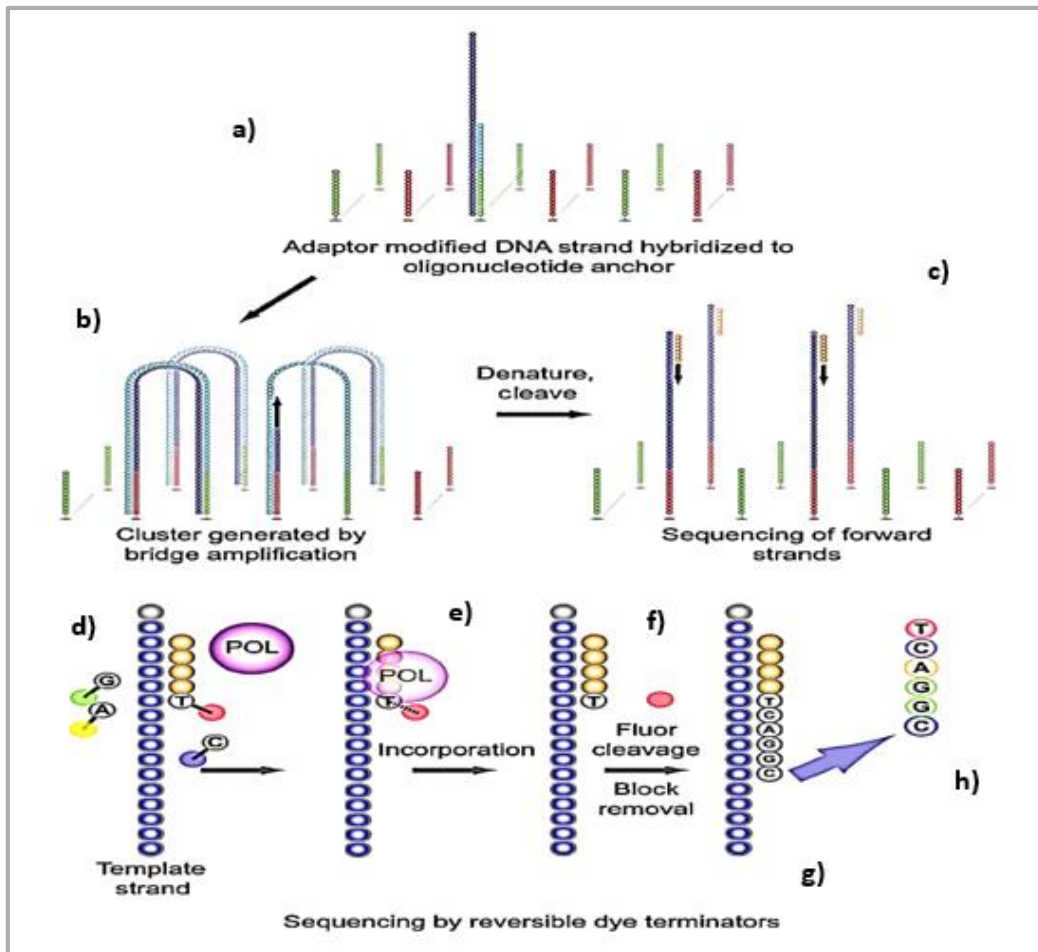
Pour le dosage, l'étalon lyophilisé est reconstitué dans 500 µL de RPMI complet et incubé 30 min dans la glace. La gamme étalon constituée de 8 points est préparée par des dilutions au quart à partir d'une dilution de 72/200 µL du standard reconstitué, puis les billes sont diluées au 1/10. Le filtre au fond de la plaque 96-puits est mouillé avec 100 µL de tampon de dosage. Cinquante µL de billes sont déposés dans tous les puits qui sont ensuite lavés 2 fois avec 100 µL de tampon de dosage. Cinquante µL de la gamme standard, blancs et échantillons sont ajoutés dans les puits correspondants. La plaque est incubée 30 min à l'obscurité à température ambiante (TA) sous agitation à 300 rpm. Les anticorps de détection biotinylés sont dilués dans le tampon de dilution de l'anticorps. Les puits sont lavés 3 fois avec 100 µL de tampon de dosage puis 25 µL d'anticorps 1x sont rajoutés dans les puits. La plaque est ensuite recouverte et incubée 30 min à l'obscurité à TA sous agitation à 300 rpm. Pendant ce temps, le protocole du programme Bio-Plex Manager™ est préparé et les valeurs des standards normalisés sont introduites dans le programme. Les puits sont lavés 3 fois avec 100 µL de tampon de dosage, puis 50 µL de SA-PE 100x sont ajoutés. La plaque est recouverte et incubée 10 min à l'obscurité à TA sous agitation à 300 rpm. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 100 µL de tampon de dosage. Enfin, les billes sont resuspendues dans 125 µL de tampon de dosage, puis la plaque est agitée à 1100 rpm pendant 10 min avant d'être lue.



## 2.14. SEQUENÇAGE DE GENOME ENTIER PAR LA METHODE ILLUMINA

Le séquençage du génome entier des souches de *S. epidermidis sec*<sup>+</sup> est réalisé avec la technologie Illumina : ILLUMINA HiSeq 2500.

**Principe :** Le séquençage Illumina est l'une des technologies de nouvelle génération séquençage (NGS) dont le principe repose sur une amplification en pont (bridge PCR) des fragments à séquencer. Cette amplification a lieu sur une surface en verre appelée flow cell (FC). Les fragments de la librairie à séquencer sont munis d'adaptateurs à leurs extrémités qui vont leur permettre de se fixer de façon aléatoire sur la FC par hybridation des amorces qui en couvrent la surface. Un nouveau brin est alors synthétisé par une polymérase. Celui-ci est fixé de façon covalente sur la FC. Le brin d'origine est éliminé par dénaturation et l'extrémité libre du brin restant s'hybride à une amorce adjacente pour former un pont. La polymérase synthétise de nouveau le brin complémentaire pour former un pont d'ADN double brin et les deux copies sont libérées par dénaturation. Le cycle d'amplification en pont recommence pour former à terme un regroupement d'ADN clonal en une zone appelé cluster. Les brins anti-sens sont ensuite clivés. L'extrémité 3' libre des fragments d'ADN est bloquée et l'amorce de séquençage s'y hybride. Des nucléotides bloqués, marqués d'un fluorophore sont ajoutés et l'un d'entre eux est incorporé. La fluorescence émise alors est relevée puis le fluorophore et le bloqueur sont clivés permettant l'ajout d'un nouveau nucléotide. A chaque cycle d'incorporation une base peut ainsi être déterminée. Le séquençage s'effectue sur des centaines de millions de *clusters* simultanément (Figure 2.12).



**FIGURE 2.12 : APERÇU DE L'AMPLIFICATION EN PONT DE LA TECHNOLOGIE ILLUMINA® (ADAPTEE DE BONNIN ET AL., 2017).**

a) Fixation de l'ADN par hybridation a une amorce fixée sur la FC. b) Formation du pont. c) Dénaturation des doubles brins. d) hybridation des amorces de séquençage. e) incorporation de nucléotide marqué. f) Clivage du fluorophore et renouvellement du cycle.g) nucléotide identifiés.

**Méthode :** L' ADN génomique des souches de *S. epidermidis* entérotoxigéniques est extrait, purifié avec le kit de purification d'ADN MasterPure™ et envoyé au Centre Européen des Génomes et du Diagnostiques GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany) pour le séquençage.

## 2.15. OUTILS BIOINFORMATIQUES

### 2.15.1. Analyse d'homologie

La recherche des cadres ouverts de lecture (« open reading frames », ORFs) potentiels et la localisation présumée des codons initiateurs lors de la traduction de l'ARNm sont réalisées à l'aide du logiciel ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). La recherche des homologies de séquences nucléotidiques ou protéiques est faite avec le logiciel BLAST par

comparaison avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast/>). La masse moléculaire, le point isoélectrique et le coefficient d'extinction de la chaîne principale de la protéine sont calculés par le serveur Protparam (<http://expasy tools>).

### 2.15.2. Modélisation structurelle

La structure tridimensionnelle de la protéine est prédite dans le serveur I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) de l'Université du Michigan. I-TASSER est une approche *in silico* hiérarchique de la structure des protéines et de la prédiction de leur fonction. Les modèles structurels sont d'abord identifiés à partir de la banque de données protéique par l'approche de multifiltrage désignée « Local Meta-Threading-Server » (LOMETS). Des modèles atomiques complets sont ensuite construits par des simulations d'assemblage de fragments de modèles itératifs. Les données I-TASSER comprennent au moins cinq modèles parmi lesquels la structure prédite de la protéine étudiée est sélectionnée sur la base de la plus faible marge d'erreur qui lui est associée pendant la modélisation (Yang et al., 2015). La fidélité de ces modèles est déterminée avec un C-score compris entre -5 et 2. Plus ce score est élevé plus la prédiction est fidèle.

### 2.15.3. Analyse du génome

Le séquençage ILLUMINA des souches de *S. epidermidis* repose sur la production de fragments de séquence d'une longueur moyenne de 125 pb et sous la forme de paires, donnant son nom à la technique utilisée pour les travaux de cette thèse : « paired-end sequencing ». Cette technique de séquençage est préférable dans la perspective d'un assemblage *de novo*. L'assemblage est réalisé étapes par étapes avec l'utilisation d'une série de programmes soit à l'aide de lignes de commandes, d'interfaces graphiques, de serveurs web, ou enfin, à partir de la plateforme Galaxy de l'Institut National de Recherche Agronomique. Nous réalisons tout d'abord un contrôle qualitatif des séquences brutes par le logiciel FastQC (v 0.11.4) permettant de déterminer le niveau qualitatif des reads produits (codes qualités selon la nomenclature Sanger), analyser le contenu en GC, la distribution des longueurs des reads et du niveau de duplication, rechercher de contaminants et notamment de primers. L'assemblage en tant que tel est réalisé à l'aide du logiciel SPAdes (v 3.10.1) en utilisant les paramètres suivants :

- Kmers : 21-33-55-77-97
- Correction des erreurs d'assemblage (décalages et insertions)
- Filtre longueur : 1000 pb
- Filtre de couverture : 10X

Les filtres ont pour objectif d'exclure de l'assemblage les séquences produites ou fragments (contigs) de mauvaise qualité c'est-à-dire trop petits (moins de 1000 pb) ou mal couverts (moins de 10X). Ces seuils ont été choisis à partir des publications faisant état des critères qualitatifs minimaux permettant de retenir des produits d'assemblages comme étant significatifs dans le cadre de séquences Illumina. A partir des résultats issus de ce programme d'assemblage nous avons utilisé la suite de logiciels PAGIT afin d'achever l'assemblage et dans la perspective d'ordonner les contigs produits, combler les trous et évaluer une organisation globale de ce génome sous la forme d'un chromosome unique par une étape de scaffolding. Compte tenu de l'existence préalable de séquences complètes pour cette espèce nous avons pu nous baser sur une séquence de référence. Il s'agit pour ce travail la souche ATCC12228 (numéro d'accession de la séquence 022247.1). La suite PAGIT est exécutable en lignes de commande et se compose de plusieurs programmes :

- 1- **ABACAS** (algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences) : destiné à l'alignement des contigs sur une séquence de référence. Les contigs non alignés sur la référence restent précieux car porteurs d'une information génétique pertinente même si elle n'est pas présente dans la référence et ils sont mis en fin de séquence.
- 2- **IMAGE** (Iterative Mapping and Assembly for Gap Elimination) : ce programme permet de combler les trous ou gaps entre les contigs ordonnés en partant des fichiers bruts issus du séquençage Illumina car le logiciel d'assemblage est parfois mis en défaut. Par ailleurs ce programme permet dans un deuxième temps de réaliser un assemblage global et final sous la forme d'un scaffold qui peut donc intégrer dans le chromosome bactérien produit des trous nucléotidiques qui, par convention, sont comblés par la succession de 300 caractères « N ». Ce chiffre n'est pas représentatif de la taille possible du trou en question.
- 3- **ICORN** (Iterative Corelation of Reference Nucléotide): ce programme permet de corriger en fin d'assemblage les erreurs d'assemblage potentiel persistantes dans le scaffold (Otto et al., 2010) .
- 4- **QUAST** (Galaxy v 2.1): permet une analyse de la séquence produite.

Nous avons ensuite procédé à une annotation globale des génomes à l'aide du programme PROKKA (Galaxy 2.4.1) permettant d'annoter sur la base d'homologies de séquence dans la banque NCBI les cadres de lecture ouverts. Les annotations sont perfectibles et nécessitent l'utilisation d'outils de visualisation graphique comme le programme Artémis (v 16.0.0) qui permet d'une manière plus générale de visualiser la séquence codante.

Nous avons pu procéder à une analyse globale des génomes produits pour *S. epidermidis* dans le cadre de ce travail de thèse en les comparant aux séquences connues et disponibles dans la banque de données Genbank. Cette analyse s'est faite à plusieurs niveaux.

- 1- Analyse phylogénique globale des séquences nucléotidiques : nous avons utilisé le serveur web CSI phylogeny (v 1.4) qui analyse les polymorphismes nucléotidiques uniques (Single Nucleotide Polymorphisms SNPs) de haute qualité et avons fixé les paramètres suivants : profondeur de couverture minimale 10, distance minimale entre 2 SNPs 10 pb, qualité minimale 30, Z-score 1.96.
- 2- Recherche d'un génome de base et du pangénome : nous avons utilisé le serveur web EDGAR permettant de retrouver à partir des génomes annotés les séquences codantes communes ou uniques en se basant sur la recherche d'orthologues entre les génomes.

Enfin, nous avons recherché dans ces génomes nouvellement produits, des éléments génétiques mobiles et en particuliers des séquences de phages, de plasmides ou enfin d'ilots de pathogénicité à l'aide de plusieurs outils.

- 1- PHASTER (Phage Search Tool Enhanced Release): il s'agit d'un outil en ligne permettant de rechercher et annoter des séquences nucléotidiques phagiques potentielles dans le génome soumis mais aussi de déterminer ses caractéristiques et son niveau d'homologie avec des séquences connues (Grant et al., 2016).
- 2- Islanviewer 4 : il s'agit d'un outil de visualisation de régions pouvant correspondre à des ilots de pathogénicité en se basant sur plusieurs caractéristiques connues de telles structures : variation du contenu en GC et d'utilisation des codons, présence de gènes de mobilité, recherche d'ARNtm.
- 3- Artémis (v 16.0.0) : cet outil que nous avons déjà décrit permet aussi d'analyser les séquences qui ont été exclues du chromosome principal après la phase d'assemblage et dont le degré de couverture est trop haut par rapport au reste du génome et qui

donc évoquent la présence possible d'une séquence en multiples exemplaires, comme un plasmide (Carver et al., 2012). Le terme de plasmides repose par ailleurs sur la présence de certains gènes attendus comme les gènes de réplication et de mobilisation servant en outre à catégoriser ces séquences comme étant des plasmides non mobilisables ou mobilisables selon la nomenclature proposée par Smillie et col.

## **2.16. ANALYSES STATISTIQUES**

Les données d'analyse sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type par rapport à trois expériences indépendantes réalisées en trois exemplaires. L'analyse statistique des données est faite avec les logiciels Excel 2010 et Graph Pad Prism 5. Le test de Khi-2 est effectué avec le Minitab 14 (<https://www.minitab.com/academic/>) pour la comparaison des proportions et le niveau de significativité a été fixé à  $p$  valeurs  $<0,05$  pour tous les tests

## **Chapitre 3 : TRAVAUX DE RECHERCHE**

## PARTIE 1

### 1.1. ARTICLE N°1: PATHOGENIC FEATURES OF CLINICALLY SIGNIFICANT COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI IN HOSPITAL AND COMMUNITY INFECTIONS IN BENIN

**Statut** : publié dans International Journal Of Medical Microbiology

**Auteurs** : Chimène Nanoukon, Xavier Argemi, Frédéric Sogbo, Jeanne Orekan, Daniel Keller, Dissou Affolabi, Frédéric Schramm, Philippe Riegel, Lamine Baba-Moussa, Gilles Prévost

#### 1.1.1. Présentation du sujet

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) constituent un grand groupe d'espèces du genre *Staphylococcus* différent de *Staphylococcus aureus*. Ils sont ainsi appelés pour leur incapacité à provoquer la coagulation du plasma de lapin, due à l'absence de production de la coagulase libre (Bannerman *et al.*, 2007). Ces microorganismes font partie des bactéries les plus fréquemment rencontrées en milieu hospitalier et sont à l'origine de diverses infections. *Staphylococcus aureus* a été longtemps considéré comme la seule espèce associée aux infections staphylococciques sévères et plusieurs facteurs de virulence responsables des symptômes et de la sévérité de ces infections ont été décrits (Wey *et al.* 1990 ; Wenzel *et al.* 1991 ; Pfaller., *et al.*, 1999 ; Fluit *et al.*, 2001). Les SCN, par contre, sont pris pour des contaminants ou des pathogènes de faible virulence, et très peu d'études se sont penchées sur leurs potentiels pathogènes. Actuellement, un certain nombre d'espèces de staphylocoques à coagulase négative qui infectent les humains, présentent un certain degré de résistance aux antimicrobiens de plusieurs classes, incluant ainsi la résistance à la pénicilline qui concerne près de 80% des SCN (Cuevas *et al.*, 2004).

Dans les pays moins développés, les espèces de SCN ne sont pas systématiquement identifiées dans la plupart des laboratoires de microbiologie clinique, malgré le nombre élevé de cas d'infections sévères à SCN enregistré ces dernières années dans le monde entier. Seules les cultures de staphylocoques positives à la recherche de la staphylocoagulase libre sont considérées pour identifier *S. aureus*, qui, dans de nombreux cas peut être simplement déterminée par un test de coagulation du plasma de lapin ou avec un kit commercial (Pastorex™ STAPH) d'agglutination permettant la détection simultanée du facteur d'affinité



au fibrinogène (clumping factor), de la protéine A et de polysaccharides capsulaires. Un résultat négatif dans un test de coagulase suffit à classer la bactérie comme un staphylocoque à coagulase négative. Cependant, en raison de leur implication dans les infections humaines, il est indispensable que les SCN ayant une signification clinique soient identifiés au niveau espèce, afin d'évaluer le degré de virulence dans chaque groupe. Au Bénin, la prévalence, la pathogénicité et le profil de résistance de ces souches ne sont pas encore connus à cause de l'inexistence de bonnes méthodes d'identification des espèces.

Ainsi cette première partie de l'étude vise à déterminer le potentiel pathogène de souches de SCN cliniquement significatives isolées d'infections chez les patients au Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert KOUTOUKOU-MAGA de Cotonou.

### 1.1.2. Résumé des résultats

Le potentiel pathogène des staphylocoques surtout des *S. aureus* induisant les maladies staphylococciques classiques, est associé à de nombreuses fonctions biochimiques ou biologiques, qui sont considérées comme des facteurs de virulence de la bactérie. Il est cependant difficile, de distinguer les SCN pathogènes des SCN non pathogènes de la flore résidante parce que leurs facteurs de virulence n'ont pas encore été bien définis. D'où l'intérêt de la mise en évidence des gènes de virulence, des fonctions toxiques ou de la production de ces derniers par les bactéries étudiées. Pour ce faire, nous avons déterminé au sein de 99 souches cliniques, la variabilité, le profil de résistance et fait une étude génotypique et phénotypique des facteurs de virulence connus à ce jour chez *S. aureus* (Article 1). Une identification des souches collectées a ainsi été réalisée au Bénin avec la galerie API® Staph, puis par la spectrométrie de masse MALDI-TOF à Strasbourg et montre que : *S. haemolyticus* (44%), *S. epidermidis* (22%) et *S. hominis* (7%) sont respectivement les espèces les plus impliquées dans les infections à SCN au Bénin et que la bactériémie, ainsi que les infections du tractus urinaire sont les pathologies à SCN les plus fréquentes. De plus, nous avons apporté la preuve de la multi-résistance des isolats aux antibiotiques dont la fosfomycine (81%), la méticilline (74%), le triméthoprime-sulfaméthoxazole (72%), la kanamycine (65%), la gentamicine (54%) et la tobramycine (52%). Aussi, dans cet article, nous avons pu mettre en évidence des activités, protéolytique (26% des isolats), estérasique (25%), hémolytique (25%) et leucotoxique (3%) de même que la présence et l'expression d'entérotoxine staphylococcique C (9%) chez certaines souches. D'autre part, le test d'immunoprécipitation

radiale en gel (Méthode d'Ouchterlony) pour la recherche des leucotoxines à double composantes HlgC/HlgB et LukS-PV/LukF-PV dans les surnageants de culture s'est révélé négatif pour toutes les souches étudiées. Nous avons suggéré que la pathogénicité des SCN pourrait fournir un avantage sélectif pour la colonisation systémique chez les patients hospitalisés. En effet, nos résultats démontrent que la majorité des souches associées aux bactériémies nosocomiales (68%) présentait au moins un caractère important de virulence, contre seulement 32% pour les souches issues d'infections communautaires.

### **1.1.3. Conclusion**

Nous avons identifié dans cet article les différentes espèces qui sont souvent impliquées dans les infections humaines à SCN au Bénin. Nous avons également caractérisé le potentiel pathogène de ces souches pour l'homme en montrant leur aptitude à produire des facteurs de virulence comme *S. aureus*. Les propriétés lytiques de ces microorganismes pourraient avoir des effets dévastateurs, notamment en provoquant une nécrose tissulaire ou en empêchant la phagocytose par les cellules immunitaires. Ceci peut contribuer à l'inefficacité du traitement antibiotique même dédié.



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijmm](http://www.elsevier.com/locate/ijmm)

## Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin



Chimène Nanoukon<sup>a,c</sup>, Xavier Argemi<sup>a</sup>, Frédéric Sogbo<sup>b</sup>, Jeanne Orekan<sup>b</sup>, Daniel Keller<sup>a</sup>, Dissou Affolabi<sup>b</sup>, Frédéric Schramm<sup>a</sup>, Philippe Riegel<sup>a</sup>, Lamine Baba-Moussa<sup>c</sup>, Gilles Prévost<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, VBP EA 7290, F-67000 Strasbourg, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Microbiologie du Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou-Maga, Cotonou, Benin

<sup>c</sup> Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, Université d'Abomey, Calavi, 05 BP 1604 Cotonou, Benin

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 July 2016

Received in revised form 14 October 2016

Accepted 8 November 2016

## Keywords:

Clinically significant coagulase-negative staphylococci  
Antibiotic resistance  
Hemolytic activity  
Enterotoxin  
Virulence factors

## ABSTRACT

In West Africa, very little consideration has been given to coagulase negative Staphylococci (CNS). Herein, we describe the features contributing to the pathogenicity of 99 clinically-significant independent CNS isolates associated with infections encountered at the National Teaching Hospital Center of Cotonou (Benin). The pathogenic potentials of nosocomial strains were compared with community strains. *S. haemolyticus* (44%), *S. epidermidis* (22%) and *S. hominis* (7%) were the most frequently isolated while bacteremia (66.7%) and urinary tract infections (24.2%) were the most commonly encountered infections. Most strains were resistant to multiple antibiotics, including penicillin (92%), fosfomicin (81%), methicillin (74%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (72%). The most frequently isolated species were also the most frequently resistant to methicillin: *S. hominis* (100%), *S. haemolyticus* (93%) and *S. epidermidis* (67%). Screening of toxic functions or toxin presence revealed hemolytic potential in 25% of strains in over 50% of human erythrocytes in 1 h. Twenty-six percent of strains exhibited protease activity with low (5%), moderate (10%) and high activity (11%), while 25% of strains displayed esterase activity. Three percent of strain supernatants were able to lyse 100% of human polymorphonuclear cells after 30 min. Polymerase chain reaction and latex agglutination methods revealed staphylococcal enterotoxin C gene expression in 9% of *S. epidermidis*. A majority of hospital-associated CNS strains (68%) had at least one important virulence feature, compared with only 32% for community-acquired strains. The present investigation confirms that these microorganisms can be virulent, at least in some individual cases, possibly through genetic transfer from *S. aureus*.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

Staphylococci are among the most commonly encountered bacteria in hospital settings and are involved in various infections. *Staphylococcus aureus* is considered as the major species associated with severe staphylococcal infections for which several virulence factors responsible for the symptoms and severity of infections have been identified (Duruapt et al., 2007; Baba-Moussa et al., 2008; Fluit et al., 2001). Meanwhile, several studies have emphasized the role of Coagulase-negative staphylococci (CNS) in various infection types (Delaunay et al., 2014; Piette and Verschraegen, 2009). Their

growing role as pathogens has been demonstrated in human infections, especially in immunocompromised patients, preterm infants and in patients with implanted devices (Becker et al., 2014).

The most frequent CNS infections associated with humans are primarily nosocomial in nature and are due to *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* isolated from bloodstream infections, peritonitis, prosthetic valve-related endocarditis, and foreign body infections (Ertem et al., 2010; Falcone et al., 2004; Schoenfelder et al., 2010). *S. lugdunensis* and *S. saprophyticus* are involved in arthritis and in urinary tract infections among adolescent females, respectively (Lo et al., 2015; Peel et al., 2015). *S. warneri*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. caprae*, *S. schleiferi*, *S. hominis* and *S. auricularis* can also be associated with severe infections (Delmas et al., 2008).

\* Corresponding author.

E-mail address: [prevost@unistra.fr](mailto:prevost@unistra.fr) (G. Prévost).



The pathogenicity of CNS and hospital-acquired CNS isolates has been difficult to establish, since the virulence factors of these microorganisms are poorly defined (Becker et al., 2014). Several CNS may carry at least parts of genes encoding exo-enzymes such as proteases, lipases and toxins, which are factors that can impact the severity of the infections (Von Eiff et al., 2002; Pinheiro et al., 2015). *S. epidermidis* produces several adhesion factors, proteins and exo-polymers involved in immune evasion and biofilm production (Otto, 2012). Recently, pathogenicity islands bearing enterotoxin SEC3 and SE1L have been described in *S. epidermidis* (Madhusoodanan et al., 2011). In addition, most CNS display a high antibiotic resistance profile, particularly to methicillin which remains a major challenge for clinicians to find alternative molecules with low grade toxicity (Diekema et al., 2001).

In most African clinical microbiology laboratories, CNS characterization is usually limited to a simple coagulation assay to distinguish *S. aureus* from non-*aureus* isolates. However, because of their involvement in human infections, it now remains essential that clinically significant CNS be identified to the species level in order to establish a correlation between clinical signs and identified bacteria, as well as to identify risks. In Benin and West Africa, the prevalence, pathogenicity and resistance profile of CNS are poorly known because of the lack of such species identification.

The present study was undertaken to characterize clinically significant CNS strains isolated from various samples at the National Teaching Hospital Center, Hubert Koutoukou Maga (NTHC-HKM), in Cotonou, Benin. In this analysis, the variability, resistance profile to antimicrobial agents and virulence factors of isolates were determined and the pathogenic potentials of nosocomial- and community-based CNS were compared.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethical statement

This work was approved by the National Ethics Committee of Benin under protocol number 2015/006. All staphylococcal isolates evaluated in this study were submitted by physicians treating patients for infectious syndromes. Buffy coats from fresh human blood from healthy donors were purchased to the « Etablissement Français du Sang de Strasbourg, France », for which all information remains confidential.

### 2.2. Study design and clinical relevance assessment of strains

Strains were collected prospectively from March 2015 to January 2016 at the NTHC-HKM, Cotonou, Benin. Clinically significant CNS isolates were retrieved from various specimens from both in- and out-patients. The clinical significance of CNS strains was determined by qualified medical personnel using the clinical records of each patient containing the demographic, clinical and laboratory data. The isolates were considered to be of clinical significance when the following general criteria were fulfilled: 1) strains obtained in bacterial pure culture; 2) presence of infection risk factors (immunosuppressive and/or front door); 3) clinical signs of infection (hyperthermia >38 °C, hypotension, tachycardia, tachypnea); 4) identification of a site of infection (respiratory, digestive, bone and joint, skin and soft tissues) (Mohammad et al., 2014). In the present study, only strains with clinical relevance were considered.

### 2.3. Identification of CNS

CNS Strains were phenotypically identified by standard microorganism identification methods in the Microbiology Laboratory of the NTHC-HKM. Methods were based on colony

morphology, Gram staining, catalase positivity (ID color Catalase; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), non-agglutination of colonies with the Pastorex Staph Plus test (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), and free staphylocoagulase non production with lyophilized rabbit plasma. Identification at the species level was carried out using Api STAPH (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the Manufacturer's instructions, and species identification was further confirmed for species identification with the MALDI-TOF Biotyper™ (Bruker Daltonics) method at the Institute of Bacteriology, University of Strasbourg, France. For two *S. epidermidis* isolates, 16 s rDNA sequencing was achieved (GATC Ltd, Basel, Switzerland) (Ghebremedhin et al., 2008).

### 2.4. MALDI-TOF mass spectrometry assay for bacterial identification

CNS strains were grown on Columbia agar with 5% (v/v) sheep blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated for 24 h at 37 °C. One colony of each strain was placed in duplicate on a 96-spot polished target plate and allowed to dry at room air. Next, 1 µl of matrix (3 mg/mL alpha-cyano-4 hydroxycinnamic acid in 50% [v/v] acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid [v/v]) was overlaid onto the sample and allowed to dry. The acquisition of protein mass spectra was performed on a Microflex LT™ instrument using the flexControl™ 3.0 software (Bruker Daltonics), with a mass-to-charge ratio (*m/z*) range of 2–20 kDa. Automated data analysis of raw spectra was performed with MALDI Biotyper™ RTC 3.1.2.0 software (Bruker Daltonics). An identification score of ≥2 was considered as high-confidence identification at the species level, whereas scores comprised between 1.7 and 1.99 were considered as intermediate confidence genus-level identification only. Scores of <1.7 were considered as an unacceptable identification, according to the Manufacturer's recommendations, and were excluded from the analysis if any.

### 2.5. Antibiotic susceptibility and methicillin resistance testing

Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance testing of the CNS isolates were performed with the VITEK 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the recommendations of the Committee for Antimicrobial Susceptibility of the French Society for Microbiology (CA-SFM)-2015. The antibiotics tested were cefoxitin (FOX), benzylpenicillin (BEN), oxacillin (OXA), gentamicin (GEN), kanamycin (K), tobramycin (TM), ofloxacin (OFX), clindamycin (CL), erythromycin (E), lincomycin (L), pristinamycin (PT), linezolid (LIZ), teicoplanin (TEC), vancomycin (VA), tetracycline (TET), fosfomycin (FOS), nitrofurantoin (FT), fusidic acid (FA), rifampicin (RIF) and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT). Methicillin-resistance was assessed by the resistance of the strains with cefoxitin and oxacillin at 37 °C.

### 2.6. Screening for proteolytic activity

After identification, each strain was first cultured on Mueller Hinton (MH) agar enriched with 5% sheep blood for 18 h at 37 °C after which a clone was selected and inoculated into 100 ml of Brain Heart Infusion (BHI) broth. The suspension was then incubated with shaking at 37 °C for 18 h and centrifuged at 10,000 × g for 10 min. The culture supernatants were collected and filtered with a 0.22 µm filter. Each filtrate was stored at –20 °C until use. Protease activity of the strains was investigated using azocasein (Sigma-Aldrich, France) as substrate (Vandecandelaere et al., 2014). Briefly, 600 µl of buffer (0.2 M Tris HCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0), 200 µl of azocasein (25 g/ml) and 200 µl of each strain culture supernatant were incubated at 37 °C. After 3 h, 200 µl of 100% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) were added and the new mixture was centrifuged for



5 min at 10,000 × g. One ml of the supernatant was decanted to which 200 µl of 7.5 M NaOH were added. Absorbance was measured at 440 nm to evaluate protease activities with the *S. lugdunensis* AACC51874 strain used as a positive control and brain heart broth without bacterial culture as a negative control. The average OD values of the negative controls were calculated from triplicate assays and subtracted from the mean absorbance values of each strain tested (specific OD). The limit of detection (LD) for this test was defined as 3 × the standard deviation of the mean of the negative controls. The strains were classified into four categories according to the classification used by Srdjan et al. (2000): non-proteolytic (OD ≤ LD), weakly proteolytic (LD < OD ≤ 2LD), moderately proteolytic (2LD < OD ≤ 4LD), very proteolytic (OD > 4LD).

### 2.7. Screening for esterase activity

Nutrient Agar containing 10 g/L yeast extract, 1% (v/v) Tween 80, 0.1 g/L CaCl<sub>2</sub>, 10 g/L casamino acids and 5 g/L NaCl was used to study esterase activity (Pakshir et al., 2013). The isolates were grown on trypticase soy agar and incubated at 37 °C for 24 h. They were subsequently inoculated by streak on Tween agar plates and incubated at 37 °C for 48 h. The formation of a white precipitate around the streak was taken as an indication of positive esterase activity.

### 2.8. Screening for hemolytic activity and two bicomponent leukotoxins

Hemolytic activity of strain supernatants on human red blood cells (hRBC) was determined by colorimetry at 414 nm (Pawel et al., 2008). One ml of human red blood cells was centrifuged and washed thrice at 10,000 × g for 15 min with 10 ml of phosphate buffered saline (PBS: 10.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, 2.7 mM KCl, NaCl 140 mM pH 7.3 to 7.4). The suspension was diluted to 50% in PBS and the concentration was adjusted to an absorbance of 8.0 [0.4% (v/v)] at 414 nm. The culture supernatants of the strains were serially diluted with PBS in a 96 well round-bottom plate. One hundred µl of 0.4% red blood cell suspension were added to each well. A negative control (RBC 100 µl + PBS 100 µl) in three wells and a positive control 100 µl PBS + 1% (w/v) saponin + (100% RBC) of 3 wells were used. The plate was incubated for 45 min at 37 °C and centrifuged at 3000 × g for 3 min. Finally, 100 µl of the supernatant was transferred to a 96-well flat-bottom plate for absorbance reading at 414 nm. The absorbance values at 414 nm of negative controls were calculated and subtracted from the mean absorbance values of each strain tested. The results were expressed as the percentage of 100% hemolysis (Shimuta et al., 2009). In this study, strain supernatants were considered as hemolytic when lysing at least 50% of RBCs at 1:4 dilution. Otherwise, presence of two bicomponent leukotoxins in culture supernatants were checked by using radial gel immunoprecipitation with anti-HlgC, –HlgB, LukS–PV, and –LukF–PV affinity-purified rabbit antibodies as earlier reported (Gravet et al., 1998).

### 2.9. Cytotoxicity assays

hPMNs were purified from anonymized buffy coats purchased as previously described (Meyer et al., 2009). The neutrophil cell pellet was resuspended in 25 ml of HBSS buffer and again centrifuged at 1600 × g for 6 min. The pellet was mixed in 25 ml of HBSS and allowed to rest for 1 h. Before use, the suspension was centrifuged and the pellet filtered on a 70 µm filter. The cytotoxic activity of the culture supernatant was determined using a commercial kit (CytoTox 96® Cytotoxicity Assay, Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA). One hundred microliters of hPMNs adjusted to a concentration of 6 × 10<sup>5</sup> cells/ml were incubated with 50 µl of

culture supernatant for 30 min. The mixture was centrifuged as above and 50 µl of the supernatant was incubated with 50 µl of reagent for 30 min. In the presence of lactate dehydrogenase (LDH), the tetrazolium salt content in the reagent was reduced in a red product, formazan, which was assayed by absorbance measurement at 490 nm. In this assay, the absorbance formed is proportional to the number of lysed cells. Cytotoxicity was represented as the percentage of total LDH release detected by lysing cells with 0.1% (v/v) Triton X-100. To determine the leukotoxic capacity of the isolates, 5 µl of culture supernatant were incubated with 6 × 10<sup>5</sup> hPMNs/ml. Strains that lysed at least 50% of hPMNs were considered as cytotoxic (Scheifele et al., 1987).

### 2.10. DNA extraction and amplification for *S. aureus* clumping factor, hlgB, *S. epidermidis* gseA and enterotoxin gene detection

DNA was extracted from CNS strains grown on blood agar plates using the MasterPure™ DNA Purification according to the Manufacturer's recommendations (Epicentre, Le Perray en Yvelines, France). DNA purity was verified using 260/280 ratios; samples with ratios <1.8 were rejected. Presence of genes encoding staphylococcal enterotoxins (*se*), *sea*, *sec*, *seg* and *seh*, was detected for all strains by Multiplex PCR using published primers (Pinheiro et al., 2015) and methods (Baba-Moussa et al., 2011). International reference strains were included in all reactions as positive [*S. aureus* SCP FRI 722 (*sea* +), SCP FRI 341 (*seb* +), SCP FRI 361 (*sec* +), SCP FRI 137 (*seg* +), SCP FRI 569 (*seh* +)] while negative controls were provided for all reactions by substituting nucleic acid by water. Three other genes, *S. aureus* *clp* (clumping factor), *S. aureus* *hlgB* (encoding gamma-hemolysin) and *gseA* encoding the specific *S. epidermidis* glutamyl-endoprotease gene (Ohara-Nemoto et al., 2002), were also investigated by using PCR (see Suppl. Table 1). Amplification products were separated on a 2% (w/v) agarose gel in TEBx0.5 buffer and stained with 0.5 µg/ml ethidium bromide before being analyzed on a UV bench using a GelDoc 2000 (Bio-Rad).

### 2.11. Detection of enterotoxin production

Extracellular enterotoxin C from strains positive by PCR investigation (*sec*) were identified by the reverse passive latex agglutination (RPLA) method using the SET-RPLA-T900 kit for the detection of SEA, SEB, SEC as described by the manufacturer (Oxoid Diagnostic Reagents). In addition, Western blotting was achieved by using *S. aureus* enterotoxin C affinity-purified rabbit polyclonal antibodies (Attien et al., 2014) and a fluorescein-labeled goat anti-rabbit secondary antibody.

### 2.12. Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation from three independent experiments performed in triplicate. The χ<sup>2</sup> test was carried out with the Minitab 14 (<https://www.minitab.com/academic/>) for proportions comparison and the level of significance was set at *p* values < 0.05 for all tests.

## 3. Results

### 3.1. CNS isolates and associated infections

A total of 99 clinically significant and independent CNS were collected over a period of ten months in the NTHC-HKM Microbiology laboratory. Amongst these, 62 were hospital-acquired and 37 were community-acquired strains. The strains were from various biological samples including: blood, urine, genital secretion, abscess and intravascular catheter. As shown in Table 1, the most frequently CNS species isolated in this study were *S. haemolyticus*

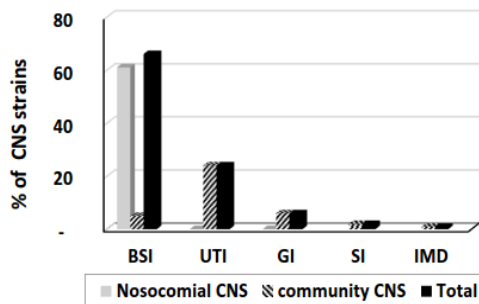
**Table 1**  
Occurrence of CNS species isolated from various clinical samples.

Species	Source					Total (%)
	Blood	Urine	Genital secretion	Abscess	Foreign bodies	
<i>S. haemolyticus</i>	32	7	5	0	0	44 (44)
<i>S. epidermidis</i>	16	3	0	2	1	22 (22)
<i>S. hominis</i>	7	0	0	0	0	7 (7)
<i>S. saprophyticus</i>	1	6	0	0	0	7(7)
<i>S. cohnii</i>	4	2	0	0	0	6 (6)
<i>S. sciuri</i>	2	0	1	0	0	3 (3)
<i>S. arlettae</i>	1	1	0	0	0	2 (2)
<i>S. capitis</i>	2	0	0	0	0	2(2)
<i>S. warneri</i>	0	2	0	0	0	2 (2)
<i>S. simulans</i>	0	1	0	0	0	1 (1)
<i>S. caprae</i>	0	1	0	0	0	1 (1)
<i>S. lugdunensis</i>	1	0	0	0	0	1(1)
<i>S. kloosii</i>	0	1	0	0	0	1(1)

(44%) followed by *S. epidermidis* (22%), *S. hominis* (7%) and *S. saprophyticus* (7%). Other species such as *S. cohnii* (6%), *S. sciuri* (3%), *S. arlettae* (2%), *S. capitis* (2%), *S. warneri* (2%), *S. simulans* (1%), *S. caprae* (1%), *S. lugdunensis* (1%) and *S. kloosii* (1%) were also identified. Bacteremia (67%) was the most common CNS infection in this study. The majority of sepsis was observed in the neonatal unit [34 (51%)]. Sixty one (92%) of the 66 bacteremia were classified as hospital-acquired bacteremia while only 5 (7%) were community-acquired. *S. haemolyticus* was the leading cause of bloodstream infections [32 (48%)], followed by *S. epidermidis* [16 (24%)] and *S. hominis* [7 (11%)] (Table 1). Urinary tract infections accounted for 24% of all CNS infections, were associated with adult patients (18–78 years) and were community-acquired (Fig. 1). *S. haemolyticus* was also the most frequent causative agent associated with urinary tract infections [7 (29%)] followed by *S. saprophyticus* [6 (25%)] and *S. epidermidis* [3 (13%)]. Genital infections represented 6% of CNS infections, all of which were community-acquired, and 5 of which (83%) were caused by *S. haemolyticus* (Table 1, Fig. 1). Dermatitis [2 (2%)] and foreign body infections [1 (1%)] were the other sources of CNS infections (Fig. 1). The species most frequently associated with CNS infections at the Cotonou NTHC-HKM were *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* and *S. warneri*.

3.2. Antimicrobial resistance of CNS

Most of the isolated strains were resistant to penicillin (92%) and fosfomicin (81%), followed by oxacillin (74%), trimethoprim-sulfamethoxazole (72%), ceftiofloxacin (74%), kanamycin (65%), gentamicin (54%) and tobramycin (52%). Resistance remained sparse for nitrofurantoin (1%), pristinamycin (6%), teicoplanin (6%) and rifampicin (6%) (Supp. Table 2a,b). *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* and *S. hominis* exhibited the highest resistance profile whereas *S.*

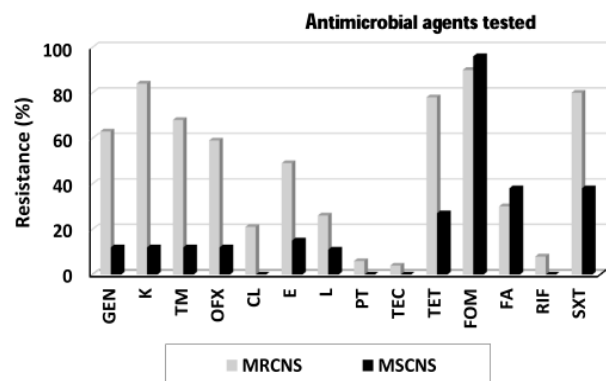


**Fig. 1.** Distribution of CNS isolates among nosocomial vs. community infections. CNS, Coagulase Negative Staphylococci; BSI, blood stream infections; UTI, urinary tract infections; GI, Genital infections; SI, skin infections; IMD, infections associated with medical devices. Bars represent percentage of strains for each species.

*saprophyticus* remained susceptible to most antibiotics tested. The methicillin resistance rate was the highest for *S. hominis* (100%), *S. haemolyticus* (93%) and *S. epidermidis* (67%). Other less frequently isolated species (*S. arlettae*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* and *S. kloosii*) showed low resistance to the majority of antibiotics, except for fosfomicin (81%) and benzylpenicillin (70%) (Supp. Table 2a,b). The rate of methicillin-resistant isolates was also found to be particularly higher among newborns (94%). Fig. 2 shows the antimicrobial resistance in methicillin-resistant CNS (MRCNS) and methicillin-susceptible CNS (MSCNS) isolates. MRCNS were significantly more resistant to other antimicrobial agents compared to MSCNS except for fosfomicin and fusidic acid ( $p < 0.001$ ). Finally, a significant association was found between MRCNS and hospital-acquired strains ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3).

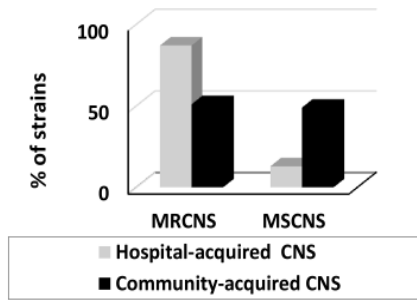
3.3. Extracellular protease and esterase enzyme production

Optical density measurements enabled to rank the 99 strains into four groups: non-proteolytic ( $OD \leq 74$  mAU; 73 strains), weakly proteolytic ( $74 \text{ mAU} < OD \leq 127$  mAU; 5 strains), moderately proteolytic ( $148 \text{ mAU} < OD \leq 295$  mAU; 10 strains) and very proteolytic ( $OD > 295$  mAU; 11 strains) (Fig. 4a). Under this classification, 26 of all collected strains had proteolytic activity. Amongst the 17 *S. epidermidis* strains, 7 (41%) were very proteolytic. Only 4 (9%) of the *S. haemolyticus* strains were proteolytic including one very proteolytic. Of the 3 strains of *S. sciuri*, 2 were very proteolytic.



**Fig. 2.** Antimicrobial resistance patterns in MRCNS and MSCNS isolates. MRCNS; methicillin-resistant coagulase negative staphylococci; MSCNS; methicillin-susceptible coagulase negative staphylococci. GEN, Gentamicin; K, Kanamycin; TM, Tobramycin; OFX, Ofloxacin; CL, Clindamycin; E, Erythromycin; L, Lincomycin; PT, Pristinamycin; TEC, Teicoplanin; TET, Tetracycline; FOM, Fosfomicin; (FA), Fusidic acid; (RIF), Rifampicin; SXT, Trimethoprim-Sulfamethoxazole. Bars represent percentage of strains for each species.





**Fig. 3.** Distribution of methicillin-resistant and methicillin-susceptible CNS according to type of strains. MRCNS; methicillin-resistant coagulase negative staphylococci, MSCNS; methicillin-susceptible coagulase negative staphylococci. Bars represent percentage of strains for each species.

None of the *S. hominis* and *S. haemolyticus* strains produced protease activity. As for the other species, *S. caprae* was very proteolytic.

Esterase activity assayed in agar supplemented with Tween 80 revealed 25 positive strains at 14 to 50% of the control value (Fig. 4b). The highest percentages were found for *S. epidermidis* [n=11 strains, (50%)] and *S. cohnii* [6 (50%)], followed by *S. haemolyticus* [10 (23%)] and *S. saprophyticus* [1 (14%)]. None of *S. hominis* and *S. sciuri* strains exhibited esterase activity. In the other species, 3 strains (30%) were found to hydrolyze esters.

**3.4. Assessment of CNS cytolytic potential on human RBC and PMNs**

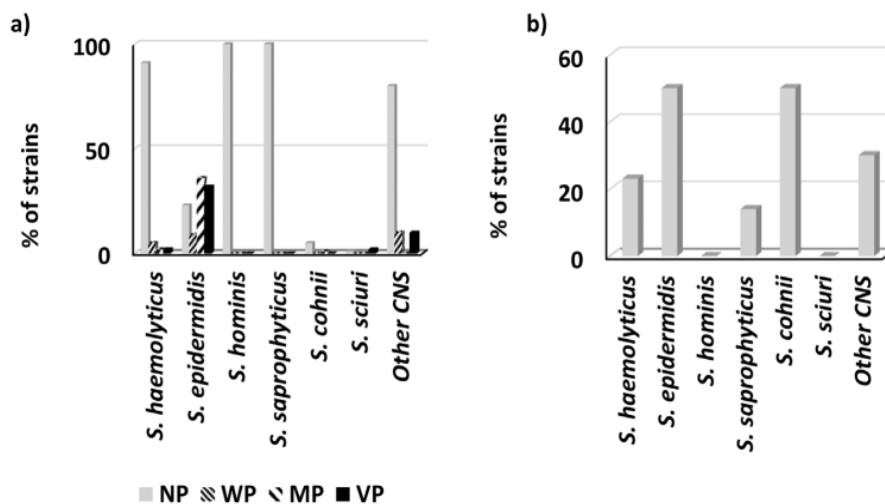
The distribution of CNS isolates according to their hemolytic activity on human erythrocytes is shown in Fig. 5a. Certain strains produced extracellular compounds that were able to lyse at least 50% of human erythrocytes at 1:4 dilution of the culture supernatants. Of the 99 strains tested, 22 (22%) were hemolytic, with the percentage of hemolysis varying according to species. In the most frequent isolated species, 9 *S. haemolyticus* strains (20%) and 4 *S. epidermidis* strains (18%) were found to be the most hemolytic. High activity (96–73%) was observed for five (56%) of the *S. haemolyticus* positive strains. Only one of the *S. hominis* (14%) and 2 of the *S. cohnii* (33%) isolates were hemolytic. None of the *S. saprophyticus* strains showed any hemolytic activity on HRBCs while five strains (50%) of other species were hemolytic. Except for *S. saprophyticus*,

all of the most frequent isolated CNS species were able to induce hemolysis of HRBCs.

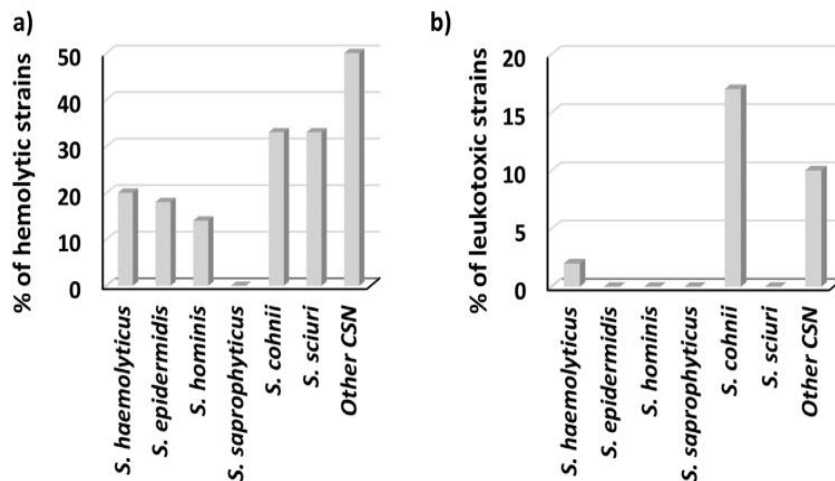
Finally, with regard to leukotoxic activity, only 3 strains were considered positive: 1 *S. haemolyticus*, 1 *S. cohnii* and 1 *S. warneri*. All other strains failed to display any leukotoxic activity (Fig. 5b).

**3.5. Enterotoxin genes and toxin expression by CNS strains**

None of the isolated CNS included in this study carried the enterotoxin *sea*, *seb*, *seg* or *seh* gene. PCR detection for the enterotoxin genes revealed the presence of *sec* genes in two *S. epidermidis* strains (9%) from the 99 staphylococcal strains studied (Fig. 6a). These two isolates (SE90 and SE95) were identified as *S. epidermidis* through mass spectrometry and Biotyper™ with confident scores of 2.07 and 2.09 for isolates 90 and 95, respectively. These isolates were neither positive for the *S. aureus* clumping factor, nor gamma-hemolysins tests, while gamma-hemolysin was previously found in 100% of *S. aureus* isolates (Mahoudeau et al., 1997). However, these two isolates carry the *S. epidermidis gseA* gene, and 16s rDNA amplification confirmed the *S. epidermidis* species identification (Suppl. Fig. 1). Genes were shotgun sequenced through original detecting primers and the corresponding sequences were identical for these two isolates and the already available *S. epidermidis* sequence, while N-terminal sequence were diverging from *S. aureus* and 9 aminoacid substitutions were noticed inside the polypeptides compared to *S. aureus* again (Suppl. Figs. 2 and 3). Reverse passive latex agglutination (RPLA) assay was performed and confirmed the expression of at least cross-reacting materials by *S. epidermidis* with staphylococcal enterotoxin C (SEC), and further confirmed by Western blotting (Fig. 6a,b). The two enterotoxin C positive *S. epidermidis* originated from blood samples. One of the strains originated from a 2-day-old newborn hospitalized in the neonatal unit for hyperthermia and dyspnea. The second originated from a 12-year-old child hospitalized in a pediatric unit for hyperthermia and digestive disorders. The 2 isolates exhibited distinct antimicrobial susceptibility (tobramycin, gentamicin and erythromycin resistance vs. tobramicin, gentamicin and erythromycin susceptibility) as well as distinct virulence factors (protease+, hemolysin+, esterase- vs. protease+, hemolysin-, esterase+). Amplicon DNA sequencing did not reveal any significant mutation compared with that published by Madhusoodanan et al. (2011).



**Fig. 4.** Extracellular enzyme production by clinical isolates according to species. (a) Proteolytic activity of culture supernatants by CNS isolates. NP; non proteolytic, WP; weakly proteolytic, MP; moderately proteolytic, VP; very proteolytic. Bars represent percentage of proteolytic strains for each species. (b) Esterase production by CNS strains. Bars represent percentage of esterase-producing strains for each species.



**Fig. 5.** Cytolytic capacity of CNS isolates on human RBC and PMNs. (a) Hemolytic activity of CNS strains according to species. Bars represent strains percentage of CNS having lysed at least 50% of human erythrocytes up to a quarter dilution of the culture supernatant for each species. (b) Leukotoxic activity of CNS strains according to species. Bars represent strains percentage of CNS having lysed at least 50% of human Polymorphonuclear cells for each species.

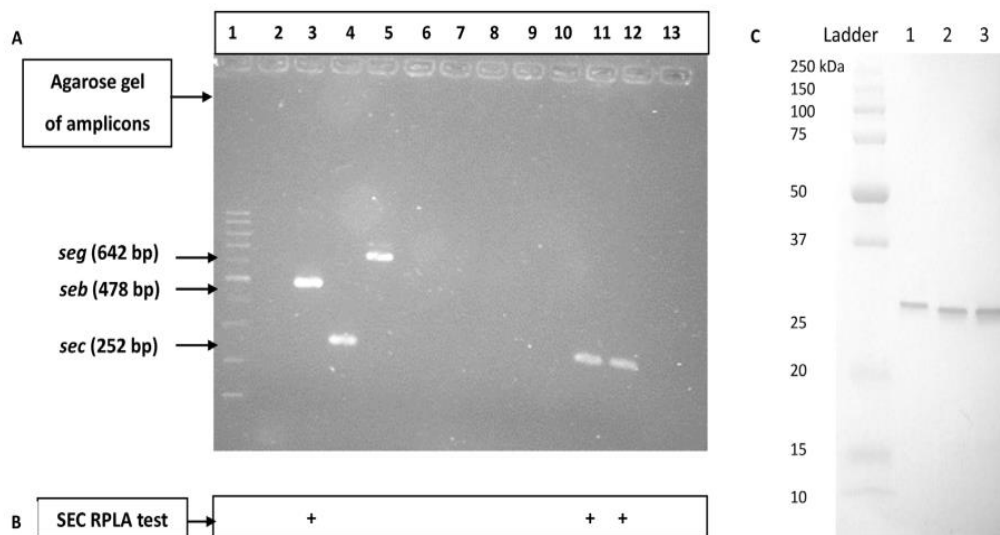
3.6. Virulence factors or functions are more frequently associated with hospital-acquired CNS

CNS are the major causative agents of nosocomial infections despite the fact that some are widespread skin commensals (Rogers et al., 2009). To explain this phenomenon, we compared the rate of virulence factors between hospital-acquired and community-acquired CNS (Table 2). The results revealed differences between occurrences of protease activity in hospital-associated CNS (65%) compared to community-associated CNS (35%) ( $p < 0.001$ ). With regard to strain toxicity on hRBC and hPMN cells, hemolytic activity was exhibited by 16 (73%) hospital-acquired CNS while 6 (27%) were from community-acquired isolates. Conversely, leukotoxic activity was associated with only community-acquired isolates. The comparison of nosocomial CNS having esterase activity with that of community-acquired isolates demonstrated that the majority of

**Table 2**  
Distribution of virulence features production according to hospital and community-acquired CNS.

Virulence factors	Hospital-acquired CNS	Community-acquired CNS	p value
Protease	17 (65%)	9 (35%)	<0.001
Esterase	16 (64%)	9 (36%)	<0.001
Hemolysis	16 (73%)	6 (27%)	<0.001
Leukocytolysis	0 (0%)	3 (100%)	
Enterotoxin	2(100%)	0 (0%)	

esterase activity was exhibited by nosocomial CNS (64% vs. 36%,  $p < 0.001$ , Table 2). Two hospital-acquired strains expressed enterotoxigenic capacity (Table 2). Finally, of the 99 CNS screened, 44 (44%) had one or more virulence features, of which 30 (68%) were associated with nosocomial isolates, whereas 14 (32%) stemmed



**Fig. 6.** (A) Agarose gel electrophoresis for the PCR detection of *sec* (252 bp), *seg* (642 bp) and *seb* genes in CNS strains by PCR. Lane 1: 100-bp molecular weight marker, lane 2: negative control, lane 3: *S. aureus* SCP FRI 341 (*seb* +); lane 4: *S. aureus* SCP FRI 361 (*sec* +), lane 5: SCP FRI 137 (*seg* +); lanes 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13: CNS isolates lacking *seb*, *sec*, and *seg*; lanes 11 and 12: CNS isolates positive for *sec* gene. (B) Result of reverse passive latex agglutination (RPLA) assay. Lane 4: *S. aureus* SCP FRI 361 positive control for SEC expression. Lanes 11 and 12: CNS isolates positive for SEC expression. (C) Immunoblot of both culture supernatants of *S. epidermidis* isolates using rabbit affinity-purified anti-enterotoxin C antibodies revealed with a goat anti-rabbit secondary antibody. Lane 1: 5 ng of *S. aureus* purified SEC1; Lanes 2 and 3: 60 ng of culture supernatants from *S. epidermidis* isolates 90 and 95, respectively.



from community-acquired strains, the difference being statistically significant ( $p < 0.001$ ).

#### 4. Discussion

In the present study, *S. haemolyticus* (44%) and *S. epidermidis* (22%) were the most frequent CNS species isolates at the NTHC-HKM in Cotonou, Benin. A study in Nigeria investigating the species distribution from 105 CNS isolates found similar incidences for *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* (Azuka and Idahosa, 2013). However, we also detected other species not identified in the Azuka et al. study, including *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. arlettae*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* and *S. kloosii*. The combined use of API STAPH and MALDI-TOF herein enabled us to identify new CNS species and could prove of interest for clinicians as some of these previously neglected species can be highly pathogenic such as *S. lugdunensis* (Argemi et al., 2015).

The results of our antibiotic susceptibility testing revealed multidrug resistance of African CNS as previously described in higher income countries (Dominguez et al., 2002; Mohan et al., 2002). Herein, the highest resistance rates were observed for oxacillin (74%), fosfomycin (81%), trimethoprim-sulfamethoxazole (72%), cefoxitin (74%), kanamycin (65%), gentamicin (54%) and tobramycin (52%). Similar results have also been reported in a study encompassing the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region (Diekema et al., 2001). Methicillin resistance (MR) still remains on the rise, especially in hospitalized patients thus complicating their treatment (Monsen et al., 2005). The most frequently isolated species in the present study were also the most resistant to methicillin with rates of 100% for *S. hominis*, 93% for *S. haemolyticus* and 67% for *S. epidermidis*. This suggests that CNS even in Benin could function as a reservoir and a source of antimicrobial resistance genes possibly transferred horizontally from CNS to *S. aureus* (Otto, 2013).

Several studies have described putative virulence factors including exoenzymes and exotoxins that could play a role in their pathogenicity as shown for *S. epidermidis* (Otto, 2012). Herein, as many as 26% of the strains displayed proteolytic activity and 25% were positive for esterase activity. Among the most frequently isolated strains, *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* were exoenzymes producers. However, some *S. cohnii* and *S. saprophyticus* isolates also showed esterase activity. The ability of some pathogenic CNS strains to produce extracellular enzymes could allow them to damage host tissues and impair innate immunity, thus promoting their spreading. As an example, the *S. epidermidis* elastase that degrades human IgM, serum albumin, fibronectin and fibrinogen is assumed to be a virulence factor (Otto, 2004). Most previous studies on the hemolytic activity of clinically significant CNS have been based on blood agar containing rabbit blood or sheep blood (Gunn and Davis, 1988), which does not reflect the specific effects of hemolytic strains stemming from humans. In the current study, we quantitatively screened strains for their hemolytic activity on human erythrocytes and obtained a positive reaction for 22% isolates, suggesting the production of extracellular hemolysins, of which *S. haemolyticus* (20%) and *S. epidermidis* (18%) were the most hemolytic.

Staphylococcal enterotoxins (SEs) are superantigens (Casman, 1960; Bergdoll and Surgall, 1959; Bergdoll et al., 1965; Casman et al., 1967; Katsuhiko et al., 2005) that stimulate the immune system to produce an exaggerated inflammatory response, causing cytokine release, clonal expansion and clonal deletion of part of these lymphocytes via apoptosis (Taylor and Llewelyn, 2010; Ortega et al., 2010). In contrast to *S. aureus* that often produces at least one superantigen, superantigen-producing CNS strains remain scarce (Becker et al., 2014). Da Cunha et al. (2007) have

reported the presence of *sea*, *seb*, *seg* and *seh* genes in various CNS species isolated from clinical samples obtained from hospitalized newborns as well as a high rate of *sec* genes specifically in *S. epidermidis* from blood (28/50). Nevertheless, the methodology used in this study for staphylococci identification appeared insufficient to confirm that the presence of *sec* genes was not partially due to *S. aureus* misidentification. Expression of these genes was not demonstrated too. While to date pertinent data on the secretion of detectable amounts of enterotoxin or enterotoxin-like products is lacking for CNS isolates, we did find in our study that 2 properly identified *S. epidermidis* strains produced SEC enterotoxin. A recent study in the United States examined 128 CNS (118 *S. epidermidis* and 10 *S. lugdunensis*) isolates from healthy human nares and diseased individuals, and determined that no known enterotoxin gene was present (Christopher et al., 2015). Enterotoxins *sec3* and *sell* carried on a pathogenicity island (SePI) were exceptionally described in a *S. epidermidis* strain (FRI909) (Madhusoodanan et al., 2011). All of the aforementioned observations hence indicate a low, but insufficiently determined prevalence of *sec* gene in *S. epidermidis*. In our context, the two strains were isolated from nosocomial bacteremia in pediatric and neonatal units and presented distinct antimicrobial resistance and virulence profiles. These *sec* gene acquisitions are likely the result of independent genetic events that need to be confirmed, since both protein and gene sequences of African strains appeared strictly comparable with the previously reported one in United States of America. Our study also revealed that 68% of virulence features were associated with nosocomial CNS, while only were observed in 32% of the community-acquired strains.

In addition to these data on the variability and antimicrobial susceptibility of CNS strains in Benin (Africa), the present study reveals the presence of virulence features such as protease, esterase, hemolysin and enterotoxins particularly in hospital-associated CNS strains isolated from blood, suggesting that CNS pathogenicity provides a selective advantage for blood colonization in hospitalized patients. Further studies will be conducted on genotyping and biochemical characterization of virulence factors of *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*.

#### Conflict of interest

None.

#### Acknowledgments

We thank Dr P. Pothier for English reading. We thank research grant from EA7290 (University of Strasbourg) and the Islamic Bank for Development, and the latter also for the doctoral award to Chimène NANOUKON.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.11.001>.

#### References

- Argemi, X., Riegel, P., Lavigne, T., Lefebvre, N., Grandpré, N., Hansmann, Y., Jaulhac, B., Prévost, G., Schramm, F., 2015. Implementation of matrix-assisted laser desorption ionization? Time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2030–2036.
- Attien, P., Sina, H., Moussaoui, W., Zimmermann-Meise, G., Dadié, T., Keller, D., Riegel, P., Edoh, V., Kotchoni, S.O., Diè, M., Prévost, G., Baba-Moussa, L., 2014. Mass spectrometry and multiplex antigen assays to assess microbial quality and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical and food samples. *Biomed. Res. Int.* 2014, 485620.

- Azuka, A., Idahosa, E., 2013. Species distribution and virulence factors of coagulase negative staphylococci isolated from clinical samples from the University of Benin Teaching Hospital, Edo State, Nigeria. *J. Nat. Sci. Res.* 3, 9.
- Baba-Moussa, L., Anani, L., Scheffel, J.M., Couturier, M., Riegel, P., 2008. Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. *J. Hosp. Infect.* 68, 32–38.
- Baba-Moussa, L., Sina, H., Scheffel, J.M., Moreau, B., Sainte-Marie, D., Kotchoni, S.O., Prévost, G., Couppié, P., 2011. Staphylococcal Pantón-Valentine Leucocidin as a major virulence factor associated to furuncles. *PLoS One* 6, e25716.
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G., 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 870–926.
- Bergdoll, M.S., Surgall, M.J., 1959. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. *J. Immunol.* 83, 334–338.
- Bergdoll, M.S., Borja, C.R., Avena, R.M., 1965. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J. Bacteriol.* 90, 1481–1485.
- Casman, D.E.P., Bennett, R.W., Dorsey, A.E., Issa, A.A., 1967. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 94, 1875–1882.
- Casman, E.P., 1960. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.* 79, 849–856.
- Christopher, S., Stach, B.G.V., Patrick, M.S., 2015. Determining the presence of superantigens in coagulase-negative staphylococci from Humans. *PLoS One* 10, e0143341.
- Da Cunha, M.L.R.S., Calsolari, R.A.O., Araujo-Junior, J.P., 2007. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol. Immunol.* 51, 381–390.
- Delanay, F., Pegot, A., Coquerel-Beghin, D., Aktouf, A., Auquit-Auckbur, I., 2014. Fasciites nécrosantes à *Staphylococcus lugdunensis* après dermolipectomie abdominale: à propos de deux cas et revue de la littérature. *Ann. Chir. Plastique Esthétique* 59, 136–139.
- Delmas, J., Chacornac, J.P., Robin, F., Giammarinaro, P., Talon, R., Bonnet, R., 2008. Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 46, 311–313.
- Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N., 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–1999. *Clin. Inf. Dis.* 32, S114–S132.
- Dominguez, E., Zarazaga, M., Torres, C., 2002. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from fecal samples of healthy children. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2638–2641.
- Durupt, F., Mayor, L., Bes, M., Reverdy, M.E., Vandenesch, F., Thomas, L., Etienne, J., 2007. Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. *Br. J. Dermatol.* 157, 1161–1167.
- Ertem, G.T., Sari, T., Hatipoglu, C.A., Yildiz, E., Zarakolu, P., Oral, B., 2010. Peritonitis due to teicoplanin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Perit. Dial. Int.* 30, 117–118.
- Falcone, M., Micozzi, A., Pompeo, M.E., Baiocchi, P., Fabi, F., Penni, A., Martino, P., Venditti, M., 2004. Methicillin-resistant staphylococcal bacteremia in patients with hematologic malignancies: clinical and microbiological retrospective comparative analysis of *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus*. *J. Chemother.* 16, 540–548.
- Fluit, A.C., Verhoef, J., Schmitz, F.J., 2001. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997–1998. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 20, 617–625.
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., König, B., 2008. Genetic classification species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1019–1025.
- Gravet, A., Colin, D.A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H., Prévost, G., 1998. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett.* 436, 202–208.
- Gunn, B.A., Davis, C.E., 1988. *Staphylococcus haemolyticus* urinary tract infection in a male patient. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1055–1057.
- Katsuhiko, O., Ken'ichi, I., Dong-Liang, H., Hidehito, K., Yoshitaku, F., Yohei, A., Shoji, H., Yutaka, W., Akio, N., Takehiko, U., Kunihiko, S., 2005. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect. Immun.* 73, 5540–5546.
- Lo, D.S., Shieh, H.H., Barreira, E.R., Ragazzi, S.L., Gilio, A.E., 2015. High frequency of *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections among female adolescents. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 1023–1025.
- Madhusoodanan, J., Seo, K.S., Remortel, B., Park, J.Y., Hwang, S.Y., Fox, L.K., Park, Y.H., Deobald, C.F., Wang, D., Liu, S., Daugherty, S.C., Gill, A.L., Bohach, G.A., Steven, R., Gill, S.R., 2011. An Enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 193, 1854–1862.
- Mahoudeau, I., Delabranche, X., Prévost, G., Monteil, H., Piémont, Y., 1997. Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2154.
- Meyer, F., Girardot, R., Piémont, Y., Prévost, G., Colin, D.A., 2009. Analysis of the specificity of Pantón-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect. Immun.* 77, 266–273.
- Mohammad, M.A.K., Aftab, F., Ahmad, M.A., 2014. Clinically significant coagulase negative staphylococci and their antibiotic resistance pattern in a tertiary care hospital. *J. Pak. Med. Assoc.* 64, 1171.
- Mohan, U., Jindal, N., Aggarwal, P., 2002. Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase negative staphylococci isolated from various clinical specimens. *Indian J. Med. Microbiol.* 20, 45–46.
- Monsen, T., Karlsson, C., Wistrom, J., 2005. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26, 76–80.
- Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S., Kimura, S., 2002. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidases from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Pathog.* 33, 33–41.
- Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., Galvez, A., 2010. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins* 2, 2117–2131.
- Otto, M., 2004. Virulence factors of coagulase-negative staphylococci. *Front. Biosci.—Landmark* 9, 841–863.
- Otto, M., 2012. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.* 34, 201–214.
- Otto, M., 2013. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection. *Bioassays* 35, 4–11.
- Pakshir, K., Zomorodian, K., Karamitalab, M., Jafari, M., Taraz, H., Ebrahimi, H., 2013. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. Isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *J. Mycol. Med.* 10, 1016.
- Pawel, M., Agnieszka, M., Malgorzata, R., 2008. The amino acid sequences and activities of synergistic hemolysins from *Staphylococcus cohnii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 287, 230–235.
- Peel, T.N., Cole, N.C., Dylla, B.L., Patel, R., 2015. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and diagnostic testing for prosthetic joint infection in the clinical microbiology laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 81, 163–168.
- Piette, A., Verschraegen, G., 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet. Microbiol.* 134, 45–54.
- Pinheiro, L., Brito, C.I., de Oliveira, A., Martins, P.Y., Pereira, V.C., da Cunha Mde, L., 2015. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. *Toxins* 7, 3688–3699.
- Rogers, K.L., Fey, P.D., Rupp, M.E., 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 23, 73–98.
- Scheifele, D.W., Bjornson, J.L., Dyer, R.A., Dimmick, J.E., 1987. Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infect. Immun.* 55, 2268–2273.
- Schoenfelder, S.M., Lange, C., Eckart, M., Hennig, S., Kozytska, S., Ziebuhr, W., 2010. Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 380–386.
- Shimuta, K., Oshinishi, M., Iyoda, S., Gotoh, N., Koizumi, N., Watanabe, H., 2009. The hemolytic and cytotoxic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. *BMC Microbiol.* 9, 261–271.
- Srdjan, S., Dragana, V., Ivana, D., Branislava, S., Milena, S., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179.
- Taylor, A.L., Llewelyn, M.J., 2010. Superantigen-induced proliferation of human CD4+ CD25-T cells is followed by a switch to a functional regulatory phenotype. *J. Immunol.* 185, 6591–6598.
- Vandecastelaere, I., Depuydt, P., Nelis, H.J., Coenye, T., 2014. Protease production by *Staphylococcus epidermidis* and its effect on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pathog. Dis.* 70, 321–331.
- Von Eiff, C., Peters, G., Heilmann, C., 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase negative *Staphylococci*. *Lancet Infect. Dis.* 2, 677–685.

## Supplementary data to the paper:

Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin.

Suppl. Table 1a. Antimicrobial resistance profile of CNS isolates.

Species	Antimicrobial resistance, N (%)										
	No.	FOX	BEN	OXA	GEN	K	TM	OFX	CLI	E	L
<i>S. haemolyticus</i>	44	41(93)	42(95)	41(93)	33(75)	40(91)	33(75)	29(66)	10(14)	22(43)	8(14)
<i>S. epidermidis</i>	22	14(64)	20(91)	14(67)	14(64)	14(64)	14(64)	9(41)	3(13)	7(33)	2(13)
<i>S. hominis</i>	7	7(100)	7(100)	7(100)	3(43)	6(86)	1(14)	2(29)	1(0)	5(40)	2(20)
<i>S. saprophyticus</i>	7	1(14)	7(100)	1(33)	0(0)	0(0)	0(0)	1(33)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>S. cohnii</i>	6	4(67)	5(83)	4(60)	1(17)	2(33)	1(17)	2(33)	0(0)	1(60)	4(60)
<i>S. sciuri</i>	3	2(67)	3(100)	2(66)	1(33)	1(33)	1(33)	1(33)	1(33)	1(33)	3(100)
Other CNS	10	4(40)	7(70)	4(40)	1(10)	1(10)	1(10)	3(30)	0(0)	2(20)	3(30)
Total	99	72(74)	91(92)	73(74)	53(54)	64(65)	51(52)	47(48)	15(15)	38(36)	22(22)

CNS, Coagulase Negative Staphylococci. The other CNS isolates were: *S. arlettae*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* and *S. kloosii*. FOX, Cefoxitin; BEN, Benzylpenicillin; OXA, oxacillin; GEN; gentamicin, K; Kanamicin, TM; Tobramicin, OFX; Ofloxacin, CL; Clindamycin, E; Erythromycin, L; Lincomycin.

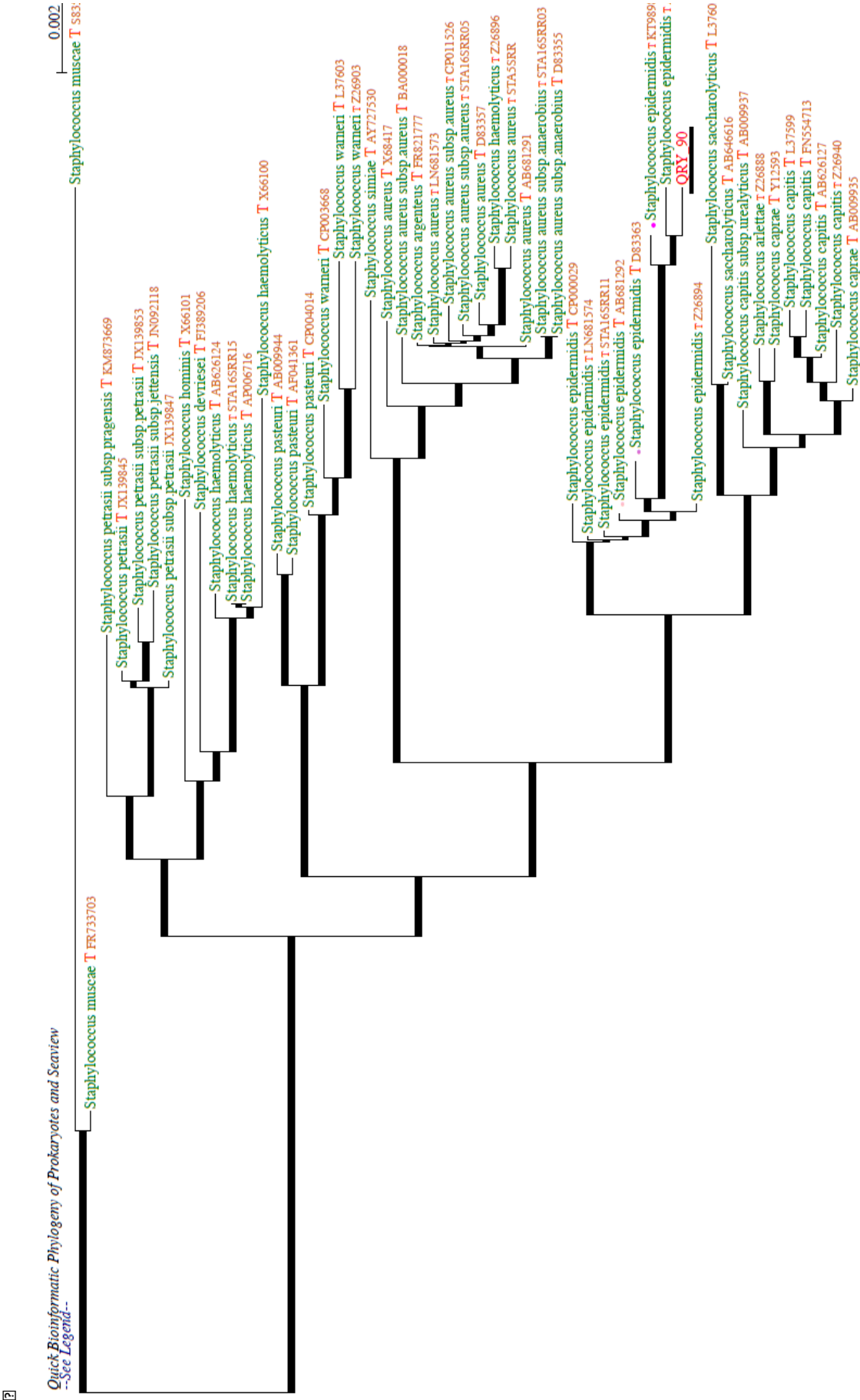
Suppl. Table 1b. Antimicrobial resistance profile of CNS isolates.

Species	Antimicrobial resistance, N (%)										
	No.	PT	LIZ	TEC	VAN	TET	FOM	NIT	FA	RIF	SXT
<i>S. haemolyticus</i>	44	1(2)	0(0)	2(6)	0(0)	26(59)	42(95)	0(0)	6(14)	5(11)	39(89)
<i>S. epidermidis</i>	22	0(0)	0(0)	1(5)	0(0)	6(27)	17(77)	0(0)	4(18)	1(7)	16(73)
<i>S. hominis</i>	7	1(14)	0(0)	0(0)	0(0)	5(71)	7(100)	0(0)	6(86)	0(0)	6(86)
<i>S. saprophyticus</i>	7	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(43)	0(0)	7(100)	0(0)	2(29)
<i>S. cohnii</i>	6	3(50)	0(0)	0(0)	0(0)	3(50)	5(83)	0(0)	5(83)	0(0)	2(33)
<i>S. sciuri</i>	3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(100)	0(0)	1(33)
Other CNS	10	1(10)	0(0)	3(30)	0(0)	2(20)	7(70)	1(10)	1(10)	0(0)	6(60)
Total	99	6(6)	0(0)	6(6)	0(0)	42(42)	81(81)	1(1)	32(32)	6(6)	72(72)

CNS, Coagulase Negative Staphylococci. The other CNS isolates were: *S. arlettae*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* and *S. kloosii*. PT, Pristinamycin; LIZ, Linezolid; TEC, Teicoplanin; VAN, vancomycin; TET, Tetracycline; FOM, Fosfomycin; FT, Nitrofurantoin; FA, Fusidic acid; RIF, Rifampicin; SXT, Trimethoprim-Sulfamethoxazole.

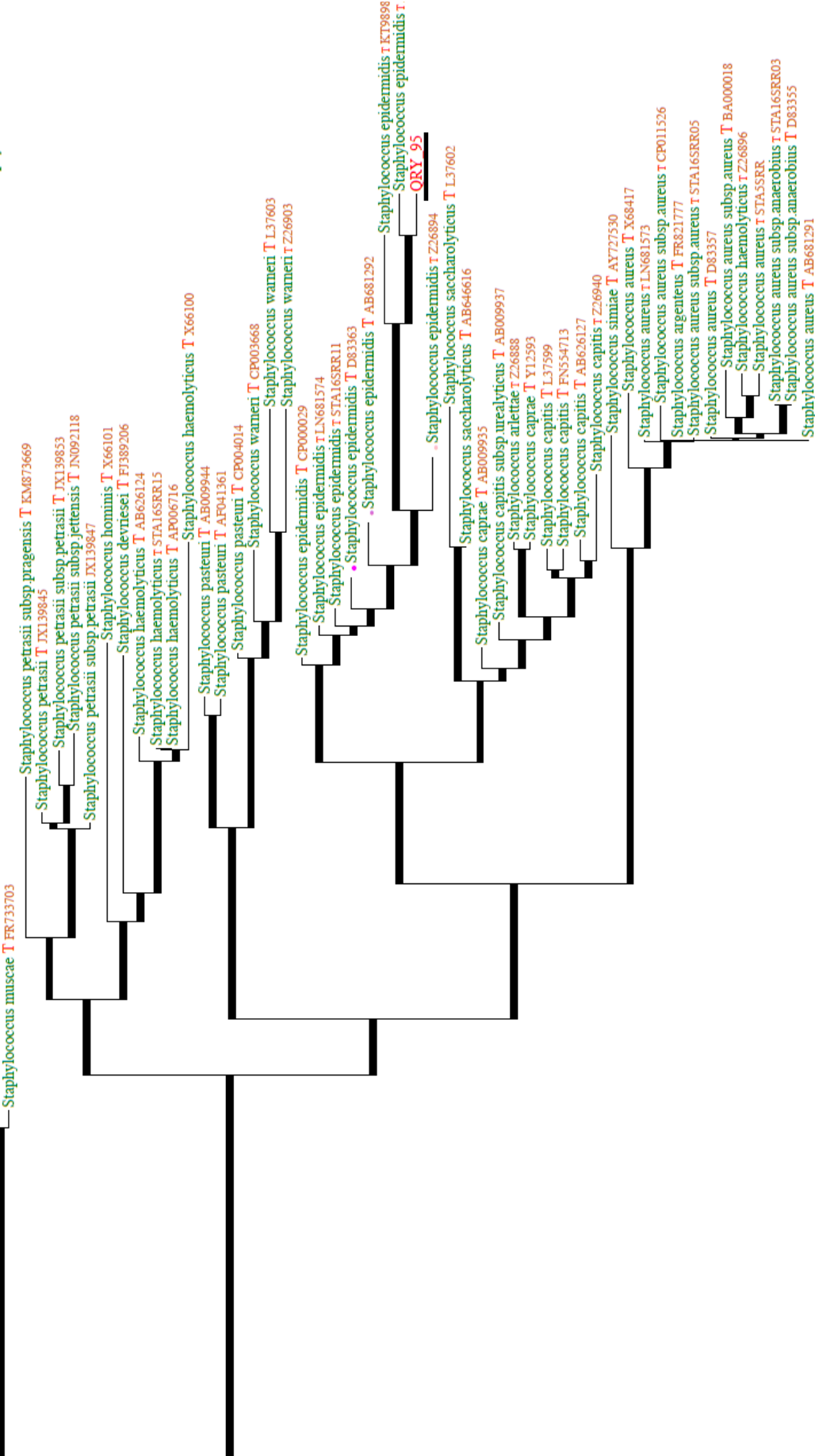


Suppl. Figure 1: Phylogenetic tree of the taxonomic situation of the *Staphylococcus* isolates based on the 16S rDNA sequencing



Quick Bioinformatic Phylogeny of Prokaryotes and Seemview  
--See Legend--

0.002  
Staphylococcus muscae T 583



Staphylococcus muscae T 583

Suppl. Figure 2: Peptidic sequences alignment of SEC3 deduced sequences from *S. epidermidis* strains 90 and 95 with that of *S. epidermidis* FRI909 and that of *S. aureus* Mu3, using Clustal software.

```

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

S_aureus_Mu3_sec3_aa      MYKRLFISRVLIFALILVISTPNVLAESQPDMPDLDHKSSEFTGTMGNMKYLYDDHYV
S_epi_FRI909_sec3_aa     MYKRLFVSRVLIFALILVIFIPNVLAESQPDMPDLDHKSSEFTGTMGNMKYLYDDHYV
s_epi_90-sec3_aa         -----MGNMKYLYDDHYV
s_epi_95-sec3_aa         -----MNMKYLYDDHYV
                          * *****

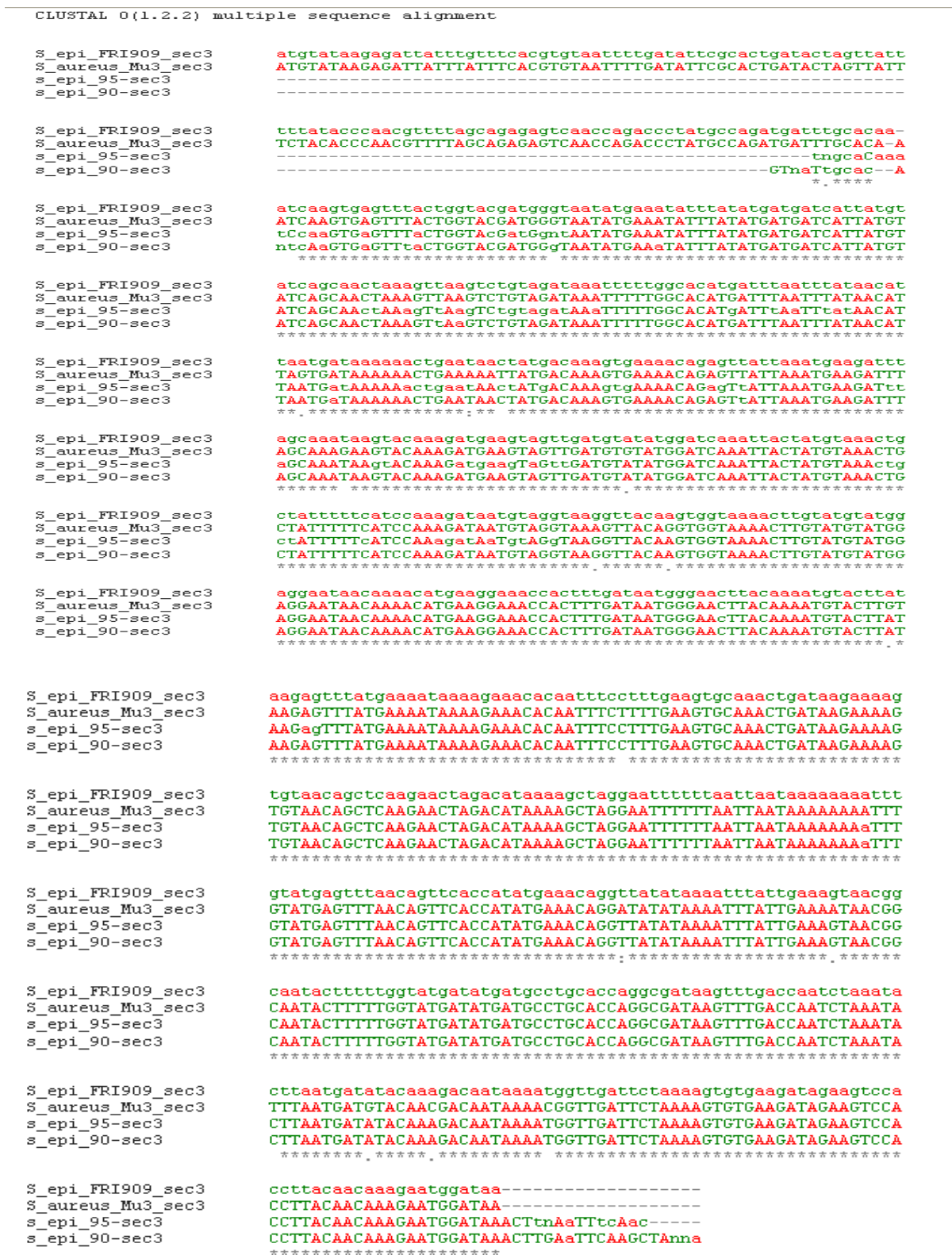
S_aureus_Mu3_sec3_aa      SATKVKSVDKFLAHDLIYMSDKKLNKYDKVKTLLNEDLAKKYRDEVVDVYGSNYYVNC
S_epi_FRI909_sec3_aa     SATKVKSVDKFLAHDLIYMINDKKLNNYDKVKTLLNEDLANKYRDEVVDVYGSNYYVNC
s_epi_90-sec3_aa         SATKVKSVDKFLAHDLIYMINDKKLNNYDKVKTLLNEDLANKYRDEVVDVYGSNYYVNC
s_epi_95-sec3_aa         SATKVKSVDKFLAHDLIYMINDKKLNNYDKVKTLLNEDLANKYRDEVVDVYGSNYYVNC
                          *****_***:*****

S_aureus_Mu3_sec3_aa      YFSSKDNVGVKVTGKTCMYGGITKHEGMHFDNGNLQNVLRVYENKRNTISFEVQTDKKS
S_epi_FRI909_sec3_aa     YFSSKDNVGVKVTGKTCMYGGITKHEGMHFDNGNLQNVLRVYENKRNTISFEVQTDKKS
s_epi_90-sec3_aa         YFSSKDNVGVKVTGKTCMYGGITKHEGMHFDNGNLQNVLRVYENKRNTISFEVQTDKKS
s_epi_95-sec3_aa         YFSSKDNVGVKVTGKTCMYGGITKHEGMHFDNGNLQNVLRVYENKRNTISFEVQTDKKS
                          *****_*****

S_aureus_Mu3_sec3_aa      VTAQELDIKARNFLINKKNLYEFNSSPYETGYIKFIE SNGNTFWYDMMPPAGDKFDQSKY
S_epi_FRI909_sec3_aa     VTAQELDIKARNFLINKKNLYEFNSSPYETGYIKFIE SNGNTFWYDMMPPAGDKFDQSKY
s_epi_90-sec3_aa         VTAQELDIKARNFLINKKNLYEFNSSPYETGYIKFIE SNGNTFWYDMMPPAGDKFDQSKY
s_epi_95-sec3_aa         VTAQELDIKARNFLINKKNLYEFNSSPYETGYIKFIE SNGNTFWYDMMPPAGDKFDQSKY
                          *****_*****

S_aureus_Mu3_sec3_aa      LMMYDNKTVDSKSVKIEVHLTTKNG
S_epi_FRI909_sec3_aa     LMIYKDNKMVDKSVKIEVHLTTKNG
s_epi_90-sec3_aa         LMIYKDNKMVDKSVKIEVHLTTKNG
s_epi_95-sec3_aa         LMIYKDNKMVDKSVKIEVHLTTKNG
                          **:*:*** *****
    
```

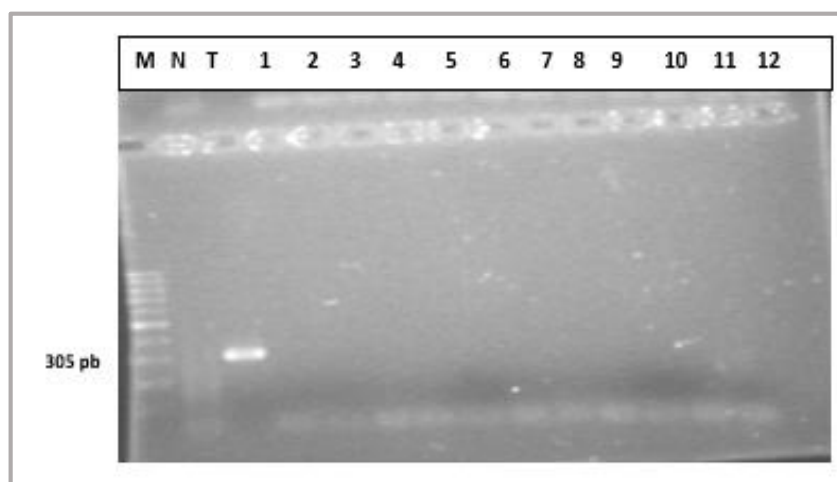
Suppl. Figure 3: Nucleotide sequences alignment of SEC3 deduced sequences from *S. epidermidis* strains 90 and 95 with that of *S. epidermidis* FRI909 and that of *S. aureus* Mu3, using Clustal software



## 1.2. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES

### Recherche de facteurs d'affinité au fibrinogène chez les SCN

Le clumping factor A (ClfA) est une protéine de liaison au fibrinogène qui fait partie de la famille des adhésines (Entenza et al., 2005). C'est un facteur de virulence de *S. aureus* localisé à la surface de la bactérie. Sa liaison aux monomères de fibrinogène dans le plasma sanguin a pour effet d'activer ces derniers et de déclencher l'agglutination du plasma (O'Brien et al., 2009). Cette capacité d'adhésion au fibrinogène a été décrite également chez certaines espèces de SCN comme *S. lugdunensis* et *S. epidermidis* qui produisent un homologue du ClfA (Fbl) et c'est ce qui explique les erreurs d'identification de ces souches avant l'avènement de la spectrométrie de masse. Ainsi, nous avons recherché par un test d'agglutination de billes de latex recouvertes de fibrinogène (Pastorex™ STAPH-plus), le ClfA dont la présence chez ces isolats témoignerait d'une éventuelle virulence de celles-ci. Finalement, aucune des 99 souches de notre étude ne produisaient le Clumping factor A. D'autre part, nous avons aussi recherché par PCR, le gène codant le clumping facteur B (ClfB) qui en plus de son affinité au fibrinogène, se fixe sur les kératinocytes, favorisant leur desquamation. Une absence d'amplification de ce gène est aussi observée pour tous les SCN testées (Figure 3.1).



**FIGURE 3.1 : ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE POUR LA DÉTECTION PAR PCR DU CLFB (305 PB).**

M: marqueur de poids moléculaire, N: contrôle négatif, T: *S. aureus* SCP FRI 341 (*clfB*<sup>+</sup>), 1- 12: souches de SCN dépourvues du gène codant le *clfB*.



## PARTIE 2

### 2.1. ARTICLE 2: CHARACTERIZATION OF HUMAN TYPE C ENTEROTOXIN PRODUCED BY CLINICAL *S. EPIDERMIDIS* ISOLATES

**Statut :** Article soumis dans « Toxins »

**Auteurs :** Chimène Nanoukon, Dissou Affolabi, Daniel Keller, Rodrigue Tollo, Phylippe Riegel, Lamine Baba-Moussa, Gilles Prévost.

#### 2.1.1. Présentation du sujet

Les entérotoxines staphylococciques sont des superantigènes (SAg) produits à l'origine par *S. aureus*. Cependant, leur présence chez les staphylocoques à coagulase négative est de plus en plus suspectée. Ces toxines ne sont pas seulement actives sur les cellules gastro-intestinales et endothéliales, mais fonctionnent aussi comme des superantigènes qui stimulent vigoureusement la prolifération non spécifique des lymphocytes T portant certains domaines V $\beta$  variables du récepteur de ces cellules et favorisant ainsi la sécrétion de cytokines à des doses toxiques pour l'organisme d'hôte. Nous avons précédemment criblé 22 souches de *S. epidermidis* issues d'infections sévères pour divers pouvoirs toxiques et antigéniques (Nanoukon et al., 2017) et avons trouvé que deux isolats provenant d'hémocultures sont identifiés comme porteurs du gène codant une entérotoxine staphylococcique proche de SEC de *S. aureus*. Dans cet article, nous avons purifié et caractérisé cette nouvelle entérotoxine C-like produite par *S. epidermidis*, nommée SEC<sub>epi</sub>, afin de déterminer ses caractères moléculaires, biologiques et immunologiques comme les prémices de son implication potentielle dans la pathogénicité de *S. epidermidis*.

#### 2.1.2. Résumé des résultats

Nos analyses montrent que les séquences nucléotidiques et peptidiques de SEC<sub>epi</sub> sont identiques pour les deux souches. Cependant, on note des substitutions d'acides aminés (11 substitutions) dans le peptide signal et dans la chaîne mature de la protéine comparativement à la séquence peptidique de SEC<sub>aureus</sub>. Nous avons pu réaliser une modélisation structurale de SEC<sub>epi</sub> sur la base de sa grande similitude avec SEC<sub>aureus</sub> Mu3 et montrer par un alignement structural des deux protéines, que la majorité des résidus impliqués dans la liaison du CMH-II de la cellule présentatrice d'antigène (CPA) et du récepteur des lymphocytes T (TCR) à SEC<sub>aureus</sub>

est conservé dans SEC<sub>epi</sub> en dehors d'une substitution de la méthionine en position 226 par l'isoleucine. En effet, cette liaison avec la toxine est un préalable à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative et donc aux effets notoires des entérotoxines. Vu la structure de SEC<sub>epi</sub>, nous avons suggéré l'existence d'une fonction superantigénique de la protéine. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons préparé SEC<sub>epi</sub> recombinante après le clonage, l'expression et la purification de la protéine par une chromatographie d'affinité à la GSH. Une analyse fonctionnelle basée sur la mesure de la prolifération lymphocytaire (ELISA directe) et de la sécrétion de cytokines (ELISA Multiplex) a été réalisée. Nos analyses révèlent que la toxine recombinante présente des activités biologiques caractéristiques d'un SAg telles que la stimulation de la mitogénicité des cellules T humaines et l'induction de la libération simultanée de quantités élevées de cytokines pro-inflammatoires : IL-2, -6, -8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF et de cytokines suppressives (IL-4, -10) déjà à partir d'une faible dose de toxine (3,7 pM). Cependant, on note une différence significative entre la quantité de cytokine pro-sepsis IL-6 produite par les lymphocytes activés par SEC<sub>epi</sub> (7000 pg/ml) et les lymphocytes T activés par SEC<sub>aureus</sub> (800 pg/ml). Ces données suggèrent que la réponse inflammatoire systémique induite par SEC<sub>epi</sub> serait plus sévère que celle provoquée par SEC<sub>aureus</sub>. De plus, SEC<sub>epi</sub> reste stable pendant près de 15 min aux températures extrêmes de cuisson (100 °C) et résiste à l'action de la pepsine ou de la trypsine. Ceci pourrait faciliter une activité émétique.

### 2.1.3. Conclusion

À partir de ces résultats, nous avons montré que les toxines superantigènes produites par les SCN sont génétiquement et fonctionnellement très proches de celles de *S. aureus* et peuvent contribuer à augmenter le pouvoir pathogène de *S. epidermidis*. Cela pourrait provenir de la colonisation de la peau humaine par diverses biovars d'espèces de staphylocoques favorisant le transfert horizontal des gènes de virulence de *S. aureus* vers les *S. epidermidis* commensaux de la peau. De plus, la réaction du système immunitaire de l'hôte peut être beaucoup plus sévère face à l'ingestion d'une dose importante d'entérotoxine SEC<sub>epi</sub> avec la production d'une forte dose d'IL-6, une cytokine marqueur du choc septique. La prise en charge de l'intoxication due à SEC<sub>epi</sub> par les cellules de l'immunité, pourrait ainsi être modifiée vers une réaction inflammatoire généralisée et un syndrome de défaillance multiviscérale.

### **Characterization of human type C Enterotoxin produced by clinical *S. epidermidis* isolates**

Chimène Nanoukon<sup>a,b</sup>, Dissou Affolabi<sup>b</sup>, Daniel Keller<sup>a</sup>, Rodrigue Tollo<sup>b</sup>, Philippe Riegel<sup>a</sup>,  
Lamine Baba-Moussa<sup>c</sup>, Gilles Prévost<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Université de Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, VBP EA 7290, F-67000 Strasbourg, France.

<sup>b</sup>Laboratoire de Microbiologie du Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou-Maga, Cotonou, Benin.

<sup>c</sup>Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, Université d'Abomey, Calavi, 05 BP 1604 Cotonou, Benin.

\*Corresponding author: Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France.

E-mail address: [prevost@unistra.fr](mailto:prevost@unistra.fr)

#### **Short title: Staphylococcal enterotoxin C in coagulase negative staphylococci**

#### **Abstract (209 words)**

Staphylococcal Enterotoxins (SEs) are superantigens (SAg) originally produced by *S. aureus* but their presence in coagulase negative staphylococci (CNS) has longer been suspected. This study aims to characterize a novel enterotoxin C-like expressed by clinical *S. epidermidis* strains, called SEC<sub>epi</sub>. In this study, we isolated and characterized SEC<sub>epi</sub> for its molecular and functional properties. The toxin was structurally modeled according to its significant similarity with *S. aureus* SEC3. To estimate functional properties of SEC<sub>epi</sub>, recombinant SEC<sub>epi</sub> was cloned for expression in *E. coli*. Most of SEC amino acids residues important for the formation of the trimolecular MHC-II–SEC–TCR complex are conserved in SEC<sub>epi</sub>. The recombinant purified toxin exhibits biological characteristics of a SAg including stimulation of human T-cell mitogenicity, concomitant releases of, and inducing high cytokines levels: IL-2, -4, -6, -8, -10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and GM-CSF at a dose as low as 3.7 pM. Indeed, the production of pro-sepsis cytokine IL-6 is significantly higher when lymphocytes are activated with SEC<sub>epi</sub>. Furthermore, SEC<sub>epi</sub> is stable to heat, pepsin or trypsin hydrolysis. Collectively, the SEC<sub>epi</sub> superantigen produced by CNS is genetically and functionally very close to that of *S. aureus* but, possibly inducing a systemic inflammatory response at least comparable to that of SEC<sub>aureus</sub>, and remains intriguing toward *S. epidermidis* pathogenicity.

**Keywords:** Enterotoxins, superantigens, coagulase-negative staphylococci, *S. epidermidis*, mitogenicity, cytokines.

### Introduction

Staphylococcal superantigens (SAGs) represent a large family of at least 23 members in *S. aureus* that includes toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), staphylococcal enterotoxins (SEs), and SE-like (SEI) where emetic activities are lacking, not yet confirmed or whose roles in diseases remain under investigation [1-4]. SEs are common causes of food poisoning, but were also involved in acute atopic eczema [5], urticaria [6] and rheumatoid arthritis [7]. Their involvement in lethal sepsis, infectious endocarditis, acute kidney injury and necrotizing pneumonia are also demonstrated in animal models [8,9]. These toxins are not only active on gastrointestinal and endothelial cells, but also function as superantigens that stimulate non-specific but vigorous proliferation of T-cells bearing certain T-cell receptor  $\beta$ -chain variable regions [10,2]. This hyperstimulation occurs through the binding of enterotoxin to the  $\alpha$ -helical regions of the Major Histocompatibility Complex class II (MHC-II) molecules present on antigen-presenting cells outside the peptide binding sites of the normal antigens [10]. Thus, conventional antigens stimulate 0.01% of T-cells, while SAGs can stimulate 30% or more of T-cells, according to individual specificities [10]. SEs superantigenicity induces many shared activities among which: cytokine induction, pyrogenicity, lymphocyte proliferation, immunosuppression and toxic shock. Due to these properties, SEs are assumed to be a threat for public health.

In coagulase negative staphylococci (CNS), there are only few studies that demonstrate their ability to produce stable enterotoxins. Recent studies indicate that CNS isolated from veterinary sources and food may produce typically *S. aureus*-related SEs [11,12], but not CNS from human sources [13]. However, it has been recognized that superantigen genes are often associated with mobile genetic elements (MGEs), such as pathogenicity islands, prophages, or plasmids [14,15]. This involves that SEs genes can move from *S. aureus* strain to strain by horizontal transfer and that the colonization of the skin and the mucosa, simultaneously by several *Staphylococcus* species might promote such genes transfer from *S. aureus* to skin commensal CNS. The *sec* gene encoding enterotoxin C has been reported among the most common enterotoxins observed in clinical *S. aureus* after, SEA, SED et SEB [16]. This toxin is produced by 16% of clinical *S. aureus* isolates [17]. Three major subtypes of SEC toxin (SEC1-

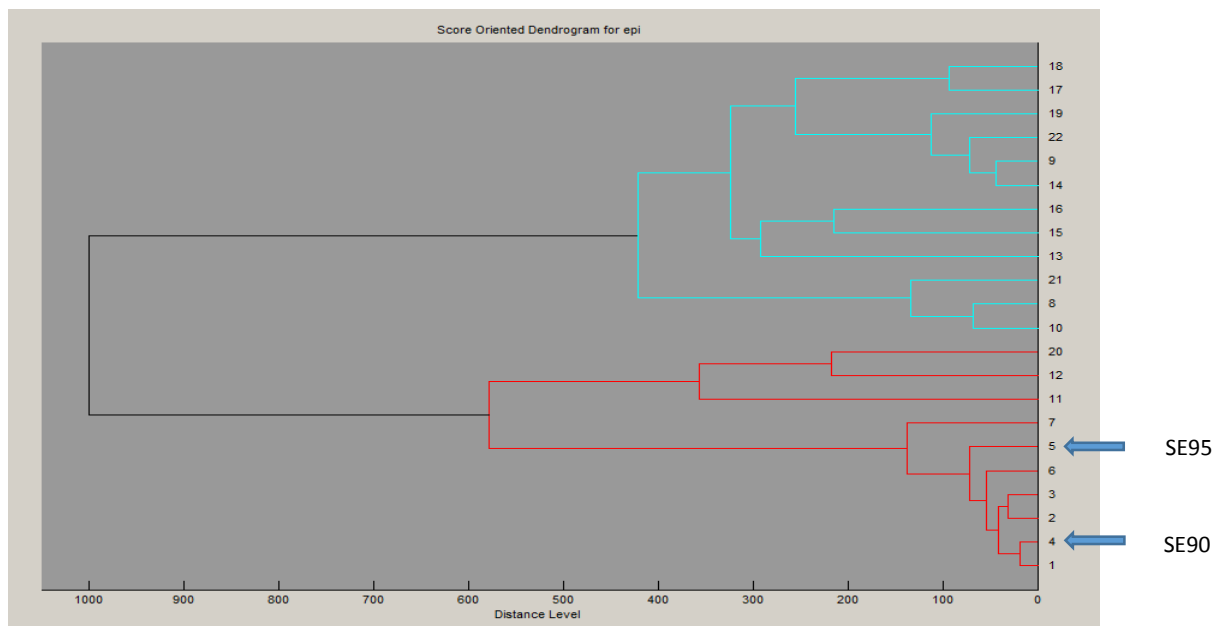
3) exist. SEC3 differs from enterotoxins SEC1 and SEC2 by four and nine amino acids, respectively [16]. The three subtypes are immunologically close [18,19] and all activate T lymphocytes though T Cell Receptors (TCR) bear hypervariable regions V $\beta$ s 3, 12, 13.2, 14, 15, 17 and/or 20 [20]. Nevertheless, it was shown that SEC2 and SEC3 have more affinity for TCR that bears V $\beta$  13.2, but bind more weakly TCR than SEC1 to TCR bearing V $\beta$ 3 [20]. This difference is due to a valine substitution at position 26 in SEC1 by a tyrosine in SEC2 and SEC3 [20]. In the CNS group, *Staphylococcus epidermidis* is one of the species that has attracted most attention by their involvement in serious hospital infections, particularly in cases related to prosthetic joint surgery [21,22]. A single human clinical *S. epidermidis* strain was previously characterized for carrying *sec* gene [23]. We previously reported the production of an staphylococcal enterotoxin C analogous in two new clinical *S. epidermidis* SE90 and SE95 isolates from Africa [24]. In the present study, we purified that the novel type C-like enterotoxin produced by *S. epidermidis* named SEC<sub>epi</sub> in order to determine its molecular, biological and immunological characters as a preamble of its potential involvement in the pathogenicity of *S. epidermidis*.

## 2. RESULTS

### 2.1. Characteristics of a putative *sec* gene encoded by clinical *S. epidermidis* strains

In order to examine the superantigenic capacity of the clinical *S. epidermidis* strains, we previously screened 22 *S. epidermidis* isolates from various clinical samples for enterotoxins genes (*sea*, *sab*, *sec*, *seg* and *seh*) by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Two isolates (9%) from blood were found to carry and to express *sec* [24]. We found by using radial immunoprecipitation method with a standard range of purified toxin concentration (data not shown), that *sec*<sub>epi</sub> is expressed at about 90  $\mu$ g/mL in both SE90 and SE95 isolates culture supernatants after 24h of growth at 37 °C. The *sec* gene was sequenced from these two *S. epidermidis* isolates. Homology analysis of the deduced amino acids sequences of the amplified *sec* genes revealed that SEC<sub>epi</sub> were 100% conserved among both two isolates, while analysis of the generated dendrogram issued from the MALDI-TOF spectrum of the 22 strains shows that both strains do not aggregate in a same cluster (Figure 1). We amplified through PCR the corresponding Open Reading Frame (ORF) and sequenced the designated *sec*<sub>epi</sub> encoding *S. epidermidis* staphylococcal enterotoxin-like toxin C (SEC<sub>epi</sub>). The corresponding peptide chain was 266 amino acids long for a structural gene of 801 bp (Figure 2). Thus, SEC<sub>epi</sub> is closely-related to previously described SEs. Based on the results of homology comparison

between the peptide chain of SEC<sub>epi</sub> and known *sec* gene sequences, we found that *sec*<sub>epi</sub> is closed to *S. aureus* Mu3 *sec3* gene, with three amino acids substitutions in the signal peptide (I7V, S21F, T22I) and nine amino acids substitutions in the mature protein (S54N, K59N, K75N, G106S, V133I, N191S, M216I, N218K, T222M) (Figure 2). Furthermore, several SEC amino acids residues are important to the formation of the trimolecular MHC–SEC–TCR complex and, thus, promoting superantigenicity (amino acids for binding to TCR colored in red and amino acids for binding to MHC colored to pink), and conserved in the SEC<sub>epi</sub> protein (Figure 2). We noted that only methionine226, participating in the binding of MHC (surrounded by a pink frame) was substituted by isoleucine in SEC<sub>epi</sub>. Using the online signal peptide prediction software Expsy Compute pI/Mw tool, we predicted the N-terminal amino acids sequence of the mature form of SEC<sub>epi</sub>. The putative mature protein sequence of SEC<sub>epi</sub> has 239 amino acids residues with a predicted molecular weight of 27.6 kDa, and an isoelectric point at 6.35, while a disulfide bridge is formed by two cysteine residues. This is similar to *S. aureus* SEC biochemical properties.



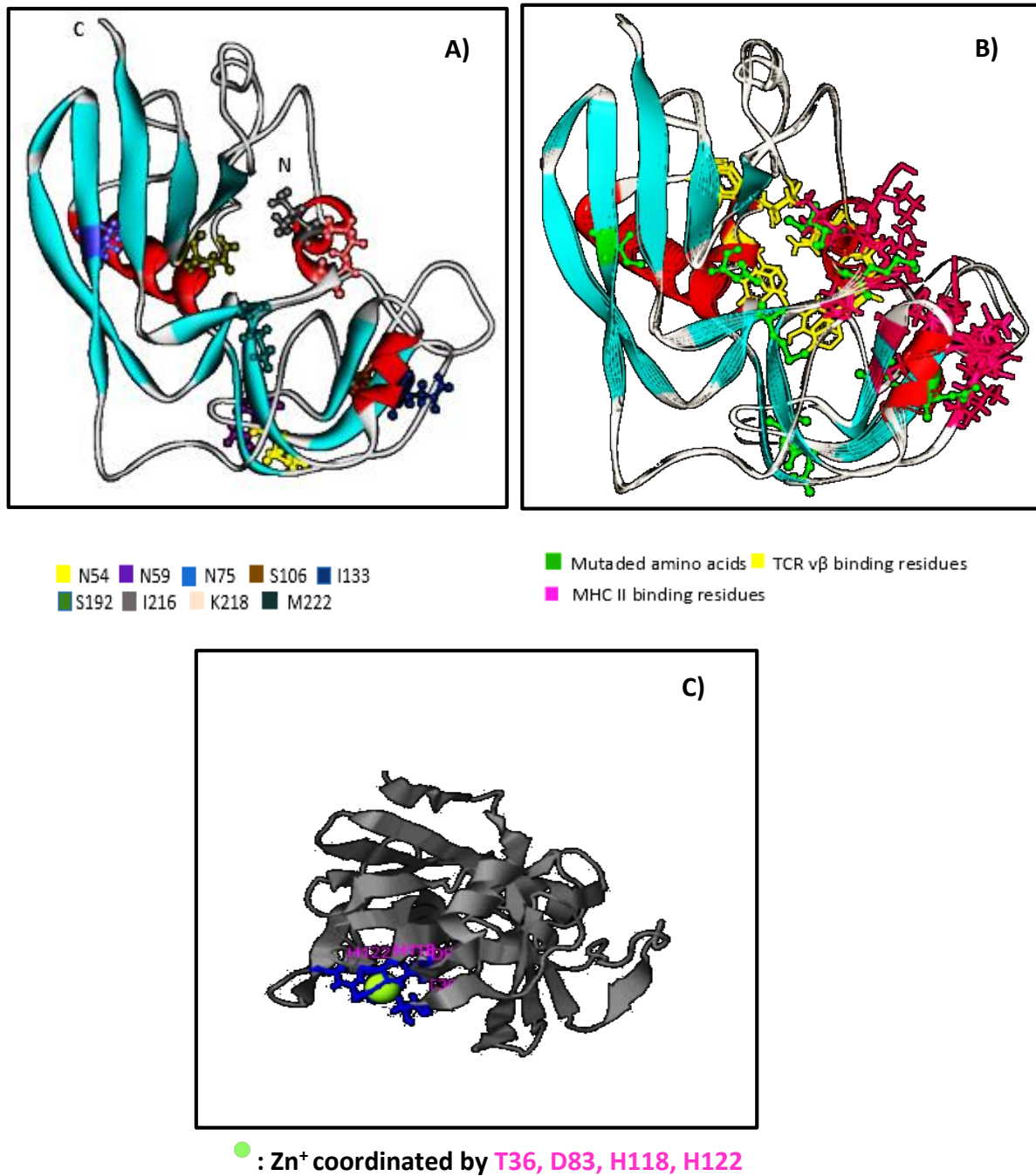
**Figure 1.** Proteomic relatedness. Dendrogram generated by Biotyper™ based on MALDI-TOF spectral profiles of *S. epidermidis* isolates.

Sec <sub>epi</sub>	1	MYKRLFYSRVILIFALILVITPNVLA	1	ESQDPMPDDLHKSSEFTGTMGN	23	50
Sec <sub>3Mu3</sub>	1	MYKRLFYSRVILIFALILVITPNVLA	1	ESQDPMPDDLHKSSEFTGTMGN	23	50
Sec <sub>epi</sub>	51	MKLYDDHYVSATKVKSVDKFLAHDLIYNINDKKLNNYDKVKTPELLNEDL	74		73	100
Sec <sub>3Mu3</sub>	51	MKLYDDHYVSRATKVKSVDKFLAHDLIYNISDKKLNNDYDKVKTPELLNEDL	74		73	100
Sec <sub>epi</sub>	101	ANKYKDEVVDVYGSNYVNCYFSSKDNVGVKVTSGKTCMYGGITKHEGNHF	124		123	150
Sec <sub>3Mu3</sub>	101	AKKYKDEVVDVYGSNYVNCYFSSKDNVGVKVTGGKTCMYGGITKHEGNHF	124		174	150
Sec <sub>epi</sub>	151	DNGNLQNVLIIRVYENKRNTISFEVQTDKKSVTAEQELDIKARNFLINKKNL	175		223	200
Sec <sub>3Mu3</sub>	151	DNGNLQNVLVIRVYENKRNTISFEVQTDKKSVTAEQELDIKARNFLINKKNL	175		223	200
Sec <sub>epi</sub>	201	YEFNSSPYETGYIKFIESNGNTFWYDMMAPGDKFDOSKYLMIYKDNKMY	224		239	250
Sec <sub>3Mu3</sub>	201	YEFNSSPYETGYIKFIENNGNTFWYDMMAPGDKFDOSKYLMMYNDNKTV	224		239	250
Sec <sub>epi</sub>	251	DSKSVKIEVHLTTKNG	266			
Sec <sub>3Mu3</sub>	251	DSKSVKIEVHLTTKNG	266			

**Figure 2.** ClustalW alignment of amino acids sequences between *S. epidermidis* SEC3 (SEC<sub>epi</sub>) and *S. aureus* Mu3 SEC3 (SEC<sub>3Mu3</sub>). Putative signal peptides are colored in yellow. The non-corresponding amino acids, amino acids required for binding to TCR V $\beta$  chain and residues contacting MHC II (HLA-DR) are highlighted in grey, red and pink, respectively. The non-corresponding residue SEC<sub>epi</sub> I216 to binding site of MHC is surrounded by a pink frame.

## 2.2. Structural features of SEC<sub>epi</sub> and Structural Homology with SEC<sub>aureus</sub>

Using I-Tasser<sup>TM</sup> and WebLab ViewerPro<sup>TM</sup>, we generated the predicted SEC<sub>epi</sub> 3D structure. The predicted conformation of SEC<sub>epi</sub> is characterized by unequal sized domains, as found too, in over bacterial superantigens. The larger domain top left is the  $\beta$ -grasp fold consisting of four to five strand  $\beta$ -sheet over, which is in front of an  $\alpha$ -helix. The small domain bottom right is the fold of a greek-key  $\beta$ -barrel capped by an  $\alpha$ -helix at end and contains the disulfide loop (Figure 3A). A structural alignment of the predicted form of SEC<sub>epi</sub> with the previously determined structure of *S. aureus* SEC type 3 in both I-TASSER<sup>TM</sup> software and in TM-align structural alignment program, revealed that the amino acids residues involved in TCR and MHC bindings are structurally identical in spite of a M226I polymorphism (Figure 3B). A zinc ligation complex is found in the structure of SEC<sub>epi</sub> and is coordinated by T36, D83, H118, H122 residues (Figure 3C). The zinc-binding site residues observed in the SEC<sub>3aureus</sub> crystal structure (deposited in the Protein Data Bank with the accession code 1ck1) vary with the amino acid D9 replaced by T36. This result clearly shows a high structural homology between these two isoforms.



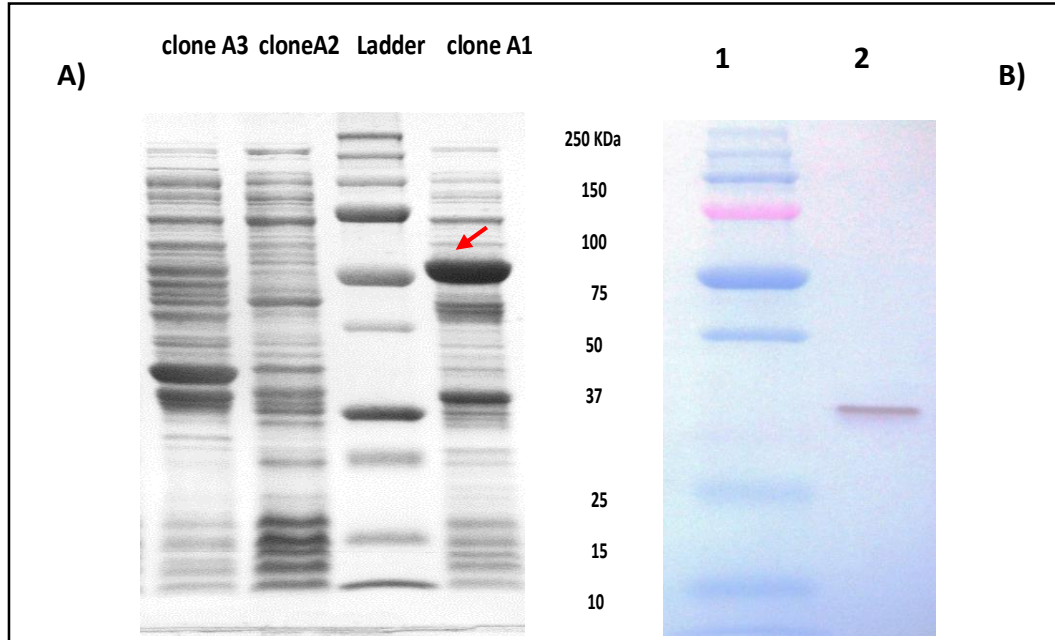
**Figure 3.** Prediction of the structure model, and structural alignment and zinc binding sites of SEC<sub>epi</sub>. A) Structure model of SEC<sub>epi</sub>. The predicted conformation was determined as “superantigen” in reference to its remarkable conformation close to other superantigens 3D structures. The mutated amino acids are in ball and stick. B) Structural alignment of SEC<sub>epi</sub>. Superimposition of the structure of SEC<sub>aureus</sub> (in line ribbon) with the predicted structure of SEC<sub>epi</sub> (in solid ribbon) shows that both toxins significantly matched together. The TCR binding sites (in yellow stick) and MHC binding sites (in pink stick) of both SEC isoforms are well



superimposed. The mutated amino acids residues in SEC<sub>epi</sub> are colored in green ball and stick. C) ligand binding sites of SEC<sub>epi</sub>, the zinc atom is represented as a green ball. Ligand binding sites residues identified in this study are colored in green stick.

### 2.3. Expression and purification of rSEC<sub>epi</sub>

Transformation of the recombinant vector pGEX-sec<sub>epi</sub> into *E. coli* BL21 allowed us to obtain three A1, A2 and A3 clones resistant to ampicillin. The expression of the fusion protein SEC<sub>epi</sub>-GST in these clones was screened by SDS-PAGE after induction with the IPTG. The results showed that only clone A1 expresses SEC<sub>epi</sub> by the presence of an approximately 53 KDa protein representing the GST (26KDa) coupled to SEC<sub>epi</sub> (27 KDa) (Figure 4A). After confirmation by nucleotide sequencing and peptide alignment with the SE90 and SE95 sec<sub>epi</sub> gene amplicon sequences, recombinant SEC<sub>epi</sub> was overexpressed in *E. coli* BL21 and purified by glutathione-Sepharose 4B chromatography. The immunological reactivities of rSEC<sub>epi</sub> with rabbit affinity-purified *S. aureus* anti-enterotoxin C antibodies were assayed by using Western blot. As shown in Figure 4B, the antibody reacted with purified rSEC<sub>epi</sub>. These results indicate that antigenic relationships of rSEC<sub>epi</sub> are close to SEC<sub>aureus</sub>.

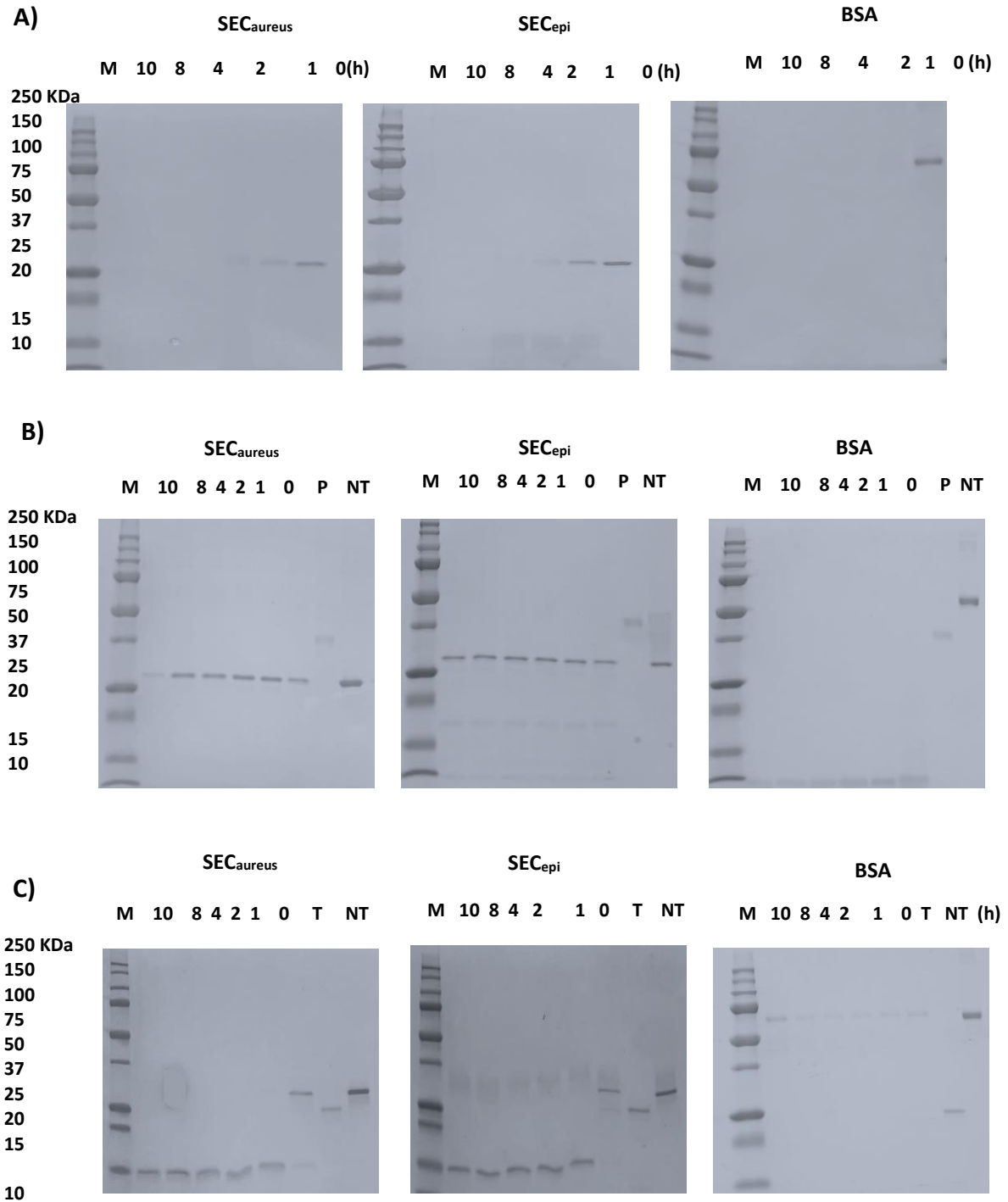


**Figure 4.** Analysis of cloning and identity of SEC<sub>epi</sub> by 12% SDS-PAGE with with Roti<sup>®</sup>-Blue staining. A) SDS-PAGE 12% of the bacterial lysates of clones A1, A2 and A3 after cloning of sec<sub>epi</sub>. The red arrow indicates the 53 kDa band corresponding to SEC<sub>epi</sub>-GST expression by

clone A1. B) Immunoblotting of purified SEC<sub>epi</sub> using rabbit affinity-purified *S. aureus* anti-enterotoxin C antibodies. Lane 1: Molecular weight standard, lane 2: 50 ng of rSEC<sub>epi</sub>.

#### **2.4. SEC<sub>epi</sub> is stable to heat treatment and digestive enzymes treatment**

In this study, we examined whether SEC<sub>epi</sub> resists to heat related to food preparation, pepsin and trypsin digestion in gastrointestinal conditions. After heat treatment at 100 °C, 1h-12h, the samples were analyzed by SDS-PAGE (Figure 5A). The BSA band immediately disappeared before 1 h treatment. However the SEC<sub>epi</sub> and SEC<sub>aureus</sub> bands persist after 1 hour and before to become almost invisible at 2 hours of treatment. For proteolytic enzymes analysis, the BSA band was no longer visible 1 h after pepsin treatment. In contrast, the SEC<sub>epi</sub> and SEC<sub>aureus</sub> bands were still observed at up to 10 h after pepsine treatment and each showed a single band of equal intensity corresponding to its authentic size (27 kDa) (Figure 5B). Trypsin is the most important digestive protease in intestine of humans and animals. The stability of both toxins upon trypsin digestion was further evaluated. SEC<sub>epi</sub> and SEC<sub>aureus</sub> treated with trypsin appeared as bands of molecular weight reduced by half (13 kDa) compared to the normal weight of the toxin in the SDS-polyacrylamide gels. However, these bands were observed until 12 h after treatment (Figure 5C). In contrast, trypsin-treated BSA appears as almost invisible bands already after 1 hour (Figure 5C). In regard to the rate of hydrolysis, the tryptic products generated by SEC<sub>epi</sub> hydrolysis was identical to those generated from SEC<sub>aureus</sub>. These results indicate that the mutations observed in the amino acids sequence of SEC<sub>epi</sub> do not affect its resistance to degradation by heat, or some of the harsh conditions of the gastrointestinal tract, at least.

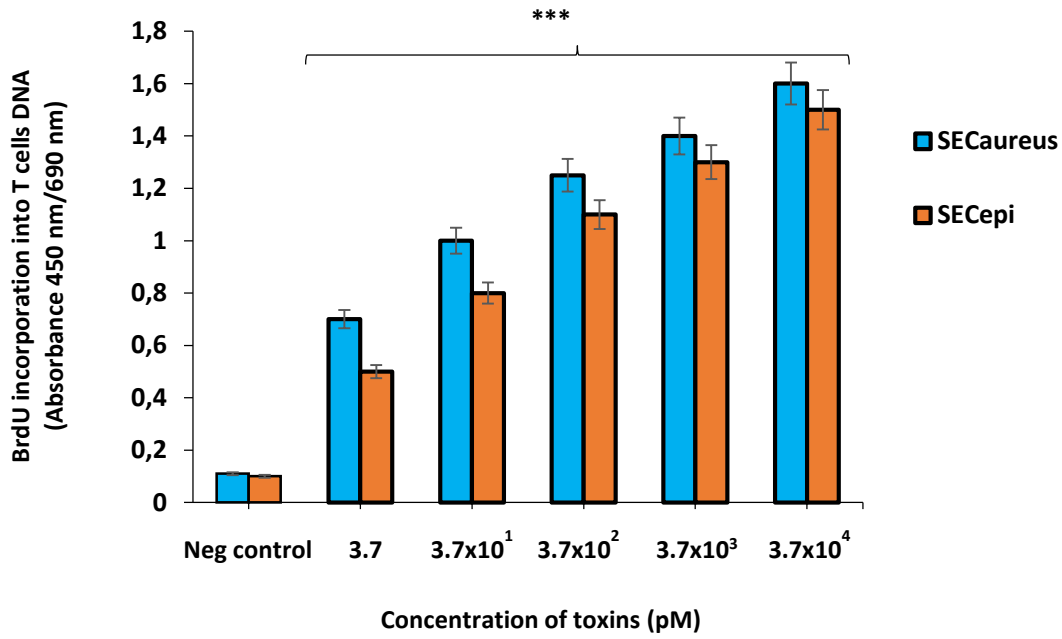


**Figure 5.** Effects of heat and digestive enzymes treatment on SEC<sub>epi</sub> and SEC<sub>aureus</sub>. A) enterotoxins (3.7  $\mu$ M) were maintained at 100°C. After the heat treatment, each sample was analyzed by SDS-PAGE. B) Each protein at 3.7  $\mu$ M was incubated with 0.028  $\mu$ M of pepsin and analyzed by SDS-PAGE. C) Each protein, at 100  $\mu$ g/mL, was incubated with 0.04  $\mu$ M of trypsin and analyzed by SDS-PAGE. BSA was used as negative control. NT, no treatment; P, pepsin; Tr, trypsin.

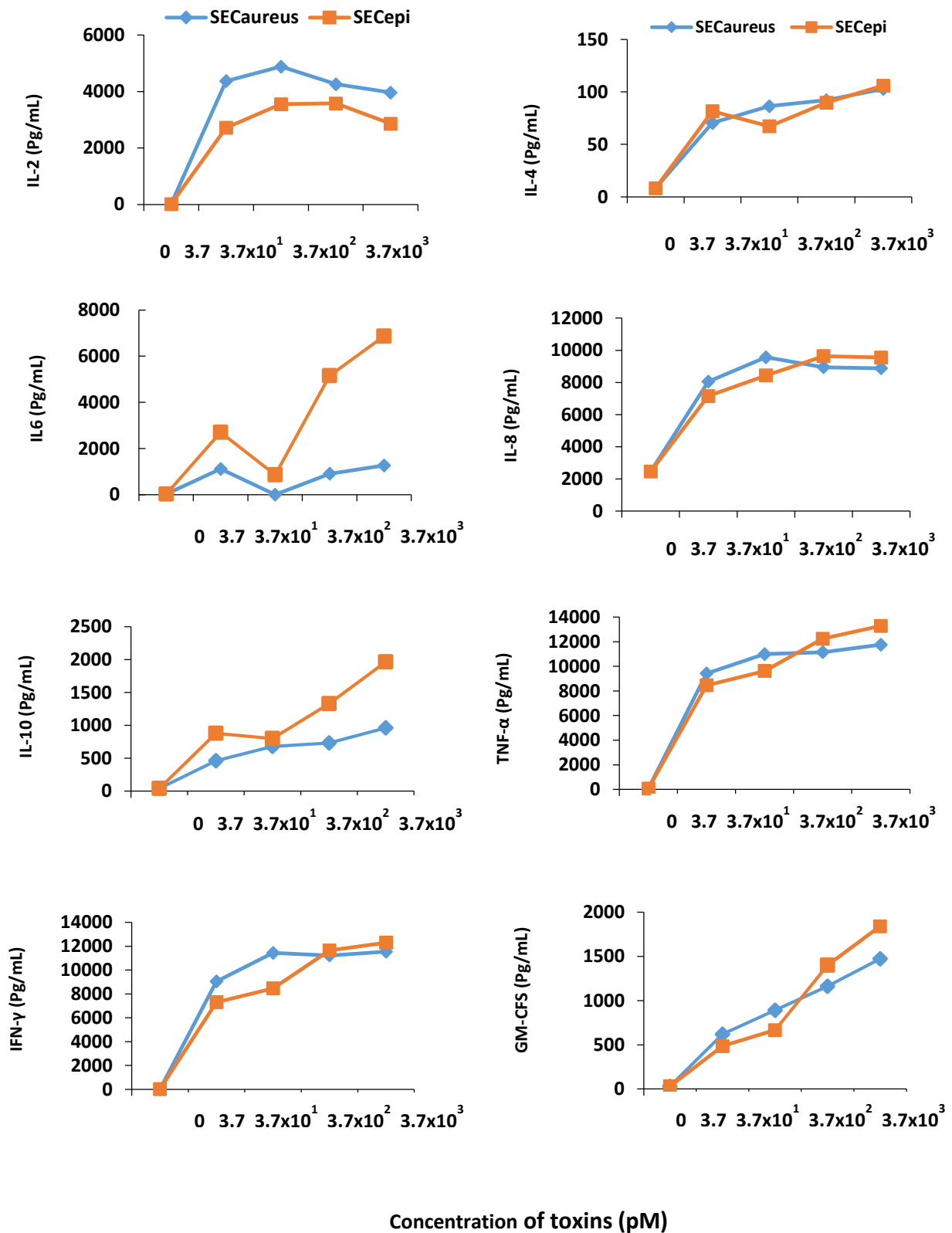
## 2.5. Functional Analyses of SEC<sub>epi</sub>

In order to examine the function of SEC<sub>epi</sub> in *S. epidermidis* pathogenicity from human, recombinant protein was purified and used to assess the superantigenic activity of enterotoxin. Lymphocyte proliferation and cytokines production were measured using human PBMC from three healthy donors. First, PBMC were stimulated in the presence or absence of various concentrations of rSEC<sub>epi</sub> and SEC<sub>aureus</sub>. SEC<sub>epi</sub> was tested for mitogenic activity on stimulated human PBMC in a 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) colorimetric incorporation assay. Figure 6 shows representative results of three experiments. The toxin strongly induces intense human T-cells proliferation at concentrations close to  $3.7 \times 10^4$  pM (Figure 6), but the protein was significantly mitogenic at doses as low as 3.7 pM. Interestingly, the superantigenic activity of SEC<sub>epi</sub> in human T cells is comparable to that of *S. aureus* SEC (Figure 6).

Second, the proinflammatory (IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF) and suppressive (IL-4, IL-10) cytokines titer in human PBMC stimulated by SEC<sub>epi</sub> was measured and compared with that stimulated by SEC<sub>aureus</sub> (Figure 7). The results showed that compared to the negative control, SEC<sub>epi</sub> induced a strong production of all cytokines tested with a dose of toxin as low as 3.7 pM. The cytokines concentrations obtained in the supernatants varied according to the nature of cytokines tested. As examples, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-6, IL-2 are produced at high titers of up to 8000 pg/mL, 7000 pg/mL, 7000 pg/mL, 3000 pg/mL and 2500 pg/mL, respectively, after activation of T cells with 3.7 pM of SEC<sub>epi</sub>, while the same concentration of toxin stimulates the production of IL-10, GM-CSF, IL-4 to respective titers of 800 pg/mL, 500 pg/mL and 80 pg/mL (Figure 8). The comparison of cytokines production profile in human PBMC stimulated by SEC<sub>epi</sub> with that of the wild-type (SEC<sub>aureus</sub>) shows that, there is no significant difference between quantities of most cytokines produced by the two toxins,  $p > 0.05$ . However, the production of pro-sepsis cytokine IL-6 is significantly higher in lymphocytes, when activated by SEC<sub>epi</sub> ( $p \leq 0.01$ ). Moreover, the lymphocytes stimulated by  $3.7 \times 10^3$  pM of SEC<sub>epi</sub> are able to secrete up to 10-fold more IL-6 than those stimulated with the same amount of SEC<sub>aureus</sub> (7500 pg/mL vs 800 pg/mL,  $p \leq 0.0001$ ), suggesting that systemic inflammatory response induced by SEC<sub>epi</sub> would be more severe than that caused by SEC<sub>aureus</sub>.



**Figure 6.** SEC<sub>epi</sub> stimulates proliferation of human lymphocytes. The proliferation of human PBMC activated with recombinant SEC<sub>epi</sub> (orange line) or SEC<sub>aureus</sub> (blue line) was measured by incorporation of 5-bromo-2' deoxyuridine. Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of three independent experiments. Neg control: Negative control containing only PBMC. \*\*\* : The results were significantly different in comparison with negative control ( $p \leq 0.001$ ).



**Figure 7.** Cytokines production in T cells Activated with recombinant SEC<sub>epi</sub> (orange line) or SEC<sub>aureus</sub> (Blue line) *in vitro*. T cells ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were prepared from three different donors and incubated for 72 hours with concentrations ranging from 3.7 pM to  $3.7 \times 10^3$  pM of SEC<sub>epi</sub>

or SEC<sub>aureus</sub>. IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and GM-CSF production in the supernatants of the T cells culture were determined by an ELISA sandwich. The results are representative of three experiments.

### 3. Discussion

Although it was reported that acquisition of SEs genes by SCN strains would be a rare and isolated event [25], the present study revealed that the SEs genes exists not only in a food poisoning isolate [1], but also in CNS isolates from cases of human infectious diseases. Indeed, this new toxin is produced at significant quantities in culture supernatant of some *S. epidermidis* isolates. This work reports a strong sequence similarity between C-types staphylococcal enterotoxin sequence of clinical strains of *S. epidermidis* SE90 and SE95 named SEC<sub>epi</sub> from Africa and wide-type *S. aureus* SEC3. This level of sequence similarity served as a benchmark for the determination of the mature sequence of SEC<sub>epi</sub> as well as its structure and the amino acids residues involved in the biological activity of this toxin. ClustalW analyses between SEC<sub>epi</sub> and its isoform *S. aureus* SEC3, reveals an evolutionary signature corresponding to substitutions of several amino acids in the signal peptide and the secreted sequence of SEC<sub>epi</sub> (I7V, S21F, T22I and S54N, K59N, K75N, G106S, V133I, N191S, M216I, N218K, T222M) (Figure 2). The prediction of the modeled SEC<sub>epi</sub> structure produced a structural architecture close to the SEs [26,2] that has high structural homology with the predetermined structure of *S. aureus* SEC3 [27]. Moreover, the SE90 and SE95 SEC gene sequence is 100% identical to that of the FRI909 strain isolated in the United States [24]. This suggests that similar mechanisms of molecular evolution and acquisition of the *sec* gene originally transcribed by *S. aureus* might occur in the genome of *S. epidermidis* isolates from different geographical areas, Africa and America.

Because SEC<sub>epi</sub> exhibited a high identity of amino acid sequence and ligand binding sites (Figures 2 and 3) with SEC<sub>aureus</sub>, we hypothesized that both toxins have the same biological properties. Using a peptide signal predictor software, we identified the mature SEC<sub>epi</sub> sequence which was then cloned into pGEX-6P-1. The resulting recombinant protein (rSEC<sub>epi</sub>) was expressed and purified by affinity chromatography and the identity of the protein is confirmed by Western blot method as a ~27 kDa protein using rabbit affinity-purified *S. aureus* anti-enterotoxin C antibodies (Figure 4B) [28]. SEs are well-known to resist heating and digestive enzymes [26,27]. rSEC<sub>epi</sub> was able to resist heating at 100°C for 1 h as SEC<sub>aureus</sub> does,

but was less resistant than SEA, which resists beyond 8 hours of heat treatment (Figure 5) [15]. In the case of gastrointestinal enzymes, the toxin was stable to pepsin and slightly unstable to trypsin action. There was no major alteration in SEC<sub>epi</sub> susceptibility to pepsin and trypsin hydrolysis compared with the native SEC<sub>aureus</sub>. A comparison between the proteolytic enzyme stability of SEC<sub>epi</sub> and SEA, the most studied enterotoxin, showed that SEC<sub>epi</sub> is less resistant to trypsin activity than SEA, but has the same pepsin resistance profile as SEA [29]. In our previous study, 9% (2/22) of *S. epidermidis* clinical isolates harboured stable SEC [24]. This frequency is even greater than in other reports, where only 3% (1/32) of *S. epidermidis* strains from food produced a stable enterotoxin C, while none of 200 clinical strains produced it [11,25]. In one of our studies involving 30 *S. epidermidis* strains of clinical origin collected in the Microbiology laboratory of the Strasbourg hospital, there was no positive strain for the *sec* gene. However, approximately 16% of clinical *S. aureus* strains are producing SEC<sub>aureus</sub> [17].

rSEC<sub>epi</sub>, which shows homology to SEC<sub>aureus</sub>, acts as a superantigen for human T lymphocytes because of its ability to induce lymphocytes proliferation and cytokines production from human T cells already with a low dose of the toxin (3.7 pM) (Figure 6,7). Substantial amounts of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-6, IL-10 and IL-2 were found in the isolated human T lymphocytes culture supernatants activated with SEC<sub>epi</sub>, while they were almost not detected in the culture supernatant of unactivated cells. Moreover, IL-6, which is an important mediator of the systemic inflammatory response in septic shock, is produced at a higher level in the culture supernatants of SEC<sub>epi</sub> stimulated T cells [30, 31]. In fact, high levels of IL-6 were found to predict a fatal outcome in patients with septic shock [32]. This increased cytokine concentration may accentuate the intensity of the immune response and result in a systemic shock leading to disseminated intravascular coagulation that can lead to hemorrhage, severe coagulation disorders and to the failure of organs, eventually leading to death [33]. The ability of rSEC<sub>epi</sub> to stimulate human lymphocytes implies that this enterotoxin is able to bind to TCR V $\beta$  elements and/or MHC class II molecules in the human [34]. In previous studies, several amino acids residues important for binding to TCR V $\beta$  and MHC class II elements to SEC have been identified (35, 36, 37). Except polymorphism at M216I, not any mutation of the involved amino acids is present in the peptide sequence of SEC<sub>epi</sub> (Figure 3B), and this would justify the preservation of the superantigenic activity of this enterotoxin as well as TCR V $\beta$  epitope segregation. It is also possible that the substitution of Methionine at



position 226 by Isoleucine in SEC<sub>epi</sub> TCR V $\beta$  binding site, is involved in the variation in the amount of IL-6 produced by the activated lymphocytes. We also found that through the binding area, which forms the zinc binding site of SEC<sub>aureus</sub>, only D9 is replaced by T36 in SEC<sub>epi</sub> zinc binding amino acids residues sites (Figure 3C). A previous report noted that zinc binding is not essential for T cell stimulation, emesis or lethality in SEC sub-types [26]. These findings are consistent with the fact that a mutation occurring at the usual zinc binding sites in SEC<sub>epi</sub> does not alter its functions.

Moreover, in this study, *S. epidermidis* SE90 and SE95 produced up to 100  $\mu$ g/mL of staphylococcal enterotoxin C in 24 h at 37 °C of microbial broth culture. This dose largely exceeds the quantities of SEC<sub>aureus</sub> found in 24h culture supernatants (BHI) of *S. aureus* isolates FRI137 (296 ng/mL), FRI913 (4134 ng/mL) and a food strain, *S. epidermidis* 4s (14 ng/mL) in another study [11]. Therefore, it might be possible that a similar amount of SEC<sub>epi</sub> may be secreted in food contaminated with enterotoxigenic *S. epidermidis* since, in most of the food poisoning cases caused by SEs produced by *S. aureus*, where amounts ranging from 5 to 100 ng/g enterotoxins can be detected in the associated foods [38]. This suggests that SEC<sub>epi</sub> would also be able to trigger a food poisoning outbreak.

These results, together with our previous data, demonstrate that clinical strains of CNS can also carry dreaded virulence factors in *S. aureus*, including the staphylococcal enterotoxin C. This study not only suggests a structural similarity between SEC<sub>epi</sub> and SEC<sub>aureus</sub> but also provides proof that SEC<sub>epi</sub> may act as a superantigen in the human host although SEC wild-type carries several differences in *S. epidermidis*. Given the great similarity between SEC<sub>aureus</sub> and SEC<sub>epi</sub>, the ability of SCN to produce enterotoxins in significant quantities also poses a real problem for food safety, and may be some infections. It now remains interesting to study *in vivo* toxicity and emetic activity of SEC<sub>epi</sub>, because the International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens [39] proposed when only staphylococcal superantigens inducing emesis after oral administration in an experimental model of primates should be designated as staphylococcal enterotoxins.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Ethical statement

Buffy coats from fresh human blood from healthy donors were purchased to the « Etablissement Français du Sang de Strasbourg, France », for which all individual information remains confidential.

### 4.2. Bacterial strains, vectors media, and growth conditions

*S. epidermidis* strains were clinical isolates originated from blood samples and identified with MALDI-TOF Biotyper™ (Bruker Daltonics) and 16S rDNA genes sequencing [24]. Dendograms were generated from main spectra projection using MALDI/TOF MS Microflex™ system and Biotyper™ software. Each *S. epidermidis* isolate was previously screened for SEA, SEB, SEC, SEG, and SEH by Western blot and immunodiffusion techniques [24]. *S. epidermidis* isolates that were called SE90 and SE95 were found to produce SEC and chosen for further analysis of the toxin. *S. aureus* SCP FRI 361 strain, a SEC producer was used as a positive control to verify the purified recombinant protein identity.

*Escherichia coli* XL1 blue cells [*recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacIqΔM15 Tn10 (tetr))*] (Stratagene, Agilent technologies, Massie, France) were used as recipient cells for transformation with recombinant pGEX-6P-1- *seC<sub>epi</sub>* gene (GE healthcare life Science, France). *Escherichia coli* BL21 [F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS (rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>)*, *galI*] was used for over-expression of the glutathione-S-transferease (GST)-*S. epidermidis* enterotoxin C fusion gene, according to the manufacturer's (GE healthcare).

For routine culture, bacteria were grown on Columbia blood agar plates (Oxoid). Overnight cultures were prepared in tryptone soy broth containing 4% yeast extract (Oxoid). 2% yeast extract-trypton broth (YT) was used for culturing *E. coli* BL21, *E. coli* XL1 and *E. coli* transformants. All cultures were incubated in an aerobic atmosphere at 37 °C.

### 4.3. DNA isolation

Total DNA of *S. epidermidis* was purified using MasterPure™ DNA Purification according to the manufacturer's recommendations (Epicentre, Le Perray en Yvelines, France). DNA purity was checked by a 260/280 ratio and samples with ratios < 1.8 were rejected. EZ-10 spin miniprep kit (euromedex, France) was used for amplicons purification following the manufacturer's instructions. For plasmid DNA isolation, *E. coli* XL-1 plasmid DNA midi- preparation was performed with GeneJET™ Midiprep Kit (Thermo Scientific, France).

### 2.4. Nucleotide sequencing and analysis

Nucleotide sequencing of *sec* gene from *S. epidermidis* SE90 and SE95 (*sec<sub>epi</sub>*) and recombinant *sec<sub>epi</sub>* gene was determined by sequencing through Sanger methods employing the dideoxynucleotide sequencing methodology [40]. Briefly, the *sec<sub>epi</sub>* gene was amplified by PCR for the two strains of *S. epidermidis sec<sup>+</sup>*. Cinq  $\mu\text{L}$  (60 ng/ $\mu\text{L}$ ) of purified amplicon are supplemented to 5  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{M}$ ) of oligonucleotide and sent to GATC (GATC BIOTEC, Germany) for sequencing.

The plasmid containing the intact sequence of *rseI<sub>epi</sub>* was purified after *E. coli x/1* plasmid DNA mini-preparation. Ten microliters (80-100 ng/mL) of purified plasmid were added to 5  $\mu\text{L}$  (5 pM) of each primer in a tube of 0.5 mL and sent for sequencing (GATC GmbH, Konstanz, Germany).

## 2.5. Bioinformatic analysis

Sequence databases were searched with the blast program available <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>. The sequence alignments were performed using the Clustalw2 alignment software (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>). The DNA sequences were translated to ORF by expasy translate [41]. The molecular weight and isoelectric point (pI) were predicted by the protram server [42]. The modeled structure and protein ligand binding site residues of *SEC<sub>epi</sub>* were predicted using the I-TASSER server (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) in Michigan University [43]. The modeled *SEC<sub>epi</sub>* was used for comparison with predetermined structure *SEC* derived from *S. aureus*.

## 2.6. Cloning of *sec<sub>epi</sub>* gene

The gene fragment corresponding to the mature form of *sec<sub>epi</sub>* gene was amplified from *S. epidermidis* SE90 DNA using the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, France) according to the protocol: 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 92 °C for 2 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 2 min. The cloning primers including a 5' *Bam*HI site, 5'\_GAGTCAACCAGACCCTATGCCAGA\_3' and 5' *Eco*RI site, 5'\_AAGTTTATCCATTCTTTGTTGTAAGGT\_3'. The amplicon was purified using EZ-10 Spin Column PCR products purification Kit (EUROMEDEX, France) and DNA fragment digested by *Bam*HI and *Eco*RI was then subcloned into the pGEX-6P-1 glutathione *S*-transferase (GST) fusion expression vector (GE Healthcare, France). The plasmid containing the intact sequence of the respective region of *sec<sub>epi</sub>* was transformed into *Escherichia coli* XL-1 blue, and the insertion of the proper length restriction fragment was verified by plasmid sequencing. The resulting recombinant *SEC<sub>epi</sub>* had 5 additional amino acid residues (GPLGS) at the N terminus

from pGEX-6P-1. Plasmid DNA midi-preparation was performed and recombinant plasmid was inserted in *Escherichia coli* BL21 for SEC<sub>epi</sub> expression and purification.

### 2.7. Expression and purification of rSEC<sub>epi</sub>

The recombinant clone was used for expression of the gene. Briefly, *Escherichia coli* BL21 harboring recombinant pGEX-6P-1 was grown in 2xTY broth containing 100 µg of ampicillin/mL at 18 °C to an optical density at 600 nm of 0.5. The expression of the GST fusion protein was induced by adding 0.2 M IPTG (isopropyl-D-thiogalactopyranoside, Amersham) to a final concentration of 0.2 mM. After 16 h of cultivation at 18 °C, the cells were harvested and lysed by French Press (French Pressure Cell Press, SLM AMINCO®). The clarified lysate was purified by affinity chromatography by using Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare, France). The GST fusion SEC<sub>epi</sub> was eluted with 10 mM glutathione in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). Mature-form toxins were then released by digestion for overnight at 4 °C with PreScission Protease (GE Healthcare, France), which cleaves at a single site between the GST tag and the mature form SEC<sub>epi</sub>. The protease and the GST tag was separated by passing the samples through glutathione-sepharose4B. Purity were verified in Roti®-Blue quick-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12 % (w/v)) in agarose gel (0.6% (w/v) of agarose in PBS) against purified *S. aureus* SEC antigens. The protein concentration was assessed by using the Bradford assay (Bio-Rad), and pure mature rSEC<sub>epi</sub> was stocked at -20 °C until used for biological and biochemical assays.

### 2.8. Western blotting

Purified recombinant protein identity was assess by western blotting as describe [44]. Briefly, the protein concentration were measured using the Bradford reagent (BioRad, France) and 50 ng of protein was loaded per well in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12% polyacrylamide), and transferred to Immobilon-membranes (TransBlot® Turbo™, BioRad, France) using the manufacturer's instructions. After being blocked with 3% bovine serum albumin in phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 0.05% (v/v) Tween 20, membranes were incubated with rabbit affinity-purified anti-enterotoxin C antibodies (primary antibody) [44,28]. To detect the primary antibody, a goat peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (GE Healthcare, France) were used. Proteins were visualized using 4-chloronaphtol (Opti4CN) detection kit according to the manufacturer's directions (BioRad, France).

### 2.9. Determination of enzyme and heat stability of SEC<sub>epi</sub>

SEs stability assays to heat and gastrointestinal environment were performed as reported previously [29]. Bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO) and purified *S. aureus* SEC was used respectively as a protein negative control and positive control.

To study the stability of purified proteine against heat treatment, 300 µL of the toxin at 3.7 µM in PBS was placed into a heat block maintained at 100 °C. At desired time intervals ranging from 1 to 10 h, tubes were removed from the heat block, immediately put into an ice bath for 5 min to cool down, and then placed at -20 °C.

Purified SEC<sub>epi</sub>, *S. aureus* SEC or BSA, was incubated in the presence of trypsin (Sigma-Aldrich, France). Each protein at 3.7 µM was incubated with trypsin (0.04 µM) in 0.01M Tris-HCl, pH 8.0 in a final volume of 300 µl at 37°C. After incubation for the desired periods of time intervals ranging from 1 to 10 h. Tubes were removed and digestion is stopped by treatment at 95 °C for 5 min. Tubes were immediately stored at -20 °C.

Purified SEC<sub>epi</sub>, *S. aureus* SEC or BSA was incubated in the presence of pepsin (Sigma-Aldrich, France). Each protein at 3.7 µM was incubated with pepsin (0.028 µM) in a final volume of 300 µL of 0,1 M sodium acetate buffer, pH 4.0, at 37 °C. After incubation for the desired periods of time intervals ranging from 1 to 10 h. Tubes were removed and digestion is stopped by treatment at 95°C for 5 min. Tubes were immediately stored at -20 °C.

### 2.10. Human Peripheral blood mononuclear cells (hPMBC) purification and culture

hPMBC were obtained from samples of heparinized whole blood by centrifugation through a Ficoll-Paque gradient (blood diluted in PBS–Ficoll, 6 :4 v/v [45]). PMBC were resuspended in RPMI 1640 for washing and then recovered by a 800 x g centrifugation at RT. The cells were resuspended in RPMI medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 2 Mm de glutaMAX and 0.1% de penicillin/streptomycin. The PMBC were resuspended in 25 mL of complete RPMI, plated in Petri plates, and allowed to incubate overnight at 37 °C (6.5% CO<sub>2</sub>). The non adherent T lymphocyte-enriched cells were collected and washed.

### 2.11. Cell proliferation assays

To assess the mitogenic capacity of toxin, we used the cell proliferation ELISA, BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) colorimetric assay (Sigma, France) according to the Manufacturer's recommendations. The purified hPMBC (2x10<sup>6</sup>/mL, 0.2 mL) was stimulated with rSEC<sub>epi</sub> or *S. aureus* SEC at concentration of 3.7 to 3.7x10<sup>4</sup> pM at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. After

incubation for 48 h, 10  $\mu$ M BrdU was added to the cells and cells were reincubated (16-24h). Cell proliferation was estimated by incorporation of BrdU measurement into newly synthesized cell DNA of dividing cells using peroxidase-conjugated anti-BrdU antibodies after 30 min cells fixation as described by the Manufacturer. The absorbance of samples were measured in ELISA reader at 450 nm/690 nm. Data are presented as means of triplicate determinations, as previously described [15].

### **2.12. Screening for cytokines production by activated T cells**

Cytokines interleukin -2 (-4, -6, -8, -10), gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) production in human PBMCs stimulated by SEC<sub>epi</sub> and SEC<sub>aureus</sub> was measured to assess superantigenic activity. Briefly, hPBMCs were stimulated with 3.7 to 3.7x10<sup>3</sup> pM of purified SEC<sub>epi</sub>. The cells were incubated at 37 °C for 72 h in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Culture supernatants were harvested by centrifugation to cytokine assays. The production of cytokine is determined by the use of Bio-Plex Pro<sup>®</sup> Human Cytokines 8-plex Assay kit from Bio-Rad Laboratories, Inc with magnetic beads, a Bio-Plex 200<sup>®</sup> System and Bio-Plex Manager<sup>®</sup> software version 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) according to manufacturer's instructions. Briefly, beads were incubated for 20 sec on 96 well plates and were washed in Bio-plex wash buffer. Diluted standard and samples were added and the plates were incubated for 30 min on shaker. After washing, detection antibodies were added and reincubated for 30 min on shaker. The plates were washed and streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) added, followed by 10 min of incubation and wash. Assay buffer was finally added and incubated for 10 min, followed by the plates analyzed. Data are presented as the means of standard deviations of triplicate determinations.

### **2.13. Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments performed in triplicate. The  $\chi^2$  test was carried out with the Minitab 14 (<https://www.minitab.com/academic/>) for proportions comparison and the level of significance was set at p values < 0.05 for all tests.

### **Funding**

Chimène Nanoukon was awarded by the Islamic Bank for Development. We thank research grant from EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Faculté de Médecine (University of Strasbourg) and the Islamic Bank for Development.

### **Author Contributions**

Chimène NANOUKON conducted all practical experiments, bioinformatic assays, all data analysis and writing the manuscript. Rodrigue Tollo and Idissou AFFOLABI, Philippe RIEGEL participated to collection and identification of strains of *S. epidermidis*. Daniel KELLER contributed to gene cloning and expression and toxins purification. Gilles PREVOST and Lamine BABA-MOUSSA supervised the project and contributed in preparation of the manuscript.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

### References

- [1] Spaulding, A.; Salgado-Pabón, W.; Kohler, P.; Horswill, A.; Leung D.; Schlievert, P. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013, 26, 422–447.
- [2] Argudín, M.A.; Mendoza, M.C.; Rodicio, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 2010, 2, 1751-1773.
- [3] Vu, B.G.; Stach, C.S.; Salgado-Pabon, W.; Diekema, D.J.; Gardner, S.E.; Schlievert, P.M. Superantigens of *Staphylococcus aureus* from patients with diabetic foot ulcers. *J. Infect. Dis.* 2014, 210, 1920–1927.
- [4] Hennekinne, J.A.; Buyser, M.L. Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36, 815–36.
- [5] Mempel, M.; Lina, G.; Hojka, M.; Schnopp, C.; Seidl, H.P.; Schafer, T., Ring, J., Vandenesch, F. Abeck, D. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus In *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, 22, 306–309.
- [6] Ye, Y.M.; Hur, G.Y.; Park, H.J.; Kim, S.H.; Kim, H.M.; Park, H.S. Association of specific IgE to staphylococcal superantigens with the phenotype of chronic urticaria. *J. Korean. Med. Sci.* 2008, 23, 845–851.
- [7] Bunning, V.K.; Lindsay, J.A.; Archer, D.L. Chronic health effects of microbial foodborne disease. *World Health Stat. Q.* 1997, 50, 51–56.
- [8] Salgado-Pabón, W.; Breshears, L.; Spaulding, A.R.; Merriman, J.A.; Stach, C.S.; Horswill, A.R.; Peterson, M.L., Schlievert, P.M. Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. *MBio.* 2013, 4, e00494–13.

- [9] Wilson, G.J.; Seo, K.S.; Cartwright, R.A.; Connelley, T.; Chuang-Smith, O.N.; Merriman, J.A.; Guinane, C. M.; Park, J.Y. ; Bohach, G.A. ; Schlievert, P.M.; et al. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog.* 2011, 7, e1002271.
- [10] Dinges, M.M.; Orwin, P.M.; Schlievert, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13, 16–34.
- [11] Podkowik, M.; Seo, K.S.; Schubert, J.; Tolo, I.; Robinson, D.A.; Bania, J.; Bystroń, J. Genotype and enterotoxigenicity of *Staphylococcus epidermidis* isolate from ready to eat meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 229, 52–59.
- [12] Veras, J.F.; Carmo, L. S; Tong, L.C.; Shupp, J.W., Cummings, C.; Santos, D.A; Cerqueira, M.M.O.; Cantini, A.; Nicoli, J.R.; Jett, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* 2008, 12, 410–415.
- [13] Stach, C.S; Vu, B.G.; Schlievert, P.M. Determining the presence of superantigens in coagulase negative staphylococci from humans. *PLoS ONE*, 2015, 10, e0143341.
- [14] Sato’o, Y.; Omoe, K.; Ono, H.K.; Nakane, A.; Hu, D.L. A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Microbiol. Immunol.* 2013, 57, 91–99.
- [15] Ono, H.K.; Sato’o, Y.; Narita, K.; Naito, I.; Hirose, S.; Hisatsune, J.; Asano, K., Hu, D.L.; Omoe, K.; Sugai, M.; Nakane, A. Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 7034–7040.
- [16] Balaban, N.; Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 61, 1–10.
- [17] Wieneke, A. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human beings. *J Hyg* 1974, 73, 255–262.
- [18] Marr, J.C. ; Lyon, J.D.; Roberson, J.R.; Lopher, M.; Davis, W.C.; Bohach, G.A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. *Infect Immun.* 1993, 61, 4254–62.
- [19] Reiser, R.F.; Robbins, R.N.; Noleto, A.L.; Khoe, G.P.; Bergdoll, M.S. Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. *Infect. Immun.* 1984, 45, 625–30.



- [20] Deringer, J.R.; Ely, R.J.; Stauffacher, C.V.; Bohach, G.A. Subtype-specific interactions of type C staphylococcal enterotoxins with the T-cell receptor. *Mol. Microbiol.* 1996, 22, 523–34.
- [21] Otto, M. *Staphylococcus epidermidis*—the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7: 555–567.
- [22] Ziebuhr, W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib. Microbiol.* 2001, 8, 102–107.
- [23] Madhusoodanan, J; Seo, K. S.; Park, J. Y.; Gill, A. L.; Waterhouse, J.; Remortel, B.; Bohach, G.; Gill, S. R. Abstr. 107th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2007, abstr. B-420.
- [24] Nanoukon, C.; Argemi, X.; Sogbo, F.; Orekan, J.; Keller, D.; Affolabi, D.; Schramm, F.; Riegel, P.; Baba-Moussa, L.; Prévost, G. Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017, 307, 75–82.
- [25] Madhusoodanan, J.; Seo, K.S.; Remortel, B.; Park, J.Y.; Hwang, S.Y.; Fox, L.K., Park, Y.H.; Deobald, C.F.; Wang, D.; Liu, S.; Daugherty, S.C.; Gill, A.L.; Bohach, G.A.; Steven, R.; Gill, S.R.; 2011. An Enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 193, 1854–1862.
- [26] Chi, Y.I.; Sadler, I.; Jablonski, L.M.; Callantine, S.D.; Deobald, C.F.; Stauffacher, C.V.; Bohach, G.A. Zinc-mediated dimerization and Its effect on activity and conformation of. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 22839–22846.
- [27] Chi, Y.I.; Bohach, G.A.; Stauffacher, C.V. Structure of staphylococcal enterotoxin. Available online: <http://sbkb.org/pdbid/1ck1>.
- [28] Attien, P.; Sina, H.; Moussaoui, W.; Zimmermann-Meise, G.; Dadié, T.; Keller, D.; Riegel, P.; Edoh, V.; Kotchoni, S.O.; Diè, M.; Prévost, G.; Baba-Moussa, L. Mass spectrometry and multiplex antigen assays to assess microbial quality and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical and food samples. *Biomed. Res. Int.* 2014, 485620.
- [29] Li, S.J.; Hu, D.L.; Maina, E.K.; Shinagawa, K.; Omoe, K.; Nakane, A. Superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 2011, 110, 729–736.

- [30] Mera, S.; Tatulescu, D.; Cismaru, C.; Bondor, C.; Slavcovici, A; Zanc, V, Carstina, D.; Oltean, M. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *Apmis*. 2011, 119, 155–63
- [31] Juhua, Z.; Chaudhry, H.; Zhong, Y.; Ali, M.; Perkins, L.A.; Owens, W., Morales, J.E.; McGuire, F.; Zumbun, E.; Zhang, J.; Nagarkatti, P.; Nagarkatti, M. Dysregulation in microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of sepsis patients is associated with immunopathology. *Cytokine*. 2015, 71, 89–100.
- [32] Dinarello, C.A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997, 112, 321S–329S.
- [33] Krakauer, T.; Pradhan, K.; Stiles, B.G. Staphylococcal superantigens spark host-mediated danger signals. *Front Immunol*. 2016, 7, 1–14.
- [34] Argudín, M.A.; Mendoza, M.C ; Rodicio, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*. 2010, 1751–1773.
- [35] Lamphear, J. G.; Bohach, G. A.; Rich, R. R. Structural dichotomy of staphylococcal enterotoxin C superantigens leading to MHC class II independent activation of T lymphocytes. *J. Immunol*. 1998, 160, 2107–2114.
- [36] Leder, L.; Llera, A.; Lavoie, P. M.; Lebedeva, M. I.; Li, H.; Sekaly, R. P.; Bohach, G. A. ; Gahr, P. J.; Schlievert, P. M.; Karjalainen, K; et al. A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor- chain and major histocompatibility complex class II. *J. Exp. Med*. 1998, 187, 823–833.
- [37] Rossle, S. C.; Bisch, P. M.; Lone, Y. C.; Abastado, J. P.; Kourilsky, P.; Bellio, M. Mutational analysis and molecular modeling of the binding of *Staphylococcus aureus* enterotoxin C2 to a murine T cell receptor V-10 chain. *Eur. J. Immunol*. 2002, 32, 2172–2178.
- [38] Bergdoll, M. *Staphylococcus aureus*. *Foodborne pathog dis*. D1989, 463–524.
- [39] Orwin, P.M.; Leung, D.Y.; Tripp, T.J.; Bohach, G.A.; Earhart, C.A.; Ohlendorf, D.H.; Schlievert, P.M. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* 2002, 41, 14033–14040.
- [40] Sanger, F.; Nicklen, S.; and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1977, 74, 5463–5467.
- [41] Translate. Available online: <http://web.expasy.org/translate> (accessed on 18 February 2017).

- [42] Protparam. Available online: <http://web.expasy.org/protparam> (accessed on 21 January 2017).
- [43] Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods*. 2015, 12, 7–8.
- [44] Podkowiak, M.; Bystróż, J.; Bania, J. Genotypes, antibiotic resistance and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. *Foodborne Pathog. Dis.* 2012, 9, 91–93.
- [45] Meyer, F.; Girardot, R.; Piémont, Y.; Prévost, G.; Colin, D.A. Analysis of the specificity of Pantone-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect. Immun.* 2009, 77, 266–273.

## 2.2. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES

### 2.2.1. Recherche du peptide signal dans la séquence de SEC<sub>epi</sub>

Nous avons utilisé le logiciel SignalP V.4. Pour identifier le peptide signal de SEC<sub>epi</sub>. Le site de clivage de la séquence signal est situé entre l'Alanine en position 27 et l'acide glutamique en position 28. Le peptide signal de SEC<sub>epi</sub> est donc constitué des 28 premiers acides aminés à l'extrémité N-terminale de la protéine (Figure 3.2).

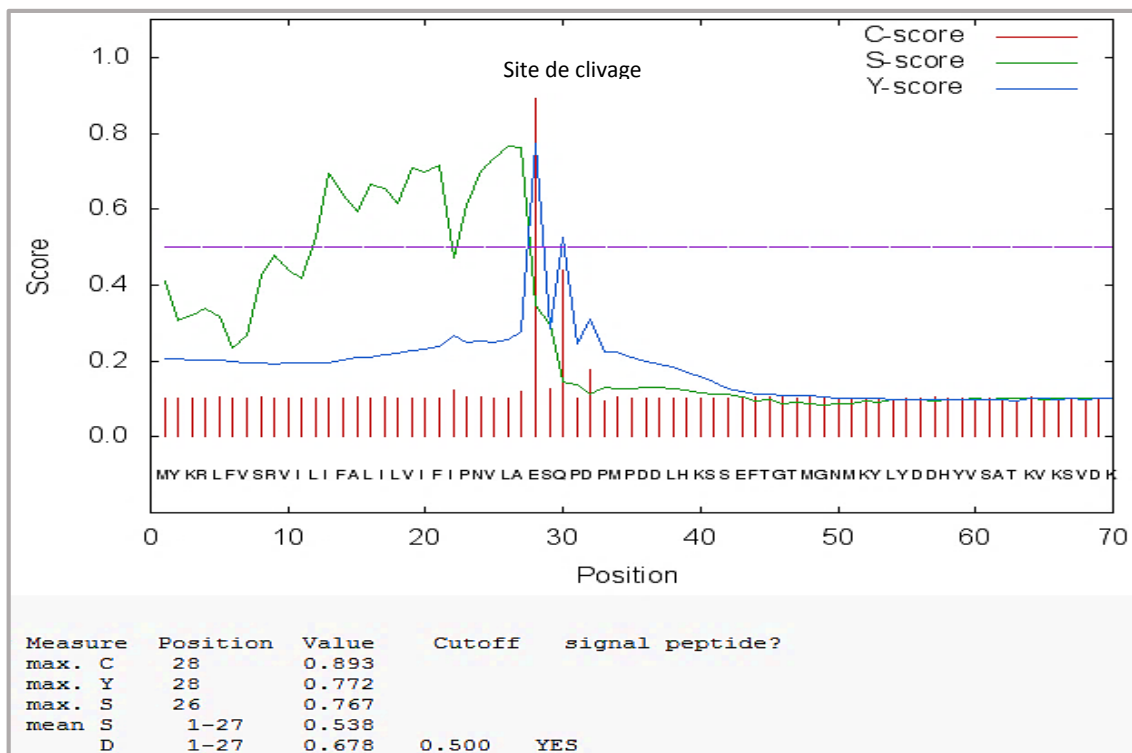
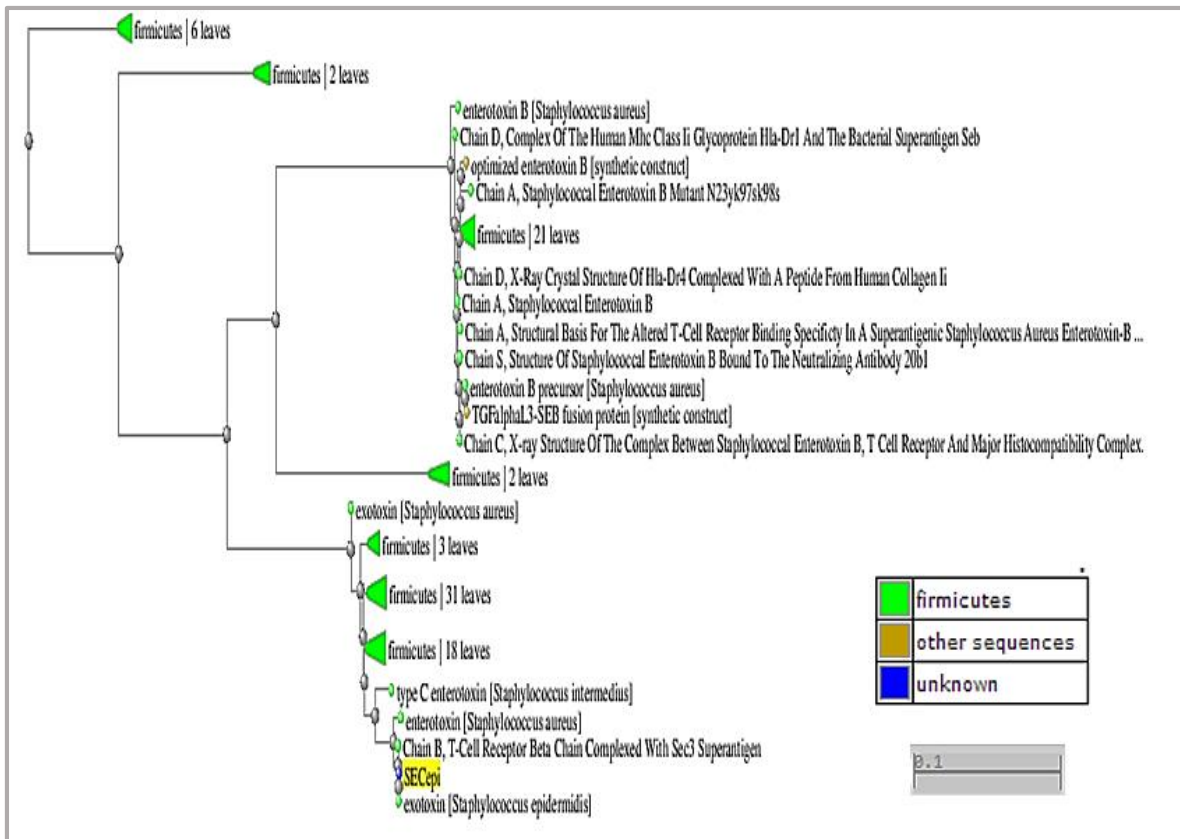


FIGURE 3.2 : SITE DE CLIVAGE DU PEPTIDE SIGNAL SEC<sub>EPI</sub>.

### 2.2.2. Analyse phylogénétique de SEC<sub>epi</sub>

Nous avons pu construire un arbre phylogénétique avec les différents types d'entérotoxines staphylococciques proposées par l'algorithme BLAST (Figure 3.3). On note le positionnement de SEC<sub>epi</sub> (jaune) sur le même nœud qu'une exotoxine décrite chez *S. epidermidis* et la présence de l'entérotoxine de type C3 de *S. aureus*, sur le nœud le plus proche de SEC<sub>epi</sub>. L'analyse de cet arbre révèle ainsi une identité entre les séquences peptidique de SEC<sub>epi</sub> et l'exotoxine de *S. epidermidis* et une grande homologie de séquence avec SEC<sub>aureus</sub>.



**FIGURE 3.3 : DENDROGRAMME MONTRANT LA RELATION PHYLOGENETIQUE DE SEC<sub>EPI</sub> AVEC LES AUTRES TYPES D'ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES SUR LA BASE DE L'ALGORITHME BLAST.**

### 2.2.3. Recherche du gène *sec* dans des souches cliniques de *S. epidermidis*

Pour déterminer si l'acquisition du gène *sec* par SE90 et SE95 était un événement isolé ou rare, nous avons examiné 30 autres souches de *S. epidermidis* collectées à l'Hôpital Universitaire de Strasbourg, et impliquées dans diverses infections pour la présence d'entérotoxine SEC<sub>aureus</sub>. Aucun des isolats ne contenait ce gène. Ces résultats combinés avec ceux obtenus pour les 22 souches de *S. epidermidis* collectées au Bénin, suggèrent que la mobilisation de l'élément génétique mobile de type SaPI codant cet entérotoxine se produit rarement chez *S. epidermidis*.

## **PARTIE 3**

### **3.1. ARTICLE N°3 : SEPTICEMIE A *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* PRODUCTEUR D'ENTEROTOXINE C**

**Statut :** Article publié dans « European Scientific Journal »

**Auteurs :** C. NANOUKON, E.G. Dassou, M. DOUSSO, F. SOGBO, A. SINA, L.S., G. PREVOST, L. BABA-MOUSSA.

#### **3.1.1. Situation du sujet**

Bien que plusieurs études aient conclu l'absence de la production de superantigènes par les souches cliniques de SCN (Kreiswirth et al., 1987, Christopher et al., 2015), nos résultats précédents ont prouvé l'expression de l'entérotoxine staphylococcique C dans le surnageant de culture de deux souches cliniques de *S. epidermidis* isolées d'hémoculture. Il est maintenant nécessaire de voir l'existence d'une corrélation clinico-biologique entre la production de cette toxine et le phénotype clinique présenté par ces patients pour une meilleure prise en charge des malades.

#### **3.1.2. Résumé des résultats**

Dans la présente étude (article 3), nous avons décidé d'analyser le dossier médical de l'un des deux patients chez qui la souche *S. epidermidis* productrice d'entérotoxine SEC a été isolée dans l'objectif de déceler un lien éventuel entre les signes cliniques présentés par le patient à son admission à l'hôpital et la présence de toxine. Nous avons rapporté dans cet article le cas d'une bactériémie à SCN associée à un paludisme grave chez un enfant de 12 ans sans antécédent particulier et vivant en zone d'endémie palustre. L'étude du dossier médical du patient montre que l'entérotoxine produite par la souche XX a bien pu contribuer à la gravité du tableau clinique avec la présence de stigmates de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et un syndrome hémorragique digestif.

#### **3.1.3. Conclusion**

Cette étude souligne l'importance de la surveillance des infections à SCN surtout chez les sujets à risque, car certaines souches sont pathogènes et produisent des entérotoxines qui peuvent entraîner des complications allant jusqu'à la mort.

## ***Staphylococcus Epidermidis* Producteur D'entérotoxine C Impliqué Dans Une Septicémie À Foyer Urinaire**

***Chimène Nadège Mahoussi Nanoukon, Msc.***

Université d'Abomey-Calavi,  
Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, Benin.  
Université de Strasbourg,  
EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Institut de Bactériologie, 3 rue  
Koeberlé,  
F-67000 Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg,  
CHRU Strasbourg, France

***Euloge Gbètonji Dassou, Chirurgien Urologue-Andrologue  
Marcos Douso, Pédiatre***

***Frédéric Sogbo, Interne des hôpitaux***

Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou Maga  
(CNHU-HKM) de Cotonou, Bénin

***Haziz Sina, PhD***

Université d'Abomey-Calavi,  
Laboratoire de Biologie et de typage Moléculaire en Microbiologie, Benin

***Gilles Prevost, PhD***

Université de Strasbourg,  
EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Institut de Bactériologie, 3 rue  
Koeberlé, F-67000 Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de  
Strasbourg, CHRU Strasbourg, France

***Lamine Baba-Moussa, PhD***

Université d'Abomey-Calavi,  
Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, Benin

doi: 10.19044/esj.2017.v13n24p278 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p278](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p278)

---

### **Abstract**

In developing countries, coagulase-negative staphylococcal (SCN) infections are often neglected. Here, we describe the identification of a coagulase-negative staphylococcal strain secreting type C staphylococcal enterotoxin (SEC) in a field weakened by severe malaria in a 12-year-old child and summarize the clinical characteristics of the patient. The identification of the strain is carried out by MALDI-TOF mass spectrometry



after protein extraction. The toxigenic capacity of the species in question is determined by the polymerase chain reaction (PCR) and the radial immunoprecipitation method. The patient's medical record was used for the study of the correlation between the clinical phenotype of the patient and the production of SEC by the strain. *S. epidermidis* was identified as the pathogen responsible of bacteremia which induces clinical sepsis, hematemesis and thrombocytopenia. The PCR test revealed that the isolated strain was positive for *sec* gene and its expression was confirmed by the radial immunoprecipitation assay. The study of the patient's medical record shows that the enterotoxin produced by the strain may have contributed to the severity of the clinical picture with the presence of disseminated intravascular coagulation stigmata (DIC) in a context of sepsis with a urinary starting point. These data suggest that CNS infections may be underestimated due to difficulties in species identification and the toxigenic capacity of some of these isolates.

---

**Keywords:** *Staphylococcus epidermidis*, septicemia, enterotoxins; mass spectrometry

---

### Résumé

Dans les pays en voie de développement les infections à staphylocoque à coagulase négative (SCN) sont souvent négligées. Ici, nous décrivons l'identification d'une souche de SCN sécrétrice d'entérotoxine staphylococcique de type C (SEC) sur un terrain fragilisé par un paludisme grave chez un enfant de 12 ans et résumons les caractéristiques clinique du patient. L'identification de la souche est réalisée par la spectrométrie de masse MALDI-TOF après une extration protéique. La capacité toxigénique de l'espèce en cause est déterminée par la réaction de polymérisation en chaine de (PCR) et par le test d'immunoprécipitation radiale. Le dossier médical du patient est exploité pour l'étude de la corrélation entre le phénotype clinique du patient et la production de SEC par la souche. *S. epidermidis* a été identifié comme l'agent pathogène responsable de la bactériémie ayant induit un sepsis clinique, une hématomèse et une thrombopénie. Le test de PCR a révélé que la souche était positive pour le gène *sec* dont l'expression a été confirmée par le test d'immunoprécipitation radiale d'Ouchtchertlony. L'étude du dossier médical du patient montre que l'entérotoxine produite par la souche à bien pu contribuer à la gravité du tableau clinique avec la présence de stigmates de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) dans un contexte de sepsis à point de départ urinaire. Ces données suggèrent que les infections à SCN peuvent être sous estimées à cause des difficultés d'identification au niveau espèce et la capacité toxigène de certains de ces isolats.



---

**Mots clés:** *Staphylococcus epidermidis*, septicémie, entérotoxine, spectrométrie de masse

### Introduction

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont des bactéries commensales de la peau à l'origine d'infections opportunistes le plus souvent nosocomiales. Une relation directe a récemment été rapportée entre les accès palustres chez les enfants vivant en zone d'endémie et de telles infections opportunistes (Scott *et al.*, 2011). Cette situation participe probablement au fort taux de mortalité observé chez les enfants présentant un paludisme grave en Afrique sub-saharienne (Were *et al.*, 2011). Les pathogènes les plus fréquemment isolés des hémocultures chez de tels patients sont les *Salmonella non-typhi*, les entérobactéries, et, plus rarement, *Staphylococcus aureus* (Bronzan *et al.*, 2007). Bien que les staphylocoques à coagulase négative soient habituellement considérés comme des pathogènes faiblement virulents, plusieurs études ont rapporté l'identification de facteurs de virulence chez certaines espèces. En effet, sachant la proximité génétique des espèces de staphylocoques et la cohabitation des SCN avec *S. aureus* sur la peau et les muqueuses de l'homme, les facteurs de virulence habituellement produits par *S. aureus* pourraient être retrouvés chez les autres staphylocoques moins pathogènes par des mécanismes de transfert horizontal de gène de virulence. Par exemple, les entérotoxines staphylococciques ayant des propriétés pyrogénique, endotoxique et superantigénique originaires isolées chez *S. aureus*, ont été récemment identifiées chez des souches de SCN d'origine humaine (Madhusoodanan *et al.*, 2007; Nanoukon *et al.*, 2016). Chez *S. aureus*, ces toxines sont associées à plusieurs pathologies dont la plus fréquente est l'intoxication alimentaires qui est due à l'ingestion d'une ou plusieurs entérotoxines staphylococciques préalablement développées dans l'aliment (Spaulding, 2013). Le syndrome de choc toxique staphylococcique est provoqué par la diffusion dans l'organisme de certains superantigènes dont les entérotoxines staphylococciques (B, C, etc.) (McCormick *et al.*, 2001). La production d'entérotoxines staphylococciques à la phase aiguë a été aussi incriminée dans la genèse de la maladie de Kawasaki (Prévost, 2004). En ce qui concerne les SCN, il n'y presque pas d'étude ayant permis d'établir une corrélation clinico-biologique entre l'expression d'entérotoxine staphylococcique et les manifestations cliniques pouvant expliquer la pathogénicité des souches.

La présente étude décrit l'identification d'une souche de *S. epidermidis* productrice d'entérotoxine staphylococcique C, impliquée dans une bactériémie associée à un paludisme grave et rapporte les caractéristiques cliniques du patient.

## Matériels et méthodes

### Collecte des échantillons

L'étude a enrôlé un enfant de sexe masculin de l'âge de 12 ans qui a été admis en urgence au Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM) de Cotonou avec des signes de septicémie à foyer urinaire. Les échantillons de sang et d'urine de ce patient ont été collectés pour analyses. Les analyses microbiologiques ont été réalisées au Laboratoire de Microbiologie dudit hôpital.

### Isolement et identification des SCN

Le sang (3 ml) a été prélevé à l'admission du patient, aux services des urgences dans des flacons d'hémoculture (BD BACTEC-plus™) contenant du bouillon de sodja enrichi et du CO<sub>2</sub>, avant toute antibiothérapie et au moment de l'élévation thermique. Les cultures positives après 24-48 h d'incubation sont soumises à la coloration de Gram et à la culture sur des milieux usuels. L'identification phénotypique de la souche isolée de l'hémoculture du patient a été réalisée par des méthodes standards incluant les tests biochimiques. Brièvement, la souche a été d'abord testée pour la recherche de la production de la staphylocoagulase libre en utilisant le plasma lyophilisé de lapin (Bio-Rad Laboratories, Marne-La-Coquette, France) (Riegel *et al.*, 2006) et la recherche de la coagulase liée avec le test d'agglutination au latex Pastorex Staph-Plus (Bio-Rad Laboratories) (Riegel *et al.*, 2006).

L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) a été réalisé à la suite d'un prélèvement aseptique des urines. Elles sont ensuite ensemencées sur les géloses Chapman et la gélose au sang (GS). Enfin, la coloration Gram de la souche soupçonnée a été réalisée suivi d'un test de recherche de la staphylocoagulase libre.

Après la négativité de ces tests, l'isolat a été considéré comme un staphylocoque à coagulase négative et a été ensuite identifiée au niveau espèce à la spectrométrie de masse MALDI-TOF avec un MALDI-TOF Microflex LT/LRF couplé à l'algorithme de biotypage MALDI à l'Institut de Bactériologie de l'université de Strasbourg selon les recommandations du fabricant. Un score d'identification  $\geq 2$  est considéré comme une forte confiance d'identification au niveau espèce de la souche.

### Susceptibilité aux antibiotiques

La susceptibilité de la souche aux antibiotiques a été recherchée avec Vitek 2 selon les recommandations du comité Européen sur le test de susceptibilité antimicrobien au cours de la période d'étude (<http://www.eucast.org/>). Les antibiotiques testés sont les suivants : Céfoxitine (10 µg), Benzylpénicilline (6 µg), Oxacilline (1 µg), Gentamicine

(10 µg), Kanamicine (30 µg), Tobramicine (10 µg), Ofloxacine (5 µg), Clindamycine (2 µg), Erythromycine (15 µg), Lincomycine (15 µg), Pristinamycine (15 µg), Linézoïde (30 µg), Téricoplanine (30 µg), Vancomycine (30 µg), Tétracycline (30 µg), Fosfomycine (200 µg), Nitrofurantoinne (300 µg), Acide fusidique (10 µg), Rifampicine (5 µg), Triméthoprime-sulfamides (1.25/23.75 µg).

### **Production de toxines**

La recherche de gène codant les entérotoxines staphylococciques (SEA, SEB, SEC, SEG, SEH), la Leucocidine de Panton et Valentine (LPV) (LukF-PV, LukS-PV) et la gamma-hémolysine de *S. aureus* a été réalisée par la réaction de polymérisation en chaîne avec les oligonucléotides spécifiques de *S. aureus*.

Enfin l'expression du gène présent est recherchée par la technique d'immunoprécipitation radiale d'Ouchterlony en utilisant les anticorps purifiés de lapin spécifique aux toxines de *S. aureus* (Gravet *et al.*, 2011). Pour cette détection, 40 µl de surnageant de culture (113 ng/µl), de toxine (100 µg/mL) et d'anticorps (2,25 µg/mL) sont déposés dans les puits correspondants, sur un gel d'agarose de 0,6%. Après 24 h incubation à 4°C, la présence de SEC dans le surnageant est mise en évidence par l'apparition d'un arc de précipitation entre le puits contenant l'anticorps anti-SEC et le puits contenant le surnageant de culture de *S. epidermidis*.

### **Importance microbiologique**

L'importance microbiologique de la souche isolée de l'hémoculture et de l'ECBU a été évaluée selon les recommandations du manuel Européen des Critères de Microbiologie Clinique pour l'Interprétation (EMCM, 2016). Ainsi, pour l'hémoculture, la souche de SCN est considérée comme responsable de l'infection s'il y a au moins deux échantillons positifs pour la même espèce à des moments de cultures différentes. Pour les échantillons d'urines, la bactériurie est significative à une valeur  $\geq 10^5$  CFU/ml, lorsqu'elle est associée à une leucocyturie  $\geq 10^4$  CFU/ml.

### **Données cliniques**

Le dossier médical du patient obtenu au service pédiatrique du CNHU-HKM a été consulté avec un regard sur les données cliniques incluant les conditions l'admission aux Urgences, les résultats d'hémogramme, de la C-protéine réactive (CRP) et de la densité parasitaire déterminés au Laboratoire d'Hématologie, de Biochimie et de Parasitologie selon les procédures standards.



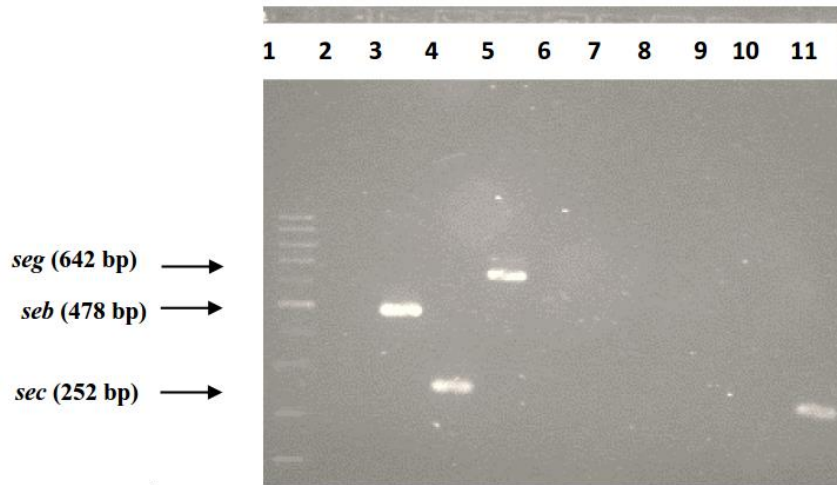
## Résultats

### Données cliniques

Cette étude porte sur un patient de 12 ans qui est admis le 12 novembre 2015 au service d'accueil des urgences du CNHU-HKM pour une fièvre évoluant depuis 10 jours et associée à une hémorragie digestive haute et basse. L'état septique est d'emblée inquiétant avec une fréquence cardiaque à 120 bpm, une polypnée à 35 cycles par minute pour une fièvre à 40°C. Biologiquement le patient présente une anémie à 11,7 g/dl, une hyperleucocytose à  $12 \times 10^9/l$  dont  $10,2 \times 10^9/l$  de polynucléaires neutrophiles. Les plaquettes sont basses à  $21 \times 10^9/l$  et le taux de prothrombine (TP) spontanément à 64% avec un temps de Céphaline Kaolin (TCK) normal. Le frottis et la goutte épaisse contiennent *Plasmodium falciparum* avec une densité parasitaire de 312941 trophozoites/  $\mu l$  de sang. Les hémocultures réalisées à l'admission objectivent la présence de cocci à Gram (+) et l'examen cyto bactériologique des urines montre une leucocyturie pathologique. Le patient est traité en urgence par artésunate associé à une antibiothérapie par ceftriaxone. L'identification bactérienne réalisée au deuxième jour retrouve un *Staphylococcus epidermidis* dans le sang et dans les urines avec un antibiogramme identique: sensibilité à Méricilline et donc à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines, aux aminosides, au linézolide, aux sulfaméthoxazole/triméthoprimine et une résistance à la fosfomycine. L'identification de ce staphylocoque est confirmée avec un score d'identification  $\geq 2$  à la spectrométrie de masse et par séquençage du gène codant l'ARN 16S. La recherche de coagulase libre ou liée est négative.

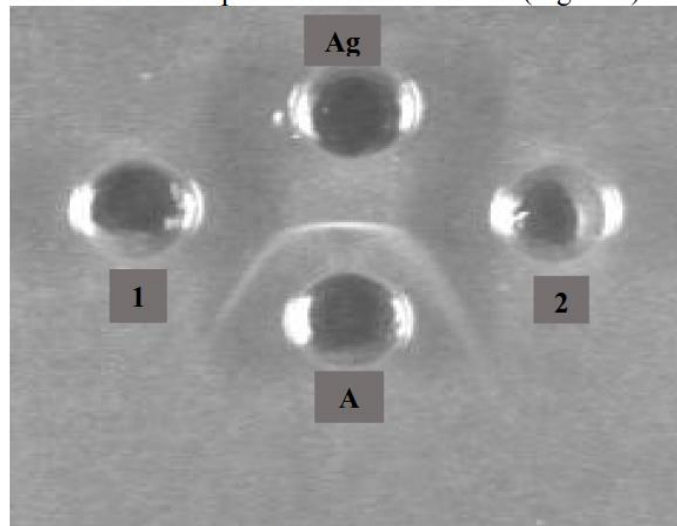
### Caractérisation de la toxigenicité de la souche

Le test de la PCR a été positif pour la recherche du gène codant l'entérotoxine staphylococcique C (*sec*) de *S. epidermidis* (Figure 1) dont l'expression a été confirmée en immunologie par la méthode d'agglutination au latex en utilisant le kit de détection des entérotoxines staphylococcique SEA, SEB, SEC, SED et SEE SET-RPLA-T900, et négatif les gènes *sea*, *seb*, *seg* et *seh* ainsi que pour le gène codant le clumping factor b (*clfb*).



**Figure 1 :** Électrophorèse sur gel d’agarose pour la détection du gène *sec* (252 bp), *seg* (642) et *seb* par PCR chez *S. epidermidis*. Ligne 1: Marqueur de poids moléculaire (100-bp), ligne 2: contrôle négatif, ligne 3: *S. aureus* SCP FRI 341 (*seb* +), ligne 4: *S. aureus* SCP FRI 361 (*sec* +), ligne 5, SCP FRI 137 (*seg* +); ligne 6, 7, 8, 9, et 10: SCN dépourvus des gènes *seb*, *sec*, et *seg*, ligne 11: souche de *S. epidermidis* positive pour le gène *sec*.

Le test d’immunoprécipitation radiale d’Ouchtterlony quant à lui a été négatif pour la production de la Leucocidine de Pantone et Valentine (LPV : LukF-PV et LukS-PV), et gamma-hémolysines de *S. aureus*, mais aussi positif avec un anticorps anti-SEC de *S. aureus* (Figure 2).



**Figure 2 :** Réaction immunologique du surnageant de culture de 24h de *S. epidermidis* (1 et 2) avec l’anticorps de lapin anti-SEC *S. aureus* SCP FRI 361 (Ac) en présence de la toxine SEC purifiée (Ag), utilisé comme témoin positif

L'évolution clinique était favorable avec la disparition des signes infectieux et de la CIVD permettant le transfert de ce patient en unité conventionnelle dès le 4<sup>ème</sup> jour d'hospitalisation. A 3 mois de suivi, le patient ne présentait pas de séquelles ni de récurrence infectieuse.

### Discussion

Nous rapportons la production d'entérotoxine staphylococcique C, un des principaux facteurs de virulence habituellement porté par *S. aureus*, par une souche de *S. epidermidis* impliquée dans une bactériémie. La gravité initiale du tableau avec la présence de stigmates de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ainsi qu'un syndrome hémorragique digestif peuvent être dus tant à l'accès palustre qu'à cette septicémie. L'identification de SCN dans les hémocultures est habituellement considérée comme une simple contamination dans la plupart des études (Were *et al.*, 2011, Sandlund *et al.*, 2013). Mais la survenue dans notre cas d'une dysurie, ainsi que l'identification d'une souche de même espèce et avec le même antibiogramme dans les urines avec production de nitrites nous conduit à confirmer le caractère pathogène de cette souche. Le lien entre accès palustre et septicémie n'est pas clair, mais certains auteurs ont évoqué la possibilité d'un déficit immunitaire transitoire concomitant de ces accès palustres (Nyein *et al.*, 2016). Il faut aussi remarquer que la plupart des infections à SCN sont nosocomiales, même en cas d'accès palustre alors que dans notre cas cette infection est d'origine communautaire, car tous les prélèvements positifs ont été réalisés à l'admission du patient (Bruneel *et al.*, 2010).

Bien que la capacité des SCN à produire des superantigènes demeure un sujet de débat et que de récentes études ont montré l'absence de production de ces dernières par des souches cliniques de SCN d'origine humaines, la souche isolée dans cette étude est sécrétrice d'entérotoxine et a pu jouer un rôle dans le tableau clinique présenté par ce jeune patient. Cette toxine est à l'origine d'intoxications alimentaires (Balaban *et al.*, 2000) mais récemment, son implication dans des sepsis létaux, des endocardites infectieuses et des lésions rénales aiguës a été démontrée dans un modèle animal (Salgado-Pabón *et al.*, 2013). En effet, l'entérotoxine déclenche directement un effet sur l'épithélium intestinal et sur le nerf vague, provoquant une stimulation du centre émétique et l'augmentation de la motilité intestinale ce qui induit les vomissements observés chez les patients. L'hémorragie digestive présentée par le patient peut être liée au tableau de CIVD présenté dès l'admission et dont la cause peut être ici multiple : accès palustre grave ou bien la septicémie à SCN producteur d'entérotoxine. L'activité de l'entérotoxine peut faciliter la transcytose, permettant à la toxine d'entrer dans la circulation sanguine induisant ainsi l'interaction forcée avec la portion V $\beta$  des cellules T et par conséquent, une hyperstimulation des



lymphocytes T. Cette super stimulation est la cause d'une synthèse et d'une libération excessive de cytokines : Tumor Necrosis Factor- alpha ( $TNF_{\alpha}$ ), Interleukin-1 et 2 (IL-1-2) qui agissent comme des vasodilatateurs capillaires, conduisant à une hypotension, un choc, une défaillance multiviscérale et souvent, alors, la mort (McCormick *et al.*, 2001).

### Conclusion

Les infections à SCN sont souvent négligées, à tort un peu partout dans le monde et particulièrement en Afrique, parce que certaines souches peuvent être virulentes. Notre étude souligne ainsi l'importance de continuer à rechercher la production d'entérotoxines chez *S. epidermidis* qui ne constitue probablement pas un pathogène opportuniste banal.

### Soutien financier

Ce travail a été financé par une bourse de Mérite de la Banque Islamique du Développement et soutenu à la fois par l'EA7290 Virulence Bactérienne Précoce de la Faculté de Médecine de l'Université de Strasbourg et par le laboratoire de Bactériologie du Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou-Maga de Cotonou, Benin.

### References:

1. Bronzan, R. N., Taylor, T. E., Mwenechanya, J., Tembo, M., Kayira, K., Bwanaisa, L., Njobvu, A., Kondowe, W., Chalira, C., Walsh, A. L., Phiri, A., Wilson, L. K., Molyneux, M. E. & Graham, S. M. (2007). Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. *Journal of Infectious Diseases*, 195 (6), 895–904. DOI: [10.1086/511437](https://doi.org/10.1086/511437)
2. Balaban, N. & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61 (1), 1–10. doi:[10.1016/S0168-1605\(00\)00377-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00377-9)
3. Bruneel, F., Tubach, F., Corne, P., Megarbane, B., Mira, J. P., Peytel, E., Camus, C., Schortgen, F., Azoulay, E., Cohen, Y., Georges, H., Meybeck, A., Hyvernat, H., Trouillet, J.L., Frenoy, E., Nicolet, L., Roy, C., Durand, R., Le Bras, J., Wolff, M. & Severe imported malaria in adults (SIMA) study group. (2010). Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PLoS One*, 5: e13236. doi: [10.1371/journal.pone.0013236](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013236).
4. Gravet, A., Couppie, P., Meunier, O., Clyti, E., Moreau, B., Pradinaud, R., Monteil, H. & Prevost, G. (2001). *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and LukE- LukD in 78% of 131 retrospective and prospective

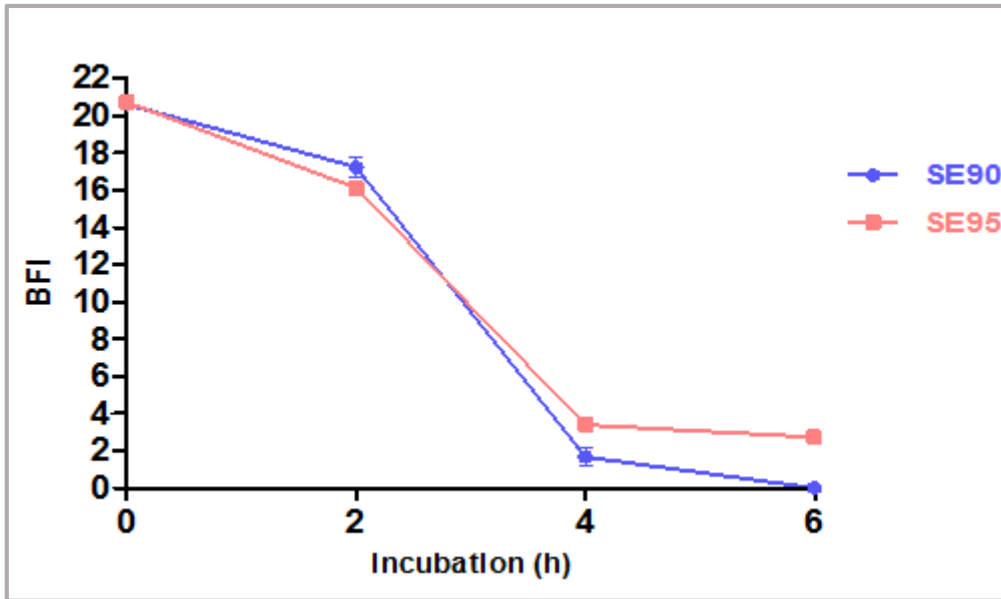
- cases. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (12), 4349-4356. doi: 10.1128/JCM.39.12.4349-4356.2001.
5. Madhusoodanan, J., Seo, K. S., Park, J. Y., Gill, A. L., Waterhouse, J., Remortel, B., Bohach, G. & Gill, S. R. (2007). Abstr. 107th *Genetics meeting of American Society for Microbiology*, Washington, DC, abstract, B-420.
  6. McCormick, J. K., Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M., (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Review of Microbiology*, 55, 77–104. DOI: [10.1146/annurev.micro.55.1.77](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.77).
  7. Nanoukon, C., Argémi, X., Sogbo, F., Orekan, J, Keller, D., Affolabi, D., Schramm, F., Riegel, P., Baba-Moussa, L. & Prévost, P. (2017). Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. *International Journal of Medical Microbiology*, 307 (1), 75–82. doi: [10.1016/j.ijmm.2016.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.11.001).
  8. Nyein, P. P., Aung, N. M., Kyi, T. T., Htet, Z. W, Anstey N. M., Kyi M.M. & Hanson, J. (2016). High frequency of clinically significant bacteremia in adults hospitalized with falciparum malaria. *Open Forum Infectious Diseases*, 3 (1), ofw028. doi: [10.1093/ofid/ofw028](https://doi.org/10.1093/ofid/ofw028).
  9. Prévost G. (2004). Toxins in *Staphylococcus aureus* pathogenesis. In Proft M. (Ed.): *Microbial toxins: molecular and cellular biology*, Norfolk, England, Horizon Bioscience.
  10. Riegel, P., Archambaud, M., Clavé, D., Vergnaud, M. (2006). *Bactérie de culture et d'identification difficiles*. Nancy l'Etoile, France, Biomérieux.
  11. Salgado-Pabón, W., Breshears, L., Spaulding, A. R., Merriman, J. A., Stach, C. S., Horswill, A. R., Peterson, M. L. & Schlievert, P. M. (2013). Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. *Mbio*, 4: e00494–13. doi 10.1128/mBio.00494-13
  12. Sandlund, J., Naucle P, Dashti, S, Shokri, A., Eriksson, S., Hjertqvist, M., Karlsson, L., Capraru, T. & Färnert, A. (2013). Bacterial co-infections in travelers with malaria: rationale for antibiotic therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (1), 15–21. doi: [10.1128/JCM.02149-12](https://doi.org/10.1128/JCM.02149-12)
  13. Scott, J. A., Berkley, J. A. Mwangi, I., Ochola, L., Uyoga, S., Macharia, A, Ndila, C, Lowe, B. S., Mwarumba, S, Bauni, E, Marsh, K. & Williams, T. N. (2011). Relation between falciparum malaria and bacteremia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *Lancet*, 378 (9799), 1316–1323. doi: [10.1016/S0140-6736\(11\)60888-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60888-X).



14. Spaulding, A.; Salgado-Pabón, W.; Kohler, P.; Horswill, A.; Leung D. & Schlievert, P. (2013). Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (3), 422–447. doi: 10.1128/CMR.00104-12.
15. Were, T., Davenport, J. B., Hittner, C., Ouma, J. M., Vulule, J. M., Ong'echa, M. J., D. J. & Perkins, D. J. (2011). Bacteremia in Kenyan children presenting with malaria. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (2), 671676. doi: [10.1128/JCM.01864-10](https://doi.org/10.1128/JCM.01864-10)

### 3.2. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES NON PUBLIES : Recherche de la production de Biofilm

Le facteur de virulence le plus important dans l'établissement des infections à *S. epidermidis* chez l'homme est sa capacité à développer un biofilm (Otto 2012, Otto 2013). Des études antérieures ont essayé d'identifier les prédictors de la vraie bactériémie à SCN comme le nombre de cultures sanguines positives, l'espèce impliquée, et la production de biofilm par la souche en cause. (Souvenirs et al., 1998, Uyanik et al., 2014). Ainsi, *S. epidermidis* est maintenant reconnu comme une cause importante de bactériémie, en particulier chez les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs (Savithri, et al., 2011). Aussi le biofilm constitue une protection génétique pour les bactéries en permettant l'acquisition de nouveaux caractères. Pour appuyer nos résultats précédents, nous avons recherché la production de biofilm par les deux souches SEC<sup>+</sup> en utilisant le Biofilm Ring Test<sup>®</sup> (BRT) (BRT, Biofilm Control, Saint-Beauzire, France). Ce test est basé sur la mobilité des billes superparamagnétiques dans les suspensions bactériennes (Olivares et al., 2016). En effet, si un biofilm se forme, ces microparticules seront incorporées dans la matrice et deviendront indétectables après l'aimantation. Nous avons ainsi pu mesurer cette immobilisation des microparticules par les deux souches SE90 et SE95, qui est exprimée comme l'Indice de BioFilm (BFI) en fonction du temps. Le test d'adhérence est positif pour les deux souches, preuve de la formation de biofilm par ces dernières (Figure 3.4). SE90 et SE95 débutent la formation de biofilm dans les 4 heures après leur incubation avec les billes magnétiques, entraînant la chute brutale de l'indice BioFilm (BFI < 4). Les billes sont complètement immobilisées avec SE90 (BFI=0) dans les 6 heures tandis qu'elles restent stables avec SE95. Ces résultats pourraient confirmer l'implication de ces souches dans une bactériémie et étayer l'hypothèse du transfert du gène *sec* de *S. aureus* vers *S. epidermidis*.



**FIGURE 3.4: CINETIQUE DE LA FORMATION DE BIOFILM DE PAR LES SOUCHES DE *S. EPIDERMIDIS* SE90 ET SE95 ISSUES DE BACTERIEMIE.**

Les résultats sont obtenus après analyse des images de microplaques par le logiciel « Biofilm Control Elements® ». La formation de biofilm est déterminée comme la variation de l'indice de BioFilm (BFI) entre 2h et 6h en fonction du temps d'incubation. Les barres représentent l'écart-type de la moyenne du BFI obtenu à partir de la mesure de 3 expériences indépendantes pour chaque souche.

## PARTIE 4

### 4.1. ARTICLE 4: IDENTIFICATION OF THE PATHOGENICITY ISLAND *SEPI-1* BEARING ENTEROTOXINS AND OTHER MOBILE GENETIC ELEMENTS IN A PATHOGENIC STRAIN OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* THROUGH WHOLE GENOME SEQUENCING

**Statut :** Article soumis dans « *Clinical Microbiology and Infection* »

**Auteurs :** Xavier Argémi\*, Chimène Nanoukon\*, Dissou Affobali, Daniel Keller, Yves Hansmann, Philippe Riegel, Lamine Baba-Moussa, Gilles Prévost.

\* Ces deux auteurs ont participé de façon égale à ce manuscrit

#### 4.1.1. Situation du sujet

Nous avons précédemment montré que des souches cliniques de *S. epidermidis* (SE90 et SE95) produisaient l'entérotoxine staphylococcique de type C (SEC<sub>epi</sub>) qui s'est révélée être génotypiquement et fonctionnellement très proche de celle décrite chez *S. aureus*. Cette toxine pouvait à la fois provoquer une prolifération anormale des cellules T et induire une augmentation excessive des niveaux de production cytokinique spécifique aux entérotoxines, pendant que des doutes existent encore sur la capacité superantigénique des SCN.

A la lumière des articles 1 et 2 (Nanoukon et al., 2017) nous pouvons supposer que la présence d'un gène *sec* stable chez des souches de *S. epidermidis* est le résultat de l'acquisition d'îlots génomiques spécifiques par cette bactérie au cours de l'évolution de son génome. Nous remettons ainsi en cause l'hypothèse de l'incapacité des SCN à recevoir par transfert horizontal, des gènes de virulence de *S. aureus*, due à la présence de CRISPR, un système de reconnaissance du non-soi, dans la majorité de leur génome (Otto et al., 2012).

De nombreux gènes qui codent pour des propriétés de virulence des bactéries ont une origine étrangère, comme l'attestent le pourcentage G+C et le taux préférentiel d'usage des codons. Chez *S. aureus*, les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques sont souvent localisés sur des éléments génétiques mobiles (EGM) provenant du génome accessoire. Quant aux SCN, les gènes impliqués dans la formation du biofilm demeurent les marqueurs génétiques de leur virulence. Zhang et al. (2003) ont montré que la nature moins agressive des SCN, comparée à celle de *S. aureus*, est expliquée par l'absence de gènes codant les entérotoxines, les

exotoxines et les leucotoxines. Ainsi, le transfert de gènes de *S. aureus* vers *S. epidermidis* par l'intermédiaire des EGMs pourrait représenter une source additionnelle de facteurs de virulence pour les deux souches SEC<sup>+</sup> de notre étude.

La virulence des SCN est souvent analysée par des méthodes phénotypiques ainsi que génotypiques et il existe un nombre limité d'études génomiques sur les souches de différentes origines. A notre connaissance, seulement deux isolats de *S. epidermidis* d'origine clinique ont été entièrement séquencés (*S. epidermidis* ATCC 12228 et RP62A). Le génome de la souche non virulente *S. epidermidis* ATCC 12228 contient six plasmides qui ne portent aucun des déterminants de la pathogénicité de *S. aureus* (Zhang et al., 2003). Celui de la souche virulente RP62A contient un plasmide intégré qui code pour le PIA (polysaccharide intercellular adhesin), favorisant la formation du biofilm. Madhusoodanan et al., (2011) ont partiellement séquencé le génome de la souche FRI909 et ont identifié un îlot de pathogénicité codant le gène *sec*. Mais des génomes entiers sont maintenant nécessaires pour donner un aperçu détaillé des processus évolutifs conduisant à des souches de *S. epidermidis* de potentiel de virulence proche de celui connu pour *S. aureus*. Nous avons donc décidé d'analyser les caractéristiques générales de deux nouveaux génomes et souligner la signification des éléments génétiques mobiles pour l'acquisition des gènes d'entérotoxines par les SCN.

#### 4.1.2. Résultats

Nous avons effectué le séquençage *de novo* et l'annotation des deux souches productrices d'entérotoxines (SE90 et SE95). Les génomes sont séquencés en utilisant la technologie de séquence Illumina® (GATC Biotech, Allemagne) et assemblés avec le logiciel SPAdes 3.8. L'ordre, l'orientation et la fermeture des lacunes des contigs sont réalisés avec PAGIT (kit d'amélioration du génome après assemblage). Les éléments de génétique mobile dont les plasmides, les îlots de pathogénicité et les prophages ont été identifiés en utilisant des logiciels annotation, Phaster et Islandviewer3 *de novo*.

Un chromosome final est obtenu pour chaque souche et permet d'identifier le gène *sec3* codant l'entérotoxine de type C, mais aussi un autre gène, codant l'entérotoxine de type L. Ces 2 facteurs de virulence sont situés sur un îlot de pathogénicité de 20 kb. Cet îlot de pathogénicité présente 85% d'identité nucléotidique avec SePI, le premier et unique îlot de pathogénicité portant le gène codant l'entérotoxine identifiée chez les SCN et est nommé SePI 2. L'organisation génétique de cet îlot montre qu'il contient des protéines d'emballage de l'îlot

de pathogénicité de *S. aureus* (SaPI) et un intégrase du prophage phiR v2. Nous avons identifié dans le génome de SE90, un prophage qui ne porte aucun facteur de virulence et deux plasmides dont un seul porte un gène de résistance au beta-lactamase. Quatre séquences de plasmides sont identifiées dans le génome de SE95 dont certains portent des gènes de résistance aux antibiotiques. Tous les plasmides identifiés sont homologues à des plasmides déjà connus, mais comprennent deux plasmides de *S. aureus*.

#### **4.1.3. Conclusion**

Cette étude a permis d'identifier un îlot de pathogénicité portant une entérotoxine staphylococcique de type C3 et de type L dans 2 souches cliniquement virulentes de *S. epidermidis*. Il confirme l'existence d'éléments génétiques mobiles virulents dans les SCN, une question de débat depuis plusieurs années. En outre, ces observations suggèrent la possibilité d'une acquisition horizontale et stable de structures mobiles associées à la virulence et provenant de *S. aureus* par les autres espèces de staphylocoque.

Clinical Microbiology and Infection



**Comparative genomics and identification of the pathogenicity island SEPI-1-bearing enterotoxins in Staphylococcus epidermidis pathogenic strains**

Journal:	<i>Clinical Microbiology and Infection</i>
Manuscript ID	CLM-17-12550
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	25-Sep-2017
Complete List of Authors:	argemi, xavier; Nouvel Hopital Civil, Maladies Infectieuses et tropicales Nanoukon, Chimène; Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie Affolabi, Dissou; University Hospital Hubert Koutoukou Maga, Clinical Microbiology Keller, Daniel; Faculte de medecine, Fédération de Médecine Translationalnelle, EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Université de Strasbourg, Hansmann, yves; CHU, Infectious Diseases riegel, philippe; nouvel hopital civil, laboratoire de microbiologie Baba Moussa, Lamine; Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie prevost, gilles; Faculte de medecine, Fédération de Médecine Translationalnelle, EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Université de Strasbourg,
Key Words:	pathogenicity island, enterotoxin, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, pan-genome, core genome
Abstract:	Objectives: Staphylococcus epidermidis is a coagulase-negative staphylococci that is part of the normal skin flora. It is a leading cause of nosocomial infection, with a high antibiotics resistance profile, and may transfer several mobile genetic elements among members of its own species as well as to Staphylococcus aureus. However, a genetic exchange from S. aureus to S. epidermidis remains controversial. We recently identified two pathogenic clinical strains of S. epidermidis that produce staphylococcal enterotoxin C (SEC) similar to that found in S. aureus pathogenicity islands. This study aimed to determine the genetic environment of the SEC-coding sequence and identify mobile genetic elements. Methods: We performed whole-genome sequencing and annotation of the S. epidermidis strains using Illumina technology and a bioinformatics pipeline for assembly. Bioinformatics tools were used to search for pathogenicity islands, prophages, and plasmids. We also performed comparative genomic analyses among the complete S. epidermidis genomes available. Results: We identified an SEC-coding sequence located in a composite

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

	<p>pathogenicity island that was previously described in the <i>S. epidermidis</i> strain FRI909, called SePI-1/SeCI-1, with 83.8%–89.7% nucleotide similarity. We also identified various plasmids and one complete prophage. Pan and core genome analyses revealed an open pan genome and core genome that rapidly stagnated at 1924 genes.</p> <p>Conclusion: The SePI-1/SeCI-1 pathogenicity island was identified in two pathogenic strains of <i>S. epidermidis</i> that produced a type of SEC that causes septic shock. This finding suggests the existence of in vivo genetic exchange from <i>S. aureus</i> to <i>S. epidermidis</i>.</p>
--	---

SCHOLARONE™  
Manuscripts

For Peer Review



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 **Original article**

2 **Title:** Comparative genomics and identification of the pathogenicity island *SEPI-1*-bearing  
3 enterotoxins in *Staphylococcus epidermidis* pathogenic strains

4 **Short title:** Enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*

6 **Authors:**

7 Xavier Argemi<sup>1,2,#</sup>

8 Chimène Nanoukon<sup>3,#</sup>

9 Dissou Affobali<sup>3</sup>

10 Daniel Keller<sup>2</sup>

11 Yves Hansmann<sup>1,2</sup>

12 Philippe Riegel<sup>1,2</sup>

13 Lamine Baba Moussa<sup>3</sup>

14 Gilles Prévost<sup>2</sup>

16 **Affiliations:**

17 <sup>1</sup> Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France

18 <sup>2</sup> Université de Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de  
19 Strasbourg, EA 7290, Virulence Bactérienne précoce, F-67000 Strasbourg, France

20 <sup>3</sup> Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en  
21 Microbiologie, Université d'Abomey, Calavi, 05 BP 1604 Cotonou, Benin

22 <sup>4</sup> Laboratoire de Microbiologie du Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert  
23 Koutoukou-Maga, Cotonou, Benin

24 <sup>#</sup>These two authors equally contributed to this manuscript.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

25 **Abstract:**

26

27 **Objectives:** *Staphylococcus epidermidis* is a coagulase-negative staphylococci that is part of  
28 the normal skin flora. It is a leading cause of nosocomial infection, with a high antibiotics  
29 resistance profile, and may transfer several mobile genetic elements among members of its  
30 own species as well as to *Staphylococcus aureus*. However, a genetic exchange from *S.*  
31 *aureus* to *S. epidermidis* remains controversial. We recently identified two pathogenic  
32 clinical strains of *S. epidermidis* that produce staphylococcal enterotoxin C (SEC) similar to  
33 that found in *S. aureus* pathogenicity islands. This study aimed to determine the genetic  
34 environment of the SEC-coding sequence and identify mobile genetic elements.

35 **Methods:** We performed whole-genome sequencing and annotation of the *S. epidermidis*  
36 strains using Illumina technology and a bioinformatics pipeline for assembly. Bioinformatics  
37 tools were used to search for pathogenicity islands, prophages, and plasmids. We also  
38 performed comparative genomic analyses among the complete *S. epidermidis* genomes  
39 available.

40 **Results:** We identified an SEC-coding sequence located in a composite pathogenicity island  
41 that was previously described in the *S. epidermidis* strain FRI909, called SePI-1/SeCI-1, with  
42 83.8%–89.7% nucleotide similarity. We also identified various plasmids and one complete  
43 prophage. Pan and core genome analyses revealed an open pan genome and core genome  
44 that rapidly stagnated at 1924 genes.

45 **Conclusion:** The SePI-1/SeCI-1 pathogenicity island was identified in two pathogenic strains  
46 of *S. epidermidis* that produced a type of SEC that causes septic shock. This finding suggests  
47 the existence of *in vivo* genetic exchange from *S. aureus* to *S. epidermidis*.

48

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

49

50 **Key words:** pathogenicity island, enterotoxin, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus*

51 *aureus*, pan-genome, core genome

52

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

53 **Manuscript**

54

55 **Introduction**

56

57 *Staphylococcus epidermidis* is a coagulase-negative staphylococci (CoNS) that is a part of the  
58 commensal skin flora. It is a major opportunistic pathogen causing nosocomial infections in  
59 hospital settings, primarily foreign body-associated infections such as catheter-related  
60 bacteremia. The mechanism through which *S. epidermidis* becomes a pathogen is related to  
61 the production of several adhesion factors and biofilm, coupled with its wide range of  
62 antibiotic resistance genes. Strong evidence supports the hypothesis that *S. epidermidis* can  
63 transfer mobile genetic elements (MGEs) to *Staphylococcus aureus aureus in vivo* [1,2]. Until  
64 recently, the absence of toxin genes from *S. aureus* in *S. epidermidis* genomes led  
65 researchers to believe that *S. epidermidis* did not acquire genes from *S. aureus in vivo*,  
66 despite evidence of horizontal gene transfers from *S. aureus* to CoNS or *Listeria in vitro* in  
67 the form of pathogenicity islands [3,4]. In 2011, Madhusoodanan *et al.* described the *S.*  
68 *epidermidis* pathogenicity island (*SePI-1*) that was identified in a clinical strain, *S. epidermidis*  
69 FRI909, which was isolated in the United States [5]. In this pathogenicity island, they found  
70 two enterotoxins genes, *sec3* and *sel*, that appeared functional, providing the first evidence  
71 that genetic material could have been passed from *S. aureus* to *S. epidermidis*. In 2016, we  
72 described two strains of *S. epidermidis*, SE90 and SE95, in two patients with bacteremia. We  
73 reported the production of staphylococcal enterotoxin C (SEC) and the presence of a coding  
74 sequence with 100% homology with *sec3*, as described in *SePI-1* [6]. Sequence alignment  
75 indicated that *sec3* in *SePI-1* has 95% identity with *sec3* from *S. aureus*. Madhusoodanan *et*  
76 *al.* also identified a chromosomal insertion sequence, named *SeCI-1*. *SePI-1* and *SeCI-1* form

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

77 a composite genomic island that lacks many genes found in *S. aureus* pathogenicity islands  
78 and that belong to the DNA packaging and replication modules. The probability of the recent  
79 transmission of this genomic island was consequently low, and as expected, no evidence of  
80 mobilization capabilities for the sequence was found, despite the presence of a putative  
81 helper phage,  $\phi 909$ . In a large screening study of 200 strains from bacteremia, the presence  
82 of *SePI-1* or other SePI-like proteins was not found, suggesting that the presence of the  
83 pathogenicity island in *S. epidermidis* is rare or unique. Our recent identification of a  
84 functional *sec3* sequence in clinically virulent *S. epidermidis* strains led us to hypothesize the  
85 presence of an underlying pathogenicity island. To better determine genetic environments  
86 of this enterotoxin, we sequenced and analyzed whole genomes of the two strains that  
87 produced SEC3 and searched for all putative MGEs.

## 89 **Materials and methods**

### 91 **Bacterial strains, culture, and DNA extraction**

92  
93 The two strains SE90 and SE95 were previously described [6] and were isolated from two  
94 children with bacteremia at the NTH-HKM hospital, Cotonou, Benin; the strains were grown  
95 on Columbia agar with 5% sheep blood and incubated for 24 h at 37°C. Bacteria were  
96 identified using matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass  
97 spectrometry, according to the manufacturer’s instructions (Bruker Daltonics, Wissembourg,  
98 France). DNA was extracted using the MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre, Le  
99 Parray-en-Yvelines, France). DNA purity was controlled through optical density (OD), with  
100  $OD_{260/280} \geq 1.8$  and  $OD_{260/230} \geq 1.9$ . DNAs were dissolved in RNase-, DNase-, and

1  
2  
3 101 protease-free 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8–8.5). The visual quality of the extracted DNA was  
4  
5 102 assessed using agarose gel electrophoresis and UV visualization to exclude DNA degradation  
6  
7 103 or contamination.  
8  
9  
10 104  
11  
12 105 **Genome sequencing and annotations were performed as previously described**  
13  
14 106  
15  
16  
17 107 Whole-genome sequencing was performed as previously described using Illumina  
18  
19 108 technology: Illumina HiSeq 2500 (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany) [7]. Sequencing  
20  
21 109 produced paired-end sequences of 125 bp. Sequence assemblies were identified using  
22  
23 110 SPAdes (v 3.10.1) with 21-33-55-77-97 k-mers. SPAdes output contigs of <1000 bp or with  
24  
25 111 coverage of <10× were removed. Sequences were completed using post-assembly genome-  
26  
27 112 improvement toolkit from the Sanger Institute [8]. The final sequence annotation was  
28  
29 113 performed using PROKKA (Galaxy version 1.4.0, Institut National de la Recherche  
30  
31 114 Agronomique Galaxy platform; <http://migale.jouy.inra.fr/?q=fr/galaxy>) [9]. The unique  
32  
33 115 chromosomes for each sequence and short, non-aligned contigs were further analyzed to  
34  
35 116 identify plasmids or other genetic elements of interest. Non-aligned contigs were loaded  
36  
37 117 into the ARTEMIS software (v.16.0.0) to identify open reading frames (ORFs), which were  
38  
39 118 successively analyzed using the UniProt database (<http://www.uniprot.org/>).  
40  
41 119  
42  
43  
44  
45  
46  
47 120 **Whole-genome sequence analysis**  
48  
49 121  
50  
51  
52 122 SE90 and SE95 whole-genome sequences were compared with three other sequences. The  
53  
54 123 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genome database currently contains  
55  
56 124 seven complete and 388 draft sequences [10]. ATCC12228 was used as the reference strain  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 125 (novel sequence publicly available in 2017 using PacBio sequencing technology; NCBI  
4  
5 126 accession number CP022247.1) with five other complete *S. epidermidis* genomes: PM221  
6  
7 127 (NCBI accession number HG813242), SEI (NCBI accession number CP009046), RP62A (NCBI  
8  
9 128 accession number CP000029.1), 14.1.R1 (NCBI accession number CP018842.1), and 1457  
10  
11 129 (NCBI accession number CP020463.1). Identification of the core genome, pan genome, and  
12  
13 130 gene sets and phylogeny analyses were performed using the EDGAR 2.2 software platform  
14  
15 131 [11]. This web tool performs analogy analyses with a cutoff value that automatically adjusts  
16  
17 132 according to the input data. The orthology analysis is based on the BLAST score ratio values  
18  
19 133 and predicts pan, core, and accessory genomes [12]. For EDGAR phylogeny analyses, as  
20  
21 134 specified in the manual, the pipeline uses the core genome, and every set of orthologous  
22  
23 135 genes found in all genomes is separately aligned using the multiple alignment tool MUSCLE  
24  
25 136 [13]. Alignments are concatenated and used to calculate a distance matrix. Finally, a  
26  
27 137 phylogenetic tree is constructed from this distance matrix using the neighbor-joining  
28  
29 138 method. Functional analyses of the putative proteins, encoded by SE90 and SE95 genomes,  
30  
31 139 were performed and compared with the *S. aureus* MU3 (NCBI accession number  
32  
33 140 AP009324.1) annotated genome using the Clusters of Orthologous Groups of proteins  
34  
35 141 (COGs) database. COG categories were retrieved using the WebMGA software platform,  
36  
37 142 with an e-value cutoff of 0.001 for prediction [14,15].  
38  
39 143  
40  
41 144  
42  
43 145 **Identification of the SEC3-coding sequence and its genetic environment**  
44  
45 146  
46  
47 147 The sequence coding for SEC3 was retrieved, and the assembled and annotated  
48  
49 148 chromosomes were loaded into the ARTEMIS software. Surrounding PROKKA-annotated  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

7



1  
2  
3 149 ORFs were evaluated using the UniProt database and were manually corrected. *Sec3* and the  
4  
5 150 surrounding sequences were aligned to the *S. epidermidis* FRI909 pathogenicity island using  
6  
7 151 EMBOSS Needle from the EBI website (<https://www.ebi.ac.uk/>) to evaluate nucleotide and  
8  
9 152 amino acid identities. Easyfig (v.2.2.2) was used to generate a BLAST alignment file with *SePI-*  
10  
11 153 *1/SeCI-1* from *S. epidermidis* FRI909, with a minimum length of 100 bp, maximum e-value of  
12  
13 154 0.001, and minimum identity value of 90 [16].  
14  
15  
16  
17 155  
18  
19 156 **Identification of other MGEs**  
20  
21 157  
22  
23  
24 158 MGEs were searched as previously described [7]. Prophage search and annotation were  
25  
26 159 performed using PHage Search Tool Enhanced Release [17], which allows the rapid  
27  
28 160 identification of putative prophage sequences and provides annotations. A quality score of  
29  
30 161 >90 indicates an intact prophage sequence. A plasmid search was performed on all non-  
31  
32 162 aligned contigs that remain after genome assembly, particularly contigs that display an  
33  
34 163 unusually high level of coverage that is possibly linked to sequence duplication in the  
35  
36 164 bacterial genome. The additional contigs were annotated using PROKKA (Galaxy version  
37  
38 165 1.4.0, Institut National de la Recherche Agronomique Galaxy platform;  
39  
40 166 <http://migale.jouy.inra.fr/?q=fr/galaxy>), and sequence similarities were identified using the  
41  
42 167 BLAST® database. Plasmid categorization was performed according to the terminology used  
43  
44 168 by Smillie *et al.*, which distinguishes mobilizable from conjugative plasmids depending on the  
45  
46 169 presence of a type IV secretion system [18]. Pathogenicity island was identified using  
47  
48 170 IslandViewer 3 [19], which associates IslandPick, SIGI-HMM, and IslandPath-DIMOB for  
49  
50 171 identifying the pathogenicity island and displays the results in circular graphical images.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57 172  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60173 **Results**

174

175 **Whole-genome sequence analyses**

176

177 Whole-genome sequences of SE90 and SE95 are presented in Table 1. Illumina paired-end  
178 reads assembly with SPAdes produced 26 contigs for SE90 and 38 for SE95, with N90 = 39 kb  
179 and N90 = 43 kb, respectively. ABACAS contig ordering and IMAGE gap closing with a  
180 scaffolding step produced two 2.4-Mb genomes, with GC content between 31.95% and  
181 32.47%. SE90 and SE95 contained 2189 coding sequences, 1 tmRNA, 57–59 tRNAs, and 9–7  
182 rRNAs. Nucleic acid identities, with previously published genomes, showed 97%–99%  
183 sequence homology between the strains (see Supplementary material, Data S1). Core vs.  
184 pan genome development analysis of five strains, including SE90 and SE95, showed that  
185 1924 genes form the core genome of *S. epidermidis* and 2094 genes form the pan genome  
186 (Figure 1A). Although the pan genome appeared to constantly grow, the core genome  
187 appeared limited to approximately 2000 genes. The Venn diagram in Figure 1B, according to  
188 the EDGAR interface, shows 66 and 67 singleton genes in SE90 and SE95, respectively.  
189 However, the singletons correspond to genes without a reciprocal best hit to another  
190 genome as orthologs and are not necessarily proper singletons. Therefore, we used the  
191 dedicated interface in EDGAR to identify singletons, excluding orthologs, and confirmed that  
192 *sec3* and *sei* genes were unique in SE90 and SE95. The second element of interest was the  
193 identification of a type III-A CRISPR system in SE95, similar to that of *S. epidermidis* RP62A  
194 [20,21]. Singleton lists are provided in the Supplementary material, Data S2. A phylogenic  
195 tree was drawn from all *S. epidermidis* genes, with the highest-level assembly according to  
196 GenBank (see Supplementary material, Data S3). The function of each gene from the *S.*

1  
2  
3 197 *epidermidis* strain sequenced in this study, as well as that from *S. aureus* MU3, was classified  
4  
5 198 into COG categories, and the results are shown in Figure 2. Most genes did not fall in a  
6  
7 199 specific COG category (unknown or general function), and genes for amino acid transport  
8  
9 200 and metabolism were the most abundant. We found that the partition for COG categories  
10  
11 201 was closed between two species.  
12  
13  
14

15 202

16 203

17 204

#### 204 **Pathogenicity island identification**

205

206 IslandViewer 4 web server identified several putative genomic islands. The most significant  
207 findings included the genetic region with the Sec3-coding sequence. Using ARTEMIS, we  
208 manually improved the annotation around this sequence. We identified a 20-kb-coding  
209 sequence that corresponded to the composite structure of *SePI-1/SeCI-1*, described  
210 previously in *S. epidermidis* FRI909, with sequence homologies that ranged from 83.8% to  
211 89.7% according to pairwise alignment using EMBOSS Needle from the EBI website. Using  
212 Easyfig, we aligned and visualized *SePI-1/SeCI-1* along with corresponding sequences from  
213 SE90 and SE95 (Figure 3). We also found that overall gene predictions were similar, as was  
214 the organization. The genome of this genomic island is inserted downstream of the SsrA-  
215 binding protein, at the location of the only tmRNA in this genome. As described in *S.*  
216 *epidermidis* FRI909, there are two sets of direct repeat sequences, DR1 and DR2, that flank  
217 the two elements of the composite genomic island *SePI-1/SeCI-1*. As observed by  
218 Madhusoodanan *et al.*, several transposases were located within the sequence, suggesting  
219 that this composite region resulted from several recombination events [5].  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

220

#### 221 Identification of plasmids and prophages

222

223 Several plasmids were identified within the non-aligned contigs that displayed an  
224 unexpected high coverage level after whole-genome assembly. We identified two plasmids  
225 in the genome of SE90, *p\_1\_90* and *p\_2\_90*, and four plasmids in the genome of SE95,  
226 *p\_1\_95* to *p\_4\_95*, as detailed in Table 2. Only one plasmid, *p\_2\_95*, contained replication  
227 and mobilization genes and was categorized as mobilizable. Two plasmids, *p\_1\_90* and  
228 *p\_3\_95*, were non-mobilizable but displayed a replication protein. The other three plasmids  
229 *p\_2\_90*, *p\_1\_95*, and *p\_4\_95* were considered doubtful because they lacked replication and  
230 mobilization genes. These three plasmids, along with *p\_3\_95*, lacked antibiotic resistance  
231 genes, and most of their sequences were identified in other plasmids. Interestingly, *p\_3\_95*,  
232 a non-mobilizable plasmid, is nearly identical to SAP085A, a cyclin resistance plasmid  
233 identified in *S. aureus* (NCBI accession number GQ900437.1).

234 Prophage sequences were searched within main chromosomes and non-aligned contigs  
235 from SE90 and SE95. We identified only one intact prophage in SE90 and none in SE95. The  
236 phage was named  $\phi$ S\_epi\_90 and contained no virulence or antibiotic resistance genes. It  
237 was a 38.2-kb sequence with 52 coding sequences and a GC content of 39.1%. These  
238 characteristics and its modular organization are characteristics of the *Siphoviridae* phage  
239 according to Kwan *et al.* (see Supplementary material, Data S4) [22].

240

#### 241 Discussion

242

1  
2  
3 243 The presence of superantigens in CoNS is very rare. We evaluated two clinical strains from  
4  
5 244 two patients, including one who died from septic shock 48 h after *S. epidermidis* bacteremia  
6  
7 245 diagnosis. We found no definitive evidence of a causative link between the presence of this  
8  
9 246 superantigen and the clinical course of the patient, but the association remains feasible  
10  
11 247 because of the findings in *S. aureus* regarding the secretion of SEA, SEC, and TSST-1 proteins  
12  
13 248 [23]. In CoNS, *S. epidermidis* is probably the most studied species because it produces  
14  
15 249 several virulence factors that are likely involved in clinical manifestations such as adhesion  
16  
17 250 factors, biofilm, and phenol soluble modulins [24–26].  
18  
19 251 We identified an enterotoxin-coding sequence in a composite genomic island previously  
20  
21 252 described in *S. epidermidis* FRI909, with high nucleotide similarity and similar coding  
22  
23 253 sequences. This genomic island, *SePI-1/SeCI-1*, probably resulted from a genetic exchange  
24  
25 254 from *S. aureus* to *S. epidermidis*. Our findings suggest that this is not an isolated event,  
26  
27 255 although Madhusoodanan *et al.* did not succeed in mobilizing the genomic island. This  
28  
29 256 enterotoxin-bearing pathogenicity island is probably transmissible or as a second hypothesis,  
30  
31 257 results not from an accidental genetic exchange from *S. aureus* to *S. epidermidis* but from a  
32  
33 258 coordinated exchange, whose mechanisms remain to be elucidated. It has been suggested  
34  
35 259 that the common presence of a III-A CRISPR system in *S. epidermidis* could interfere with  
36  
37 260 horizontal genetic transfers and prevent the acquisition of foreign DNA from different  
38  
39 261 species, a mechanism absent in *S. aureus*. Nevertheless, we identified CRISPR-coding  
40  
41 262 sequences in SE95 singletons, with similar sequences to those described in *S. epidermidis*  
42  
43 263 RP62A, although SE95 may have acquired *SePI-1/SeCI-1* from *S. aureus*. Another hypothesis  
44  
45 264 is that the genomic island was acquired from another *S. epidermidis* strain, but as evidenced  
46  
47 265 by Madhusoodanan *et al.*, it seems non-mobilizable while integrated with the *S. epidermidis*  
48  
49 266 genome [5]. In addition, we identified a plasmid, *p\_3\_95*, similar to SAP085A (GQ900437.1),  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

267 a cyclin resistance plasmid in *S. aureus*, another finding suggesting the existence of genetic  
268 exchanges between these two species.

269 Finally, sequence analysis revealed constant growth in the pan genome, whereas the core  
270 genome rapidly decays and stagnates at 1924 genes. In a recent study of the pan and core  
271 genomes of 30 clinical strains of *S. epidermidis*, Conlan *et al.* reported high diversity between  
272 the strains, even within a single individual, a particularity that relies on the open pan  
273 genome of *S. epidermidis* [27]. Similar to our study, the authors found that the core genome  
274 size fits an exponential decay curve that plateaus at 1960 genes, whereas the pan genome  
275 fits a power law curve. Post *et al.* performed comparative genomic analyses among *S.*  
276 *epidermidis* strains from orthopedic device-associated infections [28] and found no clear  
277 correlation between the lineage and clinical outcomes but observed a strong association  
278 with biofilm formation capacity and antibiotic resistance.

279 Comparative genomics provide a powerful and innovative tool to explore genome-wide  
280 associations in staphylococci as more methods, software, and genomes become available  
281 [12]. These studies reveal the phylogenic associations and differences that exist between  
282 commensal and nosocomial genomes, focusing on genes of interest that could have been  
283 ignored using proteomic approaches.

284

285

286 **Funding:** Chimène Nanoukon was awarded a grant by the Islamic Bank for Development. We  
287 are grateful for the research grant from EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Faculté de  
288 Médecine (University of Strasbourg) and the Islamic Bank for Development.

289

290 **Conflict of interests:** The authors have no conflict of interest.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

291

292 **Authors contribution:** XA designed the experiment; XA and GP performed whole-genome  
293 analyses; CN, DA, and LBM performed pathogenicity island analyses; DK performed  
294 microbiological cultures and DNA extractions; and YH and PR revised the manuscript.

295

296 **Corresponding author:** Xavier Argemi, Infectious Diseases Department, Strasbourg  
297 University Hospital, 67000, Strasbourg. E-mail: [xavier.argemi@chru-strasbourg.fr](mailto:xavier.argemi@chru-strasbourg.fr)

298

299 **Literature cited**

300

301 [1] Méric G, Miragaia M, de Been M, Yahara K, Pascoe B, Mageiros L, et al. Ecological  
302 overlap and horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus*  
303 *epidermidis*. *Genome Biol Evol* 2015;7:1313–28. doi:10.1093/gbe/evv066.

304 [2] Otto M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA  
305 infection. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 2013;35:4–11.  
306 doi:10.1002/bies.201200112.

307 [3] Chen J, Novick RP. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science*  
308 2009;323:139–41. doi:10.1126/science.1164783.

309 [4] Chen J, Carpena N, Quiles-Puchalt N, Ram G, Novick RP, Penadés JR. Intra- and inter-  
310 generic transfer of pathogenicity island-encoded virulence genes by cos phages. *ISME J*  
311 2015;9:1260–3. doi:10.1038/ismej.2014.187.

312 [5] Madhusoodanan J, Seo KS, Remortel B, Park JY, Hwang SY, Fox LK, et al. An enterotoxin-  
313 bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 2011;193:1854–  
314 62. doi:10.1128/JB.00162-10.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 315 [6] Nanoukon C, Argemi X, Sogbo F, Orekan J, Keller D, Affolabi D, et al. Pathogenic  
316 features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and  
317 community infections in Benin. *Int J Med Microbiol* 2017;307:75–82.  
318 doi:10.1016/j.ijmm.2016.11.001.
- 319 [7] Argemi X, Martin V, Loux V, Dahyot S, Lebeurre J, Guffroy A, et al. Whole-genome  
320 sequencing of seven strains of *Staphylococcus lugdunensis* allows identification of  
321 mobile genetic elements. *Genome Biol Evol* 2017;9. doi:10.1093/gbe/evx077.
- 322 [8] Swain MT, Tsai IJ, Assefa SA, Newbold C, Berriman M, Otto TD. A post-assembly  
323 genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. *Nat*  
324 *Protoc* 2012;7:1260–84. doi:10.1038/nprot.2012.068.
- 325 [9] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinforma Oxf Engl*  
326 2014;30:2068–9. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
- 327 [10] Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al.  
328 GenBank. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D36–42. doi:10.1093/nar/gks1195.
- 329 [11] Blom J, Kreis J, Spänig S, Juhre T, Bertelli C, Ernst C, et al. EDGAR 2.0: an enhanced  
330 software platform for comparative gene content analyses. *Nucleic Acids Res*  
331 2016;44:W22–28. doi:10.1093/nar/gkw255.
- 332 [12] Guimarães LC, Florczak-Wyspianska J, de Jesus LB, Viana MVC, Silva A, Ramos RTJ, et al.  
333 Inside the pan-genome - methods and software overview. *Curr Genomics* 2015;16:245–  
334 52. doi:10.2174/1389202916666150423002311.
- 335 [13] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high  
336 throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792–7. doi:10.1093/nar/gkh340.
- 337 [14] Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV. The COG database: a tool for genome-  
338 scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 2000;28:33–6.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

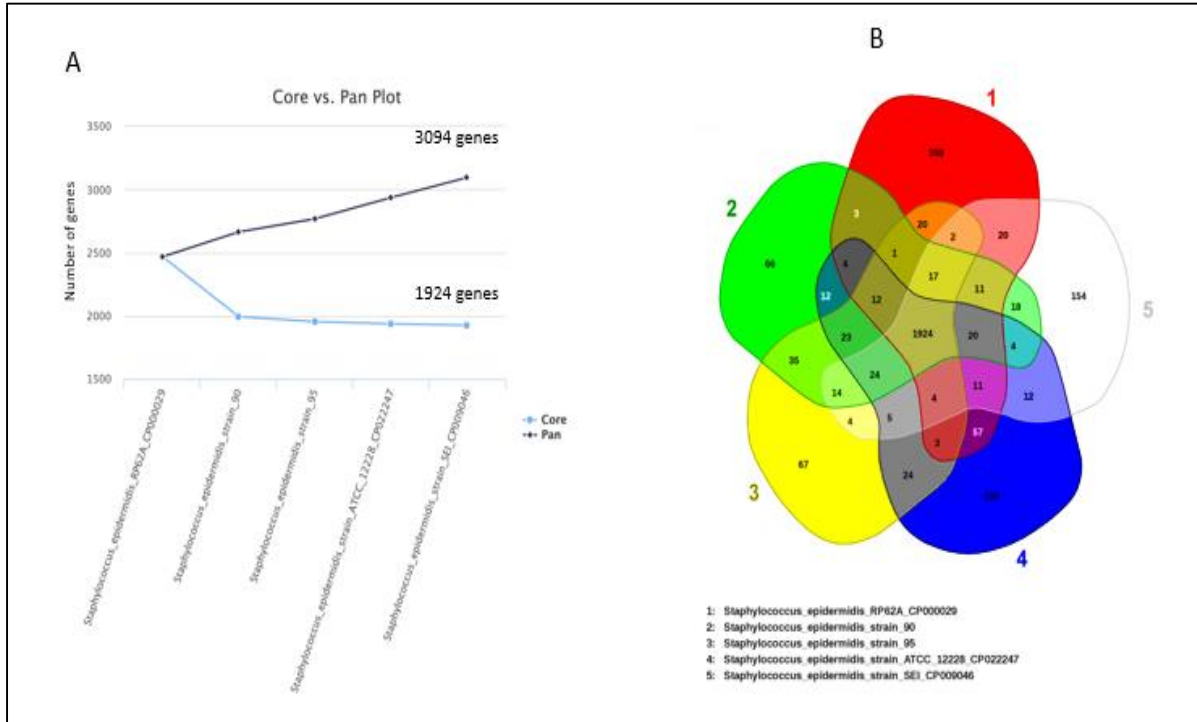
- 339 [15] Wu S, Zhu Z, Fu L, Niu B, Li W. WebMGA: a customizable web server for fast  
340 metagenomic sequence analysis. *BMC Genomics* 2011;12:444. doi:10.1186/1471-2164-  
341 12-444.
- 342 [16] Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinforma*  
343 *Oxf Engl* 2011;27:1009–10. doi:10.1093/bioinformatics/btr039.
- 344 [17] Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster  
345 version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W16-21.  
346 doi:10.1093/nar/gkv387.
- 347 [18] Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, Cruz F de la. Mobility of  
348 Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74:434–52. doi:10.1128/MMBR.00020-10.
- 349 [19] Dhillon BK, Laird MR, Shay JA, Winsor GL, Lo R, Nizam F, et al. IslandViewer 3: more  
350 flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic Acids*  
351 *Res* 2015;43:W104–8. doi:10.1093/nar/gkv401.
- 352 [20] Ramia NF, Tang L, Cocozaki AI, Li H. *Staphylococcus epidermidis* Csm1 is a 3'–5'  
353 exonuclease. *Nucleic Acids Res* 2014;42:1129–38. doi:10.1093/nar/gkt914.
- 354 [21] Wakefield N, Rajan R, Sontheimer EJ. Primary processing of CRISPR RNA by the  
355 endonuclease Cas6 in *Staphylococcus epidermidis*. *FEBS Lett* 2015;589:3197–204.  
356 doi:10.1016/j.febslet.2015.09.005.
- 357 [22] Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. The complete genomes and proteomes of  
358 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5174–9.  
359 doi:10.1073/pnas.0501140102.
- 360 [23] Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM.  
361 Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev*  
362 2013;26:422–47. doi:10.1128/CMR.00104-12.



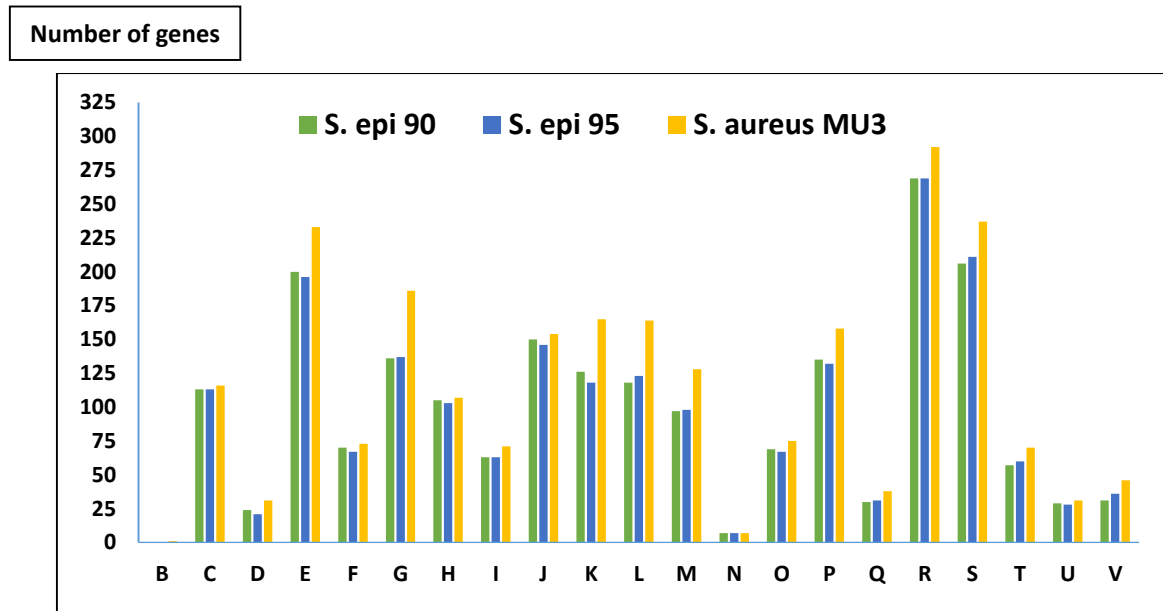
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 363 [24] Cheung GYC, Joo H-S, Chatterjee SS, Otto M. Phenol-soluble modulins – critical  
364 determinants of staphylococcal virulence. FEMS Microbiol Rev 2014;38:698–719.  
365 doi:10.1111/1574-6976.12057.
- 366 [25] Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Semin Immunopathol  
367 2011;34:201–14. doi:10.1007/s00281-011-0296-2.
- 368 [26] Otto M. *Staphylococcus epidermidis* - the “accidental” pathogen. Nat Rev Microbiol  
369 2009;7:555–67. doi:10.1038/nrmicro2182.
- 370 [27] Conlan S, Mijares LA, NISC Comparative Sequencing Program, Becker J, Blakesley RW,  
371 Bouffard GG, et al. *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals  
372 diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. Genome Biol  
373 2012;13:R64. doi:10.1186/gb-2012-13-7-r64.
- 374 [28] Post V, Harris LG, Morgenstern M, Mageiros L, Hitchings MD, Méric G, et al. A  
375 comparative genomics study of *Staphylococcus epidermidis* from orthopedic device-  
376 related infections correlated with patient outcome. J Clin Microbiol 2017.  
377 doi:10.1128/JCM.00881-17.
- 378

**Figure 1.** Core vs pan genome développement plot (panel A) and gensets (panel B) from SE90 and SE95 and three sequences available from NCBI genome server (EDGAR 2.2 software platform).

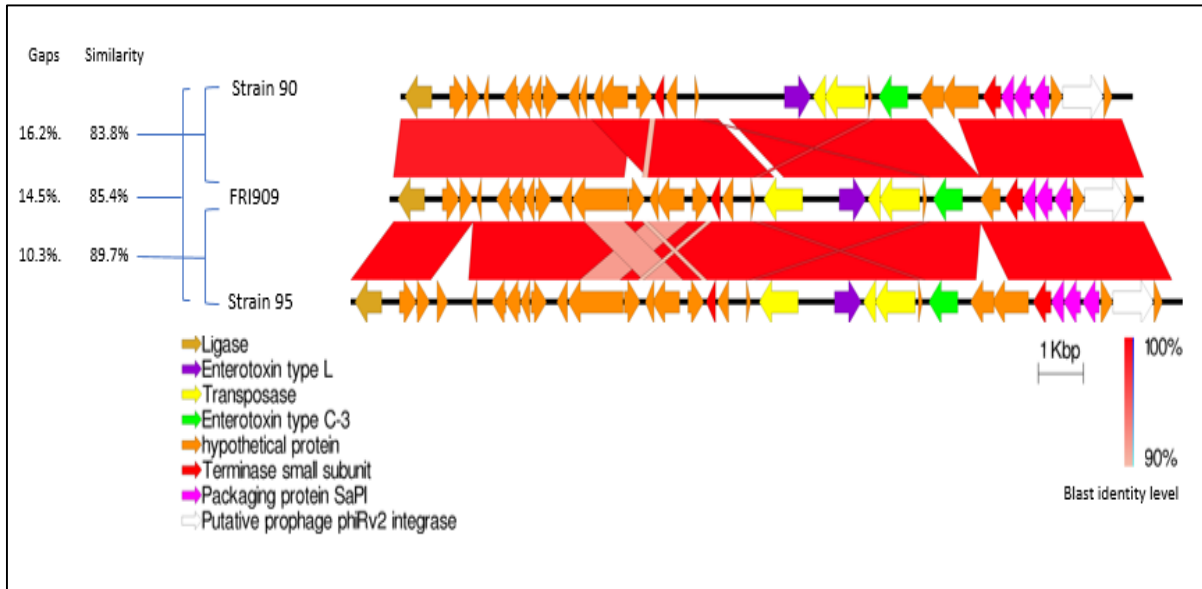


**Figure 2.** Clusters of Orthologous Groups (COG) of proteins from SE90 and SE95 after whole genome annotations, and comparison with *S. aureus*, strain MU3 (NCBI accession number: AP009324.1) (webMGA software platform with an e-value cutoff for prediction =0.001).



COG class	Description
B	Chromatin structure and dynamics
C	Energy production and conversion
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
E	Amino acid transport and metabolism
F	Nucleotide transport and metabolism
G	Carbohydrate transport and metabolism
H	Coenzyme transport and metabolism
I	Lipid transport and metabolism
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis
K	Transcription
L	Replication, recombination and repair
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
N	Cell motility
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
P	Inorganic ion transport and metabolism
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	General function prediction only
S	Function unknown
T	Signal transduction mechanisms
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
V	Defense mechanisms

**Figure 3.** Nucleotide sequence alignments of the composite genomic island SePI-1/SeCI-1 from *S. epidermidis* FRI909 with similar regions from *S. epidermidis* strains 90 and 95 with the result of gene annotations from PROKKA (Easyfig 2.2.2 for generating blast alignment file and visualisation).



**Table 1.** Whole genome sequencing of 2 strains of *Staphylococcus epidermidis* and comparison with *S. epidermidis* ATCC 12228 reference strain.

<i>S. epidermidis</i> strain	ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> _90 (this study)	<i>S. epidermidis</i> _95 (this study)
NCBI accession number	CP022247.1		
Clinical origin	Not clinical	Bacteremia	Bacteremia
N50 after SPAdes assembly (kb) <sup>1</sup>	-	179	195
N90 after SPAdes assembly (kb)	-	39	43
Contigs number after SPAdes assembly <sup>3</sup>	-	26	38
Mean coverage after SPAdes assembly	-	422X	410X
Contigs number after PAGIT assembly termination	-	7	10
Full length of the scaffold (bp) <sup>3</sup>	2.497.508	2.395.274	2.406.874
GC content (%)	32.03	32.47	31.95%
Coding sequences	2545	2189	2189
tRNA <sup>4</sup>	60	57	59
rRNA <sup>5</sup>	19	9	7
tmRNA <sup>6</sup>	0	1	1

<sup>1</sup> Kb, kilo base

<sup>2</sup> Sequence obtained with long-sequence reading technology: PacBio sequencing technology

<sup>3</sup> SPAdes output: coverage cutoff 10X and length cutoff 1000 bp

<sup>4</sup> bp, base pairs

<sup>5</sup> tRNA, transfer RNA

<sup>6</sup> rRNA, ribosomal RNA

<sup>7</sup> tmRNA, transfer-messenger RNA

**Table 2.** Plasmids identification after whole genome sequencing of *Staphylococcus epidermidis* strains 90 and 95

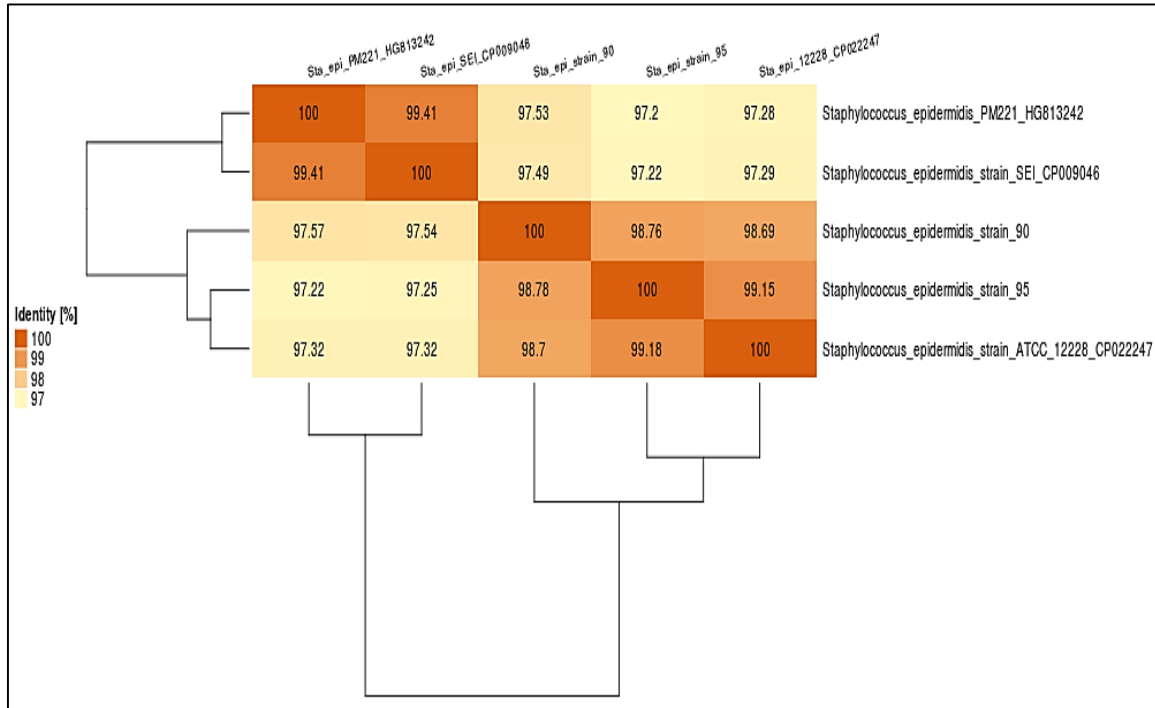
	Plasmids		Plasmids			
	<i>S. epidermidis</i> 90		<i>S. epidermidis</i> 95			
Name	<i>p_1_90</i>	<i>p_2_90</i>	<i>p_1_95</i>	<i>p_2_95</i>	<i>p_3_95</i>	<i>p_4_95</i>
Genome size <sup>1</sup>	18.6 kb	6.6 kb	12.5 kb	9 kb	3 kb	3.3 kb
Contig coverage	1968X	2095X	1212X	1214X	4536X	1567X
GC content	26.12%	28.17%	28.69%	29.29%	30.29%	33.56%
CDS <sup>2</sup>	20	7	14	10	4	3
Virulence factor	None	None	None	None	None	None
Resistance gene	None	Beta-lactamase	Beta-lactamase	None	<i>hsrA</i> (Cycline resistance)	<i>dfrG</i> (trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase)
Replication gene	<i>repA</i>	None	None	<i>repA</i>	<i>repN</i>	None
Mobilization module	None	None	None	<i>MobA</i>	None	None
T4CP/T4SS genes	None	None	None	None	None	None
Plasmid category	Nonmobilizable	Doubtful	Doubtful	Mobilizable	Nonmobilizable	Doubtful.
Related plasmid (strain, nucleotide length, CDS)	p1457 ( <i>S. epidermidis</i> , 17 CDS, 15 kb )	pSC-SNUDS-2-1 ( <i>S. cohnii</i> , 30 CDS, 29.4 kb)	pETB DNA ( <i>S. aureus</i> , 63, 60,5 kb)	pVISLISI_5 ( <i>S. lugdunensis</i> , 13 CDS, 12.6 kb)	SAP085A ( <i>S. aureus</i> , 3 CDS, 4.4 kb)	pUSA04-2-SUR11 ( <i>S. aureus</i> , 28 CDS, 26 kb)
Nucleotide similarities:						
- Sequence cov <sup>3</sup>	- 42%	- 93%	- 75%	- 52%	-100%	-88%
- Identities	- 99%	- 97%	- 99%	- 91%	-99%	-99%
- E-value	- 0.0	- 0.0	- 0.0	- 0.0	-0%	-0.0

<sup>1</sup> kb, kilo bases

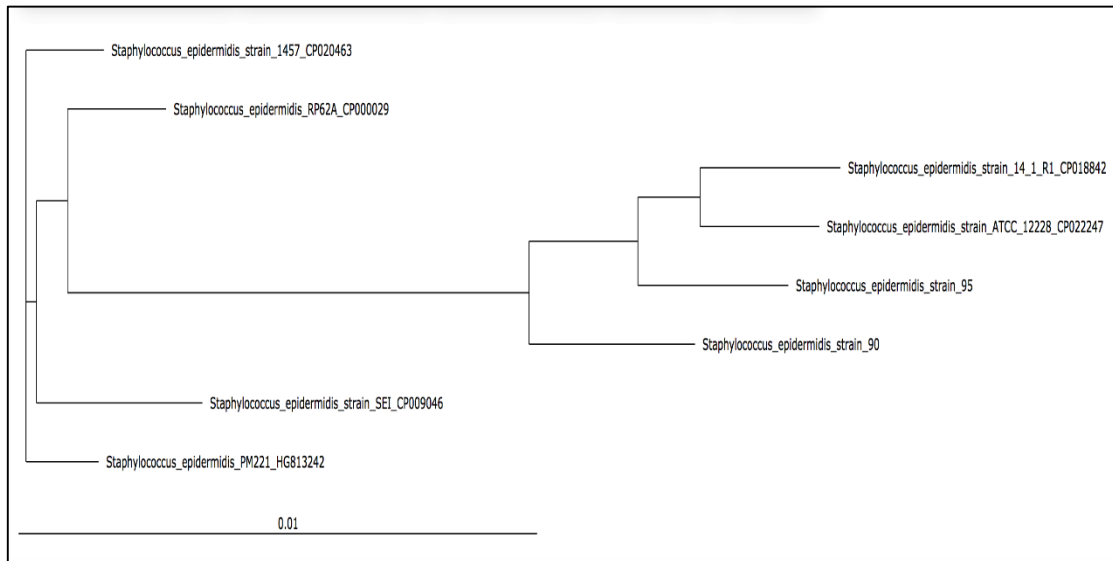
<sup>2</sup> CDS, number of coding sequences

<sup>3</sup> Sequence cov, coverage of the sequence identified in *S. epidermidis* 90 and 95 with the closet related plasmid (according to BLAST).

**S1.** Mean nucleic acid identity between whole genome sequences of SE90 and SE95 from this study and three sequences available from NCBI genome server (EDGAR 2.2 software platform).



**S2.** Phylogenic trees inferred from an estimation of orthologues among *S. epidermidis* 90, *S. epidermidis* 95 and finished genome of *S. epidermidis* available from NCBI genome web server.





### S3. *Staphylococcus epidermidis* singletons from strains SE90 and SE95.

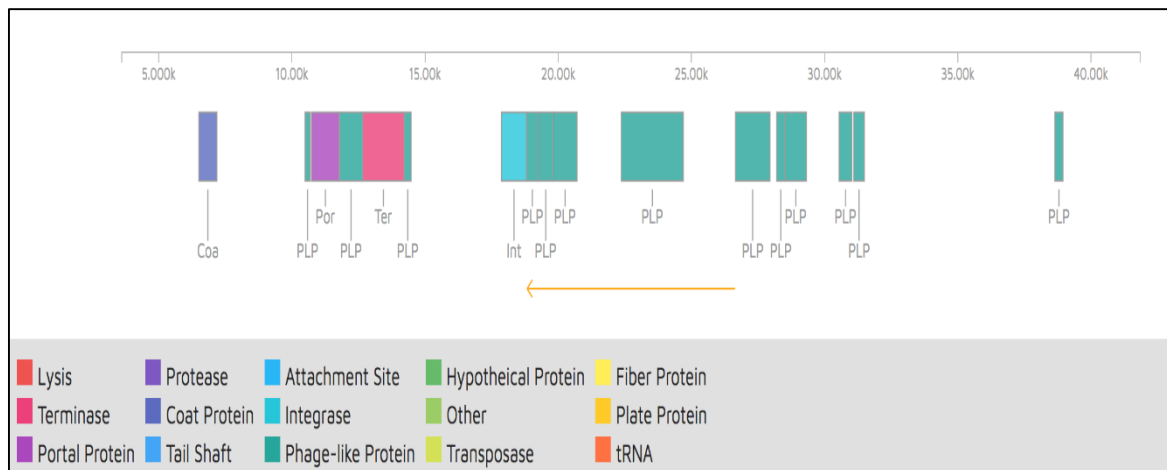
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain 95 singletons		<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain 95 singletons (excluding strain RP62A)		<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain 90 singletons	
Singleton	Protein:	Singleton	Protein:	Singleton	Protein:
PROKKA ID	Gene product	PROKKA ID	Gene product	PROKKA ID	Gene product
Sepi95_00004	4,4-diaponeurosporenoate glycosyltransferase	Sepi95_00004	4,4-diaponeurosporenoate glycosyltransferase	Sepi90_01343	DNA-invertase hin
Sepi95_00006	Dehydrosqualene desaturase	Sepi95_00513	Beta-lactamase	Sepi90_01995	HTH-type transcriptional regulator ImmR
Sepi95_00005	Dehydrosqualene synthase	Sepi95_02009	CRISPR type III-associated protein Csm2	Sepi90_00074	hypothetical protein
Sepi95_00003	Diapolycopene oxygenase	Sepi95_02010	CRISPR type III-associated RAMP protein Csm3	Sepi90_00174	hypothetical protein
Sepi95_02171	ESAT-6 secretion machinery protein EssD	Sepi95_02011	CRISPR type III-associated RAMP protein Csm4	Sepi90_01335	hypothetical protein
Sepi95_02187	HTH-type transcriptional regulator CueR	Sepi95_02006	CRISPR-associated endonuclease Cas1	Sepi90_01345	hypothetical protein
Sepi95_00002	hypothetical protein	Sepi95_02014	CRISPR-associated endoribonuclease Cas6	Sepi90_01463	hypothetical protein
Sepi95_00084	hypothetical protein	Sepi95_02008	CRISPR-associated protein Cas10/Csm1	Sepi90_01855	hypothetical protein
Sepi95_00189	hypothetical protein	Sepi95_02013	CRISPR-associated protein Csm6	Sepi90_01860	hypothetical protein
Sepi95_00489	hypothetical protein	Sepi95_00006	Dehydrosqualene desaturase	Sepi90_01861	hypothetical protein
Sepi95_00492	hypothetical protein	Sepi95_00005	Dehydrosqualene synthase	Sepi90_01862	hypothetical protein
Sepi95_00947	hypothetical protein	Sepi95_00003	Diapolycopene oxygenase	Sepi90_01863	hypothetical protein
Sepi95_01004	hypothetical protein	Sepi95_02171	ESAT-6 secretion machinery protein EssD	Sepi90_01866	hypothetical protein
Sepi95_01366	hypothetical protein	Sepi95_02187	HTH-type transcriptional regulator CueR	Sepi90_01867	hypothetical protein
Sepi95_01367	hypothetical protein	Sepi95_00002	hypothetical protein	Sepi90_01868	hypothetical protein
Sepi95_01368	hypothetical protein	Sepi95_00084	hypothetical protein	Sepi90_01875	hypothetical protein
Sepi95_01369	hypothetical protein	Sepi95_00189	hypothetical protein	Sepi90_01876	hypothetical protein
Sepi95_01370	hypothetical protein	Sepi95_00489	hypothetical protein	Sepi90_01878	hypothetical protein
Sepi95_01372	hypothetical protein	Sepi95_00492	hypothetical protein	Sepi90_01894	hypothetical protein
Sepi95_01373	hypothetical protein	Sepi95_00510	hypothetical protein	Sepi90_01899	hypothetical protein
Sepi95_01375	hypothetical protein	Sepi95_00511	hypothetical protein	Sepi90_01900	hypothetical protein
Sepi95_01383	hypothetical protein	Sepi95_00512	hypothetical protein	Sepi90_01901	hypothetical protein
Sepi95_01388	hypothetical protein	Sepi95_00947	hypothetical protein	Sepi90_01903	hypothetical protein
Sepi95_01512	hypothetical protein	Sepi95_01004	hypothetical protein	Sepi90_01904	hypothetical protein
Sepi95_01894	hypothetical protein	Sepi95_01024	hypothetical protein	Sepi90_01908	hypothetical protein
Sepi95_01994	hypothetical protein	Sepi95_01366	hypothetical protein	Sepi90_01909	hypothetical protein

Sepi95_01995	hypothetical protein	Sepi95_01367	hypothetical protein	Sepi90_01913	hypothetical protein
Sepi95_01996	hypothetical protein	Sepi95_01368	hypothetical protein	Sepi90_01915	hypothetical protein
Sepi95_01997	hypothetical protein	Sepi95_01369	hypothetical protein	Sepi90_01916	hypothetical protein
Sepi95_01998	hypothetical protein	Sepi95_01370	hypothetical protein	Sepi90_01917	hypothetical protein
Sepi95_02016	hypothetical protein	Sepi95_01372	hypothetical protein	Sepi90_01918	hypothetical protein
Sepi95_02017	hypothetical protein	Sepi95_01373	hypothetical protein	Sepi90_01921	hypothetical protein
Sepi95_02018	hypothetical protein	Sepi95_01375	hypothetical protein	Sepi90_01996	hypothetical protein
Sepi95_02020	hypothetical protein	Sepi95_01383	hypothetical protein	Sepi90_02025	hypothetical protein
Sepi95_02173	hypothetical protein	Sepi95_01388	hypothetical protein	Sepi90_02184	hypothetical protein
Sepi95_02174	hypothetical protein	Sepi95_01512	hypothetical protein	Sepi90_02186	Serine acetyltransferase
Sepi95_02019	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA	Sepi95_01894	hypothetical protein	Sepi90_01346	Teichoic acid poly(glycerol phosphate) polymerase
Sepi95_00083	putative BsuMI modification methylase subunit YdiO	Sepi95_01994	hypothetical protein	Sepi90_01920	Tyrosine recombinase XerD
Sepi95_00190	tRNA (cmo5U34)-methyltransferase	Sepi95_01995	hypothetical protein		
Sepi95_02183	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE	Sepi95_01996	hypothetical protein		
		Sepi95_01997	hypothetical protein		
		Sepi95_01998	hypothetical protein		
		Sepi95_02005	hypothetical protein		
		Sepi95_02012	hypothetical protein		
		Sepi95_02016	hypothetical protein		
		Sepi95_02017	hypothetical protein		
		Sepi95_02018	hypothetical protein		
		Sepi95_02020	hypothetical protein		
		Sepi95_02173	hypothetical protein		
		Sepi95_02174	hypothetical protein		
		Sepi95_02019	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA		
		Sepi95_00515	Penicillinase repressor		
		Sepi95_00083	putative BsuMI modification methylase subunit YdiO		
		Sepi95_00514	Regulatory protein BlaR1		
		Sepi95_00190	tRNA (cmo5U34)-methyltransferase		
		Sepi95_00508	Tyrosine recombinase XerC		
		Sepi95_00509	Tyrosine recombinase XerC		

		Sepi95_02183	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE		
--	--	--------------	--	--	--

**S4.** Prophage identification after whole genome sequencing of *S. epidermidis* 90 and 95 (using Phaster webserver).

Prophage	
<i>S. epidermidis</i> 90	
<b>Name</b>	φS_epi_90
<b>Genome size</b>	38.2 Kb <sup>1</sup>
<b>GC content</b>	39.1%
<b>CDS<sup>2</sup></b>	52
<b>Virulence factor</b>	None
<b>Resistance gene</b>	None
<b>Related phage</b>	
<b>Shared proteins</b>	



## **Chapitre 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION**

#### 4.1. APPORTS DE LA THESE

Le nombre accru de nouveau-nés prématurés, de maladies cardiovasculaires et chroniques, de patients immunodéprimés, ainsi que l'augmentation de l'utilisation de corps étrangers insérés ou implantés, a conduit à la grande variété d'infections causées par les SCN et il n'est plus rare de rencontrer ces souches dans des pathologies sévères, laissant supposer l'expression de facteurs de virulence. Ces observations rendaient intéressant le fait d'avoir des données plus précises sur ces bactéries, pour estimer leurs caractéristiques génétiques et leur dangérosité pour l'hôte.

Nos travaux révèlent que les espèces de SCN les plus fréquentes au Bénin sont : *S. haemolyticus* et *S. epidermidis*. D'autres espèces comme : *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. arlettae*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* et *S. kloosii* sont retrouvées avec de plus faibles fréquences. Cependant, l'absence de certaines espèces (*S. pettenkoferi*, *S. schleiferi*, *S. pasteurii*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*) fréquemment isolées dans d'autres pays comme la France (Argémi et al., 2015) montre que la distribution des SCN est variable et peut changer en fonction de l'espace géographique ou de la taille de l'échantillon. Le nôtre dans cette étude reste limité. Dans cette étude, nous avons obtenu des taux d'antibiorésistances très élevés particulièrement chez les espèces les plus fréquentes. Par exemple, le taux de résistance à la méticilline est de 100% pour *S. hominis*, 93% pour *S. haemolyticus*, et 67% pour *S. epidermidis*. Cette situation est d'autant plus inquiétante que la résistance à la méticilline entraîne la résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines, alors que les antibiotiques de cette classe sont parmi les plus adaptés au traitement des infections à staphylocoque. Ces données obtenues au Bénin ne sont pas surprenantes, puisque plusieurs travaux ont déjà pointé la hausse de l'indice de résistance à la méticilline chez les SCN qui passe de 20% à 70% dans le monde entier (Schaberg et al., 1991 ; Diakema et al., 2001, Mendes et al., 2010; Putnam et al., 2010). Il avait été démontré que les SCN constituent un important réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques qui sont transférés vers les espèces plus virulentes comme *S. aureus*, pour maintenir leur survie pendant l'infection (Otto, 2016). Cette hypothèse est basée sur l'apparition antérieure et la prévalence plus élevée des gènes de résistance dans le génome des SCN par rapport à *S. aureus*. Le gène *mecA* qui code pour la résistance à la méticilline a été retrouvé pour la première fois dans le génome de *S. sciuri* (Wu et al., 1996) avant d'être

mobilisé plus tard vers *S. aureus*. Les résultats de séquençage des génomes de *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri* et *S. vitulinus* (Schnellmann et al 2006, Couto et al., 1999, Takeuchi et al., 2005, Steven et al., 2004, Xiaoxi et al., 2014) ont d'ailleurs révélé la présence de nombreux éléments génétiques mobiles, portant des gènes de résistance à divers antibiotiques. De plus, à la suite d'énormes pressions de sélection des staphylocoques en milieu hospitalier par l'utilisation abusive des antibiotiques, les souches isolées d'infections nosocomiales apparaissent aujourd'hui beaucoup plus résistantes aux antibiotiques d'usage courant. Le présent travail valide aussi cette hypothèse avec la résistance multiple observée principalement au niveau des souches nosocomiales de notre étude.

Cette thèse s'est également intéressée aux possibilités pathogéniques des SCN. Au terme de cette partie, nous avons mis en évidence la présence d'au moins un ou plusieurs facteurs de virulence recherchés chez 44% des souches, toutes espèces confondues. Nous n'avons pas pu faire une caractérisation précise de tous les facteurs de virulence, mais nos résultats appuient les conclusions de Otto *et al.* (2012), et de Gunn *et al.* (1988) sur le potentiel de virulence des SCN. En effet, les protéases sont connues pour leur capacité à dégrader les facteurs du complément de l'hôte et perturber les jonctions étroites entre les cellules épithéliales, ce qui peut favoriser la propagation bactérienne (Otto, 2004). Elles sont également capables de dégrader le fibrinogène et d'autres protéines, suggérant un rôle dans l'échappement aux systèmes de défense. Certains SCN produisent une métalloprotéase extracellulaire avec une activité d'élastase. L'élastase de *S. epidermidis* par exemple dégrade l'IgM humaine, l'albumine sérique, la fibronectine et le fibrinogène (Otto, 2004). Les estérases peuvent contribuer à la virulence des souches en facilitant leur persistance dans les sécrétions grasses de la peau humaine. En ce qui concerne les cytotoxines, elles sont capables d'interagir spécifiquement avec des oligosaccharides ou des récepteurs protéiques à la surface d'une variété de cellules de mammifères, comprenant des érythrocytes et des leucocytes, ainsi que des structures intracellulaires, ce qui provoque leur lyse (Dinges et al., 2000). Sylwia *et al.* (2012) ont précédemment isolé une hémolysine de type delta avec une activité lytique, chez des *S. conchii* d'origine clinique. Toutes ces propriétés contribuent à la capacité des SCN à coloniser l'organisme et à provoquer des infections chez l'Homme.

Au cours de ce travail, nous avons découvert la production d'une SEC-like par des souches de *S. epidermidis* (SE90, SE95), alors même que la capacité des souches cliniques de SCN à

sécréter des superantigènes a été récemment contestée (Christopher et al., 2015, Becker et al., 2001) . Quelques auteurs ont aussi signalé la présence des gènes codant SEA, SEB, SEC ou SED chez des souches de *S. epidermidis* isolés d'hémoculture chez des nouveaux-nés prématurés avec une prévalence élevée pour SEC (28/50) (Da cunha et al., 2007). Mais les méthodes utilisées pour l'identification des staphylocoques dans ces travaux ne sont pas très fiables et ne permettent pas de confirmer que ces gènes ne proviennent pas d'une souche de *S. aureus* mal identifiés. Pour s'assurer de l'authenticité de nos résultats, SE95 et SE90 ont été confirmées par la spectrométrie de masse MALDI-TOF et par le séquençage de l'ARN 16S, puis de leur génome.

La formation du complexe trimoléculaire CMHII-Antigène-TCR est un préalable à l'activation du système immunitaire par un superantigène. L'analyse mutationnelle menée par Leder et al. (1998) a permis de montrer que les résidus Q210, N23, Y90, V91, Y26, F172 et les résidus K43, F44, L45, A46, H48, K65, E67, Y89, N92, Y94, S96, Y112, S211, 212 et M216 de SEC3 de *S. aureus* sont importants pour la fixation du TCR-V $\beta$  et du CMH de classe II des cellules présentatrices antigènes, respectivement. Dans un premier temps, une étude moléculaire et structurale de SEC<sub>epi</sub> a montré qu'une seule des substitutions présentes dans la séquence concerne ces acides aminés, suggérant fortement une conservation des fonctions de SEC<sub>aureus</sub> par SEC<sub>epi</sub>. Les entérotoxines staphylococciques sont des superantigènes à double fonction. En effet, elles provoquent des troubles digestifs à leur passage dans le tube digestif. Les lésions tissulaires peuvent permettre à la toxine de disséminer dans l'organisme à travers la barrière intestinale et d'activer de façon exagérée la réponse immunitaire locale et systémique au cours de laquelle des médiateurs inflammatoires solubles sont produits à des doses toxiques pour l'organisme de l'hôte (Balaban et al., 2000). Dans un second temps, nous avons pu vérifier que les mutations intervenues dans la séquence de SEC<sub>epi</sub> n'altèrent pas ces fonctions superantigéniques. L'activation des lymphocytes T humains par la protéine recombinante a provoqué une prolifération excessive de ces derniers, induisant une augmentation rapide des concentrations en cytokines proinflammatoires. Cependant, il ne nous est pas possible d'envisager une étude *in vivo* de l'activité émétique de SEC<sub>epi</sub> vu que le seul modèle animal recommandé par le Comité International de la Nomenclature des Superantigènes Staphylococciques est le singe (rhésus ou cynoipthèque, rhinopithèques). Les modèles animaux classiques comme la souris, le rat ou le lapin ne présentent en effet aucun réflexe

émétique en réponse à l'ingestion des entérotoxines. D'autres modèles animaux, comme le chien, sont quant à eux trop sensibles pour que leur utilisation soit pertinente (Bergdoll, 1988). Ainsi, les travaux de Sugiyama et Hayama en 1964, ont démontré que les singes reproduisent mieux les symptômes émétiques présentés par l'Homme après administration orale, gastrique, intraveineuse ou péritonéale des entérotoxines staphylococciques. Cependant, nous avons remarqué que SEC<sub>epi</sub> semble résister à la chaleur extrême et à l'hydrolyse des enzymes gastro-intestinales, ce qui présage d'une éventuelle capacité émétique de la toxine.

Nous avons essayé d'établir une corrélation entre la production de SEC<sub>epi</sub> et le phénotype clinique de l'un des deux patients, mais cette étude n'a pas permis de voir clairement le lien de causalité direct en raison du paludisme sévère qui est associé au sepsis. Néanmoins, Veras et al. (2007) ont montré que des souches de *S. epidermidis* (04 souches) isolées de produits laitiers, responsables d'intoxications alimentaires collectives au Brésil, ont produit SEC (03/4). La seule souche clinique de *S. epidermidis* (FRI909) ayant été réellement caractérisée à ce jour pour sa capacité entérotoxigénique fut isolée en 1960 aux Etats-Unis (Madhusoodanan et al., 2007). Les auteurs ont ensuite testé plus de 300 autres souches cliniques et n'ont enregistré aucune positivité dans la série (Madhusoodanan, et al, 2011). Au cours de ce travail de thèse, nous n'avons identifié que 2 souches SEC<sup>+</sup>, suggérant ainsi que l'acquisition de ce gène par *S. epidermidis* serait un événement plutôt rare, sachant que la fréquence de ce gène chez *S. aureus* est de 16%. Néanmoins, Podkowik et al., (2015) ont récemment rapporté la production de SEC par une souche d'origine alimentaire. *S. epidermidis* SE90 et SE95 ont produit jusqu'à 100 µg/mL d'entérotoxine SEC<sub>epi</sub> dans les surnageants de culture de 24h, pendant que Mossel et al., (1995) ont conclu qu'un homme doit ingérer entre 10 et 20 µg de SE<sub>aureus</sub>, voir moins en fonction de spécificité de ses lymphocytes et le taux des vβ ciblés, pour que les premiers symptômes d'intoxication alimentaire se déclenchent. Ces observations ouvrent de nouvelles questions sur l'implication des SCN et plus particulièrement celle de *S. epidermidis* dans les toxi-infections alimentaires.

Comme nous avons pu le vérifier, l'analyse du génome entier des souches entérotoxigènes a permis la mise en évidence d'un îlot de pathogénicité portant le gène *sec*. Nos données appuient celles de Madhusoodanan et al. (2011) qui ont retrouvé un îlot de pathogénicité comportant les gènes *sec3* et *sel-like* dans le génome de la souche FRI909. Ainsi, malgré, les hypothèses de Otto et al. (2012) qui suggèrent l'incapacité des SCN à recevoir des gènes



étrangers contrairement à *S. aureus*, nous avons démontré dans cette thèse que le gène *sec* de *S. aureus* a pu être mobilisé vers *S. aureus* par l'intermédiaire d'un phage. Il a été supposé que, l'absence de plusieurs déterminants de la virulence de *S. aureus* chez la majorité des SCN (surtout *S. epidermidis*) serait due en partie à la présence des séquences CRISPR (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat loci) (Jansen et al., 2002) dans 40-90% des génomes de ces souches (Marraffini et al., 2010), alors qu'ils sont très rares chez *S. aureus*. En effet, les ARN issus de la transcription de certaines séquences contenues dans les loci CRISPR, ont la propriété de se fixer spécifiquement aux ADN étrangers à la bactérie et provoquent leur dégradation (Bikard et al., 2012). Ainsi, ce processus protégerait les SCN contre l'intégration des éléments génétiques mobiles responsables du transfert des gènes de virulence dans leur génome, alors que les *S. aureus* semblent tolérer l'incorporation d'ADN étranger pour bénéficier d'une accumulation de gène de virulence d'autres bactéries. Les échanges génétiques entre *S. epidermidis* et *S. aureus* seraient donc unidirectionnels. Cependant, à notre connaissance, l'analyse des CRISPR contenus dans les génomes des souches de *S. epidermidis* n'a pas révélé de telles séquences à ce jour. Il semble plus évident que le génome accessoire des staphylocoques joue un rôle essentiel dans leur évolution, la diversité génétique et leur adaptation dans l'environnement comme chez tous les êtres vivants. Ainsi la présence d'éléments génétiques mobiles comme les phages, les îlots de pathogénicité ou les plasmides doit faire envisager la possibilité de transfert de gène de virulence de *S. aureus* vers les SCN même si les échanges de gènes dans ce sens ne sont pas encore vraiment prouvés. De plus, le biofilm constitue un lieu favorable aux échanges génétiques entre les bactéries d'espèce différente. L'un des mécanismes de transfert génétique horizontal est celui de la conjugaison qui permet l'échange direct d'ADN par contact physique entre deux cellules via un pilus de conjugaison. En effet, les biofilms, en favorisant le contact des bactéries entre elles, offrent un environnement idéal pour le transfert de gènes par le mécanisme de conjugaison, et de nombreuses études ont montré que la fréquence de transferts génétiques par conjugaison augmentait lorsque les bactéries se développaient sous forme de biofilm (BJORKLOF et al., 2000 ; Ghigo, 2001). Aussi, le mécanisme de transfert génétique par transformation bactérienne est aussi favorisé au sein des biofilms, du fait de la libération d'ADN extracellulaire (ADNe) par les bactéries. Madsen et al. (2012) ont signalé que le métabolisme du biofilm et les compétences bactériennes semblent être directement modulés par cet ADNe.

Enfin, la poursuite de la recherche de facteurs de virulence produits par les SCN permettra probablement de mieux comprendre la physiopathologie des infections sévères auxquelles ils peuvent être parfois associés. Sachant que les propriétés superantigéniques de SEC<sub>aureus</sub> sont aggravantes quant au développement de plusieurs pathologies comme la dermatite atopique, la maladie de Kawasaki, le syndrome de choc toxique ou les maladies auto-immunes (Prévost et al., 2004, McCormick et al., 2001, Grossmon et al., 1991, Haeghebaert et al., 2002), il n'y a aucune raison de ne pas considérer SEC<sub>epi</sub> comme une entérotoxine à l'instar de SEC<sub>aureus</sub>. Il serait aussi intéressant d'envisager l'inclusion de la recherche d'entérotoxine chez *S. epidermidis* dans les cas d'une suspicion d'intoxication alimentaire.

## 4.2. PERSPECTIVES

La présente étude sur le pouvoir pathogène des SCN a permis d'identifier les caractères de virulence de ces souches. Cependant, les détails sur chaque espèce sont loin d'être élucidés. Les différents facteurs de virulence retrouvés devraient être clairement caractérisés, afin de déterminer leur rôle dans le devenir des infections à SCN et ce pour chaque espèce. Il faut souligner que cette recherche a été effectuée à l'une des facteurs de virulence classiques exprimés par *S. aureus*. D'autres facteurs de virulence non répertoriés comme tels ne peuvent être exclus.

Notre étude a porté sur les souches de SCN cliniques isolées de diverses infections et a montré la diversité des souches ainsi que la production de facteurs de virulence par certaines d'entre elles. Cette diversité est loin d'avoir été circonscrite dans nos études. Hypothétiquement, les SCN provenant de sujets sains devraient être moins virulentes et plus sensibles aux antibiotiques. Il faudra ainsi faire une collecte des souches de SCN de la flore normale chez des personnes en bonne santé et analyser leur pouvoir pathogène et ce aussi, pour des pays dont les niveaux de développement sont différents.

De plus, les pathologies associées à cette nouvelle entérotoxine découverte chez *S. epidermidis* ne sont pas connues. Il serait donc intéressant d'étudier *in vivo* la toxicité et l'activité émétique de SEC<sub>epi</sub>, car le Comité international de la nomenclature des superantigènes staphylococciques a proposé que seuls les superantigènes staphylococciques induisant un vomissement après administration orale dans un modèle expérimental de primates soient désignés comme des entérotoxines staphylococciques.

Nous avons suggéré la possibilité d'échange du gène *sec* de *S. aureus* vers *S. epidermidis*, bien que dans le cas de cette dernière espèce l'îlot soit dénaturé par rapport aux archétypes. Il convient de vérifier cette hypothèse par une reproduction *in vitro* de la transformation de *S. epidermidis* avec SEC<sub>aureus</sub>, ou du transfert de ce gène par l'intermédiaire d'un plasmide congugatif ou d'un bactériophage. Manifestement, d'autres échanges génétiques sont courants entre plusieurs espèces de staphylocoques, et interrogent sur leurs résultats pour les décennies à venir, en particulier dans les écosystèmes où certaines de ces espèces de staphylocoques sont sélectionnées.

### 4.3. CONCLUSION

Cette thèse a permis de confirmer la pathogénicité des SCN à travers l'étude du potentiel pathogène des souches d'infection. De façon générale, nous avons fait la lumière sur les espèces de SCN circulant au Bénin et leur profil de susceptibilité aux antibiotiques. Nous avons pu montrer que contrairement aux idées perçues, certaines souches peuvent produire des facteurs de virulence les rendant potentiellement pathogènes surtout chez des sujets déjà fragilisés par des maladies cardiovasculaires, rénales ou des immunodéficiences. Au cours de ce travail, il a été aussi mis en évidence et caractérisé chez *S. epidermidis*, une nouvelle entérotoxine staphylococcique de type C-like qui présente des caractéristiques, moléculaires, structurales, fonctionnelles et cliniques la rapprochant des isoformes produites par *S. aureus*. Néanmoins, malgré la grande similitude entre les deux toxines, SEC<sub>epi</sub> semble induire une réponse inflammatoire systémique plus exacerbée que SEC<sub>aureus</sub>. Ceci pourrait s'expliquer par la mutation M226I intervenue dans le site de liaison des lymphocytes à la toxine. La formation de biofilm par les isolats de *S. epidermidis* SEC<sup>+</sup>, et la présence d'éléments génétiques mobiles dans le génome accessoire de ces souches sont autant d'arguments pour consolider l'hypothèse de transfert du gène de virulence de *S. aureus* vers les SCN bien que des travaux suggèrent l'existence d'une possible immunisation des SCN contre l'insertion d'ADN étranger.

## **Chapitre 5 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Al-Bakri, A.G., Al-Hadithi, H., Kasabri, V., Othman, G., Kriegeskorte, A., Becker, K. (2013). The epidemiology and molecular characterization of methicillin-resistant staphylococci sampled from a healthy Jordanian population. *Epidemiology and Infection*. **141**, 2384–2391.
- Al-Fattani, M. A., and L. J. Douglas. 2004. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**, 3291-3297.
- Al-Laham, N., Rohde, H., Sander, G., Fischer, A., Hussain, M., Heilmann, C., Mack, D., Proctor, R., Peters, G., Becker, K., von Eiff, C. (2007). Augmented expression of polysaccharide intercellular adhesin in a defined *Staphylococcus epidermidis* mutant with the small-colony-variant phenotype. *Journal of Bacteriology*. **189**, 4494–4501.
- Allignet, J., Aubert, S., Dyke, K.G., El-Solh, N. (2001). *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**, 712–718.
- Archer, G.L., Bosilevac, J.M. (2001). Signaling antibiotic resistance in staphylococci. *Science*. **29**, 1915–1916.
- Andrade, F., Shelley, W., Wetzell, M., Webb, G., Gamez, S., Ray, G. (2008) «Atmospheric pressure chemical ionization source. Desorption-ionization for the direct analysis of solid compounds». *Analytical Chemistry*. **80**, 2654-63.
- Arbuthnott, J.P., Coleman, D.C., De Azevedo, J.S. (1990). Staphylococcal toxins in human disease. *Society for Applied Bacteriology symposium series*. 19 (Suppl.): 101S-107S.
- Archer GL, Thanassi JA, Niemeyer DM, Pucci MJ. (1996). Characterization of IS1272, an insertion sequence-like element from *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **40**, 924–9.
- Argemi, X., Riegel, P., Lavigne, T., Lefèbvre, N., Grandpré, N., Hansmann, Y., Jaulhac, B., Prévost, G., Schramm, F. (2015). Implementation of matrix-assisted laser desorption ionization? Time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **53**, 2030–2036.
- Argudín, M.A.; Mendoza, M.C.; Rodicio, M.R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*. **2**, 1751-1773.
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D.S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *nucleic acids research*. **8**, W16-21.
- Athan, E., Chu, V.H., Tattevin, P., et al. (2012). Clinical characteristics and outcome of infective endocarditis involving implantable cardiac devices. *JAMA*. **307**, 1727–1735.
- Attien, P., Sina, H., Moussaoui, W., Zimmermann-Meise, G., Dadié, T., Keller, D., Riegel, P., Edoh, V., Kotchoni, S.O., Diè, M., Prévost, G., Baba-Moussa, L. (2014). Mass spectrometry and

multiplex antigen assays to assess microbial quality and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical and food samples. *BioMed Research International*. 485620.

Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S., (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*. **130**, 33-40.

Assefa, S., Keane, T.M., Otto, T.D., Newbold, C., Berriman, M. (2009). ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics*. **25**, 1968-9.

Azuka, A., Idahosa, E. (2013). Species distribution and virulence factors of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples from the University of Benin Teaching Hospital, Edo State, Nigeria. *Journal of Natural Sciences Research*. **3**, 9.

Baba-Moussa, L., Anani, L., Scheftel, J.M., Couturier, M., Riegel, P. (2008). Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. *Journal of Hospital Infection*. **68**, 32–38.

Baba-Moussa, L., Sina, H., Scheftel, J.M., Moreau, B., Sainte-Marie, D., Kotchoni, S.O., Prévost, G., Couppié, P. (2011). Staphylococcal Panton-Valentine Leucocidin as a major virulence factor associated to furuncles. *PLoS One*. **6**, e25716.

Baddour, L.M., Christensen, G.D. (1987). Prosthetic valve endocarditis due to small-colony staphylococcal variants. *Reviews of infectious diseases*, 1168–1174.

Balaban, N.; Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. **61**, 1–10.

Bannerman, T.L., Peacock, S.J. *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al., editors. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press; Washington: 2007. pp. 390–411.

Barbier, F., Lebeaux, D., Hernandez, D., et al. (2011). High prevalence of the arginine catabolic mobile element in carriage isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **66**, 29–36.

Barber, M.A. (1914). Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. *Philippine journal of science*. **9**, 515- 519.

Barber M. Methicillin resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. **14**, 385–93.

Barbier, F., Ruppe, E., Hernandez, D., Lebeaux, D., et al. (2010). Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

*Journal of Infectious Diseases*. **202**, 270–81.

Barros, E.M., Ceotto, H., Bastos, M.C., dos Santos, K.R., GiambiagideMarval, M. (2012). *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *Journal of Clinical Microbiology*. **50**, 166–168.

Becker, K., Haverkämper, G., von Eiff, C., Roth, R., Peters, G. (2001). Survey of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene in non-*Staphylococcus aureus* species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **20**, 407–409.

Becker, K., Heilmann, C., Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. **27**, 870–926.

Becker, K., Haverkämper, G., von Eiff, C., Roth, R., Peters, G. (2001). Survey of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene in non-*Staphylococcus aureus* species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **20**, 407–409.

Benito, N., Miro, J.M., de Lazzari, E., *et al.* (2007). Health care-associated native valve endocarditis: importance of non-nosocomial acquisition. *Annals of Internal Medicine*. **150**, 586–594.

Bergdoll, M.S., Surgall, M.J. (1959). Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. *Journal of Immunology*. **83**, 334–338.

Bergdoll, M.S. (1983). Enterotoxins. In: *Staphylococci and Staphylococcal Infections* (Easman, C.S.F. and Adlam, C., eds.). Academic Press, London, UK, pp. 559–598.

Bergdoll, M. *Staphylococcus aureus*. (1989). In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, 463–524.

Bergdoll, M.S.; Chesney, P.J. (1991). *Toxic shock syndrome*. CRC Press, Boca Raton. 234.

Bergdoll, M.S., Borja, C.R., Avena, R.M. (1965). Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *Journal of Bacteriology*. **90**, 1481–1485.

Besier, S., Ludwig, A., Ohlsen, K., Brade, V., Wichelhaus, T.A. (2007). Molecular analysis of the thymidine-auxotrophic small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. **297**, 217–225.

Betley, M.J., Borst, D.W.; Regassa, L.B. (1992). Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chemical Immunology*. **55**, 1–35.

Bienvenut, W., Deon, C., Pasquarello, C., Campbell, J., Sanchez, J., Vestal, M., Hochstrasser, D. (2002). «Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins». *Proteomics*, 868-76.

Bikard, D., Marraffini, L.A. (2012). Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. *Current Opinion in Immunology*. **24**, 15–20.

Biswas, R., Voggu, L., Simon, U.K., Hentschel, P., Thumm, G., Götz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiology Letters*. **259**, 260–268.

Björklöf, K., urmiaho-Lassila, E.L., Klinger, N., Haahtela, K., Romantschuk, M. (2000). Colonization strategies and conjugal gene transfer of inoculated *Pseudomonas syringae* on the leaf surface. *Journal of Applied Microbiology*. **89**, 423–32.

Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., et al. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xl. *Immunity*. **3**, 87–98.

Bohach, G.A. (1997). Staphylococcal Enterotoxins B and C. Structural Requirements for superantigenic and enterotoxigenic Activities. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. **27**, 79–110.

Bonnin, R.A., Naas, T., Dortet, L. (2017). Impact du séquençage d'ADN à haut débit sur la surveillance des épidémies de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. *Bactériologie NGS*. **334**, 1-11.

Bunning, V.K., Lindsay, J.A.; Archer, D.L. (1997). Chronic health effects of microbial foodborne disease. *World health statistics quarterly*. **50**, 51–56.

Carbon, C. (2000). MRSA and MRSE: is there an answer? *Clinical microbiology and infection*. **6**(Suppl 2), 17-22.

Carl, R., Woese, A., George E. (1977). Fox, « Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. **74**, 5088–5090.

Carlsson, R.; Fischer, H.; Sjogren, H.O. (1998). Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *Journal of Immunology*. **140**, 2484–2488.



- Carver, T., Simon, R., Harris, M.B., Parkhill, J., McQuillan, A.J. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*. **28**, 464–469.
- Casman, D.E.P., Bennett, R.W., Dorsey, A.E., Issa, A.A. (1967). Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *Journal of Bacteriology*. **94**, 1875–1882.
- Casman, E.P. (1960). Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *Journal of Bacteriology*. **79**, 849–856.
- Chesney, C.M. (1997). The role of antiplatelet therapy in stroke prevention. *Tennessee Medicine*. **90**, 454-455.
- Cheung, G.Y., Rigby, K., Wang, R., Queck, S.Y., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Teintze, M., DeLeo, F.R., Otto, M. (2010). *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathogens*. **6**, e1001133.
- Chi, Y.I.; Sadler, I.; Jablonski, L.M.; Callantine, S.D.; Deobald, C.F.; Stauffacher, C.V.; Bohach, G.A. (2002). Zinc-mediated dimerization and its effect on activity and conformation of. *Journal of Biological Chemistry*. **277**, 22839–22846.
- Chi, Y.I.; Bohach, G.A.; Stauffacher, C.V. (2002). Structure of staphylococcal enterotoxin. Available online: <http://sbkb.org/pdbid/1ck1>.
- Christopher, S., Stach, B.G.V., Patrick, M.S. (2015). Determining the presence of superantigens in coagulase-negative staphylococci from humans. *PLoS One*. **10**, e0143341.
- Clarke, S.R., Foster, S.J. (2006). Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in Microbial Physiology*. **51**, 187–224.
- Chua, S.L., Liu, Y., Yam, J.K., Chen, Y., Vejborg, R.M., Tan, B.G., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. and Yang, L. (2014). Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic life styles. *Nature communications*. **5**, 4462.
- Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. **326**, 1694–1697.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. **284**, 1318–1322.
- Couto, I., Lencastre, H., Severina, E., Kloos, W., Webster, J.A., Hubner, R.J., Sanches, I.S., Tomasz, A. (1996). Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*. **2**, 377–91.
- Dack, G.M.; Cary, W.E.; Woolpert, O.; Wiggins, H.J. (1939). An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow haemolytic *Staphylococcus*. *J. Prev. Med.* **4**, 167–175.

- Da Cunha, M.L.R.S., Calsolari, R.A.O., Araujo-Junior, J.P. (2007). Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiology and Immunology*. **51**, 381–390.
- Deane, J.A., Fruman, D.A. (2004). Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annual Review of Immunology*. **22**, 563–98.
- De Bel, A., Van Hoorde, K., Wybo, I., Vandoorslaer, K., Echahidi, F., De Brandt, E., Schumann, P., Ieven, M., Soetens, O., Piérard, D., Vandamme, P. (2013). *Staphylococcus jettensis* sp. nov., a coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **63**, 3250–3256.
- Dellabona, P., Peccoud, J., Kappler, J., Marrack, P., Benoist, C., Mathis, D. (1990). Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cells*. **62**, 1115–21.
- Delaunay, F., Pegot, A., Coquerel-Beghin, D., Aktouf, A., Auquit-Auckbur, I. (2014). Fasciites nécrosantes à *Staphylococcus lugdunensis* après dermolipectomie abdominale : à propos de deux cas et revue de la littérature. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*. **59**, 136–139.
- Delmas, J., Chacornac, J.P., Robin, F., Giammarinaro, P., Talon, R., Bonnet, R. (2008). Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**, 311–313.
- Didonato, J.A., Mercurio, F., Karin, M. (2012). NFκB and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*. **246**, 379–400.
- Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N. (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases*. **32**, S114–S132.
- Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F., Sensabaugh, G.F., Perdreau-Remington, F. (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. **367**, 731–739.
- Diep, B.A., Otto, M. (2008). The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends in Microbiology*. **16**, 361–369.
- Dinges, M.M.; Orwin, P.M.; Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. **13**, 16–34.

- Dominguez, E., Zarazaga, M., Torres, C. (2002). Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from fecal samples of healthy children. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**, 2638–2641.
- Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P., Bes, M., Etienne, J., Lina, G. (2002). High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *Journal of Bacteriology*. **184**, 1180–1186.
- Durupt, F., Mayor, L., Bes, M., Reverdy, M.E., Vandenesch, F., Thomas, L., Etienne, J. (2007). Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. *British Journal of Dermatology*. **157**, 1161–1167.
- Entenza, J.M., Moreillon, P., Magdalena, S.M., Kormanec, J.; Dunman, P.; Berger-Bächli, B., Projan, S., Bischoff, M. (2005). « Role of  $\sigma^B$  in the Expression of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Adhesins ClfA and FnbA and Contribution to Infectivity in a Rat Model of Experimental Endocarditis ». *Infection and Immunity*. **73**, 990–998.
- Ertem, G.T., Sari, T., Hatipoglu, C.A., Yildiz, E., Zarakolu, P., Oral, B., 2010. Peritonitis due to teicoplanin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Peritoneal Dialysis International*. **30**, 117–118.
- Falcone, M., Micozzi, A., Pompeo, M.E., Baiocchi, P., Fabi, F., Penni, A., Martino, P., Venditti, M. (2004). Methicillin-resistant staphylococcal bacteremia in patients with hematologic malignancies: clinical and microbiological retrospective comparative analysis of *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus*. *Journal of Chemotherapy*. **16**, 540–548.
- Fey, P.D., Olson, M.E. (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future microbiology*. **5**, 917–933.
- Flamm, R.K., Mendes, R.E., Ross, J.E., Sader, H.S., Jones, R.N. 2013. Linezolid surveillance results for the United States: LEADER surveillance program. (2011). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **57**, 1077–1081
- Fluit, A.C., Verhoef, J., Schmitz, F.J. (2001). Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997–1998. *European Journal Of Clinical Microbiology*. **20**, 617–625.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews in Microbiology*. **12**, 49–62.
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Llaca-Díaz, J.M., Rodríguez-Noriega, E. (2010). Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-

negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiology and Infection*. **138**, 645–654.

Genigeorgis, C.A. (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 327-360.

Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., König, B. (2008). Genetic classification species based on different partial gap, 16SrRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**, 1019–1025.

Ghigo JM (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on Escherichia coli K-12 gene expression. *Molecular Microbiology*. **51**, 659-674.

Gilligan, K., Shipley, M., Stiles, B., Hadfield, T.L., Sofi Ibrahim, M. (2000), Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Molecular and Cellular Probes*. **14**, 71-78.

Gordon, R.J., Miragaia, M., Weinberg, A.D, Lee, C.J, Rolo, J, Giacalone, J.C, Slaughter, M.S, Pappas, P., Naka, Y., Tector, A.J, de Lencastre, H., Lowy, F.D. (2012). *Staphylococcus epidermidis* colonization is highly clonal across US cardiac centers. *Journal of Infectious Diseases*. **205**, 1391–1398.

Götz. F., Perconti, S., Popella, P., Werner, R., Schlag, M. (2014). Epidermin and gallidermin: staphylococcal lantibiotics. *International Journal of Medical Microbiology*. **304**, 63–71.

Gravet, A., Colin, D.A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H., Prévost, G. (1998). Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the *ebi*-component staphylococcal leucotoxines family. *FEBS Letter*. **436**, 202–208.

Grice, E.A, Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. **9**, 244–253.

Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley R.W., Murray, P.R., Green, E.D., Turner, M.L., Segre, J.A. (2009). Comparative Sequencing Program. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. **324**, 1190–1192.

Grossman, D., Van, M., Mollick, J.A., Highlander, S.K., Rich, R.R. (1990). Mutation of the disulphide loop in staphylococcal enterotoxin A. Consequences for T cell recognition. *Journal of Immunology*. **147**, 3274-8 1.

Gunn, B.A., Davis, C.E. (1988). *Staphylococcus haemolyticus* urinary tract infection in a male patient. *Journal of Clinical Microbiology*. **26**, 1055–1057.

Gurwinder, K., Amit, A., Sathyaseelan, S., Nida, M., Sheenam, V., S, M., Javed, N., Agrewala, Kaur. et al. (2016). Genome sequencing, assembly, annotation and analysis of *Staphylococcus xylosus* strain DMB3-Bh1 reveals genes responsible for pathogenicity. *Gut Pathogens*. **8**, 55.

Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M. and Vaillant, V. (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. **23**, 105–109.

Hajjeh, R.A., Reingold, A., Weil, A., Shutt, K., Schuchat, A., Perkins, B.A. Toxic shock syndrome in the United States: surveillance update, 1979–1996. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, 5, 807.

Hansen, J.N. (1993). Antibiotics synthesized by post-translational modification. *Annual Review of Microbiology*. **47**, 535–564.

Hansen, J., Laci, A., Ruedy, R., Sato, M., Wilson, H. 1993. How sensitive is the world's climate? *National Geographic Society supports exploration, research*. **9**, 142-158.

Harrison, E.M., Paterson, G.K., Holden, M.T., Ba, X., Rolo, J., Morgan, F.J., Pichon, B., Kearns, A., Zadoks, R.N., Peacock, S.J., Parkhill, J., Holmes, M.A. (2014). A novel hybrid SCCmec-mecC region in *Staphylococcus sciuri*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **69**, 911–918.

Harrison, E.M., Paterson, G.K., Holden, M.T., Morgan, F.J., Larsen, A.R., Petersen, A., Leroy, S., De Vlieghe, S., Perreten, V., Fox, L.K., Lam, T.J., Sampimon, O.C., Zadoks, R.N., Peacock, S.J., Parkhill J, Holmes MA. 2013. A *Staphylococcus xylosus* isolate with a new *mecC* allotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **57**, 1524–1528.

Heikens, E., Fler, A., Paauw, A., Florijn, A.C., Fluit, A., 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**, 2286–2290.

Heilmann, C. (2011). Adhesion mechanisms of staphylococci. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **715**, 105–123.

Hennekinne, J.A.; Buyser, M.L. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. **36**, 815–36.

Higashide, M., Kuroda, M., Omura, C.T., Kumano, M., Ohkawa, S., Ichimura, S., Ohta, T. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* isolates carrying staphylococcal cassette chromosome *mec* have emerged in urogenital tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52**, 2061–2068.

Hira, V., Sluijter, M., Estevao, S., Horst-Kreft, D., Ott, A., de Groot, R., Hermans, P.W., Kornelisse, R.F. (2007). Clinical and molecular epidemiologic characteristics of coagulase-

negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates. *Pediatric Infectious Disease Journal*. **26**, 607–612.

Hira, V., M., Sluijter, W.H.F., Goessens, et al. (2010). Coagulase-negative staphylococcal skin carriage among neonatal intensive care unit personnel: from population to infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**, 3876–3880.

Hirschhausen, N., Schlesier, T., Schmidt, M.A., Götz, F., Peters, G., Heilmann, C. (2010). A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cellular Microbiology*. **12**, 1746–1764.

Hudson, K.R., Tiedemann, R.E., Urban, R.G., Lowe, S.C., Strominger, J.L., Fraser, J.D. (1995). Staphylococcal enterotoxin A Has Two Cooperative Binding Sites on Major Histocompatibility Complex Class II. *Journal of Experimental Medicine*. **182**, 711–720.

Huebner, J., Goldmann, D.A. (1999). Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annual Review of Medicine*. **50**, 223–236.

Isakov, N., Altman, A. (2012). PKC-theta-mediated signal delivery from the TCR/ CD28 surface receptors. *Frontiers in Immunology*. **3**, 273.

Issa, N.C., Thompson, R.L. (2001). Staphylococcal toxic shock syndrome. Suspicion and prevention are keys to control. *Postgraduate Medicine*. **110**, 59-62.

Ito, T., Hiramatsu, K., Oliveira, D.C., de Lencastre, H., Zhang, K.Y., Westh, H., O'Brien, F., Giffard, P.M., Coleman, D., Tenover, F.C. et al. (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 4961–4967.

Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B., Kaplan, J.B. (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**, 470–476.

Jamaluddin TZ, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, Sotozono C, Kinoshita S, Ito T, Hiramatsu K. (2008). Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**, 3778–3783.

Jansen, R., Embden, J.D., Gaastra, W., Schouls, L.M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. **43**, 1565–75.

Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougél, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G. (2001), *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology*. **166**, 42–60.

- Jones, R.N. (2006). Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. *Clinical infectious diseases*. **42**, S13–24.
- Jones, R.N., Barry, A.L., Gardiner, R.V., Packer, R.R. (1998). The prevalence of staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins. A retrospective and prospective national surveillance trial of isolates from 40 medical centers. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **12**, 385–94.
- Jung, G., Sahl, H. (1991). Lantibiotics: a survey In Nisin and Novel. *Lantibiotics*, 1–34.
- Kahler, R.C., Boyce, J.M., Bergdoll, M.S., Lockwood, W.R., Taylor, M.R. (1986). Toxic shock syndrome associated with TSST-1 producing coagulase-negative staphylococci. *American Journal of the Medical Sciences*. **292**, 310–312.
- Katsuhiko, O., Ken'ichi, I., Dong-Liang, H., Hidehito, K., Yoshitaku, F., Yohei, A., Shoji, H., Yutaka, W., Akio, N., Takehiko, U., Kunihiro, S. (2005). Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infection and Immunity*. **73**, 5540–5546.
- Kaur, D.C., Narayan, P.A. (2014). Mupirocin resistance in nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers of a tertiary care rural hospital. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. **18**, 716–21.
- Kim, J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1994). Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Complexed with a Class II Major Histocompatibility Molecule HLA DR1. *Science*. **266**, 1870–1874.
- Kloos, W., Musselwhite, M.S. (1975). Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied Microbiology*. **30**, 381–385.
- Kloos, W., Zimmerman, R.J., Smith, R.F. (1976). Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Applied Microbiology*, **31**, 53–59.
- Korinek, A.M., Golmard, J.L., Elcheick, A. et al. (2005). Risk factors for neurosurgical site infections after craniotomy: a critical reappraisal of antibiotic prophylaxis on 4578 patients. *British Journal of Neurosurgery*. **19**, 155–162.
- Kornblum, J., Kreiswirth, B., Projan, S.J., Ross, H., and Novick, R. P. (1990). *agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Molecular biology of staphylococci*. **29**, 373–402.

- Kozitskaya, S., Olson, M.E., Fey, P.D., Witte, W., Ohlsen, K., Ziebuhr, W. (2005). Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**, 4751–4757.
- Krakauer, T.; Pradhan, K.; Stiles, B.G. (2016). Staphylococcal superantigens spark host-mediated danger signals. *Frontiers in Immunology*. **7**, 1–14.
- Krakauer, T., Vilcek, J., Oppenheim, J.J. (1998). Proinflammatory cytokines: TNF and IL-1 families, chemokines, TGF $\beta$  and others. 4th ed. In *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven. **88**, 775–811.
- Krakauer, T. (1994). Co-stimulatory receptors for the superantigen staphylococcal enterotoxin B on human vascular endothelial cells and T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. **56**, 458–63.
- Krakauer, T., Buckley, M., Huzella, L.M., Alves, D. (2009). Critical timing, location and duration of glucocorticoid administration rescues mice from superantigen-induced shock and attenuates lung injury. *International Immunopharmacology*. **9**, 1168–74.
- Krakauer T., Buckley, M. (2006). Dexamethasone attenuates staphylococcal enterotoxin B-induced hypothermic response and protects mice from superantigen-induced toxic shock. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**, 391–5.
- Kreiswirth, BN, Schlievert, PM, Novick, RP. (1987). Evaluation of coagulase-negative staphylococci for ability to produce toxic shock syndrome toxin 1. *Journal of Clinical Microbiology*. **25**, 2028–2029.
- Krediet, T.G., Mascini, E.M., van Rooij, E., Vlooswijk, J., Paauw, A., Gerards, L.J., Flier, A. (2004). Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**, 992–995.
- Kresken, M., Hafner, D. (1999). Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975–1995. *Infection*. **27** (Suppl 2).
- Kresken, M., Becker, K., Seifert, H., Leitner, E., Körber-Irrgang, B., von Eiff, C., Löschnann, P.A. (2011). Resistance trends and in vitro activity of tigecycline and 17 other antimicrobial agents against Gram-positive and Gram-negative organisms, including multidrug-resistant pathogens, in Germany. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **30**, 1095–1103.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*. **30**, 16-34.



Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H. et al. (2005). Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**, 13272–13277.

Lai, Y., Villaruz, A.E., Li, M., Cha, D.J., Sturdevant, D.E., Otto, M. (2007). The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Molecular Microbiology*. **63**, 497–506.

Lamphear, J. G.; Bohach, G. A.; Rich, R.R. (1998). Structural dichotomy of staphylococcal enterotoxin C superantigens leading to MHC class II independent activation of T lymphocytes. *Journal of Immunology*. **160**, 2107–2114.

Layer, F., Ghebremedhin, B., Moder, K., König, W., König, B. (2006). Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. **44**, 2824–2830.

Lebeaux, D., Larroque, B., Gellen-Dautremer, J. et al. (2012). Clinical outcome after a totally implantable venous access port-related infection in cancer patients: a prospective study and review of the literature. *Medicine*. **91**, 309–318.

Leder, L.; Llera, A.; Lavoie, P. M.; Lebedeva, M. I.; Li, H.; Sekaly, R. P.; Bohach, G. A. ; Gahr, P. J.; Schlievert, P. M.; Karjalainen, K. et al. (1998). A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor- chain and major histocompatibility complex class II. *Journal of Experimental Medicine*. **187**, 823–833.

Lederberg, J. (1952). Plasmid. *PLASMID*. **39**, 1 – 9.

Legeay, G., Poncin-Epaillard, F., Arciola, C.R. (2006). New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relation to (no) bioadhesion . *International Journal of Artificial Organs*. **29**, 453–61

Lepelletier, D., Perron, S., Bizouarn, P. et al. (2005). Surgical-site infection after cardiac surgery: incidence, microbiology, and risk factors. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. **26**, 466–472.

Li, S.J.; Hu, D.L.; Maina, E.K.; Shinagawa, K.; Omoe, K.; Nakane, A. (2011). Superantigenic activity of toxic shock syndrome toxin-1 is resistant to heating and digestive enzymes. *Journal of Applied Microbiology*. **110**, 729–736.

Li, H., Llera, A., Tsuchiya, D., Leder, L., Ysern, X., Schlievert, P.M., Karjalainen, K., Mariuzza, R.A. (1998). Three-dimensional structure of the complex between a T cell Receptor beta chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Immunity*. **9**, 807–816.

Lina, G., Boutite, F., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F. (2003). Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal *agr* alleles. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 18–23.

Lo, D.S., Shieh, H.H., Barreira, E.R., Ragazzi, S.L., Gilio, A.E. (2015). High frequency of *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections among female adolescents. *Pediatric Infectious Disease Journal*. **34**, 1023–1025.

Longshaw, C.M., Farrell, A.M., Wright, J.D., Holland, K.T. (2000) Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. *Microbiology*. **146**, 1419–27.

Luzzaro, F., Ortisi, G., Larosa, M., Drago, M., Brigante, G., Gesu, G. (2011). Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. **69**, 363–369.

Lyytikäinen, O., Vaara, M., Järviluoma, E., Rosenqvist, K., Tiittanen, L., Valtonen, V. (1996). Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12-year period. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **15**, 133–138.

McCormick, J.K., Yarwood, J.M., Schlievert, P.M. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Veterinary Microbiology*. **55**, 77–104.

McKevitt, A.I., Bjornson, G.L., Mauracher, C.A., Scheifele, D.W. (1990). Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*. **58**, 1473–1475.

Madhusoodanan, J., Seo, K.S., Remortel, B., Park, J.Y., Hwang, S.Y., Fox, L.K., Park, Y.H., Deobald, C.F., Wang, D., Liu, S., Daugherty, S.C., Gill, A.L., Bohach, G.A., Steven, R., Gill, S.R. (2011). An enterotoxin-bearing pathogenicity island in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*. **193**, 1854–1862.

Madhusoodanan, J; Seo, K. S.; Park, J. Y.; Gill, A. L.; Waterhouse, J.; Remortel, B.; Bohach, G.; Gill, S.R. (2007). 107th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. *American Society for Microbiology*, Washington, DC. abstr. B–420.

Mahoudeau, I., Delabranche, X., Prévost, G., Monteil, H., Piémont, Y. (1997). Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**, 2154.

Mattsson, E., Verhage, L., Rollof, J., FLeer, A., Verhoef, J., van Dijk, H. (1993). Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 and interleukin-6. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **7**, 281–287.

- Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J. (2010). Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*. **463**, 568–71.
- Martin, S.E., Myers, E.R., Landolo, J.J. (2001). *Staphylococcus Aureus* In : Hui Y. H., Pierson M. D., Gorham J. R. (eds) Foodborne disease handbook Vol. 1 – Bacterial pathogens. New York Basel : Marcel Dekker Inc., 345 -381.
- Marrack, P., Kappler, J. (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. **248**, 705–711.
- Mattsson, E., Roloff, J., Verhoef, J., van Dijk, H., Fleer, A. (1994). Seruminduced potentiation of tumor necrosis factor alpha production by human Costerton, J.W., Montanaro, L., Arciola, C.R. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *International Journal of Artificial Organs*. **28**, 1062–1068.
- Mehlin C, Headley CM, Klebanoff SJ. 1999. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *Journal of Experimental Medicine*. **189**, 907–918.
- Mellmann, A., Becker, K., von Eiff, C., Keckevoet, U., Schumann, P., Harmsen, D. (2006). Sequencing and staphylococci identification. *Emerging Infectious Diseases*. **12**, 333–336.
- Mellmann, F., Bimet, C., Bizet, A.D., Borovskaya, R.R., Drake, U., Eigner, A.M., Fahr, Y., He, E., Ilina, N., Kostrzewa, M., Maier, T., Mancinelli, L., Moussaoui, W., et al. (2009). High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**, 3732-4.
- Mempel, M.; Lina, G.; Hojka, M.; Schnopp, C.; Seidl, H.P.; Schafer, T., Ring, J., Vandenesch, F. Abeck, D. (2003). High prevalence of superantigens associated with the egc locus In *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **22**, 306–309.
- Mendes, R.E., Sader, H.S., Jones, R.N. (2012). Activity of telavancin and comparator antimicrobial agents tested against *Staphylococcus* spp. Isolated from hospitalised patients in Europe (2007-2008). *International Journal of Antimicrobial Agents*. **36**, 374–379.
- Meyer, F., Girardot, R., Piémont, Y., Prévost, G., Colin, D.A. (2009). Analysis of the specificity of Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infection and Immunity*. **7**, 266–273.
- Miragaia, M., de Lencastre, H., Perdreau-Remington, F., et al. (2009). Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One*. **4**, e7722.

- Miragaia, M., Couto, I., de Lencastre, H. (2005). Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microbial Drug Resistance*. **11**, 83–93.
- Mohammad, M.A.K., Aftab, F., Ahmad, M.A. (2014). Clinically significant coagulase-negative staphylococci and their antibiotic resistance pattern in a tertiary care hospital. *Journal of Pakistan Medical Association*. **64**, 1171.
- Mohan, U., Jindal, N., Aggarwal, P. (2002). Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase negative staphylococci isolated from various clinical specimens. *Indian Journal of Medical Microbiology*. **20**, 45–46.
- Mombach, P.M., Reiter, K.C., Paiva, R.M., Barth, A.L. (2007). Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. **56**, 1328–33.
- Monsen, T., Karlsson, C., Wistrom, J. (2005). Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. **26**, 76–80.
- Monsen, T., Olofsson, C., Rönmark, M., Wistrom, J. (2000). Clonal spread of staphylococci among patients with peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney International*. **57**, 613–618.
- Murdoch, D.R., Corey, G.R., Hoen, B., Hoen, B., Miró, J.M., Fowler, V.G., Bayer, A.S., Karchmer, A.W., Olaison, L., Pappas, P.A., *et al.* (2009). Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: The International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. *Archives of Internal Medicine*. **169**, 463–473.
- Murray, R.J. (2005). Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Internal Medicine Journal*. **2**, S106–S119.
- Nanoukon, C.; Argemi, X.; Sogbo, F.; Orekan, J.; Keller, D.; Affolabi, D.; Schramm, F.; Riegel, P.; Baba-Moussa, L.; Prévost, G. (2017). Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. *International Journal of Medical Microbiology*. **307**, 75–82.
- Neely, A.N., Maley, M.P. (2000). Survival of Enterococci and Staphylococci on hospital fabrics and plastic. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**, 724–726.
- Nienaber, J.J., Kusne, S., Riaz, T., Walker, R.C., Baddour, L.M., Wright, A.J., Park, S.J., Vikram, H.R., Keating, M.R., Arabia, F.A., *et al.* (2013). Clinical manifestations and management of left ventricular assist device-associated infections. *Clinical Infectious Diseases*. **57**, 1438–1448.

- Nouwen, J.L., van Belkum, A., de Marie, S., Sluijs, J., Wielenga, J.J., Kluytmans, J.A., Verbrugh, H.A. (1998). Clonal expansion of *Staphylococcus epidermidis* strains causing Hickman catheter-related infections in a hemato-oncologic department. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**, 2696–2702.
- Novick, R.P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*. **48**, 1429–1449.
- Novick, R. P., and A. Subedi. 2007. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chemical Immunology and Allergy*. **93**, 42–57.
- O'Brien, L., Kerrigan, S., Kaw, G., Hogan, M., Penadés, J., Litt, D., Fitzgerald, D., Foster, T., Cox, D. (2009). « Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine–aspartate repeat protein SdrE and protein A ». *Molecular Biology*. **44**, 1033-1044
- Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S., Kimura, S., (2002). Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidases from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*. **33**, 33–41.
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., Jehl, F. (2016). The BioFilm Ring Test: a Rapid Method for Routine Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation Kinetics. *Journal of Clinical Microbiology*. **54**, 657–661.
- Onyango, L.A., Dunstan, R., Hugh, D., Roberts, T. (2008). 'Small colony variants of staphylococci: Pathogenesis and evolutionary significance in causing and sustaining problematic human infections'. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*. **17**, 1, 56 — 75.
- Ono, H. K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D. L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K. (2008). Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. *Infections and Immunity*. **76**, 4999-5005.
- Ono, H.K.; Sato'o, Y.; Narita, K.; Naito, I.; Hirose, S.; Hisatsune, J.; Asano, K., Hu, D.L.; Omoe, K.; Sugai, M.; Nakane, A. (2015). Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. **81**, 7034 –7040.
- Opal, S.M., Laterre, P.F., Francois, B., LaRosa, S.P., Angus, D.C., Mira, J.P. (2013). Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. **309**, 1154–62.
- Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., Galvez, A. (2010). Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins*. **2**, 2117–2131.

- Orwin, P.M.; Leung, D.Y.; Tripp, T.J.; Bohach, G.A.; Earhart, C.A.; Ohlendorf, D.H.; Schlievert, P.M. (2002). Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry*. **41**, 14033–14040.
- Orwin, P.M., Leung, D.Y.M., Donahue, H.L., Novick, R.P. Schlievert, P.M. (2001). Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infection and Immunity*. **69**, 360–366.
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. **7**, 555–567.
- Otto, M. (2004). Virulence factors of coagulase-negative staphylococci. *Frontiers in Bioscience*. **9**, 841–863.
- Otto, M. (2012). Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in Immunopathology*. **34**, 201–214.
- Otto, M. (2013). Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection. *Bioassays*. **35**, 4–11.
- Otto, M., Süßmuth, R., Vuong, C., Jung, G., Götz, F. (1999). Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis agr* pheromone and derivatives. *FEBS Letters*. **450**, 257–262.
- Otto, T.D., Sanders, M., Berriman, M., Newbold, C. (2010). Iterative Correction of Reference Nucleotides (iCORN) using second generation sequencing technology. *Bioinformatics*. **15**, 1704–7.
- Pakshir, K., Zomorodian, K., Karamitalab, M., Jafari, M., Taraz, H., Ebrahimi, H. (2013). Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. Isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *Journal of Medical Mycology*. 10–1016.
- Pantucek, R., Svec, P., Dajcs, J.J., Machová, I., Cernohlavkova, J., Sedo, O., Gelbicova, T., Maslanova, I., Doskar, J., Zdrahal, Z., et al. (2013). *Staphylococcus petrasii* sp. nov. including *S. petrasii* subsp. *Petrasii* sub sp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. *Systematic and Applied Microbiology*. **36**, 90–95.
- Papageorgiou, A.C., Tranter, H.S., Acharya, K.R. (1998). Crystal Structure of Microbial Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B at 1.5 Å Resolution: Implications for Superantigen Recognition by MHC Class II Molecules and T-Cell Receptors. *Journal of Molecular Biology*. **277**, 61–79.

- Papageorgiou, A.C., Acharya, K.R., Shapiro, R., Passalacqua, E.F., Brehm, R.D., Tranter, H.S. (1995). Crystal Structure of the Superantigen Enterotoxin C2 From *Staphylococcus aureus* Reveals a Zinc-Binding Site. *Structure*. **3**, 769–779.
- Park, J.Y., Fox, L.K., Seo, K.S., McGuire, M.A., Park, Y.H., Rurangirwa, F.R., Sischo, W.M., Bohach, G.A. (2011). Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology*. **147**, 149–154.
- Paul, S., Schaefer, B.C. (2013). A new look at TCR signaling to NFκB. *Trends in Immunology*. **34**, 269–81.
- Pawel, M., Agnieszka, M., Malgorzata, R. (2008). The amino acid sequences and activities of synergistic hemolysins from *Staphylococcus cohnii*. *FEMS Microbiology Letter*. **287**, 230–235.
- Peel, T.N., Cole, N.C., Dylla, B.L., Patel, R. (2015). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and diagnostic testing for prosthetic joint infection in the clinical microbiology laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **81**, 163–168.
- Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, K. C. Kugler, M. L. Beach. (1999). Survey of blood stream infections attributable to gram positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **33**, 283–297.
- Petti, C.A., Simmon, K.E., Miro, J.M., Hoen, B., Marco, F., Chu, V.H., Athan, E., Bukovski, S., Bouza, E., Bradley, S., et al. (2008). Genotypic diversity of coagulase-negative staphylococci causing endocarditis: a global perspective. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**, 1780–1784.
- Peters, G., Locci, R., Pulverer, G. (1982). Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *Journal of Infectious Diseases*. **146**, 479–482.
- Peters G, Locci R, Pulverer G. 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *Journal of Infectious Diseases*. **146**, 479–482.
- Piette, A., Verschraegen, G. (2009). Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*. **134**, 45–54.
- Pinheiro, L., Brito, C.I., d'Oliveira, A., Martins, P.Y., Pereira, V.C., da Cunha, L. (2015). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. *Toxins*. **7**, 3688–3699.

Arndt, D., Grant, J., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*. **44**, W16–W21.

Podkowik, M.; Seo, K.S.; Schubert, J.; Tolo, I.; Robinson, D.A.; Bania, J.; Bystroń, J. (2016). Genotype and enterotoxigenicity of *Staphylococcus epidermidis* isolate from ready to eat meat products. *International Journal of Food Microbiology*. **229**, 52–59.

Podkowik, M.; Bystroń, J.; Bania, J. (2012). Genotypes, antibiotic resistance and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. *Foodborne Pathogens Disease*. **9**, 91–93.

Podkowik, M.; Seo, K.S.; Schubert, J.; Tolo, I.; Robinson, D.A.; Bania, J.; Bystroń, J. (2016). Genotype and enterotoxigenicity of *Staphylococcus epidermidis* isolate from ready to eat meat products. *International journal of food microbiology*. **229**, 52–59.

Prevost G. (2004): Toxins in *Staphylococcus aureus* pathogenesis. In Proft M. (Editor): Microbial toxins: molecular and cellular biology. *Horizon Bioscience*. **1**, 243-284.

Proctor, R.A., von Eiff, C., Kahl, B.C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*. **4**, 295–305.

Protparam. Available online: <http://web.expasy.org/protparam> (accessed on 21 January 2017).

Putnam, S.D., Sader, H.S., Moet, GJ, Mendes, R.E., Jones, R.N. (2010). Worldwide summary of telavancin spectrum and potency against Grampositive pathogens: 2007 to 2008 surveillance results. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **67**, 359–368.

Rebecca, J. (2007). Case, Yan Boucher, Ingela Dahllöf, Carola Holmström, W. Ford Doolittle et Staffan Kjelleberg, « Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies ». *Applied and Environmental Microbiology*. **73**, 278-288.

Redpath, S., Alam, S.M., Lin, C.M., O'Rourke, A.M., Gascoigne, N.R. (1999). Cutting Edge: Trimolecular Interaction of TCR with MHC Class II and Bacterial Superantigen Shows a Similar Affinity to MHC: Peptide Ligands. *Journal of Immunology*. **163**, 6–10.

Réseau REA-Raisin des infections nosocomiales en réanimation adulte, France. Résultats 2012.

Réseau REA-Raisin des infections nosocomiales en réanimation adulte, France. Résultats 2014.

Rogers, K.L., Fey, P.D., Rupp, M.E. (2009). Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infectious disease clinics of North America*. **23**, 73–98.

Rooijackers, S.H., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2005b). Staphylococcal innate immune evasion. *Trends in Microbiology*. **13**, 596-601.



Rossle, S.C.; Bisch, P. M.; Lone, Y. C.; Abastado, J. P.; Kourilsky, P.; Bellio, M. (2002). Mutational analysis and molecular modeling of the binding of *Staphylococcus aureus* enterotoxin C2 to a murine T cell receptor V-10 chain. *European Journal of Immunology*. **32**, 2172–2178.

Rupp, M.E., Archer, G.L. (1994). Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clinical Infectious Diseases*. **2**, 231-43.

Ruppé, E., Barbier, F., Mesli, Y., Maiga, A., Cojocar, R., Benkhalfat, M., Benchouk, S., Hassaine, H., Maiga, I., Diallo, A. (2009). Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53**, 442–449.

Sahl, H.G., Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*. **52**, 41–79.

Salgado-Pabón, W.; Breshears, L.; Spaulding, A.R.; Merriman, J.A.; Stach, C.S.; Horswill, A.R.; Peterson, M.L., Schlievert, P.M. (1998). Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. *MBio*. **4**, e00494–13.

Sanger, F.; Nicklen, S.; and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**, 5463–5467.

Sato’o, Y.; Omoe, K.; Ono, H.K.; Nakane, A.; Hu, D.L. (2013). A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Microbiology and Immunology*. **57**, 91–99.

Savithri, M.B., Iyer, V., Jones, M., Yarwood, T., Looke, D., Kruger, P.S., Faogali, J., Venkatesh, B. (2011). Epidemiology and significance of coagulase-negative staphylococci isolated in blood cultures from critically ill adult patients. *Critical Care and Resuscitation*. **13**, 103–107.

Schaberg, D.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P. (1991). Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *American Journal of Medicine*. **91**, 72S–5S.

Scheifele, D.W., Bjornson, J.L., Dyer, R.A., Dimmick, J.E. (1987). Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infection and Immunity*. **55**, 2268–2273.

Schmidt, K.A., Donegan, N.P., Kwan, W.A., Cheung, A. (2004). Influences of sigma and agr one expression of staphylococcal enterotoxin B in *S. aureus*. *Canadian Journal of Microbiology*. **50**, 351-60.

Schmitz, F.J., Verhoef, J., Fluit, A.C. (1999). Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme.

- Schnellmann C, Gerber V, Rossano A, Jaquier V, et al. 2006. Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. Isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *Journal of Clinical Microbiology*. **44**, 4444–54.
- Schoenfelder, S.M., Lange, C., Eckart, M., Hennig, S., Kozytska, S., Ziebuhr, W. (2010). Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as nosocomial pathogen. *International Journal of Medical Microbiology*. **300**, 380–386.
- Schrag, C., Kleger, G.R. (2011). Syndrome de choc toxique. *Forum Médical Suisse*. **11**, 805–807.
- Sentry Participants Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**, 783–92.
- Shanahan, F.; Denburg, J.A.; Fox, J.; Bienenstock, J.; Befus, D. (1985). Mast cell heterogeneity: Effects of neuroenteric peptides on histamine release. *Journal of Immunology*. **135**, 1331–1337.
- Sheehy, S.H., Atkins, B.A., Bejon, P., Byren, I., Wyllie, D., Athanasou, N.A., Berendt, A.R., McNally, M.A. (2010). The microbiology of chronic osteomyelitis: prevalence of resistance to common empirical anti-microbial regimens. *Journal of Infection*. **60**, 338–343.
- Shin, J.H., Kim, S.H., Jeong, H.S., Oh, S.H., Kim, H.R., Lee, J.N., Yoon, Y.C., Kim, Y.W., Kim, Y.H. (2011). Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid using 16S ribosomal RNA, *tuf*, and *sodA* gene sequencing. *Peritoneal Dialysis International*. **31**, 340–346.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annual Review of Immunology*. **27**, 591–619.
- Shimuta, K., Oshnishi, M., Iyoda, S., Gotoh, N., Koizumi, N., Watanabe, H. (2009). The hemolytic and cytotoxic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. *BMC Microbiology*. **9**, 261–271.
- Simons, J.W., van, Kampen, M.D., Riel, S., Götz, F., Egmond, M.R., Verheij, H.M. (1998). Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis* comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *European Journal of Biochemistry*. **253**, 675–683.
- Söderquist, B., Berglund, C. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). *Clinical Microbiology and Infection*. **15**, 1176–1178.
- Solanki, L.S., Srivastava, N., Sanjay, M.D. (2008). Superantigens: a brief reviews with special emphasis on dermatologic diseases. *Dermatology Online Journal*. **14**, 3.

Sonneville, R., Mirabel, M., Hajage, D., Tubach, F., Vignon, P., Perez, P., Lavoué, S., Kouatchet, A., Pajot, O., Mekont, A. (2013). Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. **26**, 422–447.

Sonneville, R., Mirabel, M., Hajage, D., Tubach, F., Vignon, P., Perez, P., Lavoué, S., Kouatchet, A., Pajot, O., Mekont, A., *et al.* (2011). Neurologic complications and outcomes of infective endocarditis in critically ill patients: the Endocardite en REAnimation prospective multicenter study. *Critical Care Medicine*. **39**, 1474–1481.

Souvenir, D., Anderson, D.E., Palpant, S., Mroch, H., Askin, S., Anderson, J., Claridge, J., Eiland, J., Malone, C., Garrison, M.W., Watson, P., Campbell, D.M. (1998). Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**, 1923–1926

Speziale, P., Pietrocola, G., Rindi, S., Provenzano, M., Provenza, G., Di Poto, A., Visai, L., Arciola, C.R. (2009). Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host . *Future Microbiology*. **4**, 1337–52.

Spaulding, A.; Salgado-Pabón, W.; Kohler, P.; Horswill, A.; Leung D.; Schlievert, P. (2013) Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. **26**, 422– 447.

Srdjan, S., Dragana, V., Ivana, D., Branislava, S., Milena, S. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. **40**, 175–179.

*Staphylococcus aureus and food poisoning (PDF Download Available)*. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/10613996\\_Staphylococcus\\_aureus\\_and\\_food\\_poisoning](https://www.researchgate.net/publication/10613996_Staphylococcus_aureus_and_food_poisoning) [accessed Sep 26, 2017].

Stach, C.S; Vu, B.G.; Schlievert, P.M. (2015). Determining the presence of superantigens in coagulase negative staphylococci from humans. *PLoS ONE*. **10**, e0143341.

Stepan, J., Pantucek, R., Doskar, J. (2004). Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiologica*. **49**, 4, 353-386.

Stefani, S., Varaldo, P.E. (2003). Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clinical microbiology and infection*. **9**, 1179-1186.

Stewart, P. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*. **292**, 107-113.

Sundstrom, M., Abrahmsen, L., Antonsson, P., Mehindate, K., Mourad, W., Dohlsten M. (1996). The Crystal Structure of staphylococcal enterotoxin type D reveals Zn<sup>2+</sup> mediated homodimerization. *European Molecular Biology Organization Journal*. **15**, 6832–6840.

- Sugiyama, H., Hayama, T. (1964). Comparative resistance of vagotomized monkeys to intravenous vs. Intra-gastric staphylococcal enterotoxin challenges. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **115**, 243-6.
- Szabados, F., Kleine, B., Anders, A., Kaase, M., Sakin, T., Schmitz, I., Gatermann, S. (2008). *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 is internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. *FEMS Microbiology Letter*. **285**, 163–169.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cells*. **140**, 805–20.
- Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A. et al. (2005). Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *Journal of Bacteriology*. **187**, 7292–7308.
- Tang, Y.W., Han, J., McCormac, M.A., Li, H., Stratton, C.W. (2008). *Staphylococcus pseudolugdunensis* sp. nov., a pyrrolidonyl arylamidase/ ornithine decarboxylase-positive bacterium isolated from blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **60**, 351–359.
- Tallent, S.M., Langston, T.B., Moran, R. G., Christie, G.E. (2007). Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins. *Journal of Bacteriology*. **189**, 7520–7524
- Tilahun, A.Y., Theuer, J.E., Patel, R., David, C.S., Rajagopalan, G. (2010). Detrimental effect of the proteasome inhibitor, bortezomib in bacterial superantigen- and lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *Molecular Therapy*. **18**, 1143–54.
- Taylor, A.L., Llewelyn, M.J. (2010). Superantigen-induced proliferation of human CD4<sup>+</sup> CD25-T cells is followed by a switch to a functional regulatory phenotype. *Journal of Immunology*. **185**, 6591–6598.
- Tiedemann, R.E., Fraser, J.D. (1996) Cross-linking of MHC class II molecules by staphylococcal enterotoxin A is essential for antigen-presenting cell and T cell activation. *Journal of Immunology*. **157**, 3958–66.
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K. (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**, 4352–9.
- Translate. Available online: <http://web.expasy.org/translate> (accessed on 18 February 2017).

- Tuscherr, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., von Eiff, C., Peters, G., Becker, K., Löffler, B. (2010). *Staphylococcus aureus* small colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *Journal of Infectious Diseases*. **202**, 1031–1040.
- Ubeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R. P., Penadés, J.R. (2006). Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Molecular Microbiology*. **56**, 836–844.
- Uyanik, M.H., Yazgi, H., Ozden, K., Erdil, Z., Ayyildiz, A. (2014). Comparison of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures as a true bacteremia agent and contaminant in terms of slime production and methicillin resistance. *Eurasian Journal of Medicine journal*. **46**, 115–119.
- Valdimarsson, H., Baker, B.S., Jonsdottir, I., Powles, A., Fry, L. (1995). Psoriasis: a T cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens. *Immunology Today*. **16**, 145–9.
- Valour, F., Trouillet-Assant, S., Rasigade, J.P., Lustig, S., Chanard, E., Meugnier, H., Tigaud, S., Vandenesch, F., Etienne, J., Ferry, T., Laurent, F. (2013). *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One*. **8**, e67240.
- Vandenesch, F., Eykyn, S.J., Etienne, J., Lemozy, J. (1995). Skin and post-surgical wound infections due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Clinical Microbiology and Infections*. **1**, 73-74.
- Vandecandelaere, I., Depuydt, P., Nelis, H.J., Coenye, T. (2014). Protease production by *Staphylococcus epidermidis* and its effect on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pathogens and Disease*. **70**, 321–331.
- Van Leeuwen, J.E., Samelson, L.E. (1999). T cell-antigen receptor signal transduction. *Current Opinion in Immunology*. **11**, 242–8.
- Van Mellaert, L., Shahrooei, M., Hofmans, D., Eldere, J.V. (2012). Immunoprophylaxis and immunotherapy of *Staphylococcus epidermidis* infections: challenges and prospects. *Expert review of vaccines*. **11**, 319-334.
- Veras, J.F., do Carmo, L.S., Tong, L., Shupp, W., Cummings, C., dos Santos, D.A., Cerqueira, M.M.O., Cantini, A., Nicoli, J. et al. (2008). A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. **12**, 410–415.
- Von Eiff, C., Arciola, C.R., Montanaro, L., Becker, K., Campoccia, D. (2006). Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. *International Journal of Artificial Organs*. **29**, 360–367.

- Von Eiff, C., Heilmann, C., Proctor, R.A., Woltz, C., Peters, G., Götz, F. (1997). A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *Journal of Bacteriology*. **179**, 4706–4712.
- Von Eiff, C., Vaudaux, P., Kahl, B.C., Lew, D., Emler, S., Schmidt, A., Peters, G., Proctor, R.A. (1999). Bloodstream infections caused by small-colony variants of coagulase-negative staphylococci following pacemaker implantation. *Clinical Infectious Diseases*. **29**, 932–934.
- Von Eiff, C., Peters, G., Heilmann, C., 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase negative Staphylococci. *Lancet Infectious Diseases*. **2**, 677–685.
- Vu, B.G.; Stach, C.S.; Salgado-Pabon, W.; Diekema, D.J.; Gardner, S.E.; Schlievert, P.M. Superantigens of *Staphylococcus aureus* from patients with diabetic foot ulcers. *Journal of Infectious Diseases*. **210**, 1920–1927.
- Xiaoxia, L.i., Min, L., Song, Y., Gong, K., Li, L., Liang, H., Jiang, X. (2014). Whole genome sequence and comparative genomic analysis of multidrug-resistant *Staphylococcus capitis* subsp. *Urealyticus* strain LNZR-1. *Gut Pathogens*. **6**, 45.
- Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., Otto, M., Gao, Q. (2006). Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*. **74**, 488–496.
- Wang, R et Chait, B. «High-accuracy mass measurement as a tool for studying proteins ». *Current Opinion in Biotechnology*. **5**, 77–84.
- Wang, K.W., Chang, W.N., Huang, C.R., Tsai, N.W., Tsui, H.W., Wang, H.C., Su, T.M., Rau, C.S., Cheng, B.C., Chang, C.S. et al. (2005). Post-neurosurgical nosocomial bacterial meningitis in adults: microbiology, clinical features, and outcomes. *Journal of Clinical Neuroscience*. **12**, 647–650.
- Widerstrom, M., Monsen, T., Karlsson, C., Wistrom, J. (2006). Molecular epidemiology of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra and interhospital clonal spread. *Journal of Hospital Infection*. **64**, 177–183.
- Wieneke, A.A.; Roberts, D.; Gilbert, R.J. (1993). Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90. *Epidemiology and Infection*. **110**, 519–531.
- Willcox, M.D. (2013). Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Experimental Eye Research*. **117**, 99–105.
- Wisplinghoff, H., Rosato, A.E., Enright, M.C., Noto, M. Craig, W., Archer, G.L. (2003). Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**, 3574–9.

Wilson, G.J., Seo, K.S., Cartwright, R.A., Connelley, T., Chuang-Smith, O.N., Merriman, J.A., Guinane, C.M., Park, J.Y., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., et al. (2011). A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathogens*. **7**, e1002271.

Wisplinghoff H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*. **39**, 309–317.

Wenzel, R.P., Nettleman, M.D., Jones, R.N. and Pfaller, M.A. (1991) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990s and effective control measures. *Am J Med* 91(Suppl. 3B), 2215–2275.

Wey, S.B., Cardo, D.M., Halker, E., Carratu, F.P. and Saes, A.C. (1990) Distribution and analysis of 8268 nosocomial infections at the Hospital Sao Paulo: 1985 to 1989. *Rev Hosp Sao Paulo* 1, 169–174.

Wos-Oxley, M.L., Plumeier, I., von Eiff, C., Taudien, S., Platzer, M., Vilchez-Vargas, R., Becker, K., Pieper, D.H. (2010). A poke into the diversity and associations within human anterior nares microbial communities. *ISME Journal*. **4**, 839-51.

Wright, A., Andrews, P.L., Titball, R.W. (2000). Induction of emetic, pyrexia, and behavioral effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in the ferret. *Infections and Immunity*. **68**, 2386-2389.

Wu, S., Piscitelli, C., de Lencastre, H., Tomasz, A. (1996). Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*. **2**, 435–41.

Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. **12**, 7–8.

Ye, Y.M.; Hur, G.Y.; Park, H.J.; Kim, S.H.; Kim, H.M.; Park, H.S. (2008). Association of specific IgE to staphylococcal superantigens with the phenotype of chronic urticaria. *Journal of Korean Medical Science*. **23**, 845–851.

Yoshino, T., Asada, H., Sano, S., Nakamura, T., Itami, S., Tamura, Yoshikawa, K. (2000). Impaired responses of peripheral blood mononuclear cells to staphylococcal superantigens in patients with severe atopic dermatitis: a role of T cell apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*. **114**, 281–8.

Zhanel GG, Adam HJ, Baxter MR, Fuller J, Nichol KA, Denisuk AJ, Lagacé-Wiens P, Walkty A, Karlowsky JA, Schweizer F, Hoban DJ. 2013. Antimicrobial susceptibility of 22746 pathogens from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007–11 study. *Antimicrobial Chemotherapy*. **68**, i7–i22.

Zhang, S.; landolo, J.J.; Stewart, G.C. (2001). The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiology Letter*. **168**, 227–233.

Zapun, A., Contreras-Martel, C., et Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiolog Reviews*. **32**, 361-385.

Ziebuhr, W. (2001). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib. Microbiol.* **8**, 102–107.

Zimmerli, w., Trampuz, A., Ochsner, P.E. (2004). Prosthetic-joint infections. *New England Journal of Medicine*. **351**, 1645–1654.

Zong, Z., Peng, C., Lü, X. (2011). Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PLoS One*. **6**, e20191.



## **Chapitre 6 : ANNEXES**

## 6.1. SEQUENCES

TABLEAU 6.1 : REFERENCES EMBL DES SEQUENCES D'ENTEROTOXINES UTILISEES

Protéines	Références
enterotoxin type C3	>ENA BAF78878 BAF78878.1/ enterotoxin typeC3 [ <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Mu3]
enterotoxin type C3	>ENA EFV90065 EFV90065.1/ enterotoxin type C3 [ <i>Staphylococcus epidermidis</i> FRI909]

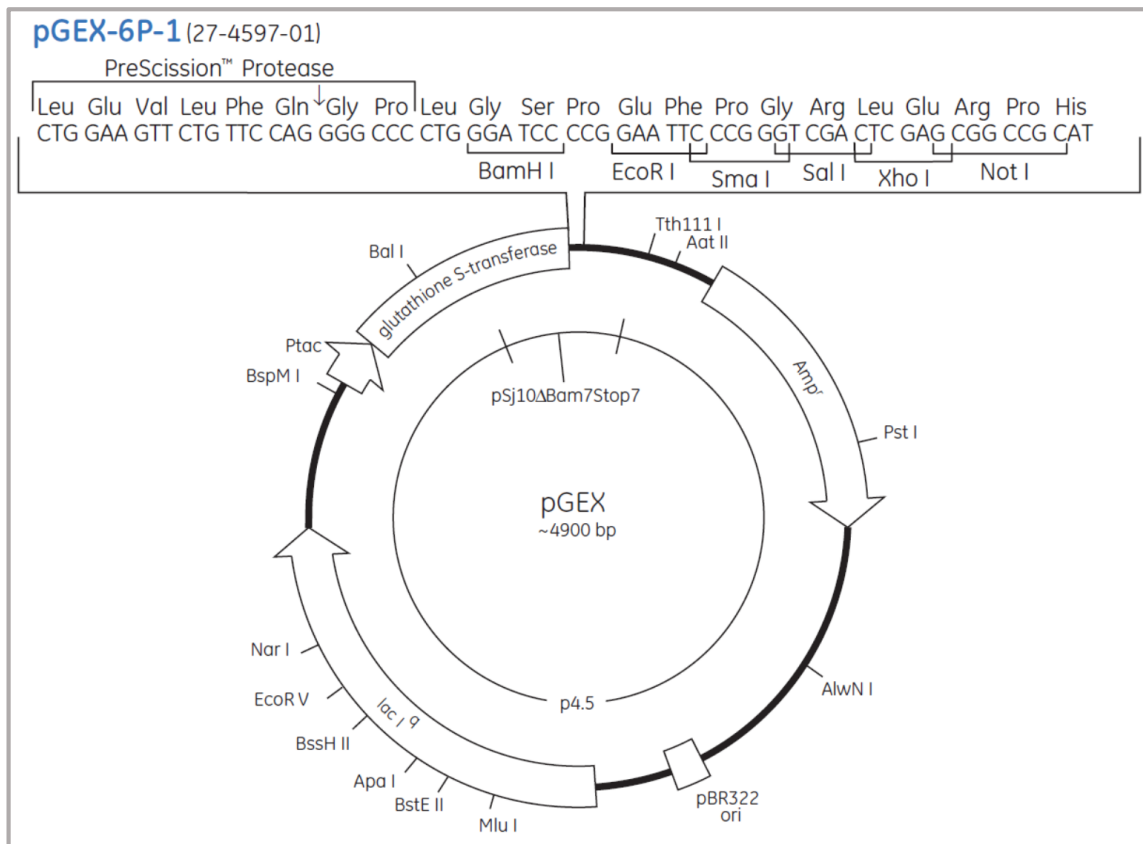


FIGURE 6.1 : pGEX-6P-1 ET DETAIL DE LA CASSETTE DE CLONAGE.

>embl|U78872|Cloning\_Vector\_pGEX-6P-1, Complete\_Sequence. + Insert *SEC<sub>epi</sub>*

acgttatcgactgcacggcgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggatggctgtgcaggtcgtaaactcactg  
 cataattcgtgtcgtcaaggcgcactcccgttctggataatgtttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatga  
 gctgttgacaattaatcatcggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagtattcatgtccccta  
 tactaggttattggaaaattaagggccttgtgcaaccactcacttcttttgaatatctgaagaaaaatgaagagcatttgtat  
 gagcgcgatgaaggatgataaatggcgaacaaaaagttgaattgggttggagttccaatcttcttattatattgatggatgat  
 taaattaacacagtctatggccatcatacgttatatagctgacaagcacaacatgttgggtggttgcaaaagagcgtgcagagatt  
 tcaatgcttgaaggagcggtttggatattagatacgggtttcgagaattgcatatagtaaagactttgaaactctcaaagttgattt  
 ctagcaagctacctgaaatgctgaaaatgttcaagatcgtttatgtcataaacatatttaaatggtgatcatgtaaccatcctga  
 cttcatgtttagcgtctttagtgttttatacatggaccaatgtgcctggatgcgttccaaaattagtttgttttaaaaaacgt  
 attgaagctatcccacaaattgataagtactgaaatccgcaagtatatagcatggccttgcagggctggcaagccacgtttggtg  
 gtggcgacctcctccaaaatcggatctggaagttctgttccaggggcccctgggatcc

**GAGTCAACCAGACCTATGC** CAGATGATTTGCACAAATCAAGTGAGTTTACTGGTACGATGGGTAAT  
 ATGAAATATTTATATGATGATCATTATGTATCAGCAACTAAAGTTAAGTCTGTAGATAAATTTTTGGC  
 ACATGATTTAATTTATAACATTAATGATAAAAACTGAATAACTATGACAAAGTGAAAACAGAGTTAT  
 TAAATGAAGATTTAGCAAATAAGTACAAAGATGAAGTAGTTGATGTATATGGATCAAATTAATATGT  
 AACTGCTATTTTTATCCAAAGATAATG**TAGGTAAGGTTACAAGTGGTAAA**ACTTGTATGTATGGA  
 GGAATAACAAAACATGAAGGAAACCACTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTATAAGAGTTT  
 ATGAAAATAAAAGAAACACAATTTCTTTGAAGTGCAAAGTATAAGAAAAGTGTAACAGCTCAAGA  
 ACTAGACATAAAAGCTAGGAATTTTTAATTAATAAAAAAATTTGTATGAGTTAACAGTTCACCAT  
 ATGAAACAGGTTATATAAAATTTATTGAAAGTAACGGCAATACTTTTTGGTATGATATGATGCCTGCA  
 CCAGGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATACTTAATGATATACAAAGACAATAAAATGGTTGATTCTAA  
 AAGTGTGAAGATAGAAGTCCACCTTACAACAAAGAATGGATAA

ccgggtcgactcgagcggccgcatcgtgactgactgacgatctgcctcgcgcttctcggatgacgggtgaaaacctctgacacatg  
 cagctcccgggagacggcagcagcttctgtgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgctcagcgggtgttggcgg  
 gtgtcggggcgagccatgaccagtcacgtagcagatagcggagtgtataattctgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatt  
 tttataggttaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatt  
 ttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaagagtatgagta  
 ttcaacatttccgtgtcgccttattccctttttgcggcatttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaagat  
 gctgaagatcagttgggtgcagagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaa  
 cgtttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgttgcgcccgggcaagagcaactcggcgcgg

catacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatg  
cagtgctgccataacctgagtgataaactgcgccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttt  
gcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacacca  
cgatgctgcagcaatggcaacaacgttgcgaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactg  
gatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgag  
cgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtccaggca  
actatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatata  
tacttttagattgatttaaaacttatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacg  
tgagtttctgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgctaatctgctgcttg  
caacaaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagca  
gagcgcagatacacaactgtccttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgc  
tctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtgggcagataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataag  
gcgcagcggctcgggctgaacggggggttctgtcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagc  
gtgagctatgagaaagcgccacgcttccgaagggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcaggggtcggaaacaggagagc  
gcacgaggagcctccaggggaaacgcctggatctttatagctctgtcgggttccgacactgacttgagcgtcgattttgtga  
tgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaagccagcaacgcggcctttttacggttctggccttttctggccttttctcacat  
gttctttctcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagttagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccga  
gcgcagcaggtcagtgagcaggaagcggaaagcgcctgatgaggatcttctccttacgcatctgtgagggtatttcacaccgcat  
aaattccgacaccatcgaatgggtcaaaaccttctcgggtatggcatgatagcggcgaagagagtcaattcaggggtggtgaatgt  
gaaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagatgcccgggtctcttatcagaccggttcccgcgtggtgaaccaggccagccagtt  
tctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattccaaccgctggcacaacaactggcgggca  
aacagtcgttctgattggcgttccacctccagctgcccctgcacgcgctcgcgcaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgat  
caactgggtgccagcgtgggtgctgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgggtgcacaatcttctcgcgca  
acgctcagtgaggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgcattgctgtggaagctgcctgactaatgttccggcgttat  
ttcttgatgtcttgaccagacaccatcaacagtatttttctccatgaagacggtagcgcgactgggctggagcatctggtcgcgca  
ttgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgctggtggtggcataaatatctcac  
tcgcaatcaaatcagccgatagcggaaacgggaaggcactggagtgccatgtccggtttcaacaaccatgcaaatgctgaatg  
agggcatcgttcccactgcgatgctggttccaacgatcagatggcgtgggcaatgcccgcattaccgagtcgggctgcgcg  
ttggtgaggatctcggtagtgggatacagcagataccgaagacagctcatgttatatcccgcgtcaaccacatcaaacaggattt  
tcgctgctggggcaaacaccagcgtggaccgcttctgcaactctcagggccaggcgggtgaagggaatcagctgttggcctctc  
actggtgaaaagaaaaaccacctggcgccaatacgaacaccgcttccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcac  
gacaggttcccgactggaaagcgggagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccaccaggctttacac

tttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgaccatgattacggattcac  
 tggccgctgcttttacaacgctcgtgactgggaaaaccctggcgttaccaacttaatgccttgagcacatccccctttccgagctgg  
 cgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgcccttccaacagttgcgagcctgaatggcgaatggcgctttgctggttccggca  
 ccagaagcgggtccggaaagctggctggagtgcgatcttctgaggccgatactgtcgtcgtcccctcaaactggcagatgcaggt  
 tacgatgcgcccattacaccaacgtaacctatcccattacggtcaatccgcccgtttgtcccacggagaatccgacgggtgttactc  
 gctcacatttaattgtgatgaaagctggctacaggaaggccagacgcaattatgttggatggcggttgaatt

gggccct.....correspond au tag +5 GPLGS de l'extrémité N-ter de *sec<sub>Epi</sub>* recombinante.

GAGTCAAC.....PGEX1: amorce de clonage 1

TAGGTAAG.....PGEC2: amorce de clonage 2

GAGTCAACCAG..... Gène *sec<sub>Epi</sub>*

## 6.2. LISTE DES COMMUNICATIONS

### 6.2.1. ARTICLES PUBLIES, ACCEPTES, SOUMIS OU EN COURS DE REDACTION

**Nanoukon, C.**; Argemi, X.; Sogbo, F.; Orekan, J.; Keller, D.; Affolabi, D.; Schramm, F.; Riegel, P.; Baba-Moussa, L.; Prévost, G. Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017, 307, 75–82.

**Nanoukon, C.** ; Keller, D.; Tollo, R.; Baba-Moussa, L.; Affolabi, D.; Prévost, G. Characterization of human type C enterotoxin produced by clinical *S. epidermidis* isolates. (Article soumis dans « Toxins »).

**C. NANOUKON**, E.G. Dassou, M. DOUSSO, F. SOGBO, A. SINA, G. PREVOST, L.S. BABA-MOUSSA. *Staphylococcus epidermidis* producteur d'entérotoxine C impliqué dans une septicémie à foyer urinaire. *European Scientific Journal.* 2017, 13, 1857 – 7881.

Xavier Argémi, **Chimène Nanoukon**, Dissou Affolabi, Daniel Keller, Lamine Baba-moussa, Gilles Prévost. Identification of the pathogenicity island *sepi-1* bearing enterotoxins and other mobile genetic elements in a pathogenic strain of *staphylococcus epidermidis* through whole genome sequencing. (Article soumis dans « Clinical Microbiology and Infection »).

## 6.2.2. COMMUNICATION ORALE

**Chimène NANOUKON\***. Point à mi-parcours de la thèse « Importance des staphylocoques à coagulase-négative dans les infections primitives sévères: Recherche de nouveaux facteurs de virulence ». Réunion de l'EA-7290 Virulence bactérienne précoce, 25 novembre 2016, Institut de Bactériologie de Strasbourg, France.

## 6.2.3. COMMUNICATIONS AFFICHEES

**Chimène NANOUKON\***, Xavier ARGEMI, Frédéric SOGBO, Jeanne OREKAN, Philippe RIEGEL, Dissou AFFOLABI, Daniel KELLER, Lamine BABA-MOUSSA, Gilles PREVOST. Microbiological characterization of clinically significant coagulase-negative staphylococci isolates from various clinical specimens at the Hubert Koutoukou Maga National Hospital center of Cotonou (Benin). Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (SMS), 3 Mars 2016, Strasbourg, France.

**Chimène NANOUKON\***, Xavier ARGEMI, Frédéric SOGBO, Jeanne OREKAN, Philippe RIEGEL, Dissou AFFOLABI, Daniel KELLER, Lamine BABA-MOUSSA, Gilles PREVOST. Microbiological characterization of clinically significant coagulase-negative staphylococci isolates from various clinical specimens at the Hubert koutoukou Maga National Hospital Center of Cotonou (Benin). 23<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), 22-23 Mars 2016, Institut Pasteur – Paris, France.

**Chimène NANOUKON\***, Frédéric SOGBO, Jeanne OREKAN, Philippe RIEGEL, Dissou AFFOLABI, Daniel KELLER, Lamine BABA-MOUSSA, Gilles PREVOST. Identification of a staphylococcal enterotoxin C in *Staphylococcus epidermidis*. 23<sup>ème</sup> Rencontre en Toxinologie de la Société Française pour l'Etude des Toxines (SFET), 5-6 Décembre 2016, Institut Pasteur – Paris, France.

**Chimène NANOUKON\***, Dissou AFFOLABI, Daniel KELLER, Rodrigue TOLLO, Phylippe RIEGEL, Lamine BABA-MOUSSA, Gilles PREVOST. Characterization of human type C enterotoxin produced by clinical *S. epidermidis* isolates. European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX 18), 26-29 Juin 2017, Institut Pasteur – Paris, France.



### Résumé

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont généralement considérés comme des pathogènes opportunistes à faible virulence. Cependant, des études antérieures ont rapporté une pathogénicité de certaines souches similaire à celle observée chez *S. aureus* ce qui laisse supposer l'expression de facteurs de virulence. Cette thèse vise à contribuer à l'importance des SCN dans les infections primitives sévères. Nous avons évalué le potentiel pathogène de souches cliniques de SCN au Bénin. Pour atteindre cet objectif, des SCN associés à diverses infections cliniques sévères ont été collectés sur une période de 10 mois au Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou Maga à Cotonou. Ces souches sont identifiées d'abord par la galerie API® Staph, puis par la spectrométrie de masse MALDI-TOF et analysées pour leur susceptibilité aux antibiotiques et leur capacité à produire des facteurs de virulence. Cette partie de l'étude a montré que les espèces les plus impliquées dans les infections à SCN au Bénin sont : *S. haemolyticus* et *S. epidermidis* suivi d'autres espèces comme *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. arlettae*, *S. capitis*. Nous avons aussi apporté la preuve de la multi-résistance des souches aux antibiotiques, ainsi que de la présence d'au moins un, voire plusieurs facteurs de virulence tels que la protéase, l'estérase, l'hémolysine, la leucotoxine et l'entérotoxine staphylococcique C chez 44% des souches testées particulièrement dans les souches hospitalières isolées d'hémocultures. Ensuite, nous avons caractérisé un nouveau facteur de virulence identifié chez deux souches de *S. epidermidis* : l'entérotoxine staphylococcique C nommée SEC<sub>epi</sub> qui a été dosée à environ 100 µg/mL dans les surnageants de culture bactérienne. Le gène *secepi* est constitué de 801 pb correspondant à 266 acides aminés. Sur la base des résultats de la comparaison d'homologie entre la chaîne peptidique de SEC<sub>epi</sub> et les séquences déjà connues, nous avons constaté que SEC<sub>epi</sub> est proche de SEC3 de la souche de *S. aureus* Mu3, avec trois substitutions d'acides aminés dans le peptide signal et neuf substitutions d'acides aminés dans la protéine mature. Cependant, plusieurs résidus qui sont impliqués dans la formation du complexe trimoléculaire CMH-SEC-TCR sont conservés dans SEC<sub>epi</sub>. L'analyse de la protéine recombinante (rSEC<sub>epi</sub>) révèle une parenté antigénique et une forte homologie structurale prédite avec SEC<sub>aureus</sub>. De plus, cette toxine présente les activités biologiques caractéristiques d'un superantigène (SAG) incluant la stimulation de la mitogénicité et de la production concomitante de fortes doses de cytokines pro-inflammatoires et suppressives chez des lymphocytes T humains activés. Par ailleurs, SEC<sub>epi</sub> résiste assez bien au chauffage à 100°C et à la digestion par les enzymes gastro-intestinales telles que la pepsine et la trypsine. Ces résultats fournissent la preuve que SEC<sub>epi</sub> peut agir comme un superantigène chez l'hôte humain bien que le type sauvage comporte plusieurs mutations chez *S. epidermidis*. L'étude du dossier médical de l'un des patients a montré que l'entérotoxine produite par la souche de *S. epidermidis* a bien pu être à l'origine d'éléments de gravité du tableau clinique présenté par ce dernier à son admission en hospitalisation. Enfin, l'analyse génomique des deux souches toxigènes de *S. epidermidis*, ainsi que leur aptitude à former du biofilm, confirment les possibilités variées d'échanges génétiques entre cette espèce et *S. aureus*. Cette thèse souligne l'importance de la surveillance des infections à SCN chez l'homme parce que certaines souches, à l'instar de *S. aureus*, produisent des facteurs de virulence pouvant aggraver l'état générale l'hôte.

**Mots clés :** Staphylocoque à coagulase négative, facteurs de virulence, entérotoxines, superantigènes, mitogénicité, échanges

### Abstract

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are generally considered as opportunistic pathogens with low virulence. However, previous studies have reported pathogenicity of some strains similar to that observed in *S. aureus*. This thesis aims to contribute to the importance of SCN in severe primitive infections. First, we evaluated the pathogenic potential of clinical CNS strains in Benin. To achieve this objective, CNS associated with various severe clinical infections were collected over at the Hubert Koutoukou Maga National Hospital and University Center in Cotonou. These strains are identified as well as their susceptibility to antibiotics and their ability to produce virulence factors. This part of the study showed that the most involved species in Benin are: *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* followed by other species such as *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. arlettae*, *S. capitis*. We also demonstrated the multi-resistance of strains to antibiotics, as well as the presence of potential virulence factors such as protease, esterase, hemolysin, leukotoxin and, enterotoxin Staphylococcal C in 44% of strains tested particularly in hospital strains isolated from blood cultures. We, then, characterized a new virulence factor identified in two strains of *S. epidermidis*: staphylococcal enterotoxin C called SEC<sub>epi</sub>, which was secreted at ~100 µg/mL in bacterial culture supernatants. The *secepi* gene consists of 801 bp corresponding to 266 amino acids. On the basis of the comparison between the peptide chain of SEC<sub>epi</sub> and the already known peptide sequences of the SEC, we found that SEC<sub>epi</sub> is close to SEC3 of *S. aureus* Mu3 strain with three amino acids substitutions in the signal peptide and nine amino acid substitutions in the mature protein. However, most residues involved in formation of the tri-molecular complex CMH-SEC-TCR are conserved in SEC<sub>epi</sub>. Analysis of the recombinant protein (rSEC<sub>epi</sub>) revealed antigenic relationships and a strong structural homology is predicted with SEC<sub>aureus</sub>. Moreover, this toxin exhibits the biological activities characteristic of a SAG including the stimulation of the mitogenicity and the concomitant production of high doses of pro-inflammatory and suppressive cytokines in activated human T lymphocytes. Moreover, SEC<sub>epi</sub> is resistant to heating at 100 °C and digestion by gastrointestinal enzymes such as pepsin and trypsin. These results provide evidence that SEC<sub>epi</sub> can act as a superantigen in humans although the wild type has several mutations in *S. epidermidis*. The study of the medical record of one of the patients showed that the enterotoxin produced by the strain of *S. epidermidis* might be at the origin of severity of the clinics presented at hospital admission. Finally, genomic analysis of the two toxigenic *S. epidermidis* strains confirms the varied possibilities of genetic exchange between this species and *S. aureus*. This thesis underscores the importance of monitoring CNS infections in humans because some strains, like *S. aureus*, produce virulence factors that can aggravate the overall host condition.

**Key words:** Coagulase-negative staphylococci, virulence factors, enterotoxins, superantigens, mitogenicity, genetic exchange.