



UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale Sciences de la Vie



Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie

Thèse

N° 38 /EDSV

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

OPTION : SCIENCES DE LA VIE

Spécialité : Biochimie, Biologie Moléculaire et Microbiologie.

**Antibiorésistance et variabilité de la production
des facteurs de virulence produits par les souches
de *Staphylococcus aureus* d'origines clinique et
alimentaire.**

Présentée et soutenue, le 13 Décembre 2012

Par Mr. SINA OROU S. M. Abdel Haziz

Devant le Jury composé de :

Président Mr. Fatiou TOUKOUROU

Professeur Titulaire Université d'Abomey Calavi (BENIN).

Membres Mr. Joseph D.HOUNHOUIGAN

Professeur Titulaire Université d'Abomey Calavi (BENIN), **Examineur.**

Mr. Mamoudou H.DICKO

Professeur Titulaire Université de Ouagadougou (Burkina Faso), **Rapporteur.**

Mr. Alphonse SEZAN

Maître de Conférences Université d'Abomey Calavi (BENIN), **Rapporteur.**

Mr. Tchadjobo TCHACONDO

Maître de Conférences Université de Lomé (TOGO), **Rapporteur.**

Mr. Lamine Saïd BABA-MOUSSA

Maître de Conférences Université d'Abomey Calavi (BENIN), **Directeur de thèse.**

DEDICACES*A :**Mes parents,*

Infatigables artisans de la personnalité qui se forge en moi. Que ce travail soit l'expression de ma profonde gratitude.

Mon épouse et ma fille Gnanki Ayan,

Maintenant, c'est un nouveau chapitre de notre vie qui va commencer et j'espère vous avoir toujours à mes côtés pour réaliser et affronter tout ce que la vie nous réserve désormais.

Mes frères et sœurs

Vos soutiens ne m'ont jamais fait défaut, j'ai de la chance de vous avoir. Que ce travail soit l'expression de mon Merci.

REMERCIEMENTS

Au Professeur BABA-MOUSSA Lamine Saïd: mes premières pensées durant la rédaction de ce manuscrit sont allées vers vous, sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Professeur, depuis la Maîtrise de Biochimie où je vous ai eu comme enseignant, je n'ai jamais manqué de votre soutien et de vos conseils. Merci. Merci aussi pour m'avoir fait partager votre expérience et votre culture scientifique et pour votre confiance qui est source intarissable de motivation. Travailler sous votre direction a été un plaisir et un honneur pour moi. Difficile de vous remercier en quelques phrases tant je vous suis redevable. Simplement, j'ai pu réaliser ce travail en toute sérénité dans des conditions idéales grâce à vous, alors, comme on le dit chez nous « NAGBE ».

Au Professeur TOUKOUROU Fatiou, Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi : Éminent spécialiste en microbiologie que vous avez enseigné et que vous continuez d'enseigner à toute une génération d'étudiants dont je fais partie. Je vous remercie pour l'immense intérêt accordé à notre travail en le suivant pas à pas en tant que membre de mon comité de thèse. Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de jury et d'en être le président.

Au professeur HOUNHOUGAN D. Joseph, Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences Agronomique de l'Université d'Abomey-Calavi, Responsable du DEA Nutrition et Sciences Alimentaires : votre présence dans ce jury est un honneur pour nous. Merci pour tout ce que vous faites pour le rayonnement de la jeunesse dans notre Université. Je vous sais gré pour votre disponibilité à juger cette thèse, soyez assuré de ma sincère gratitude.

Au Professeur DICKO H. Mamoudou, Professeur Titulaire à l'UFR Sciences de la Vie et de la Terre (SVT) de l'Université de Ouagadougou (Burkina Faso). Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements pour le temps et la peine consacrés. C'est un grand honneur pour moi de vous compter dans le jury de cette thèse.

Au Professeur TCHACONDO Tchadjobo, Maître de Conférences à l'Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA) de l'Université de Lomé (Togo). Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements pour le temps et la peine consacrés. C'est un honneur pour moi de vous compter dans le jury.

Au Professeur SEZAN Alphonse, Maitre de Conférences à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Responsable du Master de Physiologie Cellulaire et Applications : je tiens à vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté sur mon travail en le suivant avec bienveillance en tant que membre de mon comité de thèse. Merci de faire partir de ce jury.

Au Professeur PREVOST Gilles, MCU-PH, Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Strasbourg en France : je vous remercie très particulièrement pour votre aide précieuse dans la purification des anticorps anti-leucotoxine et surtout dans la réalisation de l'Electrophorèse en Champs Pulsés. Je vous sais gré du soutien que vous ne cessez d'apporter à notre Université depuis plus de 15 ans.

Avant de m'adresser aux personnes qui m'ont aidé durant cette extraordinaire expérience qu'est cette thèse, je tiens à remercier le gouvernement de la république du Bénin à travers le projet soutien aux doctorants du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique qui m'a accordé une bourse de thèse pendant trois années universitaires. En ce moment où j'écris les dernières lignes de cette thèse, je voudrais leur témoigner ma reconnaissance pour cette aide financière dont j'ai bénéficiée. J'espère que les fruits ont porté la promesse des fleurs.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au professeur KOTCHONI O. Siméon pour ses conseils précieux, sa disponibilité et surtout pour sa rigueur scientifique qui m'a permis de progresser.

J'exprime ma profonde gratitude aux Docteurs BABA-MOUSSA Abdel Kader Farid, CHABI Nicodème, VODOUNON Cyrille Jr., TOKO Mohamed et AHYI Virgile pour leurs encouragements et conseils durant la réalisation de ce travail.

Au Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, il règne une excellente ambiance qui rend chaque jour de travail agréable. Je remercie particulièrement aux doctorants NOUMAVO Pacôme ATTIEN Yao Paul et les masters MOUSSE Wassiyath, N'TCHA Christine, DAH N. Durand, DIDAGBE Oscar, CHABI SIKA Kamirou, CHABI YAOURE Faridath, MANMA-SIROU Ibrahim, SALAMI Hafiz, AGBODJATO A. Nadège, AZONWADE François, SEMASSA Josiane, ADJILE A. Aurelle, ADIGOUN Fabienne pour leurs soutiens de divers ordres.

Au Laboratoire National de Santé Publique, j'ai une pensée particulière pour le Chef service le Dr. BANKOLE Honoré, aux Messieurs HOUNSOU François et DJOSSOU Soumaïla sans oublier Madame HOUNWANOU DESSOU Agnès pour leurs aides indispensables et je crois pouvoir dire, sans me tromper, que l'on peut compter sur vous. Merci pour tout.

Il est temps de remercier la famille sur qui je me suis toujours reposé. Je pense surtout aux familles GASSO, SINA OUNEGUI, TANTANME de Somborou (Goumori-Banikoara) particulièrement mes tantes, oncles, cousins et cousines qui m'ont toujours apporté leurs soutiens de divers ordres. J'espère toujours bénéficier de vos faveurs en tant que votre préféré. Merci pour votre amour des valeurs traditionnelles Bariba.

Enfin, un grand merci aux amis sur qui j'ai pu compter et avec qui j'ai partagé de bons et moins bons moments durant cette thèse. Tout d'abord, je remercie le Dr. Vahid M. AISSI pour sa constante présence à mes côtés. Merci à NADOR Anani, NABIOLIWA Ali et ATCHABAO Nabil qui m'ont toujours considéré comme leur frère et dont les conseils ne m'ont jamais manqué. Merci à OUPKEDJOU Mohamed dit « Malam Kaolo », à Eugène Gameli SOSSOU et à CAKPO-CHICHI Stéphane pour leurs soutiens.

Pour finir, merci à tous...

« **NAN SIARA** », Merci.

Jamais, je n'oublierai.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xiii
ABREVIATIONS ET ACRONYMES	xiv
RESUME	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
<i>Première partie: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</i> ..	5
1.1. Chapitre 1 : <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.1.1. Caractéristiques générales et nutritionnelles des <i>Staphylococcus aureus</i> ..	6
1.1.1.1. Caractéristiques générales	6
1.1.1.2. Caractéristiques nutritionnelles	6
1.1.1.3. Conditions de croissance	6
1.1.1.3.1. La Température	7
1.1.1.3.2. Le potentiel Hydrogène (pH)	7
1.1.1.3.3. La force ionique	7
1.1.1.3.4. Activité de l'eau (aw)	7
1.1.1.4. Autres facteurs influençant la croissance des <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.1.2. Epidémiologie générale de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> : un germe commensal.	8
1.1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> : agent pathogène	9
1.1.3. Facteurs de risque des infections à <i>Staphylococcus aureus</i>	10

1.2. Chapitre 2 : La virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.2.1. Le pouvoir adhésif	11
1.2.2. Pouvoir toxique	14
1.2.2.1. Les toxines à hélice alpha	14
1.2.2.1.1. La delta-hémolysine	14
1.2.2.1.2. Les peptides Phénol-Soluble Modulins « les peptides PSM »	14
1.2.2.2. Les peptides à brins beta (beta-PFTs ou leucotoxines)	15
1.2.2.2.1. L'alpha-toxine ou l'alpha-hémolysine	15
1.2.2.2.2. Les leucotoxines à deux composés	17
1.2.2.2.2.1. La gamma-hémolysine	20
1.2.2.2.2.2. La leucocidine de Pantou et Valentine (LPV)	21
1.2.2.2.2.3. La leucotoxine Luk E/Luk D	21
1.2.2.2.2.4. La leucotoxine LukM - LukF ³ -PV like	21
1.2.2.2.2.5. La leucotoxine LukS-I-LukF-I	23
1.2.2.2.2.6. La leucocidine R	23
1.2.2.3. Les entérotoxines	23
1.2.2.3.1. Effet émétique des entérotoxines	26
1.2.2.3.2. Activité superantigénique des entérotoxines	27
1.2.2.3.3. Les gènes codant les entérotoxines	29
1.2.2.3.3.1. Localisation des gènes codant les entérotoxines	29
1.2.2.3.3.2. L'expression des gènes	29
1.3. Chapitre 3 : Pouvoir pathogène de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.3.1. Les pathologies liées à la prolifération de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.3.2. Les pathologies liées aux toxines de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.3.2.1. Pathologies associées à la LPV	34
1.3.2.2. Pathologies associées aux épidermolysines	35
1.3.2.3. Pathologies liées aux entérotoxines	37
1.3.2.3.1. Choc Toxique Staphylococcique	37
1.3.2.3.2. Intoxications alimentaires	37
1.3.2.4. La maladie de Kawasaki	38
1.3.2.5. Dermite atopique	38
1.4. Chapitre 4: Traitement des infections à <i>S. aureus</i>	39
1.4.1. Les molécules antistaphylococciques	39
1.4.2. Classification des antibiotiques	39

1.4.2.1. Mécanismes de la résistance des bactéries aux antibiotiques	41
1.4.2.2. La résistance aux antibiotiques.....	43
1.4.2.2.1. Résistance à la pénicilline	43
1.4.2.2.2. Résistance à la méthicilline	43
1.4.2.2.3. Résistance à la Vancomycine	45
1.4.2.2.4. Autres résistances.....	46
1.5. Chapitre 5 : Impact socio-économique	48
<i>Deuxième partie: MATÉRIEL ET MÉTHODES....</i>	49
2.1. Types de prélèvements.....	50
2.1.1. Souches alimentaires.....	50
2.1.2. Souches cliniques.....	50
2.1.2.1. Les urines	50
2.1.2.2. Les prélèvements vaginaux	50
2.1.2.3. Les spermés.....	51
2.1.2.4. Les prélèvements urétraux.....	51
2.1.2.5. Les prélèvements de pus, ulcères de Buruli, abcès, nasal.....	51
2.1.2.6. Les prélèvements de pyomyosites et d'ostéomyélites	51
2.1.2.7. Les hémocultures.....	51
2.1.3. Détermination de la séropositivité au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Park, 2005)	52
2.1.3.1. Détection immunologique.....	52
2.1.3.2. Confirmation de la séropositivité par immuno-empreinte.....	54
2.2. Isolement-Purification-Identification des souches de <i>S. aureus</i>	54
2.2.1. Isolement.....	54
2.2.2. Identification	54
2.2.2.1. Coloration Gram	54
2.2.2.1.1. Principe.....	54
2.2.2.1.2. Réalisation de la coloration de Gram.....	56
2.2.2.2. Test de la Catalase.....	57
2.2.2.2.1. Principe.....	57
2.2.2.2.2. Réalisation du test de la catalase.	57
2.2.2.3. Test de la Coagulase.....	57
2.2.2.3.1. Principe.....	57

2.2.2.3.2. Réalisation du test de recherche de la coagulase.....	57
2.2.3. Purification	58
2.3. Détermination de la susceptibilité aux antibiotiques des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	58
2.3.1. Technique de l'antibiogramme.....	58
2.3.2. Les antibiotiques testés.....	59
2.4. Recherche des toxines	59
2.4.1. Détection phénotypique des toxines	59
2.4.1.1. Purification des composés leucotoxiques (LukS-PV et LukF-PV) par chromatographie échangeuse d'ions (FPLC) (Finck-Barbancon <i>et al.</i> , 1991 ; Joubert <i>et al.</i> , 2006).....	59
2.4.1.1.1. Principes	59
2.4.1.1.2. Purification de LukS-PV (Finck-Barbancon <i>et al.</i> , 1991).....	60
2.4.1.1.3. Purification de LukF-PV (Finck-Barbancon <i>et al.</i> , 1991).....	60
2.4.1.2. Immunoprécipitation des leucotoxines par une diffusion radiale en gel des protéines ou Méthode d'Ouchtterlony	61
2.4.1.2.1. Principe.....	61
2.4.1.2.2. Réalisation du test d'Ouchtterlony	61
2.4.1.2.2.1. Préparation du gel.....	61
2.4.1.2.2.2. Dépôt des échantillons.....	62
2.4.1.3. Recherche des entérotoxines par le Test d'agglutination:.....	62
2.4.1.4. Dosage des entérotoxines (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI) par Bio-Plex (Joubert <i>et al.</i> , 2005).....	64
2.4.1.4.1. Principe.....	64
2.4.1.4.2. Réalisation du dosage des entérotoxines par Bio-Plex.....	66
2.4.2. Détection génotypique des toxines.....	66
2.4.2.1. Principe de la PCR.....	67
2.4.2.2. Extraction de l'ADN (Adapté de Zimmemann <i>et al.</i> , 1998).....	67
2.4.2.2.1. Lyse des cellules.....	69
2.4.2.2.2. Précipitation des acides nucléiques	69
2.4.2.2.3. Purification des Acides nucléiques	69
2.4.2.3. Réalisation de la PCR	69
2.4.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	70
2.4.3. Electrophorèse en champs pulsé (PFGE)	70

2.4.3.1. Principe de la PFGE	70
2.4.3.2. Réalisation de la PFGE.....	71
2.4.3.2.1. Extraction de l'ADN	72
2.4.3.2.2. Digestion enzymatique.....	72
2.4.3.2.3. Séparation électrophorétique et révélation des profils de macro-restriction	74
2.4.3.3. Analyse des résultats	75
2.5. Traitement des données	75
<i>Troisième partie: RÉSULTATS-DISCUSSION.....</i>	76
3.1. <i>Chapitre 1 : Susceptibilité aux antibiotiques et production de toxines par les souches cliniques de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées au CNHU de Cotonou.</i>	77
3.1.1. Introduction.....	77
3.1.2. Article N°1	79
3.1.3. Conclusions et perspectives.....	87
3.2. <i>Chapitre 2 : <i>Staphylococcus aureus</i> isolés des aliments de rue au Bénin : facteurs de virulence associés et profils de résistance aux antibiotiques.</i>	88
3.2.1. Introduction.....	88
3.2.2. Article N°2	90
3.2.3. Recherche d'autres toxines et facteurs d'adhésions produits par les souches de <i>S. aureus</i>	102
3.2.3.1. Recherche des gènes codant pour des toxines secretées par les souches alimentaires de <i>S. aureus</i>	102
3.2.3.2. Recherche des gènes codant des facteurs d'adhésion chez les souches alimentaires de <i>S. aureus</i>	103
3.2.4. Conclusion et perspectives	105
3.3. <i>Chapitre 3 : Etude de la corrélation entre l'antibiorésistance et la présence des facteurs de virulence associés aux souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées d'infections cutanées et profondes.</i> 106	
3.3.1. Introduction.....	106
3.3.2. Article N°3	108
3.3.3. Conclusion et perspectives	145

3.4. <i>Chapitre 4 : La Leucocidine de Panton et Valentine (LPV) : facteur de virulence majeur associé aux infections cutanées ?</i>	146
3.4.1. Introduction.....	146
3.4.2. Article N°4	148
3.4.3. Conclusion et perspectives	155
<i>CONCLUSION GÉNÉRALE</i>	156
<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	156

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figure 2: Protéines de Surface de <i>S. aureus</i>	12
Figure 3: Modélisation du pore monomérique (A) et heptamérique (B) formé par l' α -toxine de <i>S. aureus</i>	16
Figure 4: Structure tridimensionnelle de LukS-PV (A) et de LukF-PV (B) produit par <i>S. aureus</i>	16
Figure 5: La famille des leucotoxines de staphylocoque: Schéma des différentes combinaisons des gènes chromosomiques codants et leur fréquence	18
Figure 6: Mode d'action des leucotoxines à deux composés de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Figure 7: Représentation schématique du mode d'action de la LPV sur les macrophages	22
Figure 8 : Mécanisme d'Action de la LPV dans les poumons	22
Figure 9: Mode d'action d'un superantigène.....	28
Figure 10: Structure et fonctionnement du locus <i>agr</i>	32
Figure 11: Photos d'un malade d'impétigo (a) de la face et (b) bulleux.....	36
Figure 12: Photo d'un nourrisson souffrant du syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée.	36
Figure 13: Cibles des antibiotiques dans la cellule bactérienne.....	40
Figure 14: Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries	41
Figure 15: Introduction/ utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figure 16 : Structure de la penicilline (A) et un mécanisme de d'hydrolyse du cycle β -lactame (B)	44

Figure 17 : Structure chimique du peptidoglycane de <i>S. aureus</i>	46
Figure 18 : Représentation schématique du test ELISA	53
Figure 19 : Schéma résumant les différentes étapes du western blot.	55
Figure 20 : Représentation d'un arc de précipitation suite à un test d'Ouchterlony	63
Figure 21 : Gabarit de perforation des puits indiquant la disposition des solutions utilisées ..	63
Figure 22 : Microbilles du kit Bio-Plex : 100 billes différentes présentent un spectre de couleur rouge et infrarouge permettant le dosage de 100 analytes différents d'un même échantillon ..	64
Figure 23 : Etapes du dosage des entérotoxines par Bio-Plex	65
Figure 24 : Analyse de la réaction par le Bio-Plex Array Reader.	65
Figure 25 : Schéma résumant les différentes étapes de la PCR	68
Figure 26 : Schéma résumant le principe de l'électrophorèse en champs pulsés (PFGE).....	71
Figure 28 : Schéma résumant les différents traitements subis par les plugs d'ADN	73
Figure 27 : Photo du système d'électrophorèse en champ pulsé	74
Figure 29 : Fréquence des gènes de quelques toxines identifiées chez les souches de <i>S. aureus</i> isolées d'aliments de rue à Cotonou (Bénin).....	103
Figure 30 : Proportion des gènes codant pour des facteurs d'adhésion chez les souches de <i>S. aureus</i> alimentaires.....	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques majeures des entérotoxines staphylococciques.....	24
Tableau II: Classification des entérotoxines basée sur l'homologie des séquences.....	26
Tableau III: Support génétique des gènes de quelques entérotoxines staphylococciques.....	30
Tableau IV: Protéines de surface impliquées dans l'adhésion.....	35
Tableau V: Classes et molécules antistaphylococciques	40
Tableau VI : Les antibiotiques représentatifs et leurs mécanismes de résistance.....	44

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

A: Absorbance	HlgB : Composé de classe F de la γ -hémolysine
ADN: Acide désoxyribonucléique	kB : Kilobase
ARN : Acide ribonucléotidique	kDa : Kilodalton
ATP : Adénosine triphosphate	LPV : Leucocidine de Pantton et Valentine
BET : Bromure d'éthidium	LTB4 : Leucotriène B4
<i>clfA</i> : Locus codant le Clumping Factor A	LukF-PV : Composé de classe F de la LPV
<i>clfB</i> : Locus codant le Clumping Factor B	<i>luk-PV</i> : Locus codant pour la LPV
<i>cna</i> : Locus codant la Collagen-Binding Adhesin	LukS-PV : Composé de classe S de la LPV
ddNTP : didésoxynucléotide triphosphate	NFkB: Nuclear factor kappa B
dNTP: désoxynucléotide triphosphate	PBS: Phosphate Buffered Saline
EDIN: Epidermal Cell Differentiation Inhibitor	PEG: Polyéthylène glycol
<i>edinA</i> : Locus codant la Epidermal cell differentiation inhibitor A	PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
<i>edinB</i> : Locus codant la Epidermal cell differentiation inhibitor B	PFT: Pore-Forming Toxin
<i>edinC</i> : Locus codant l'Epidermal cell différenciation inhibitor C	PLP: Protéines Liant la Pénicilline
EDTA: Ethylène diamino tétra acétique acide	PN : Polynucléaires neutrophiles
<i>etA</i> : Locus codant la Exfoliative Toxin A	Rnase : Ribonucléase
<i>etB</i> : Locus codant la Exfoliative Toxin B	SARM: <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
<i>etD</i> : gène de Exfoliative Toxin D	SASM: <i>S. aureus</i> sensible à la méthicilline
<i>hlg</i> : Locus codant la γ -hémolysine	SDS: Sodium dodécyl sulfate
HlgA : Composé de classe S de la γ -hémolysine	TE: Tris EDTA
	TEB : Tris-borate-EDTA
	Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
	TSST-1: Toxic Shock Syndrome Toxin -1

RESUME

Staphylococcus aureus est un pathogène et commensal qui colonise le plus souvent le nez et la peau des patients. Cette bactérie est responsable de plus de 20% des infections nosocomiales ce qui augmente le coût de l'hospitalisation. L'importance de son pouvoir pathogène est due à sa capacité à produire une grande variété de facteurs de virulence et à sa résistance aux antibiotiques. L'objectif de notre étude était de contribuer à l'amélioration des méthodes de diagnostic pour une meilleure prise en charge des malades par la détermination des facteurs de virulence des souches *S. aureus* en fonction de leurs origines de prélèvement ainsi que leur antibiorésistance.

Les souches bactériennes étudiées dans cette thèse étaient d'origines cliniques et alimentaires. La susceptibilité à 29 antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion de disque sur gélose Muller Hinton. La production des leucotoxines et des exfoliatines a été détectée par la méthode d'immunoprécipitation radiale utilisant des anticorps spécifiques purifiés par affinité. Les gènes codant les facteurs d'adhésion et les entérotoxines ont été recherchés par la PCR multiplex. L'électrophorèse en champs pulsés a permis de réaliser la discrimination des souches. La production des entérotoxines a été dosée par la méthode du Bioplex.

Les résultats ont montré l'existence d'une association entre certains facteurs de virulence et certaines infections. La leucocidine de Panton et Valentine (LPV) s'est révélée être le facteur de virulence majeur associée à plus de 90% des cas de furoncles. Cette toxine était également associée à plus de 80% des infections cutanées. La leucocidine Luke/LukD a été produite par 80% des souches de *S. aureus* d'origine alimentaire ce qui expliquerait son rôle dans les toxi-infections alimentaires. Nos résultats ont montré également une variabilité dans la résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* en fonction de leurs origines de prélèvement en association avec la production de toxine. Les souches résistantes à la méthicilline (SARM) et productrices de PVL ont été isolées aussi bien en milieu hospitalier que dans la communauté. Ces SARM-PVL+ ont été rapportés dans le monde et constituent une grave menace pour la santé publique. Pour la majorité des maladies causées par *S. aureus*, la pathogénie est multifactorielle, il est donc difficile de déterminer avec précision le rôle d'un facteur de virulence donné. Cependant, il y a des corrélations entre les souches isolées à partir de maladies particulières et l'expression de facteurs de virulence particuliers, ce qui peut suggérer un rôle dans la pathologie de ces maladies.

L'application de la biologie moléculaire ciblée sur une large variété de facteurs de virulence associés aux infections à *S. aureus* devrait conduire à des progrès significatifs dans la prise en charge rapide des malades.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, facteurs de virulence, antibiotiques, PCR multiplex, toxines, facteurs d'adhésion, leucocidine, entérotoxines, Bénin.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a versatile pathogenic and commensal bacterium which more often colonizes patient's nose and skins. This bacterium is responsible for more than 20% of nosocomial infections, increasing the hospitalization cost. The success of *S. aureus* as a pathogen is not only due to its ability to express a variety of virulence factors but also to its exceptional ability to develop resistance to antimicrobial agents. Our work aimed to contribute to the improvement of diagnostic methods for a better care of patients by determining *S. aureus*' strains virulence factors depending on their sampling origin and their antibiotic resistance profile.

The studied bacteria in this thesis were isolated from clinical and alimentary samples. The susceptibility to 29 antibiotics agents has been determined by the Muller Hinton disc diffusion method. The production of leukotoxins and exfoliantines toxins has been detected by radial immunoprecipitation method using specific antibodies purified by affinity. The genes encoding for factors of adhesions and enterotoxins have been sought by multiplex polarization chain reaction (PCR). The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) enabled realize the discrimination of *S. aureus*. The production of enterotoxins was detected by Bioplex assay.

The results showed an existing link between some virulence factors and some infections. The Pantone and Valentine Leukocidin (PVL) appeared as the major virulence factor associated to more than 90% of furuncles cases. This toxin was also associated to more than 80% of skin infections. The leukocidin Luke/LukD was produced by 80% of *S. aureus* strains isolated from alimentary sources; this may explain its implication in food poisonings. Our results also showed variability in *S. aureus*' strains resistance to antibiotics agents according to their sampling origin and their toxins production profile. *Staphylococcus aureus* strains that resist to Methicillin (MRSA) and produce PVL were isolated in both hospital and communities. Those SARM-PVL + have been reported all over the world and constitute a public health issue. Concerning most of the diseases caused by *S. aureus*, the pathology remains multi-factorial and it is therefore difficult to point out the precise role of a given virulence factor. However, there is a correlation between strains isolated from specific diseases and the expression of particular virulence factors. Such fact may suggest a specific role of a given virulence factors in particular pathology of diseases.

The application of molecular biology focused on a wide variety of virulence factors associated to *S. aureus*' infections should lead to significant progress in the care of patients.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, virulence factors, antibiotics, multiplex PCR, toxins, adhesion factors, leukocidins and enterotoxins, Benin.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Staphylococcus aureus est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme. Trente à cinquante pour cent d'individus sains sont porteurs de ce germe. Ubiquiste et saprophyte, *Staphylococcus aureus* est une bactérie à coloration de Gram positive, appartenant à la famille des *Staphylococcaceae* (Ludwig *et al.*, 2009). Cette bactérie qui est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme est l'une des espèces les plus couramment isolées en milieu hospitalier. Elle est impliquée dans la survenue d'infections nosocomiales (Laupland *et al.*, 2003 ; Farr, 2006 ; Klein *et al.*, 2007) et représente le deuxième agent pathogène responsable de ce type d'infections après *E. coli* (Emori & Gaynes, 1993). Mais son isolement en milieu communautaire est également de plus en plus fréquent (Frazee *et al.*, 2005 ; Moran *et al.*, 2006).

Les infections à *S. aureus* sont très polymorphes, allant d'atteintes suppuratives superficielles cutané-muqueuses bénignes comme les folliculites, les furoncles, les impétigos ou les panaris à des pathologies mettant en jeu le pronostic vital comme les septicémies à l'origine de localisations viscérales pleuro-pulmonaires (abcès bulleux), cardiaques (endocardites aiguës), ostéoarticulaires (ostéomyélites) ou urinaires (Lowy, 1998). En plus de ces infections, on peut citer les toxémies staphylococciques qui sont dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé. Ces toxémies regroupent les syndromes cutanés staphylococciques, le choc toxique staphylococcique (TSST) et les intoxications alimentaires (Prevost, 2004).

Plusieurs facteurs expliquent la fréquence et la gravité des infections à *S. aureus*. De ce fait, la pathogénicité de cette bactérie peut être reliée à l'expression de facteurs de virulence (Gordon & Lowy, 2008). En effet, *S. aureus* produit des plusieurs exoprotéines qui lui permettent de coloniser les tissus de leurs cellules hôtes tout en se protégeant de leurs systèmes immunitaires (Coelho *et al.*, 2009). Pour ce faire, l'adhésion et la fixation de *S. aureus* sur les surfaces biologiques représentent une étape fondamentale dans l'apparition d'une infection. Après l'adhésion et la fixation, la gravité des infections dues à ce germe est déterminée par la diversité des toxines qu'il sécrète. Ainsi, de part sa capacité à produire une gamme variée de facteurs de virulence qui lui permettent d'envahir les tissus de plusieurs espèces animales, *S. aureus* est considérée comme l'espèce la plus pathogène de sa famille (Lowy, 1998). Parmi les facteurs de virulence produits, on retrouve entre autres les toxines de la grande famille des superantigènes qui sont impliquées dans les toxi-infections alimentaires (tst-1) et le syndrome de la peau ébouillantée (exfoliatines A et B) (John & Schreiber, 2006 ; Tristan *et al.*, 2007) et

les toxines à deux composés formant des pores dont la Leucotoxine de Panton et Valentine (LPV) associée à la pneumonie nécrosante (Chambers, 2005 ; DeLeo *et al.*, 2009) avec pour cible la membrane des leucocytes (McClure *et al.*, 2006 ; Morgan, 2010).

De plus, le caractère ubiquitaire de *S. aureus*, la multi-résistance de certaines de ces souches aux antibiotiques usuels notamment en milieu hospitalier et la diminution des défenses immunitaires des patients hospitalisés peuvent expliquer les caractéristiques de ces infections. En effet, *Staphylococcus aureus* a une capacité exceptionnelle à développer une résistance aux agents antibactériens (Chambers & DeLeo, 2009). C'est ainsi que les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) sont apparues dans les années 1960 (Chen *et al.*, 2011) comme des bactéries hospitalières (H-SARM) résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques telles que les quinolones, les macrolides et éventuellement l'acide fucidique, la tétracycline et la rifampicine (Morgan, 2010). Mais déjà dans les années 1990, rapporté par Chen *et al.* (2011), les nouvelles souches de SARM ont présenté deux caractéristiques : d'une part, elles sont apparues chez des patients n'ayant aucun antécédent d'hospitalisation et de ce fait baptisées SARM-communautaires (C-SARM) et d'autre part, elles sont particulièrement résistants à la méthicilline contrairement à celles hospitalières qui sont résistantes à plusieurs antibiotiques (Morgan, 2010). Ce problème que constitue la résistance est dû entre autres à la pression de sélection exercée par l'usage des antibiotiques autant dans le domaine médical qu'agricole. Tout ceci a favorisé l'émergence et la dissémination des gènes de résistance dans les populations bactériennes (Allen *et al.*, 2010). Les C-SARM sont la cause, pour la plus part du temps (77-96% des cas), des infections des tissus mous de la peau (Frazee *et al.*, 2005 ; Moran *et al.*, 2006) telles que l'impétigo, les folliculites, les abcès les cellulites (Moran *et al.*, 2006). Les modes de transmission les plus fréquemment observés dans les groupes à haut risque sont la contamination nasale (surtout pour H-SARM) et la contamination environnementale (surtout pour les C-SARM) (Chen *et al.*, 2011).

Cependant, en raison de son expansion continue, aussi bien dans le milieu hospitalier qu'en dehors, chaque étude des facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* analysant une situation particulière permet, non seulement de suivre et de comprendre son évolution, mais aussi et surtout de définir des stratégies de lutte au niveau d'un hôpital ou d'une communauté. En effet, il est démontré que la sécrétion de ces toxines par les souches dans ces infections constitue un risque de prolongement des périodes d'hospitalisation (Cupane *et al.*, 2012). Dans cet ordre d'idée, les C-SARM reconnus être sensibles à plusieurs antibiotiques sont

porteurs des gènes tels que les gènes de la Leucocidine de Pantone et Valentine (LPV) (Chen *et al.*, 2011). Ainsi, la production des toxines pourrait être liée à la nature (résistante/sensible) et/ou au lieu de prélèvement d'une souche. Les infections pourraient avoir une spécificité dans la production des toxines secrétées. Dans le but d'établir les corrélations qui existent entre l'origine de prélèvement et la production de toxines, la présente recherche se propose d'étudier la **variabilité des facteurs de virulence produits par les souches de *Staphylococcus aureus* et leur antibiorésistance en fonction de leurs origines de prélèvement**. Cette étude est une contribution à l'approfondissement des méthodes de diagnostic permettant une meilleure prise en charge des malades. Pour y parvenir, il sera spécifiquement question de :

- Rechercher les souches de *S. aureus* dans des prélèvements d'origine clinique et dans les aliments de rue ;
- Evaluer la susceptibilité de ces souches aux antibiotiques couramment utilisés en milieu hospitalier pour le traitement des infections à *S. aureus* ;
- Etudier la variabilité de production de toxines par ces souches isolées ;
- Etudier la variabilité de production de certains facteurs d'adhésion par ces souches isolées ;
- Etudier l'effet de la résistance à certains antibiotiques (Méthicilline et Vancomycine) sur la production des toxines.

La première partie de ce document sera consacrée à une revue bibliographique des connaissances relatives aux caractéristiques générales, aux facteurs de virulence, au pouvoir pathogène et aux traitements des infections de *S. aureus*. Dans la deuxième partie, la méthodologie et les méthodes analytiques utilisées seront décrites. La troisième partie sera consacrée à l'exposé et la discussion des résultats.

Première partie:
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Chapitre 1 : *Staphylococcus aureus*

1.1.1. Caractéristiques générales et nutritionnelles des *Staphylococcus aureus*

1.1.1.1. Caractéristiques générales

Décrit pour la première fois par Ogston (1882), *Staphylococcus aureus* est un pathogène majeur de l'homme causant des infections de la peau et des tissus mous, des septicémies, des pneumonies, des endocardites et des abcès profonds (Holmes *et al.*, 2005).

C'est une bactérie Gram positive de 0,5 à 1,5 µm de diamètre, asporulée, non mobile, coagulase positive et elle est groupée en amas ou en paires (Hermier *et al.*, 1992 ; Kosikowski & Mistry, 1997). C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative et chimio-organotrophe qui a un métabolisme respiratoire et fermentatif (Kloos *et al.*, 1998).

1.1.1.2. Caractéristiques nutritionnelles

Les souches de *S. aureus* présentent des exigences nutritionnelles particulières. Elles ont besoin d'une source organique d'azote (5 à 12 acides aminés) et de vitamines. Certaines souches de *S. aureus* ont besoin de différents acides aminés, particulièrement la cystine, l'aspartate et le glutamate. L'arginine, la valine, la leucine, la glycine et la proline, sont eux aussi, importants pour les besoins nutritionnels de certaines souches. Néanmoins, les besoins en acides aminés varient selon les souches (Taylor & Holland, 1989 ; Kuroda *et al.*, 2001).

En aérobiose, *S. aureus* métabolise plusieurs sucres tels que fructose, galactose, mannose, ribose, saccharose et glycérol (Kloos & Schleifer, 1986). La plupart des souches de *S. aureus* sont capables d'hydrolyser des protéines animales comme l'hémoglobine, la fibrine, l'albumine, les caséines et les peptides. De plus, ces souches peuvent utiliser comme souce d'énergie divers lipides et phospholipoprotéines. Pour se développer en conditions d'anaérobiose, il leur faut de l'uracile et une source de carbone fermentescible (Kloos & Schleifer, 1986). *S. aureus* métabolise (en anaérobiose et en aérobiose) le glucose, le lactose, le maltose et le mannitol.

1.1.1.3. Conditions de croissance

La croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines peuvent être affectées par plusieurs facteurs environnementaux comme la température, le pH, l'activité de l'eau (aw) et

la force ionique (Mossel & van Netten, 1990), la composition de l'atmosphère ou du milieu (Onoue & Mori, 1997 ; Su & Wong, 1998).

1.1.1.3.1. La Température

S. aureus peut se développer entre 7 et 46°C, mais sa croissance optimale est à 37 °C (Kosikowski & Mistry, 1997 ; Sesques & Ballot, 1998). Les températures minimale et maximale de croissance sont quant à elles distribuées de façon irrégulière entre 7 et 13°C d'une part et entre 40 et 48°C d'autre part. Les toxines peuvent être produites entre 10 et 45°C (Sesques, 1994 ; Sesques & Ballot, 1998), l'optimum étant à 40°C. La croissance de *S. aureus* et la production de toxines sont complètement inhibées à une température inférieure à 7°C (Mossel & van Netten, 1990).

1.1.1.3.2. Le potentiel Hydrogène (pH)

Pour inhiber la croissance de *S. aureus*, il faut un pH minimal de 4,0 en aérobiose et de 4,6 en anaérobiose (Mossel & Van Netten, 1990 ; Hermier *et al.*, 1992). Généralement, les souches peuvent croître entre pH 4,0 et pH 9,3 (Mossel & Van Netten, 1990 ; Fox, 1993a, b), leur optimum étant à des pH proches de la neutralité (pH 7 à 7,5). La production de toxines est aussi favorisée par un pH proche de la neutralité.

1.1.1.3.3. La force ionique

Les souches de *S. aureus* tolèrent une concentration de NaCl comprise entre 2,5 et 15%, mais leur croissance est beaucoup plus faible à 15% (Gomez-Lucia *et al.*, 1992 ; Fox, 1993a, b ; Sesques, 1994 ; Kosikowski & Mistry, 1997). Une forte augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu entraîne une diminution de la croissance bactérienne, même si certaines souches de *S. aureus* peuvent survivre dans 20% de NaCl (Eck & Gillis, 1997). Remarquons que d'autres facteurs tels que le pH, la température et l'acidité interfèrent avec l'action du NaCl (Sesques, 1994 ; Stewart *et al.*, 2002).

1.1.1.3.4. Activité de l'eau (aw)

Contrairement aux autres pathogènes, *S. aureus* peut se développer dans une gamme d'activité de l'eau (aw) comprise entre 0,86 (Qi & Miller, 2000) et 0,99 (Smith *et al.*, 1983) en condition aérobie. En anaérobiose, en dessous d'une aw de 0,90, il y a inhibition de la croissance de *S. aureus* (Mossel & Van Netten, 1990 ; Sesques, 1994). Les conditions hydriques nécessaires pour la production de toxines dépendent quant à elles du type de toxine

produite. Les toxines de type SEA et SED sont produites quelle que soit la valeur de l'aw permettant la croissance de *S. aureus*. Les productions de SEB et SEC sont très sensibles à une réduction de l'aw. Ces toxines sont fortement produites dès que l'aw est égale à 0,93 (Qi & Miller, 2000). Pour la toxine de type SEE, Thota *et al.* (1973) ont montré que la production avait lieu avec une aw de 0,92. En générale, une diminution de l'aw entraîne une diminution de la quantité de toxines produites (Sesques, 1994). Enfin, selon l'humectant utilisé, la croissance de *S. aureus* est plus ou moins affectée (Vilhelmsson & Miller 2002).

1.1.1.4. Autres facteurs influençant la croissance des *Staphylococcus aureus*

Les changements du potentiel redox de l'environnement ont un grand impact sur la cellule vivante. Des bactéries, en phase exponentielle de croissance consomment de l'oxygène et réduisent le milieu (Bespalov *et al.*, 1996 ; Aubert *et al.*, 2002). Le potentiel redox a une grande influence sur la croissance cellulaire des bactéries notamment sur leur activité métabolique, sur la perméabilité (Riondet *et al.*, 1999) et sur la fluidité membranaire (Ouvry *et al.*, 2002). De plus, le potentiel redox a une action sur la régulation de l'expression des gènes à travers les protéines à doigt de Zinc (Wu *et al.*, 1996).

En compétition avec d'autres micro organismes, *S. aureus* est très sensibles (Mossel & Van Netten, 1990). Cette sensibilité, de *S. aureus* en présence d'autres bactéries, se manifeste souvent par une inhibition de sa croissance (Bolin *et al.*, 1998 ; Benkerroum *et al.*, 2002).

1.1.2. Epidémiologie générale de *Staphylococcus aureus*

1.1.2.1. *Staphylococcus aureus* : un germe commensal.

S. aureus est un germe commensal de la peau et des muqueuses mais sa niche écologique dominante est la partie antérieure du nez (Kluytmans *et al.*, 1997). Le taux de portage nasal chez les sujets sains varie entre 20% et 55% selon la population étudiée, les méthodes de prélèvements et de cultures (Vandenbergh & Verbrugh, 1999 ; Nouwen *et al.*, 2001). Trois profils de portage nasal peuvent être distingués : environ 20% des sujets sains sont porteurs permanents, 60% sont des porteurs intermittents, et 20% ne sont pas porteurs (Kluytmans *et al.*, 1997). Ces profils peuvent changer dans le temps.

La distinction entre porteurs permanents et intermittents est importante. En effet, les porteurs permanents ont une densité bactérienne plus élevée et un risque plus important d'infection (Vandenbergh & Verbrugh, 1999). De plus, les techniques de typage moléculaire ont montré

que les porteurs persistants sont souvent colonisés avec la même souche alors que les porteurs intermittents sont colonisés, à différents moments, avec des souches génétiquement différentes (Vandenbergh & Verbrugh, 1999).

Les mécanismes impliqués dans le portage nasal sont encore mal compris. Mais il faut noter que ces mécanismes font intervenir des facteurs liés à l'hôte, des facteurs bactériens et des facteurs environnementaux (Kluytmans *et al.*, 1997 ; Vandenbergh & Verbrugh, 1999; Peacock *et al.*, 2001). De nombreux déterminants de l'hôte ont été suspectés : la race, le sexe, l'âge, des facteurs hormonaux, des altérations anatomiques nasales, une activité bactéricide des sécrétions nasales, des récepteurs sur les cellules épithéliales, une immunité locale liée aux IgA. Un taux de portage nasal plus élevé a été noté dans différents groupes : les patients hémodialysés ou sous dialyse péritonéale, les diabétiques insulino-dépendants, les patients HIV positifs, les toxicomanes intraveineux (Williams, 1963). Les facteurs bactériens font intervenir plusieurs protéines de surface de *S. aureus*. Les acides téichoïques de la paroi bactérienne joueraient un rôle essentiel dans l'adhésion à la muqueuse nasale (Weidenmaier *et al.*, 2004). Par contre, aucune caractéristique génétique pouvant expliquer le caractère intermittent ou permanent n'a été identifiée. Il existe également une compétition bactérienne avec les staphylocoques non dorés et les corynébactéries qui antagonisent le portage de *S. aureus* (Lina *et al.*, 2003). Les facteurs environnementaux comprennent l'utilisation d'antibiotiques et l'hospitalisation. Le portage nasal de *S. aureus* constitue une barrière de colonisation, empêchant l'adhésion d'autres souches. Cette barrière est altérée en cas d'antibiothérapie. Il a été montré que la vaccination anti-pneumococcique des enfants augmente le portage nasal de *S. aureus* (Bogaert *et al.*, 2004).

1.1.2.2. *Staphylococcus aureus* : agent pathogène

Staphylococcus aureus est la première cause d'infection bactérienne à travers le monde (Weems, 2001). L'incidence annuelle des infections invasives à *S. aureus* est de 28 cas pour 100 000 habitants en Amérique du Nord (Laupland *et al.*, 2003). *S. aureus* est impliqué dans 19 à 25% des bactériémies, 20 à 25% des pneumonies, 32 à 44% des infections cutanées et des tissus mous (Diekema *et al.*, 2001). *S. aureus* est la première cause de pneumopathies nosocomiales et d'infections postopératoires et la deuxième cause de bactériémies nosocomiales (Emori & Gaynes, 1993). En réanimation, *S. aureus* est impliqué dans 30% des infections nosocomiales (Vincent *et al.*, 1995). La situation épidémiologique a considérablement changé au cours des quatre dernières décennies : des souches hyper

virulentes ont émergé, responsables de chocs toxiques et de pneumonies nécrosantes gravissimes (Todd *et al.*, 1978 ; Gillet *et al.*, 2002). Enfin, notons que *S. aureus* a développé des résistances à la plupart des antibiotiques mis sur le marché, en particulier la méthicilline (*S. aureus* résistant à la méthicilline ou SARM) et plus récemment les glycopeptides (*S. aureus* intermédiaire aux glycopeptides ou GISA) faisant craindre l'émergence des souches résistantes à tous les antibiotiques connus (Hiramatsu *et al.*, 2001). Les SARM sont devenus endémiques en milieu hospitalier mais des SARM d'origine communautaire sont de plus en plus fréquemment rapportés (Chambers, 2001 ; Eady & Cove, 2003 ; Gordon & Lowy, 2008 ; DeLeo *et al.*, 2010).

1.1.3. Facteurs de risque des infections à *Staphylococcus aureus*

Les facteurs de risque de bactériémie à *S. aureus* sont les cathéters, la toxicomanie intraveineuse et les plaies cutanées (Lowy, 1998 ; Weems, 2001 ; Gonzalez *et al.*, 2003). Les facteurs de risque de pneumonies à *S. aureus* sont les infections virales respiratoires, les interventions neurochirurgicales, les traumatismes crâniens, la corticothérapie, l'infection à VIH, le diabète, la ventilation mécanique invasive (Espersen & Gabrielsen, 1981; Rello *et al.*, 1990 ; Bergmans *et al.*, 1996; Fagon *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1999).

Le portage nasal semble jouer un rôle clé dans la pathogénie des infections à *S. aureus* (Kluytmans *et al.*, 1997; Vandenberghe & Verbrugh, 1999). Le taux d'infection est plus élevé chez les porteurs dans de nombreuses situations : les infections des plaies postopératoires, les infections sur cathéters chez les patients hémodialysés, les infections du site externe de dialyse chez les patients en dialyse péritonéale, chez les patients infectés par le VIH. Les études comparant les souches isolées dans le nez et les souches isolées d'autres infections ont montré qu'elles sont le plus souvent reliées génétiquement (Pignatari *et al.*, 1990 ; Pujol *et al.*, 1996 ; Ahmed *et al.*, 1998 ; Fierobe *et al.*, 1999 ; Kreft *et al.*, 2001; Wertheim *et al.*, 2004).

On remarque alors que *Staphylococcus aureus* n'est ni un pathogène strict ni un germe opportuniste pur par sa capacité à coloniser. De plus, les infections à *S. aureus* sont très polymorphes allant d'infections cutanées bénignes comme les furoncles et les panaris aux infections mettant en jeu le pronostic vital comme les états de choc, les endocardites, les pneumonies, les infections du système nerveux central (Lowy, 1998).

1.2. Chapitre 2 : La virulence de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus produit de nombreux facteurs de virulence, incluant des facteurs associés à la paroi et des exotoxines (**Figure 1**), responsables d'une grande variété de tableaux infectieux (Lowy, 1998 ; Cunha *et al.*, 2006).

1.2.1. Le pouvoir adhésif

1.2.1.1. La protéine A

La protéine A est considérée comme une molécule reconnaissant différentes protéines du plasma et/ou de la matrice extracellulaire (MSCRAMM acronymes anglais de Microbial-Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule) car elle se lie au facteur de von Willebrand. Le facteur de von Willebrand est une glycoprotéine présente au niveau de l'endothélium lésé. La protéine A peut de ce fait jouer le rôle d'une adhésine au début d'une infection intra-vasculaire. De plus, la protéine A possède deux domaines de liaison aux immunoglobulines : un fixant le fragment Fc (partie constante) et l'autre le fragment Fab (partie variable). L'interaction protéine A-fragment Fc des immunoglobulines interfère avec l'opsonisation dépendante des anticorps, tandis que l'interaction protéine A-fragment Fab entraîne une activation polyclonale des lymphocytes B. La protéine A se comporte ainsi comme un superantigène pour les lymphocytes B (Lowy, 1998).

1.2.1.2. Les adhésines

S. aureus possède des composantes de surface, appelées adhésines, reconnaissant différentes protéines du plasma et/ou de la matrice extracellulaire. Les adhésines les mieux caractérisées sont celles qui reconnaissent le fibrinogène ou la fibrine, le collagène ou la fibronectine. La structure commune de ces adhésines qui sont aussi appelées MSCRAMMs est montrée sur la **figure 2** (Foster & Höök, 1998, Pallanza *et al.*, 1983). Les MSCRAMMs ont en commun plusieurs domaines : une séquence signal (domaine S) en position N-terminale adressant l'adhésine néo-synthétisée au niveau de la membrane plasmique ; en position C-terminale se trouvent des régions hydrophobes W et M séparées par une séquence dont le motif consensus est LPXTG ; l'extrémité C-terminale contient une région chargée positivement (Foster & Höök, 1998). Ces protéines jouent un rôle important dans la colonisation des tissus de l'hôte (Patti *et al.*, 1994). Les adhésines les mieux connues produites par *S. aureus* sont : la protéine de liaison au collagène (Cna), les protéines de liaison à la fibronectine (FnBP A et B) et les protéines de liaison au fibrinogène, nommées « Clumping factor » (ClfA, ClfB).

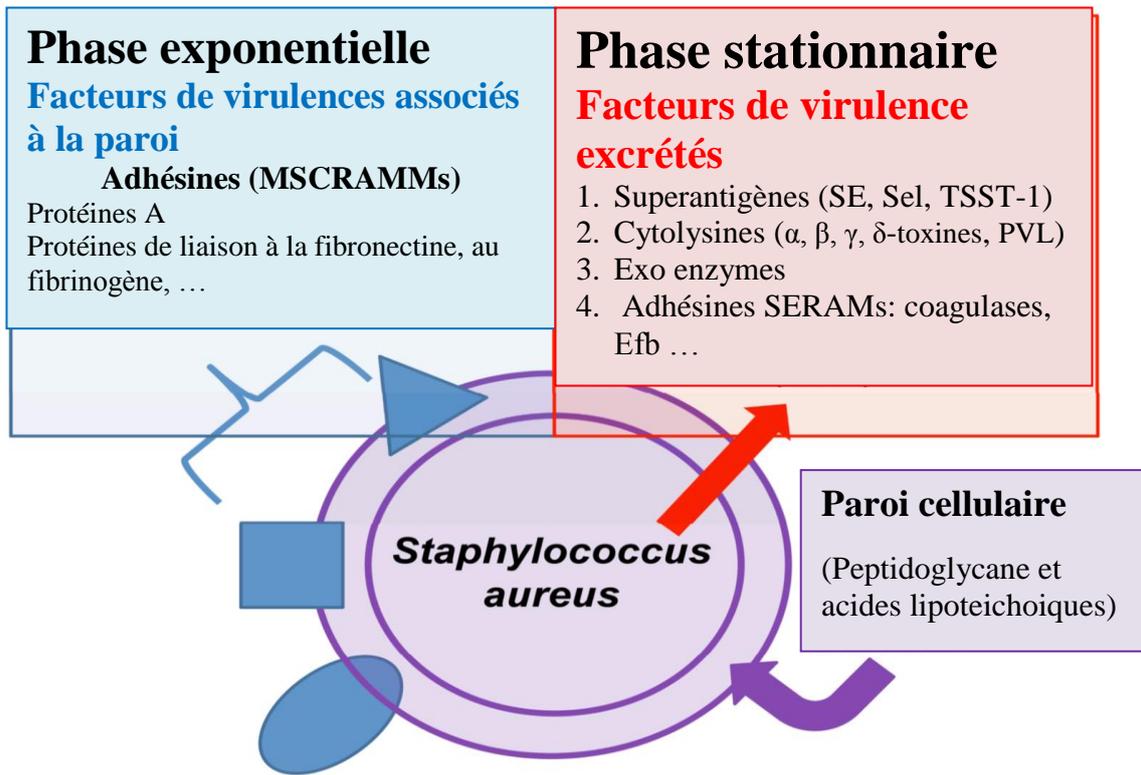


Figure 1: Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (adaptée de Schlievert *et al.*, 2010)

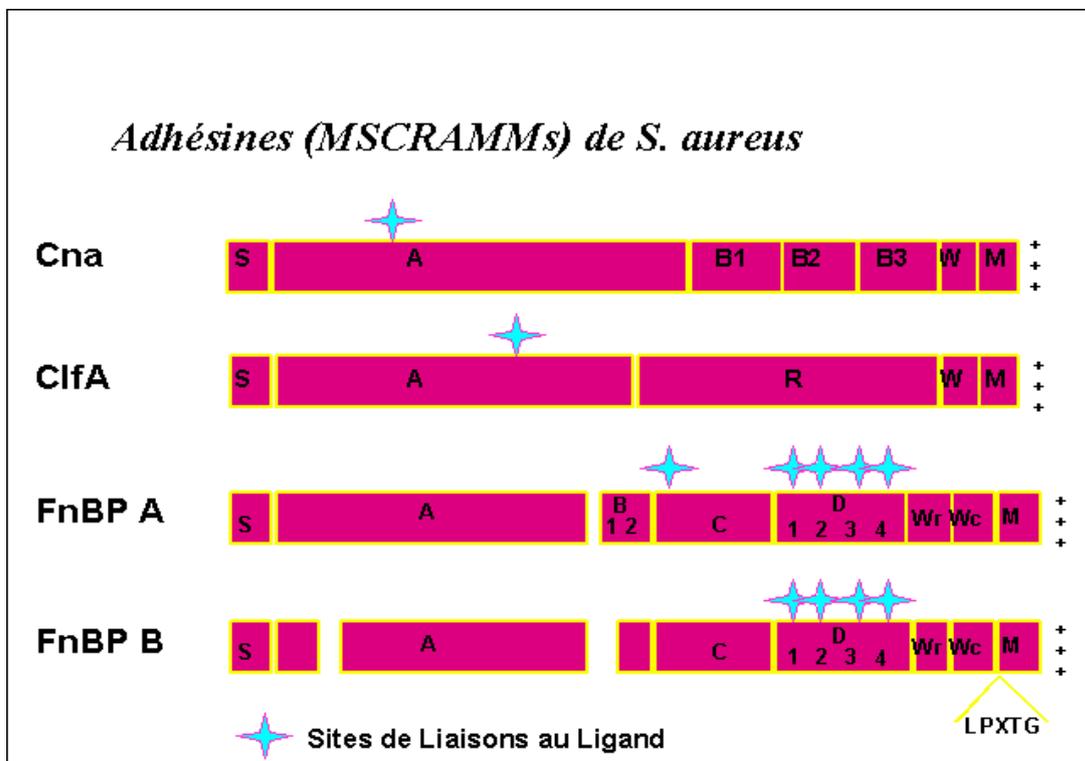


Figure 2: Protéines de Surface de *S. aureus*

1.2.1.2.1. La protéine de liaison au collagène

Le collagène est un constituant majeur des matrices extracellulaires. Une seule protéine de liaison au collagène est décrite chez *S. aureus* et le gène codant cette adhésine (*cna*) n'est pas présent dans toutes les souches (Ryding *et al.*, 1997). Cette protéine Cna semble jouer un rôle particulièrement important dans les infections ostéoarticulaires (Smeltzer & Gillaspay, 2000). La Cna possède un site de liaison à son ligand dans le domaine A. Le nombre de domaines B, qui ne lient pas le collagène, varie de 1 à 4 (**Figure 2**).

1.2.1.2.2. Les protéines de liaison à la fibronectine

Les protéines de liaison à la fibronectine (FnBPs) sont impliquées dans les phénomènes d'internalisation du staphylocoque dans la cellule endothéliale via les intégrines b1, la fibronectine pouvant former un pont entre les FnBPs et les intégrines (Sinha *et al.*, 1999 ; Fowler *et al.*, 2000). L'adhésine FnBPA permet la formation de sites d'attachement comparables à des adhésions fibrillaires qui entourent la bactérie (Schroder *et al.*, 2006). Les adhésions fibrillaires se forment par translocation des intégrines $\alpha 5\beta 1$ liées à la fibronectine en dehors des adhésions focales. Ces adhésions fibrillaires contiennent de la tensine, mais sont dénuées de la plupart des autres composants des adhésions focales (Danen *et al.*, 2002). Une étude comparant les effets *in vivo* et *in vitro* de la protéine FnBPA montre que la liaison de *S. aureus* à la fibronectine permet une invasion *in vitro* mais pas *in vivo* (Que *et al.*, 2005). La protéine FnBPA possède aussi un domaine de liaison au fibrinogène (Wann *et al.*, 2000). Ce serait la liaison au fibrinogène qui permettrait l'invasion *in vivo*. La coopération de ces deux domaines (liaison à la fibronectine et au fibrinogène) de FnBPA permettrait la colonisation, l'invasion ainsi que la persistance dans l'endocardite infectieuse (Que *et al.*, 2005). FnBPA et FnBPB possèdent un site de liaison au ligand en position C-terminale (**Figure 2**).

1.2.1.2.3. Les protéines de liaison au fibrinogène

Les protéines de liaison au fibrinogène sont nommées « Clumping factor » Clf A et ClfB (McDevitt *et al.*, 1994 ; Que *et al.*, 2001). Elles provoquent l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Il semble que le ClfB soit un déterminant majeur de la colonisation nasale à travers une interaction spécifique avec la cytokératine K10 (O'Brien *et al.*, 2002 ; Garcia-Lara *et al.*, 2005 ; Ohlsen & Lorenz, 2010). ClfA semble impliqué dans les étapes précoces de colonisation de la valve lors d'une endocardite infectieuse mais pas dans la persistance des bactéries (Que *et al.*, 2005). ClfA contient un site de liaison au ligand dans le domaine A. Le domaine R est une région contenant de nombreuses répétitions du dipeptide Asp-Ser permettant l'exposition du domaine A pour permettre l'interaction avec le ligand.

1.2.2. Pouvoir toxique

Les toxines cytolytiques ont la capacité de détruire les cellules de la défense de l'hôte (Parker & Feil, 2005) en formant des pores au niveau des membranes cellulaires. Les toxines formant des pores (en anglais Pore-Forming Toxins, PFTs) sont souvent sécrétées sous forme de monomères (Lesieur *et al.*, 1997). Leur caractéristique commune est la sécrétion par la bactérie sous forme de protéines libres hydrosolubles. En fonction des PFTs, des facteurs lipidiques ou protéiques interviennent ensuite pour permettre l'interaction de ces toxines avec les membranes de leurs cibles cellulaires. Une concentration des monomères, appelée oligomérisation, s'effectue alors à la surface cellulaire (Parker & Feil, 2005). Un pore membranaire hydrophobe se forme et la virulence de la toxine peut alors s'exprimer. Classiquement, on distingue deux grands groupes de PFTs en fonction de leur structure tridimensionnelle (Prevost *et al.*, 2001) :

- les alpha-PFTs, dont la structure secondaire est formée d'une simple hélice alpha hydrophobe ;
- les bêta-PFTs, où le pore est constitué majoritairement du brin bêta s'assemblant en tonneaux bêta.

1.2.2.1. Les toxines à hélice alpha

1.2.2.1.1. La delta-hémolysine

La delta-hémolysine, toxine de 26 acides aminés, est caractéristique des alpha-PFTs (Prevost *et al.*, 2006). L'oligomérisation se réaliserait en trimères ou en octamères. Grâce à leur structure amphipathique, chaque monomère crée des interactions pendant la formation du pore avec les phospholipides membranaires, notamment la phosphatidylcholine. La majorité des souches de *S. aureus* (97 %) synthétise cette toxine.

1.2.2.1.2. Les peptides Phénol-Soluble Modulon « les peptides PSM »

Ils représentent une famille de peptides initialement caractérisée chez *Staphylococcus epidermidis* et composée de deux sous-groupes : les peptides de type I (une vingtaine d'acides aminés) sont assez proches de la delta-hémolysine, alors que ceux de type II sont deux fois plus longs (Wang *et al.*, 2007). Chacun de ces peptides est codé par un gène spécifique, et possède une structure amphipathique organisée sous la forme d'hélices alpha. Ces peptides

sont produits en grandes quantités par les souches communautaires et participeraient au succès de l'infection par leur capacité à lyser les polynucléaires neutrophiles.

1.2.2.2. Les peptides à brins beta (beta-PFTs ou leucotoxines)

Elles peuvent être différenciées, tout comme les alpha-PFTs, par l'étude de leur structure. Leurs cibles cellulaires majeures sont les leucocytes (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages et lymphocytes), d'où l'emploi du terme de leucotoxines pour les désigner (Parker & Feil, 2005). La richesse en brins bêta est élevée, représentant de 65 à 75 % de leur structure. Ces toxines ne contiennent pas de segments hydrophobes, mais suivent de profonds remaniements conformationnels pour la formation des oligomères et du pore (**Figure 3B**). Le groupe des bêta-PFTs inclut l'alpha-toxine ou alpha-hémolysine (**Figure 3**) ainsi que les leucotoxines à deux composés formant des pores (**Figure 4**).

1.2.2.2.1. L'alpha-toxine ou l'alpha-hémolysine

Cette toxine (**Figure 3**) de 31 kDa est sécrétée en fin de phase exponentielle de croissance par 80 à 90 % des souches de *S. aureus* (Bhakdi *et al.*, 1996 ; Dinges *et al.*, 2000 ; Menestrina *et al.*, 2003 ; Montoya & Gouaux, 2003 ; Prevost *et al.*, 2001 ; 2006 ; Valeva *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007). L'activité lytique de l'alpha-toxine a été mise en évidence chez de nombreux mammifères (Kollef *et al.*, 2005) et notamment chez le lapin. Outre les globules rouges qui sont la cible principale de cette toxine, de nombreuses autres cellules (les lymphocytes T, les plaquettes, les kératinocytes et les fibroblastes) peuvent être lysées. Les monomères de l'alpha-toxine s'oligomérisent à la surface membranaire des cellules cibles et forment alors un pore heptamérique. Celui-ci induit des perturbations au niveau de la perméabilité membranaire, notamment des échanges Na⁺/K⁺. L'une des conséquences cellulaires est une libération massive de molécules pro-inflammatoires et les cytokines (Grimminger *et al.*, 1997). Ainsi, l'interleukine IL-1 est sécrétée par les monocytes mis en contact avec cette toxine. Après activation calcique, l'alpha-hémolysine peut également induire une augmentation du métabolisme de l'acide arachidonique, elle-même à l'origine de la synthèse de prostaglandines, de leucotriènes et d'oxyde d'azote par les cellules endothéliales. Cette toxine peut aussi induire la sécrétion de thromboxane A2 et d'IL-8, et permettre l'activation de la voie de transduction du signal NF-κB. Tous ces phénomènes observés en présence de cette toxine peuvent induire une mort programmée de la cellule (Jonas *et al.*, 1994).

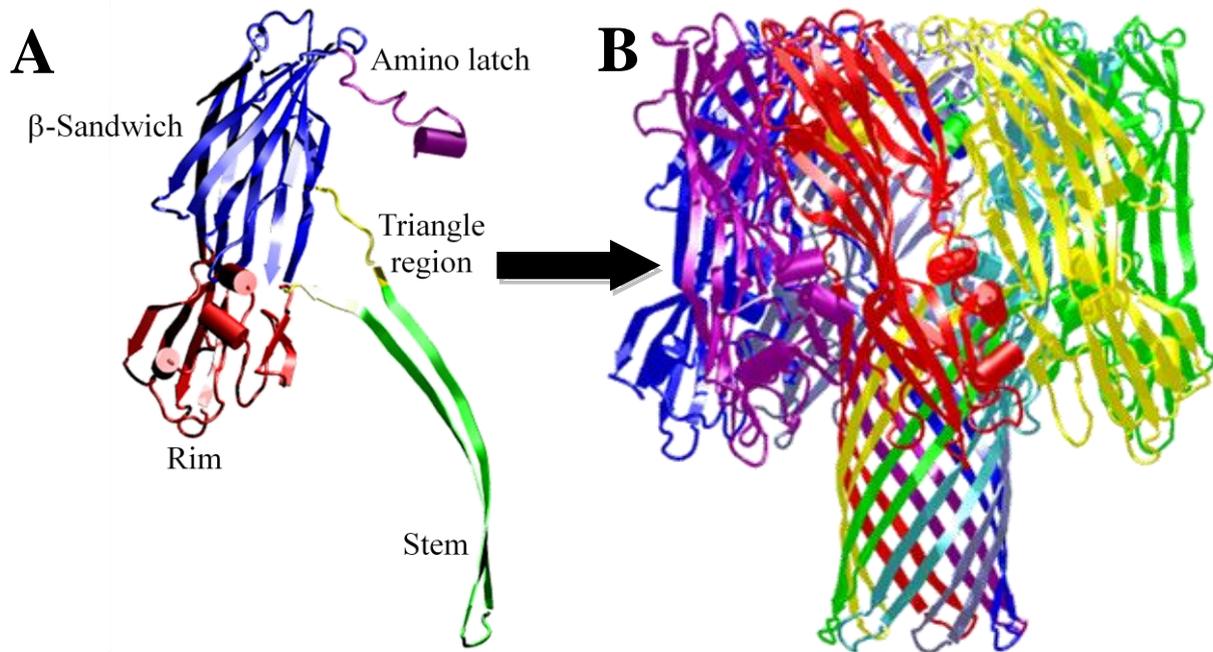


Figure 3: Modélisation du pore monomérique (A) et heptamérique (B) formé par l' α -toxine de *S. aureus* (adapté de Prevost *et al.*, 2003)

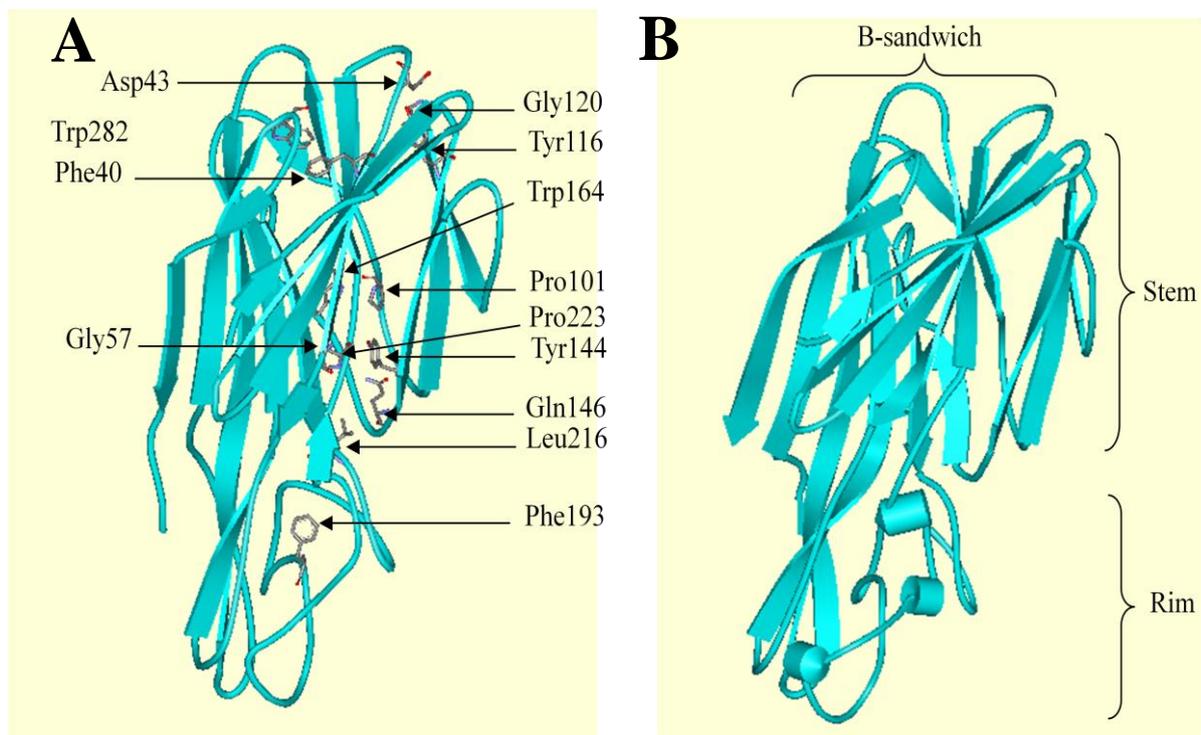


Figure 4: Structure tridimensionnelle de LukS-PV (A) et de LukF-PV (B) produit par *S. aureus* (Prevost *et al.*, 2003)

1.2.2.2. Les leucotoxines à deux composés

Le terme « leucotoxine » rassemble l' α -toxine et les toxines à deux composés formant des pores produites par *Staphylococcus aureus*, à savoir les gamma-hémolysines, la leucocidine de Panton et Valentine (LPV), LukM-PV+LukF'-PV, LukE+LukD, et LukS-I+LukF-I (produites par *Staphylococcus intermedius*). Ce nom leur a été donné, car leurs cibles cellulaires majeures sont les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages ou les lymphocytes (Prevost, 2004).

Ces toxines interagissent avec la membrane des cellules cibles : l'action synergique des deux composés conduit à la formation d'un pore, c'est pourquoi ces toxines sont classées dans la famille des PFTs. Deux protéines différentes, de classe S (31-32 kDa) et de classe F (34-35 kDa), sont donc nécessaires pour former un pore actif (Prevost *et al.*, 2001). La dénomination des classes de protéines vient de leur comportement en chromatographie échangeuse de cations : les protéines de classe F sont « Fast eluted » (éluées rapidement) et les protéines de classe S sont « Slow eluted » (Woodin, 1960). Chaque protéine de classe S peut donner une leucotoxine spécifique quand elle est combinée avec une protéine de classe F (**Figure 5**) (Szmigielski *et al.*, 1998). Ces protéines sont sensibles à la température. Leur solubilité (> 20 mg/ml) dépend du pH et de la force ionique du milieu. Elles ont un point isoélectrique basique compris entre 7,4 et 9,9 (Prevost, 1999). Le composé de classe S se fixe en premier à la membrane, permettant la fixation du composé de classe F avant l'oligomérisation et la formation du pore (Colin *et al.*, 1994). C'est pour cette raison que ces protéines sont toujours citées dans le même ordre S puis F pour décrire une leucotoxine.

L'activation synergique de ces deux composés individualisés conduit à la formation d'un pore actif. En effet, l'activation débute par la fixation du composé de classe S à la membrane de la cellule cible, permettant l'ajout du composé de classe F (**Figure 6**). Il y a ensuite oligomérisation puis formation du pore octamérique (Prevost, 2004 ; Joubert *et al.*, 2006). Les protéines de classe S n'ont pas toutes le même ligand cellulaire (Gauduchon *et al.*, 2001). Chaque protéine de classe S peut alors former une leucotoxine spécifique lorsqu'elle se combine avec une protéine de classe F (**Figure 6**), la structure du tonneau bêta influant sur la spécificité cellulaire. Les identités de séquences peptidiques varient de 55 à 79 % à l'intérieur de chaque classe (Baba-Moussa *et al.*, 1999 ; Werner *et al.*, 2002 ; Prevost, 2004). Les réponses cellulaires induites par les leucotoxines à deux composés sont surtout liées à l'activation de la voie calcique. Des facteurs chimiotactiques, tels que le leucotriène B4 et l'IL-8, sont sécrétés et exprimés.

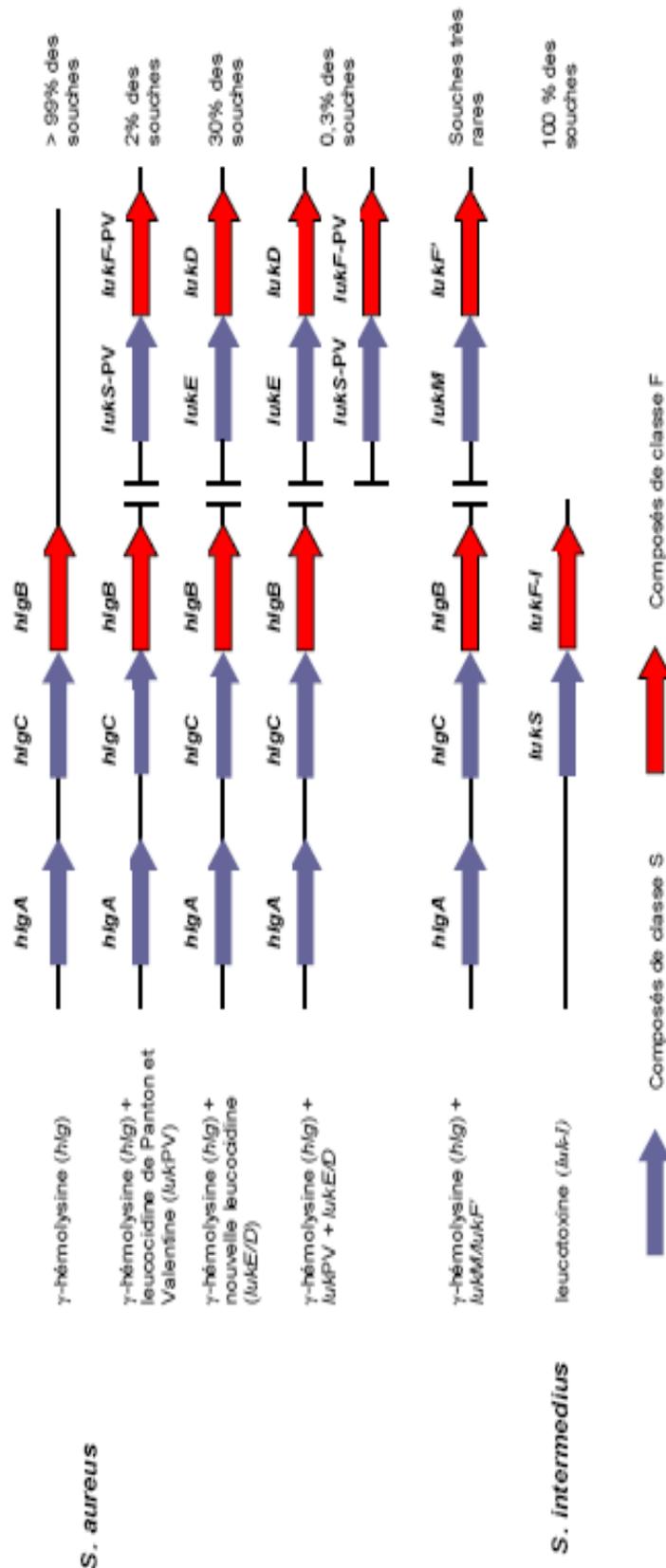


Figure 5: La famille des leucotoxines de staphylocoque: Schéma des différentes combinaisons des gènes chromosomiques codants et leur fréquence (adapté de Baba-Moussa *et al.*, 2006)

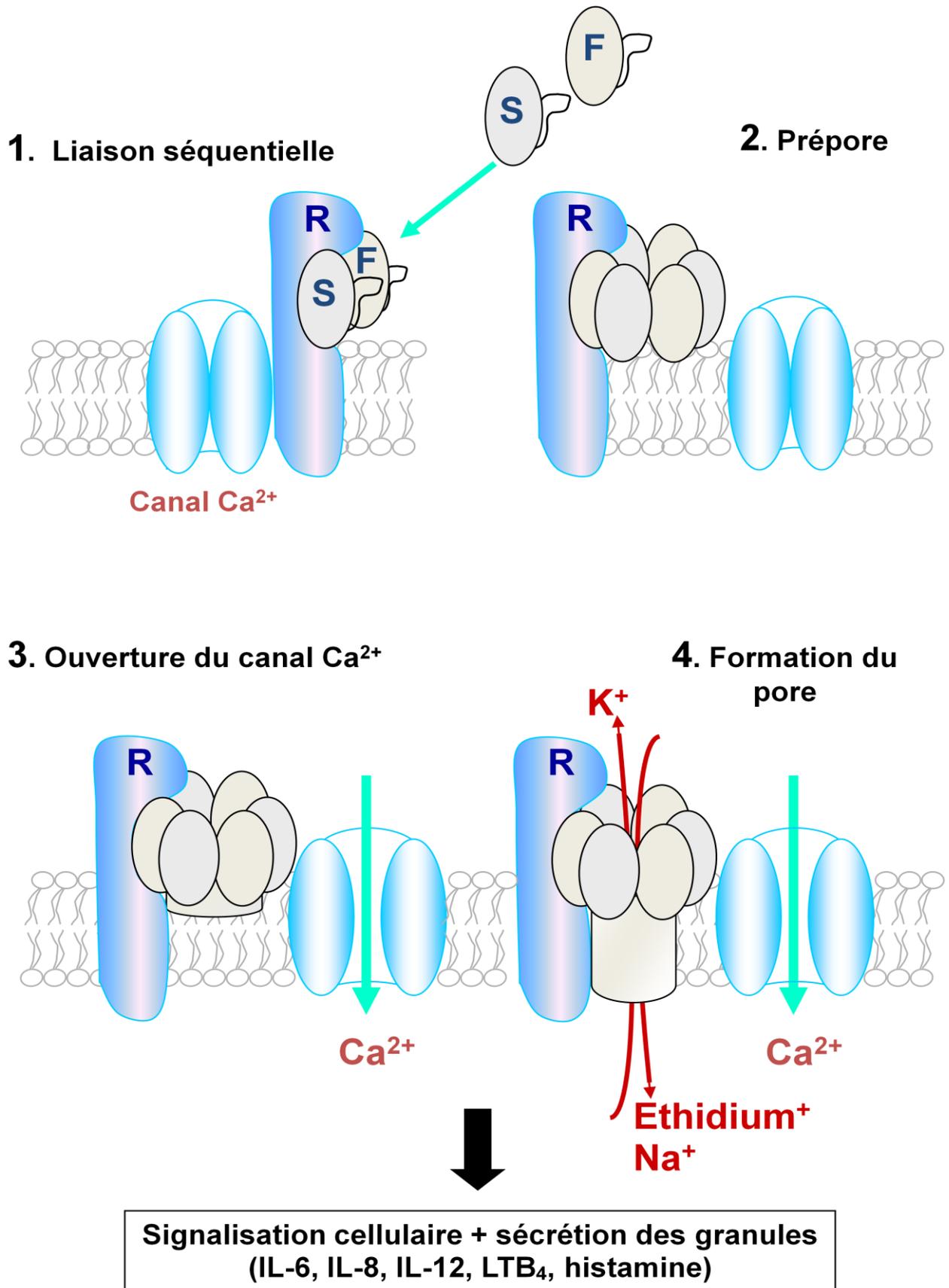


Figure 6: Mode d'action des leucotoxines à deux composés de *Staphylococcus aureus* (Adapté de Prevost *et al.*, 2003)

S : protéine de classe S, F : Protéine de classe F

La production d'histamine, molécule vasodilatatrice, a également été mise en évidence. Des molécules inflammatoires telles que l'IL-6 ou l'IL-12 ainsi que des enzymes (glucuronidase, lysozyme) sont sécrétées de manière variable selon la leucotoxine (Prevost *et al.*, 2003). La sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène par les polynucléaires neutrophiles renforce le processus inflammatoire.

Les protéines constitutives des leucotoxines sont réparties en deux classes : les protéines de classe S et les protéines de classe F. Tous les gènes correspondants ont été clonés en utilisant des sondes oligonucléotidiques dont la séquence a été déduite du séquençage de l'extrémité N-terminale, ou de peptides générés par une digestion à la trypsine des protéines purifiées (Gravet *et al.*, 1998; Prevost *et al.*, 1995a). Tous les gènes codant les protéines de classe F sont localisés en aval de ceux codant les protéines de classe S et ne sont séparés que par une seule base, une thymine, formant un opéron. La seule leucotoxine présentant une organisation différente des autres est la γ - hémolysine qui est en fait constituée de deux entités leucotoxiques, HlgA+HlgB et HlgC+HlgB. Les gènes correspondants sont organisés en un locus, où *hlgA* précède de 400 pb *hlgC* et *hlgB*, qui sont contigus et co-transcrits. Pour tous les gènes codant les protéines de classe F, un site rbs (site de fixation des ribosomes) potentiel peut être observé.

1.2.2.2.1. La gamma-hémolysine

La gamma-hémolysine rassemble deux toxines distinctes : HlgA-HlgB et HlgC-HlgB (Taylor & Bernheimer, 1974 ; Kamio *et al.*, 1993; Prevost *et al.*, 1995a). Les deux composés de classe S (HlgA et HlgC) et le composé de classe F (HlgB) sont codés par un locus de 3 gènes dont 2, *hlgC* et *hlgB*, sont co-transcrits (Cooney *et al.*, 1993). Son locus, *hlg*, a été caractérisé par Cooney *et al.* (1993). HlgA-HlgB a un large spectre d'activité alors que HlgC-HlgB ne lyse pas les lymphocytes T et est moins actif sur les érythrocytes humains (Gauduchon *et al.*, 2001). De toutes les leucotoxines connues, la paire HlgA-HlgB est la plus active sur membrane synthétique (Ferrerias *et al.*, 1998). La γ - hémolysine est produite par 99 % des souches cliniques de *S. aureus* (Mahoudeau *et al.*, 1997). Supersac *et al.*, (1998) ont montré qu'une souche déficiente en *hlg* se multiplie plus lentement et produit une inflammation moindre dans un modèle d'endophtalmie chez le lapin. Ceci a été également confirmé par Dajcs *et al.* (2002). La paire HlgC-HlgB est aussi cytolytique pour une grande variété de polynucléaires neutrophiles (PNs) et hémolytique pour les hématies de lapin seulement (Prevost *et al.*, 1995b ; Nariya *et al.*, 1997). Sa capacité à former un pore dans les vésicules lipidiques est réduite par rapport au couple HlgA-HlgB (Ferrerias *et al.*, 1998).

1.2.2.2.2. La leucocidine de Panton et Valentine (LPV)

Cette toxine isolée en 1932 par Panton et Valentine est produite par certaines souches de *S. aureus* provenant des furoncles (Panton & Valentine, 1932). La toxine comporte 2 composants (F et S) qui agissent en synergie (Prevost *et al.*, 2003). Elle se fixe sur les granulocytes et les érythrocytes humains et crée des pores hexamériques sur la membrane cellulaire (**Figure 6**). La sécrétion de cette toxine est associée aux souches de *S. aureus* isolées d'infections telles que les furoncles et les pneumonies (Couppié *et al.*, 1997 ; Baba-Moussa *et al.*, 1999 ; Gillet *et al.*, 2002 ; Löffler *et al.*, 2010).

Le spectre d'activité lytique de cette toxine est restreint aux monocytes, aux macrophages, aux polynucléaires neutrophiles et aux métamyélocytes (Gladstone & Heyningen, 1957) ; les érythrocytes ne sont pas lysés en leur présence (Prevost *et al.*, 2001). Cette toxine qui est reconnue avoir un effet cytolytique uniquement sur les polynucléaires neutrophiles du lapin et de l'homme (Finck-Barbancon *et al.*, 1991) est identifiée comme un indicateur crucial de la virulence des souches de staphylocoque (Cribier *et al.*, 1992). L'activité cytolytique de la toxine est exprimée à forte concentration alors qu'à faible concentration, on observe une apoptose (**Figure 7**) (Genestier *et al.*, 2005).

Son mode d'action fait intervenir une stimulation exagérée et une lyse des granulocytes (**Figure 8**). Elle est antigénique et provoque la formation d'anticorps. Sa mise en évidence fait actuellement appel à la biologie moléculaire qui permet de repérer le gène codant pour cette toxine (Oliveira & Lencastre, 2002 ; Zhang *et al.*, 2008, Al-Talib *et al.*, 2009).

1.2.2.2.3. La leucotoxine Luk E/Luk D

Cette leucocidine a été identifiée à partir d'une souche Newman (NTCC 8178), mutée ne sécrétant ni alpha-hémolysine, ni gamma-hémolysine, ni LPV, mais possédant une activité leucotoxique résiduelle (Gravet *et al.*, 1998). Luke-LukD est isolée chez plus de 75 % des souches de *S. aureus* responsables d'impétigo bulleux, elles-mêmes productrices d'épidermolysines A ou B (Gravet *et al.*, 2001). Elle a été isolée chez plus de 93,6 % des souches de *S. aureus* associées à une diarrhée post-antibiotique et productrices également d'entérotoxines (Gravet *et al.*, 2001).

1.2.2.2.4. La leucotoxine LukM - LukF'-PV like

En 1995, Choorit *et al.* (1995) purifient une protéine, LukM produite par la souche *S. aureus* P83. La séquence protéique montre une identité de séquence de 62 % à 67 % avec les autres protéines de classe S. En 1997, Kaneko *et al.* (1997) ont caractérisé une protéine LukF-PV-like (ou LukF'-PV) qui possède 79 % d'identité de séquence avec LukF-PV.

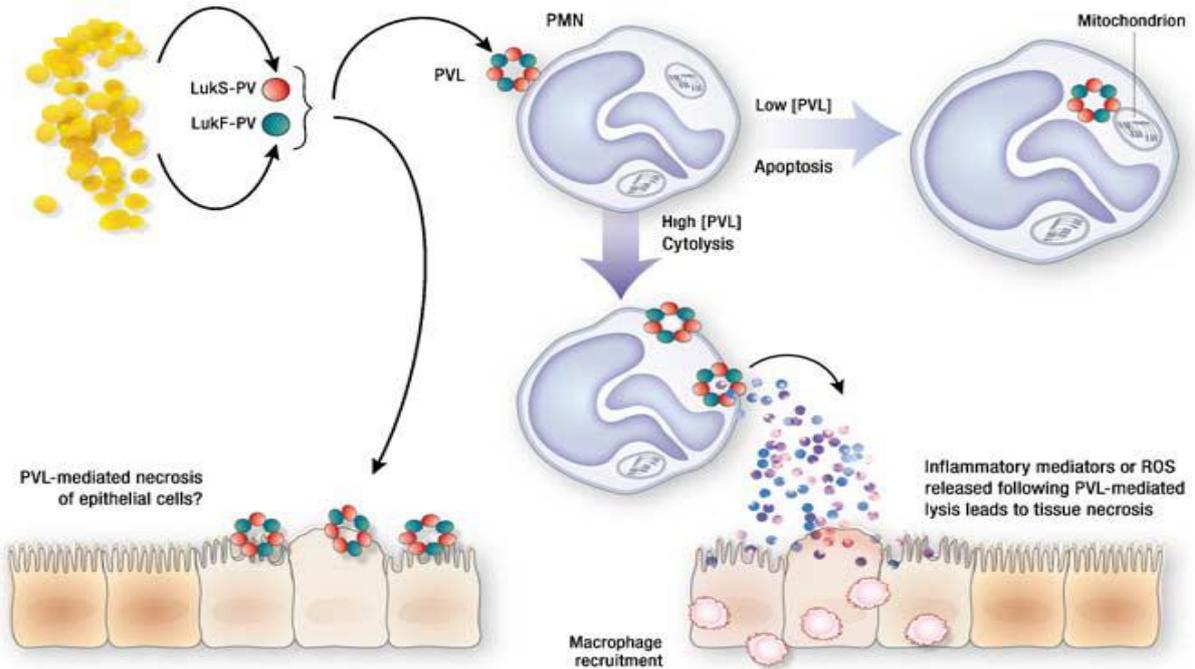


Figure 7: Représentation schématique du mode d'action de la LPV sur les macrophages (Boyle-Vavra & Daum, 2007)

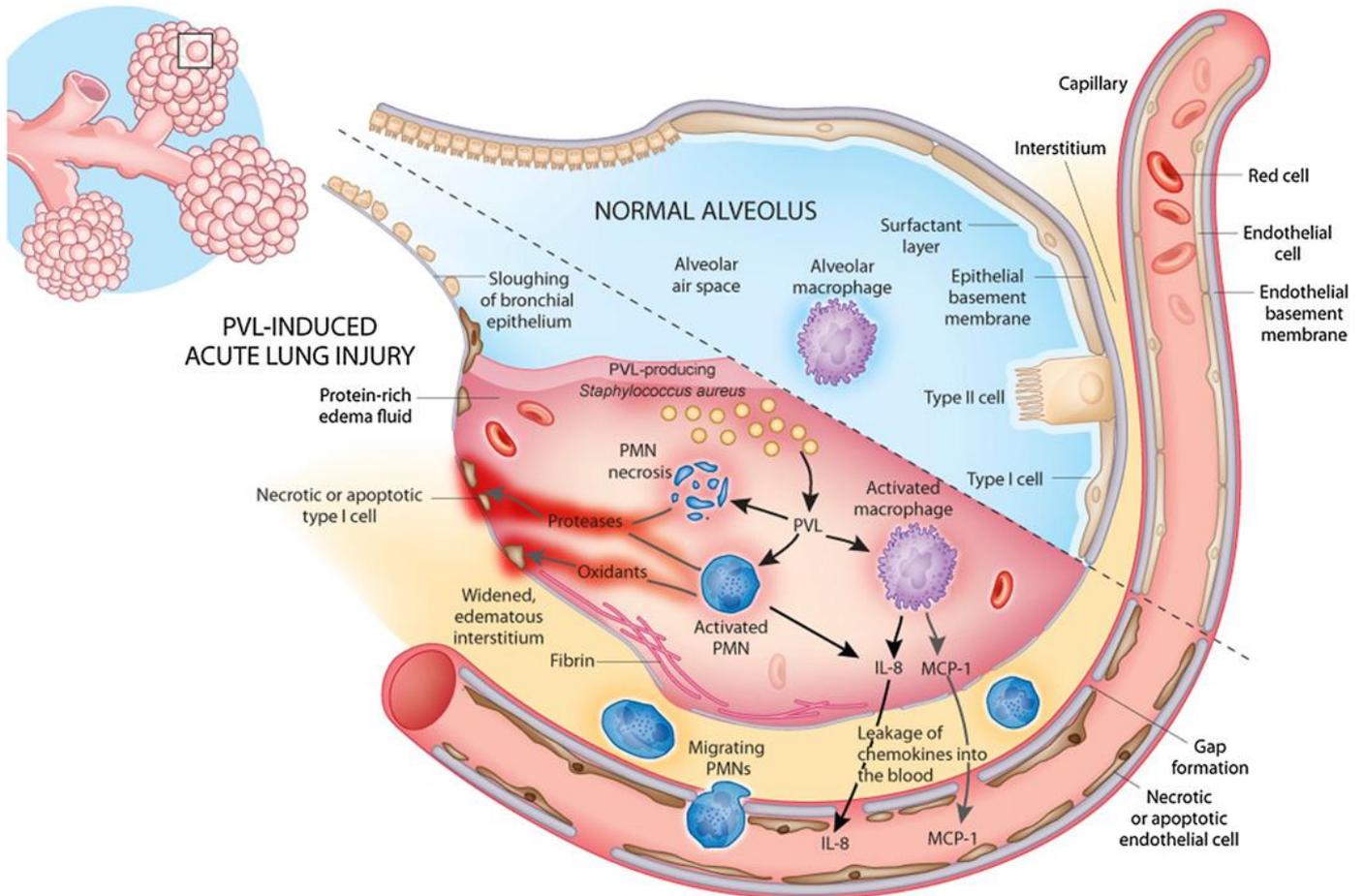


Figure 8 : Mécanisme d' Action de la LPV dans les poumons (Diep *et al.*, 2010)

Cette toxine n'est pas produite par des souches de *S. aureus* isolées en pathologie humaine (Kaneko *et al.*, 1997). Elle a été produite par deux souches de *S. aureus* isolées de mammites bovines. Aucune des souches testées à partir d'isolats humains ne produit cette toxine (Gravet *et al.*, 1998). Seuls 9,5 % des spécimens testés provenant de mammitte bovine produisent ce couple toxique (Gravet *et al.*, 1998).

1.2.2.2.5. La leucotoxine LukS-I-LukF-I

Le gène codant pour LukS-I-LukF-I est présent dans probablement toutes les souches de *S. intermedius* (Prevost *et al.*, 1995a). La présence de cette toxine dans une autre espèce bactérienne, même très proche de *S. aureus* révèle le possible transfert et l'évolution de l'information génétique pour ces toxines. Cette leucotoxine est active sur les PNs et les cellules dendritiques.

1.2.2.2.6. La leucocidine R

Cette toxine est produite par la souche *S. aureus* P83 isolée d'une mammitte bovine. Par rapport à la LPV, la leucocidine R a une activité leucotoxique dix fois inférieure sur les granulocytes humains mais, cette dernière est cent fois supérieure sur les granulocytes de bovins. Les activités hémolytiques et leucotoxiques de la leucotoxine R sont comparables à celles de la gamma-hémolysine. Elle a initialement été décrite en 1973 par Soboll *et al.* (1973), mais pourrait correspondre à la gamma-hémolysine, LukM-LukF' ou une combinaison secondaire de ces toxines génériques.

1.2.2.3. Les entérotoxines

Selon Vasconcelos et Cunha (2010), les entérotoxines sont des protéines à faible poids moléculaire (26900-29600 Da). La classification des entérotoxines peut se faire souvent en se basant sur leurs différences d'antigénicité (Su & Wong, 1998). On dénombre 23 différentes entérotoxines qui ont été décrites (**Tableau I**), partant de SEA à SEV (Schlievert & Case, 2007; Larkin *et al.*, 2009). Toutes ces protéines ont une activité superantigénique alors que très peu d'entre elles (SEA à SEI, SER, SES et SET) sont émétiques (Le Loir *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2008). Le Comité International de Nomenclature des Superantigènes Staphylococciques propose que seuls les superantigènes qui, après une administration orale, induisent le vomissement puissent être considérés comme entérotoxines staphylococcique (ES).

Tableau I: Caractéristiques majeures des entérotoxines staphylococciques

ES	Longueur phase codante (bp)	Taille ES (acide aminé)	Masse moléculaire (kDa)	pHi	Référence
A	774	233	27,100	7,3	Betley & Mekalanos, 1985, Borst & Betley, 1994
B	801	239	28,336	8,6	Schafer & Iandolo, 1979. Johns & Khan, 1988
C1	801	239	27,531	8,6	Bohach <i>et al.</i> , 1990
C2	801	239	27,531	7,8	
C3	801	239	27,563	8,1	
D	777	228	26,360	7,4	Chang & Bergdoll, 1979. Bayles et Iandolo, 1989.
E	774	230	26,425	7,0	Couch <i>et al.</i> , 1988
G	777	233	27,043	5,7	Munson <i>et al.</i> , 1998.
H	726	218	25,210	5,65	Su & Wong, 1995 ; Ren <i>et al.</i> , 1994
I	729	218	24,928	8,37	Munson <i>et al.</i> , 1998.
J	806	245*	28,565*	8,65	Zhang <i>et al.</i> , 1998
K	729	219	25,539	6,5	Orwin <i>et al.</i> , 2001
L	723	215*	24,593*	6,66	Fitzgerald <i>et al.</i> , 2001
M	722	217*	24,842*	6,24	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
N***	720	227*	26,067*	6,97	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
O***	783	227*	26,777*	6,55	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
P	783	232*	26,608	6,19	Kuroda <i>et al.</i> , 2001
Q	729	216	25,076	6,60	Diep <i>et al.</i> , 2006
R	780	233	27,049	8,76	Omoe <i>et al.</i> , 2004
S		257	26,217		Ono <i>et al.</i> , 2008
T		216	22,614		Ono <i>et al.</i> , 2008
U	783	232	27,192	6,20	Letertre <i>et al.</i> , 2003
U2	771	227	26,672	7,20	Thomas <i>et al.</i> , 2006
V	720	217	24,997	6,07	Thomas <i>et al.</i> , 2006

* : Masse moléculaire et point isoélectrique de la partie mature déterminés par les auteurs à l'aide du logiciel MWALC.

** : longueur de la partie mature déterminée par les auteurs d'après Nielsen *et al.*, 1997.

*** : nommées SEK et SEL dans Jarraud *et al.* 2001, renommées SEN et SEO respectivement dans une note correctrice publiée dans J. Immunol. 2001. 166:4260.

Il faut noter que ce même Comité reconnaît les toxines « similaires » qui n'ont pas d'activités émétique prouvées sur les modèles de primates doivent être désignées comme des toxines semblables aux entérotoxines (staphylococcal enterotoxin-like toxins, SEL) suivie de la lettre de la toxine (Lisa, 2004; Omoe *et al.*, 2005). De ces 23 toxines, celle jadis nommée SEF induit le Syndrome de Shock Toxique (Bergdoll *et al.*, 1981; Vianello, 2006). C'est dans cette logique que la toxine fut renommée TSST-1 (Fueyo *et al.*, 2005).

Toutes ces 23 toxines 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 pour leur détection (Ono *et al.*, 2008). Ainsi, en se basant sur l'homologie de leurs séquences, les entérotoxines peuvent être divisées en cinq groupes (**tableau II**) différents (Vasconcelos & Cunha, 2010).

Les entérotoxines staphylococciques sont riches en lysine, acide aspartique, acide glutamique et tyrosine. La plupart possèdent un pont disulfure nécessaire à leur conformation et probablement impliqué dans l'activité émétique. Elles sont très stables, résistantes à la plupart des enzymes protéolytiques telles que la pepsine ou la trypsine et gardent ainsi leur activité après ingestion d'aliments contaminés, dans le tube digestif. Elles résistent aussi à la chymotrypsine, la rénine et la papaine. Néanmoins, SEB et SEC1 ont pu être hydrolysées en peptides par une digestion trypsique modérée au niveau du pont disulfure. SEB peut être détruite par la pepsine à pH 2 mais est résistante à la pepsine à des pH supérieurs, qui sont les conditions généralement rencontrées dans l'estomac après l'ingestion de nourriture (Bergdoll, 1983). Les entérotoxines staphylococciques sont également très thermorésistantes. Elles sont réputées plus thermorésistantes dans les aliments qu'en culture *in vitro*, en condition de laboratoire mais elles peuvent être inactivées par les traitements thermiques utilisés en appertisation lorsqu'elles sont présentes en faible concentration (Bergdoll, 1988). Les traitements thermiques en milieu acide aboutissent généralement à une perte d'activité immunologique par dégradation des acides aminés et à la perte concomitante d'activité biologique. Cependant, il a été montré que SEA et SED peuvent être indétectables (perte de reconnaissance sérologique) mais rester actives, c'est-à-dire toxiques, (tests *in vivo* sur le chat) après traitement thermique (Bennett, 2005).

Tableau II: Classification des entérotoxines basée sur l'homologie des séquences

Groupe	Toxines	Références
1	SEA, SED et SEE puis SEIJ, SEIN, SEIO et SEIP	Marrack & Kappler, 1990 ; Larkin <i>et al.</i> , 2009
2	SEB, SEC1, SEC2 et SEC3 puis SEG, SER et SEIU	Marrack & Kappler, 1990 ; Larkin <i>et al.</i> , 2009
3	SEI, SEIK, SEIL, SEIM et SEIQ	Omoie <i>et al.</i> , 2005; Larkin <i>et al.</i> , 2009
4	SET	Larkin <i>et al.</i> , 2009
5	SEH	Larkin <i>et al.</i> , 2009

1.2.2.3.1. Effet émétique des entérotoxines

L'activité entérotoxine au sens strict repose uniquement sur la capacité des toxines à provoquer une réponse émétique lorsqu'elles sont administrées oralement alors que les autres superantigènes ne sont pas émétiques (Dinges *et al.*, 2000). L'absence de modèle animal capable de reproduire les manifestations cliniques de la toxi-infection staphylococcique est probablement l'un des facteurs limitant les avancées dans la compréhension de ce phénomène. Les modèles animaux classiques comme la Souris, le rat ou le lapin ne présentent en effet aucun réflex émétique en réponse à l'ingestion des toxines. Chez le chaton, l'administration intraveineuse de SEB (Bergdoll, 1988) peut induire le réflex émétique mais curieusement, une ingestion intra-gastrique ne le fait pas (Sugiyama *et al.*, 1966). Il serait 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 & Hayama, 1964). D'autres études ont montré que chez le Singe, l'administration par voie orale d'une dose de 30 µg de SEH provoque des effets émétiques (Su & Wong, 1998). Par ailleurs, on a pu observer dans un délai de deux heures des vomissements et diarrhées chez un sujet ayant ingéré un aliment contaminé par les entérotoxines (Hu *et al.*, 2003).

Afin d'étudier le pouvoir émétique de certaines entérotoxines, plusieurs auteurs (Hu *et al.*, 2003 ; 2007 ; Ono *et al.*, 2008) se sont penchés sur les mécanismes d'action déclenchant les vomissements. L'activité émétique des toxines est probablement induite par la présence des résidus cystéines (Hovde *et al.*, 1994; Le Loir *et al.*, 2003; Orwin *et al.*, 2003) et de l'acide aspartique en position 227 de la SEA (Hu *et al.*, 2009). Certaines études suggèrent que les

entérotoxines 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 ; Vianello, 2006). Il a ainsi été démontré que la SEA induisait la libération de sérotonine dans l'intestin suite à une injection intrapéritonéale. La sérotonine se fixe alors sur les récepteurs présents sur le nerf vague conduisant à une activation des centres émétiques (Hu *et al.*, 2007).

1.2.2.3.2. **Activité superantigénique des entérotoxines**

Chez *S. aureus*, plus de trente superantigènes ont été identifiés, comprenant essentiellement des entérotoxines. Un superantigène est une protéine bactérienne capable d'établir une interaction directe entre les cellules T réceptrices d'antigène (TCR pour T-Cell antigen Receptor) et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Cette liaison qui se fait au niveau de sites externes à celui de l'antigène s'établit avec une affinité importante (Schlievert & Case, 2007 ; Fraser & Proft, 2008).

Remarquons qu'un antigène normal est présenté au TCR sous la forme de peptides liés au CMH de classe I ou II après leur digestion et présentation par les CPA. Les CMH sont des complexes protéiques exposés à la surface des CPA. Le TCR est un hétérodimère glycosylé composé de chaînes variables V α et β ; δ et γ . La formation d'un complexe tri-moléculaire (complexe TCR + antigène étranger + CMH II) induit par conséquent l'activation ciblée de ces lymphocytes T (**Figure 9**).

La reconnaissance de l'antigène est une étape préliminaire dans la réponse immunitaire cellulaire et est une des clés de la spécificité de la réponse immunitaire. Seules quelques cellules T peuvent reconnaître un antigène spécifique des CMH d'une CPA (McCormick *et al.*, 2001). A l'exception de SEH (spécifique des chaînes V β des TCR), les toxines superantigéniques interagissent avec de nombreuses cellules T par reconnaissance des chaînes V β spécifique. Dans la plus part des cas, une diminution de l'activité antigénique d'une toxine (mutation génétique par exemple) résulte de la diminution de sa toxicité (Harris *et al.*, 1993). Elle est responsable de la stimulation massive et indistincte du système immunitaire (Marrack & Kappler, 1990; Balaban & Rasooly, 2000). Des cytokines sont ainsi produites en grande quantité (TNF- α , IL-1, IL-2 et IFN- α) (Jarraud *et al.*, 2001 ; Vianello, 2006). Elles induisent une vasodilatation majeure qui peut se transformer en état de choc ou induire différentes formes de réponses inflammatoires intermédiaires (McCormick *et al.*, 2001).

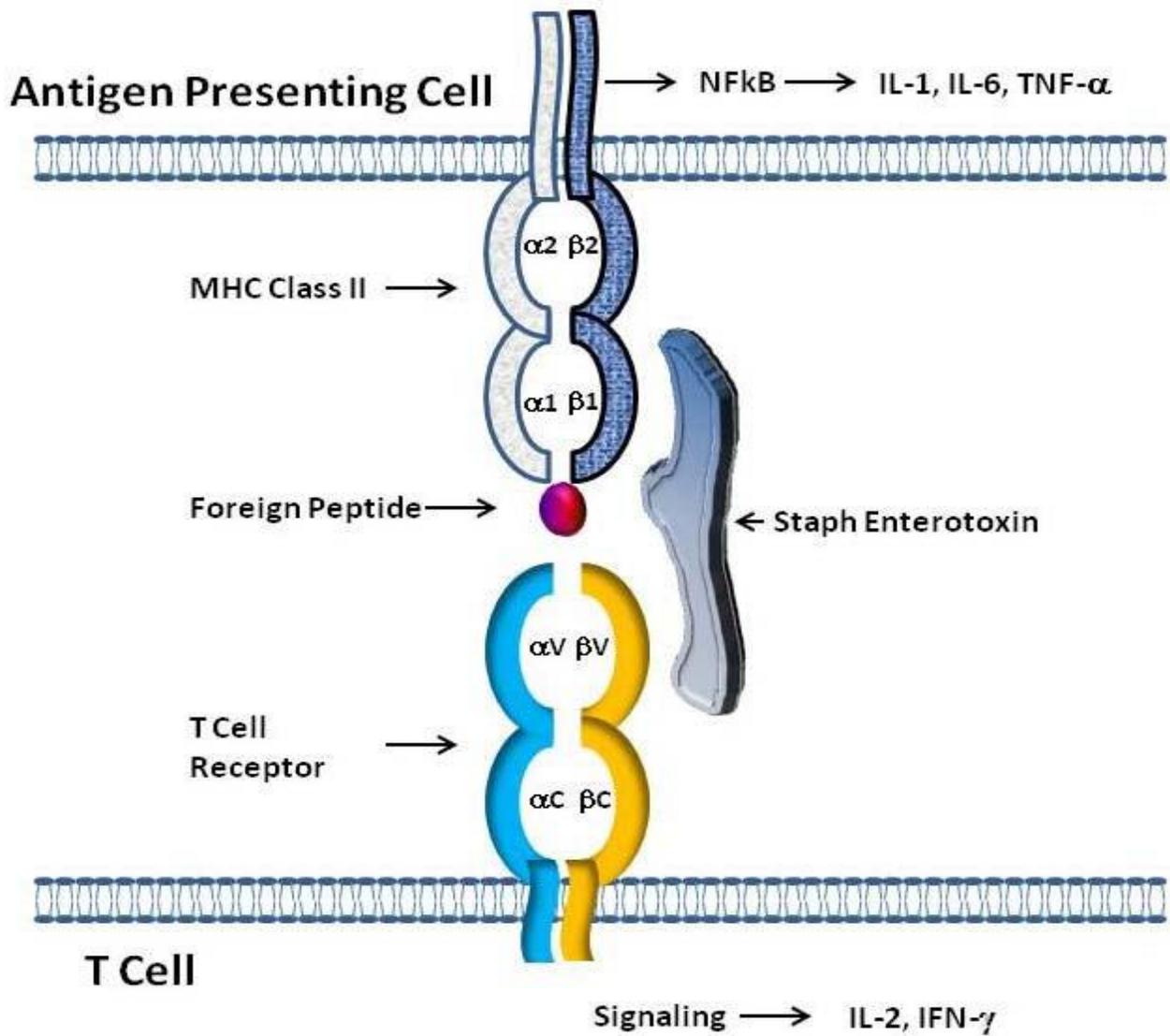


Figure 9: Mode d'action d'un superantigène. (Pinchuk *et al.*, 2010)

1.2.2.3.3. Les gènes codant les entérotoxines

1.2.2.3.3.1. Localisation des gènes codant les entérotoxines

Selon la nature de l'entérotoxine, les gènes codant celle-ci peuvent se trouver sur le chromosome, sur un plasmide ou sur un prophage (**Tableau III**).

Si l'on considère SEA et SED, elles sont associées à des vecteurs de bactériophages et des plasmides, respectivement (Gilligan *et al.*, 2000). SEA est encodée sur un bactériophage de *Staphylococcus aureus* (Zhang *et al.*, 1998) et SED est encodée sur un plasmide, analogue à un plasmide de pénicillinase (Betley *et al.*, 1992). 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 & Rasooly, 2000). SEE est soupçonnée d'être liée à un bactériophage de transformation défectueuse qui porte une séquence de codage similaire à celle de SEA (Gilligan *et al.*, 2000). Les gènes codant SEB, SEC, SEG, SEH et SEI se trouvent sur le chromosome (Gilligan *et al.*, 2000). Néanmoins, le gène *seb* peut se trouver sur le chromosome ou sur le plasmide, selon la provenance de l'isolat. Selon son origine, le gène *sec* peut se trouver sur un plasmide ou un îlot de pathogénicité (Balaban & Rasooly, 2000). Jarraud *et al.* (2001) ont découvert un opéron hautement prépondérant parmi des isolats de *S. aureus*, *egc* (enterotoxin gene cluster) qui cotranscrit cinq gènes et deux pseudo-gènes. Il est également possible que ce locus joue le rôle d'un réservoir pour les gènes d'entérotoxines. L'*egc* code pour plusieurs entérotoxines, dont SEG, SEI, SEM, SEN et SEO (Jarraud *et al.*, 2001 ; Orwin *et al.*, 2001). SEU résulte de la divergence des séquences de deux pseudo-gènes encodés par un opéron *egc* décrite par Jarraud *et al.* (2001), le résultat d'une insertion dans le pseudo-gène 1 donnant un cadre de lecture ouvert.

1.2.2.3.3.2. L'expression des gènes

L'expression des gènes codant les entérotoxines staphylococciques varie selon leur mode de régulation. Le principal système régulateur contrôlant l'expression des facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* est le système *agr* (accessory gene regulator) (Peng *et al.*, 1988). Ce système agit en combinaison avec d'autres systèmes tel que le *sar* (staphylococcal accessory regulator) (Cheung *et al.*, 1992; McCulloch, 2006) et *rot* (repressor of toxins) (McNamara *et al.*, 2000). L'*agr* est un locus qui régule l'expression d'un grand nombre d'exo-

Tableau III: Support génétique des gènes de quelques entérotoxines staphylococciques

Gène	Support génétique	Références
<i>sea</i>	Bactériophage	Betley <i>et al.</i> , 1992 ; Zhang <i>et al.</i> , 1998 ; Betley & Makalanos, 1985
<i>seb</i>	chromosome, plasmide, transposon	Shafer & Iandolo, 1978; Shalita <i>et al.</i> , 1977; Altboum <i>et al.</i> , 1985
<i>sec</i>	îlot de pathogénicité, plasmide	Fitzgerald <i>et al.</i> , 2001; Balaban & Rasooly, 2000
<i>sed</i>	plasmide (pIB485)	Bayles & Iandolo, 1989; Zhang <i>et al.</i> , 1998
<i>see</i>	défective phage	Couch <i>et al.</i> , 1988
<i>seh</i>	Élément génétique mobile putatif	Noto & Archer, 2006
<i>seg</i> ,	<i>Etotoxin gene cluster (egc)</i> , chromosome	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
<i>sei</i> ,	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
<i>sej</i>	plasmide (pIB485)	Zhang <i>et al.</i> , 1998 ; Balaban & Rasooly, 2000
<i>sek, sel</i>	îlot de pathogénicité	Lindsay <i>et al.</i> , 1998 ; Kuroda <i>et al.</i> , 2001 ; Orwin <i>et al.</i> , 2001 ; Fitzgerald <i>et al.</i> , 2001
<i>sem, sen, seo</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
<i>sep</i> ,	prophage (Sa3n)	Omoe <i>et al.</i> , 2005
<i>seq</i>	îlot de pathogénicité	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
<i>ser</i>	Plasmide (pIB485)	Omoe <i>et al.</i> , 2003
<i>ses</i>	Plasmide (pIB485)	Ono <i>et al.</i> , 2008
<i>set</i>	Plasmide (pIB485)	
<i>seu</i>	<i>egc</i> , (fusion entre <i>ent1</i> et <i>ent2</i>), chromosome	Letertre <i>et al.</i> , 2003
<i>seu2</i>	<i>egc</i> , (délétion partielle dans les pseudos gènes ϕ ent1 et ϕ ent2), chromosome	Thomas <i>et al.</i> , 2006
<i>sev</i>	<i>egc</i> , (recombinaison entre <i>selm</i> et <i>sei</i>), chromosome	Thomas <i>et al.</i> , 2006

protéines staphylococciques et régule cette production temporellement avec une expression maximale pendant la phase post-exponentielle de croissance (Betley *et al.*, 1992). C'est ainsi que la production de la plus part des facteurs de virulence staphylococciques est coordonnée principalement par le locus *agr* (Shopsin *et al.*, 2003 ; Novick, 2003). Le locus *agr*, formé par deux opérons distincts, est composé de cinq gènes : *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* et le gène de la delta hémolysine (*hld*) (Peng *et al.*, 1988) et est régulé par deux promoteurs, P2 et P3 (**Figure 10**). L'opéron ayant pour promoteur P2 est constitué des gènes *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* alors que l'opéron ayant pour promoteur P3 est constitué uniquement du gène *hld* (McCulloch, 2006). L'expression de certains gènes d'entérotoxines est induit pendant la phase post-exponentielle par le locus *agr* (**Figure 10**) de *S. aureus* (Betley *et al.*, 1992 ; Schmitz *et al.*, 1998) alors que d'autres (SEA, SEJ) ne sont pas régulés par le locus *agr* (Tremaine *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 1998).

1.2.2.4. Les épidermolysines

Les **épidermolysines** ou **exfoliatines** (Ets) sont des protéases à sérine active dont l'activité est très spécialisée (Ladhani *et al.*, 2003 ; Prevost *et al.*, 2003). La cible majeure de ces toxines (27-29 kDa) est la desmogléine-1, une protéine importante des desmosomes du *stratum granulosum* de l'épiderme, expliquant ainsi le décollement observé lors de l'impétigo des jeunes enfants ou du syndrome de la peau ébouillantée (Plano, 2004). Quatre sérotypes d'épidermolysines ont été caractérisés : ETA, ETB, ETC et ETD (Sato *et al.*, 1994 ; Yamaguchi *et al.*, 2002). Elles ont des identités de séquences peptidiques comprises entre 40 et 50 %, mais présentent la même spécificité et des toxicités voisines, bien que n'ayant pas ou peu d'antigènes communs (Plano, 2004).

Les gènes codant les toxines *eta*, *etb* et *etd*, ont été séquencés (Yamaguchi *et al.*, 2002). Le gène *etc* a été isolé, mais sa fonction n'est pas caractérisée (Sato *et al.*, 1994). Le gène codant l'épidermolysine A est porté par un bactériophage, tandis que le gène codant l'épidermolysine B est à transmission plasmidique. Ces toxines sont majoritairement produites par des souches staphylococciques du groupe phagique II (Prevost *et al.*, 2003). L'expression des gènes de leucotoxines est régulée principalement par les systèmes *agr* et *sar* (Bronner *et al.*, 2004). En effet, dans les souches déficientes en gènes *agr* et *sar*, l'expression des leucotoxines est réduite (Bronner *et al.*, 2000).

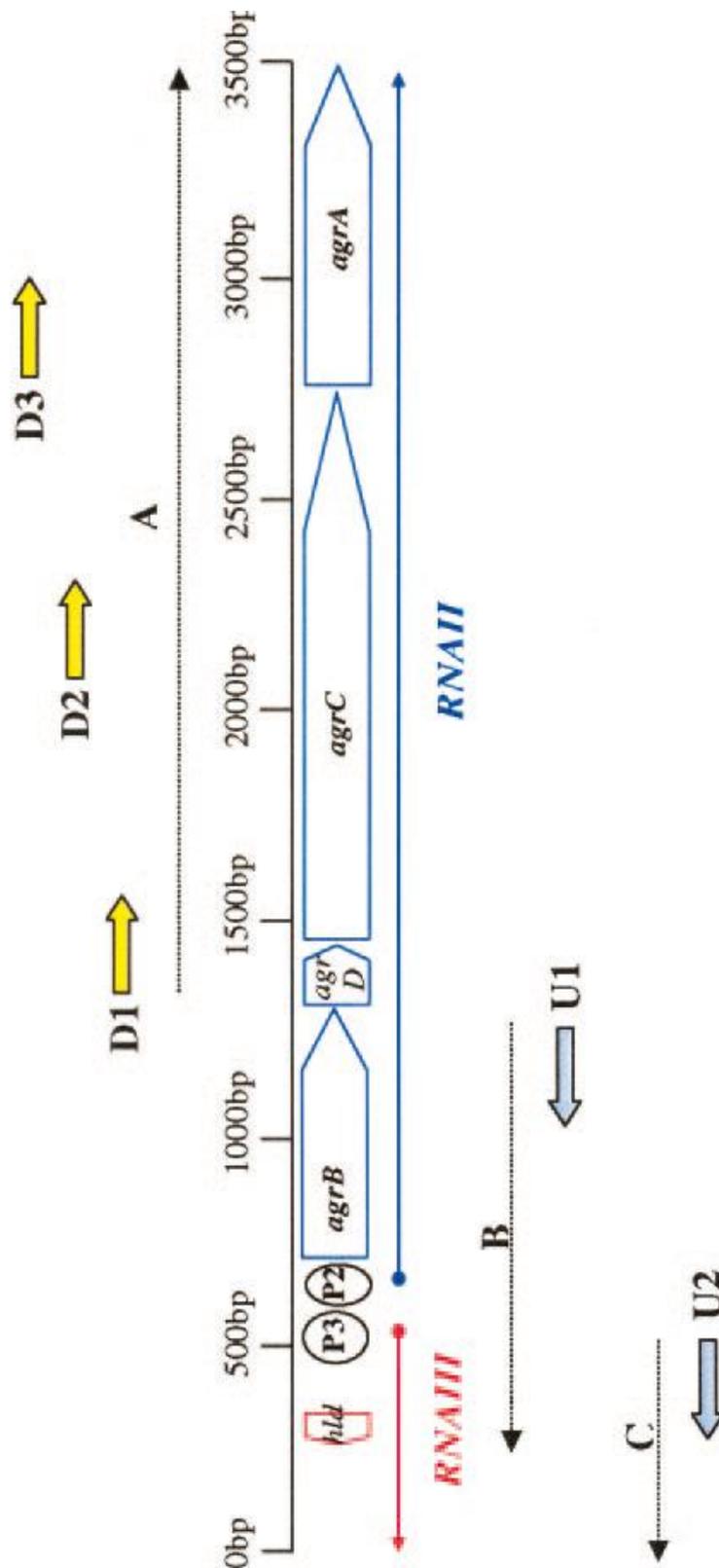


Figure 10: Structure et fonctionnement du locus *agr* (Sung *et al.*, 2006).

1.2.2.5. Les Staphopâines

Les **staphopâines** A et B sont des protéases à cystéine actives. L'activité de ces dernières serait inhibée par une cystatine phosphorylée, un petit peptide dont l'expression serait diminuée dans les cas de dermatite atopique (Dubin *et al.*, 2007). Par ailleurs, une métalloprotéase comme l'auréolysine pourrait jouer plusieurs rôles : en complément de la coagulase, elle détruirait des inhibiteurs de protéases, participant ainsi à la formation de thrombus, et en modifiant les protéines bactériennes de surface elle participerait à l'essaimage bactérien à partir de biofilms ou de foyers septiques.

1.2.2.6. Les Protéines inhibitrices de la chemotaxis de *Staphylococcus aureus*

La **CHIPS** (*chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus*) de poids 15 kDa et produite par 60 % des isolats cliniques, a la particularité de se fixer aux résidus 10-18 de l'extrémité N-terminale de l'anaphylatoxine C5a du complément, ainsi qu'au récepteur de la formyl-méthionine-leucine phénylalanine. La CHIPS a donc une action d'inhibiteur du chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes. Comme pour compléter son arsenal, la bactérie sécrète plusieurs inhibiteurs des C3 convertases comme les « *staphylococcal complement inhibitor – SCIN* », « *extracellular fibrinogen-binding protein – Efb* », « *extracellular complement-binding protein – Ecb* » ; les deux derniers ayant un potentiel inhibiteur des C3bBb, C3b2Bb et C4b2aC3b convertases (Rooijackers *et al.*, 2006 ; Jongerius *et al.*, 2007). Ainsi, et complétant la séquestration des immunoglobulines par la protéine A, ces molécules seraient capables de minimiser l'opsonisation de la bactérie et la maturation d'une défense immunitaire adaptée, mais aussi de limiter le recrutement des polynucléaires au site de l'infection. *Efb* et *Ecb* constituent un autre groupe de gènes impliqués dans l'évasion face aux défenses immunes, localisé à proximité du gène codant l'alpha-hémolysine.

1.2.2.7. Les inhibiteurs de la différenciation des cellules de l'épiderme

L'EDIN (Epidermal Cell Differentiation Inhibitor) est également nommée C3stau du fait de son homologie avec l'exoenzyme C3 de *Clostridium botulinum*. Il existe trois isoformes d'EDIN connues (EDIN A, B, et C ou C3stau1, 2, et 3). EDIN A a été découverte en premier comme un inhibiteur de la différenciation des kératinocytes épidermaux *in vitro*, d'où son nom (Sugai *et al.*, 1992). Les gènes codant les protéines EDIN A et C sont portés par un plasmide alors que le gène codant l'EDIN B est chromosomique. La séquence du plasmide codant pour EDIN A n'est pas encore connue, par contre l'EDIN C semble liée à l'exfoliatine B de façon clonale (Yamaguchi *et al.*, 2001) et l'EDIN B est liée à l'exfoliatine D au sein d'un îlot de pathogénicité (Yamaguchi *et al.*, 2002).

1.3. Chapitre 3 : Pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus*

1.3.1. Les pathologies liées à la prolifération de *Staphylococcus aureus*

La présence de *Staphylococcus aureus* peut être source d'infections, ces types d'infections sont caractérisées par plusieurs phases : la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction tissulaire, la réponse inflammatoire locale et parfois systémique. Les facteurs de virulence impliqués sont les protéines de surface qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte et les facteurs qui inhibent la phagocytose par les leucocytes (Lowy, 1998). *S. aureus* se fixe aux cellules et au collagène de la matrice extracellulaire par des protéines de surface appelées adhésines : protéine A (Spa), protéine de liaison au collagène (Cna), protéine de liaison à la fibronectine (FnBP), protéine de liaison au fibrinogène (ClfA), protéine de liaison à l'élastine (EbpS). Les adhésines ont des récepteurs spécifiques différents ce qui pourrait expliquer les différentes formes cliniques des infections à *S. aureus* (**Tableau IV**) (Brun & Bes, 2000; Gomez *et al.*, 2004). La résistance à la phagocytose passe par la formation de biofilm et l'intégration intracellulaire de *S. aureus*, en particulier dans les cellules endothéliales (Lowy, 2003). Ces processus peuvent expliquer la résistance de la bactérie aux antibiotiques même si elle est sensible *in vitro*.

1.3.2. Les pathologies liées aux toxines de *Staphylococcus aureus*

1.3.2.1. Pathologies associées à la LPV

Les souches productrices de LPV sont classiquement associées à des infections cutanées primitives, notamment les furoncles (Couppié *et al.*, 1994 ; Durupt *et al.*, 2007). La LPV est également associée, au moins en partie, à des infections profondes sévères : essentiellement des pneumonies nécrosantes (Couppié *et al.*, 1997 ; Lina *et al.*, 1999 ; Gillet *et al.*, 2002 ; Labandeira-Rey *et al.*, 2007 ; Diep *et al.*, 2008), mais aussi des ostéomyélites (Gillet *et al.*, 2007) ainsi que des cas de *purpura fulminans* (Hussain *et al.*, 2007). Cette toxine a été également identifiée lors d'un cas de pseudo-syndrome de Lemierre (Shivashankar *et al.*, 2008) et dans un cas de gangrène de Fournier (Burton, 2008). La LPV a été associée à la survenue de pneumopathies communautaires nécrosantes et hémorragiques chez des enfants ou de jeunes adultes auparavant en bonne santé (Gillet *et al.*, 2002 ; Dumitrescu *et al.*, 2007). Le diagnostic précoce est très difficile. En effet, cette forme clinique de pneumopathie apparaît initialement comme un tableau pseudo-grippal. La pathologie peut ensuite évoluer

rapidement vers une détresse respiratoire sévère, une leucopénie étant présente dans les formes graves. La létalité est élevée, proche de 37 % (Gillet *et al.*, 2002 ; van der Flier *et al.*, 2003 ; Morgan, 2005).

Tableau IV: Protéines de surface impliquées dans l'adhésion (Brun & Bes, 2000 ; Gomez *et al.*, 2004)

Protéines	Sites de liaison	Pathogénie
Spa	facteur von Willebrand	infection intra-vasculaire
	épithélium voies aériennes	pneumonie
Cna	collagène	infection ostéo-articulaire
FnBP	fibronectine	infection sur corps étranger
ClfA	fibrinogène	plaies, infection sur corps étranger
EbhA, EbhB		endocardite

1.3.2.2. Pathologies associées aux épidermolysines

En 1878, le baron Ritter von Ritterhain décrit des cas de dermatites exfoliatrices chez de jeunes nourrissons. Melish et Glasgow isolent en 1970 une toxine à activité épidermolytique chez des souris (Ladhani, 2003). Si le mode d'action précis de ces toxines reste encore discuté, les lésions qu'elles induisent sont, quant à elles, bien connues. Les épidermolysines sont responsables d'un décollement intra-épidermique au niveau du *stratum granulosum* des épithéliums kératinisés. Les épidermolysines atteignent cette zone par diffusion à travers les capillaires du derme. Ainsi, elles induisent une perte d'adhérence cellulaire entre les zones épithéliales du *stratum spinosum* et du *stratum granulosum*, à l'origine du décollement. Deux grandes pathologies cliniquement différentes et très contagieuses sont reliées à l'action de ces toxines épidermolytiques : l'impétigo bulleux (**Figure 11**) et sa forme généralisée appelée syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée (**Figure 12**) ou *staphylococcal scaled skin syndrome* (SSSS).



Figure 11: Photos d'un malade d'impétigo (a) de la face (Empinotti *et al.*, 2012) et (b) bulleux



Figure 12: Photo d'un nourrisson souffrant du syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée (Baartmans *et al.*, 2006).

1.3.2.3. Pathologies liées aux entérotoxines

1.3.2.3.1. Choc Toxique Staphylococcique

Le syndrome de choc toxique staphylococcique est provoqué par la diffusion dans l'organisme de la toxine (TSST-1) ou de certaines entérotoxines (B, C, etc.) (McCormick *et al.*, 2001). Ce syndrome associe une fièvre supérieure à 39 °C, une hypotension artérielle et une érythrodermie scarlatiniforme généralisée, suivie 7 à 14 jours plus tard d'une desquamation intense et d'une atteinte multi-viscérale. La létalité est proche de 10 %. Le choc toxique staphylococcique peut succéder à une infection suppurative staphylococcique chez un enfant, toucher un adulte présentant une infection postopératoire à staphylocoque ou encore apparaître chez une femme en période menstruelle. Dans ce dernier cas, bien qu'il n'existe pas de foyer d'infection suppurative à staphylocoque, la présence de tampon hygiénique contaminé favorise la colonisation du vagin par des souches de *S. aureus* produisant la toxine TSST-1. 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).

1.3.2.3.2. Intoxications alimentaires

Selon les études réalisées, les intoxications alimentaires à *S. aureus* représenteraient de 15 à 30 % des toxi-infections alimentaires collectives. Elles sont provoquées par l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (préalablement développées dans l'aliment) qui sont toutes émétisantes, à l'exception notable de la TSST-1. En effet, en présence d'entérotoxine B, 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. Ces toxines produites par les souches de *S. aureus* sont thermostables, résistent à la cuisson et aux enzymes du tube digestif. Elles contaminent les aliments, 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 généralement bénigne, sauf chez les individus «fragiles» (Archer & Bosilevae, 2001). 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 (Prevost, 2004).

1.3.2.4. La maladie de Kawasaki

La maladie de Kawasaki, ou « syndrome lympho-cutanéomuqueux », est une vascularite infantile des artères de moyen et petit calibre (Prevost, 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 énanthème, 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.

1.3.2.5. 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 *S. aureus* (jusqu'à 90 %) des patients souffrant de dermatite atopique (Prevost, 2004). Les lésions de grattage secondaires au prurit favorisent l'adhérence de *S. aureus*. Celui-ci va participer aux mécanismes de sensibilisation et d'inflammation. La production de céramidase augmente la perméabilité de l'épiderme. Les entérotoxines de *S. aureus* 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 31, 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).

1.4. Chapitre 4: Traitement des infections à *S. aureus*

La prise en charge des infections à *S. aureus* comprend le traitement de la porte d'entrée (drainage d'un abcès, ablation d'une voie veineuse infectée), une antibiothérapie adaptée et le traitement symptomatique des défaillances viscérales (Domart, 2002). Le choix du traitement antibiotique dépend de la gravité de l'infection et de la sensibilité de la souche *in vitro*.

1.4.1. Les molécules antistaphylococciques

L'antibiothérapie des infections à *S. aureus* sensible à la Méthicilline (SASM) repose sur les pénicillines M associées ou non à un aminoside. Par voie orale, les pénicillines M ont une mauvaise biodisponibilité et une demi-vie trop courte. Un traitement par l'amoxicilline associé à un inhibiteur des β -lactamases sera alors préféré. En cas d'allergie aux pénicillines, les alternatives sont les fluoroquinolones, les synergistines et les lincosamides. Les échecs de traitement sont liés à la virulence du germe, aux co-morbidités, à la présence de matériel étranger, à des foyers secondaires profonds ou à des posologies insuffisantes (Wolff, 2002).

En ce qui concerne les souches résistantes à la Méthicilline (SARM), leur traitement repose sur les glycopeptides (vancomycine, téicoplanine) associés ou non à un autre anti staphylococcique actif sur les SARM (**Tableau V**). L'émergence de souches de *S. aureus* intermédiaire aux glycopeptides (GISA) pourrait expliquer certains échecs thérapeutiques ou une réponse tardive aux glycopeptides. L'antibiothérapie d'une infection grave à GISA n'est pas codifiée. Elle nécessite des posologies élevées de glycopeptides associées à la rifampicine ou au β -cotrimoxazole ou le recours à de nouvelles molécules comme le linezolid ou la quinupristine/dalfopristin (Cosgrove *et al.*, 2004).

1.4.2. Classification des antibiotiques

Un antibiotique est défini comme « tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit synthétique, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certains êtres pluricellulaires. La classification des antibiotiques est souvent faite en se basant sur leur origine, leur nature chimique (**Tableau V**), leur mode (**Tableau VI**), modalité (bactéricide ou bactériostatique) et spectre d'action. Chaque famille d'antibiotique possède son site d'action propre (**Figure 13**).

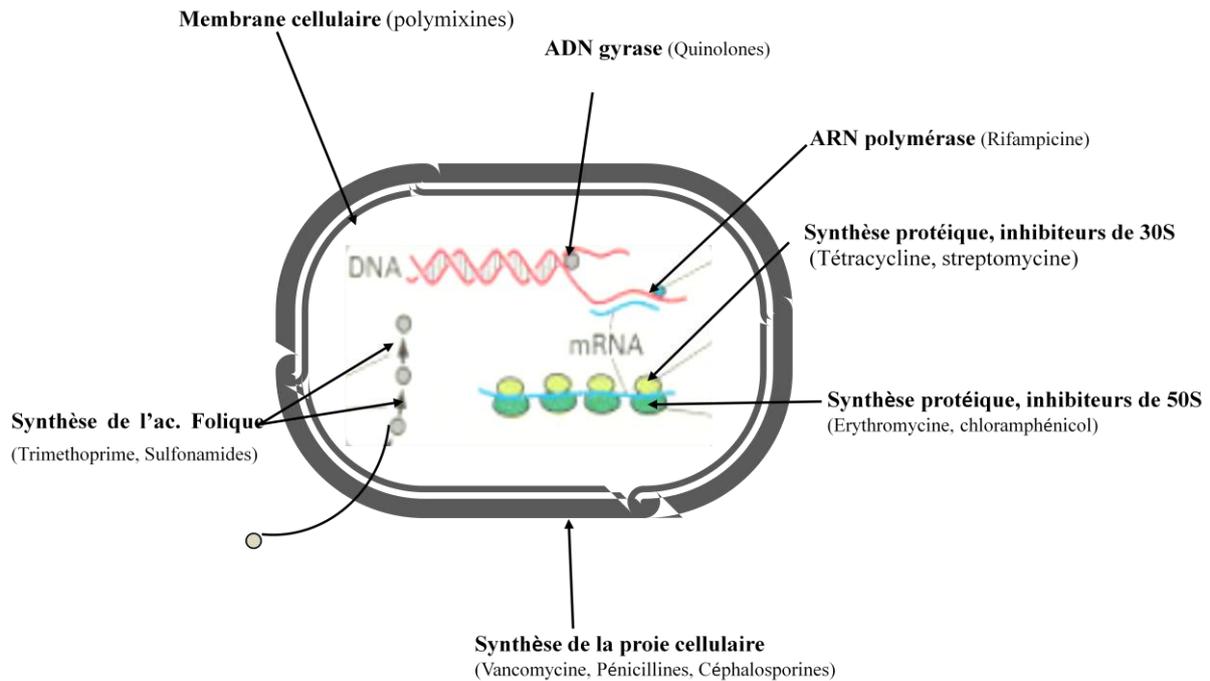


Figure 13: Cibles des antibiotiques dans la cellule bactérienne.

Tableau V: Classes et molécules antistaphylococciques

Classes	Molécules
Majeures	
<i>β-lactamines antistaphylococciques</i>	
Pénicilline M	Oxaciline, cloxacilline
Céphalosporines	Céfazoline, céfamandole
Glycopeptides	Vancomycine*, téicoplanine*
Mineures	
Aminosides	Gentamicine*, tobramycine, Netilmicine
Rifampicine	Rifampicine*
Fluoroquinolones	Ofloxacine, ciproflaxine
Acide fucidique	Acide fucidique*
Fosfomycine	Fosfomycine*
Lincosamides	Clindamycine*
Synergistines	Pristinamycine*
Sulfamides	Triméthoprime-sulfaméthoxazole*

*Actif sur SARM

1.4.2.1. Mécanismes de la résistance des bactéries aux antibiotiques

Les antibiotiques, en présence des bactéries exercent une pression de sélection qui favorise la sélection des mutants ayant la faculté de survivre en présence de l'antibiotique en question. Trois mécanismes principaux sont responsables de la résistance aux antibiotiques. Ces mécanismes sont :

- Modification de la cible des antibiotiques ;
- Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques ;
- Diminution de la perméabilité bactérienne aux antibiotiques.

Une espèce bactérienne peut être résistante à plusieurs antibiotiques selon des mécanismes différents (Figure 14 et Tableau VI).

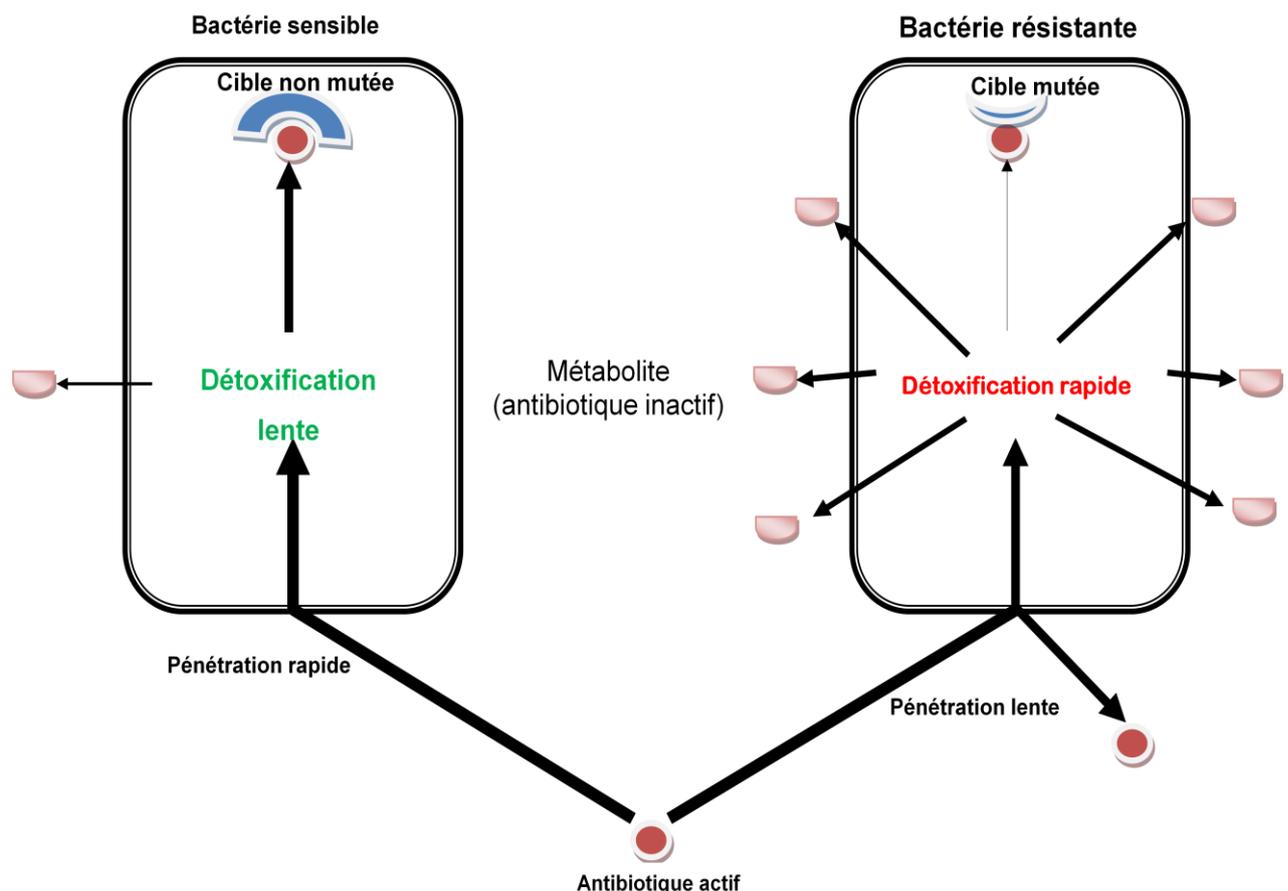


Figure 14: Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries

Tableau VI : Les antibiotiques représentatifs et leurs mécanismes de résistance (Adaptée de Jayaraman, 2009)

Catégorie d'antibiotiques	Exemples	Mode d'action	Mécanismes majeurs de résistance
β -lactames	Pénicilline, Céphalosporine, Cefotoximes, Carbapenemes	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Clivage par les β -lactamases, ESBLs, CTX-nases, Carbapenemases, PLPs altérées
Aminoglycosides	Streptomycine, Gentamycine, Tobramycine, Amikacine	Inhibition de la synthèse protéique	Modification enzymatique, efflux, mutation ribosomale, méthylation de la rRNA16S
Quinolones	Ciprofloxacine, Ofloxacine, Norfloxacine	Inhibition de l'ADN	Efflux, modifications de la cible
Glycopeptides	Vancomycine	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Altération de la paroi cellulaire, efflux
Tétracyclines	Tétracycline	Inhibition de la traduction	Efflux
Rifamycines	Rifampicine	Inhibition de la traduction	Altération de la sous unité β de l'ARN polymérase
Streptogramines	Virginamycines, Quinupristine, Dalfopristine	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	Modification enzymatique, efflux
Oxazolidinones	Linezolide	Inhibition de la formation du complexe ribosomal 70S	Mutations sur le gène de la rRNA 23S suivie de la conversion du gène.

1.4.2.2. La résistance aux antibiotiques

Staphylococcus aureus a développé des résistances à quasiment tous les antibiotiques mis sur le marché dont les deux classes d'antistaphylococciques majeures (**Figure 15**). Les mécanismes impliqués comprennent la synthèse d'enzymes inactivatrices, la modification de la cible des antibiotiques, des systèmes d'efflux qui diminuent la concentration de l'antibiotique dans la bactérie (**Tableau VI**).

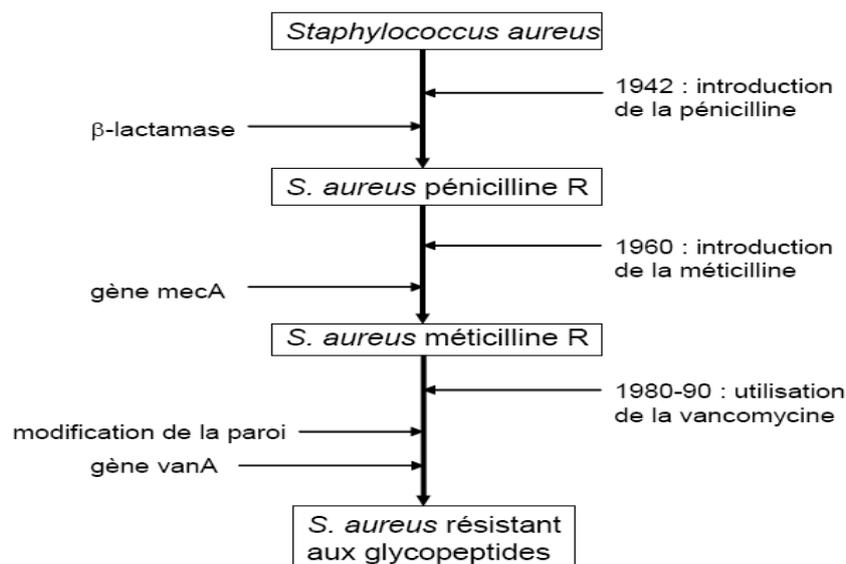


Figure 15: Introduction/ utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par *Staphylococcus aureus* (Hardy *et al.*, 2004).

1.4.2.2.1. Résistance à la pénicilline

Le mécanisme de résistance à la pénicilline repose sur la synthèse par la bactérie d'une enzyme appelée β -lactamase ou pénicillinase qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines et les rend inactives (**Figure 16**). Le gène *blaZ* qui code pour cette enzyme est porté par un plasmide ou un transposon. Le gène *blaZ* est sous le contrôle d'un système répresseur/antirépresseur (*blaR1/blaI*). La production de β -lactamase est le plus souvent inductible (Lowy, 2003).

1.4.2.2.2. Résistance à la méthicilline

Les β -lactamines ont pour cible les transpeptidases appelées aussi protéines liant la pénicilline. Ces protéines liant la pénicilline (PLP) interviennent dans la synthèse de la paroi bactérienne en catalysant la formation de ponts peptidiques entre les chaînes glycaniques qui lui confère sa stabilité (Waxman *et al.*, 1980 ; Ghuysen, 1994 ; Koch, 2003).

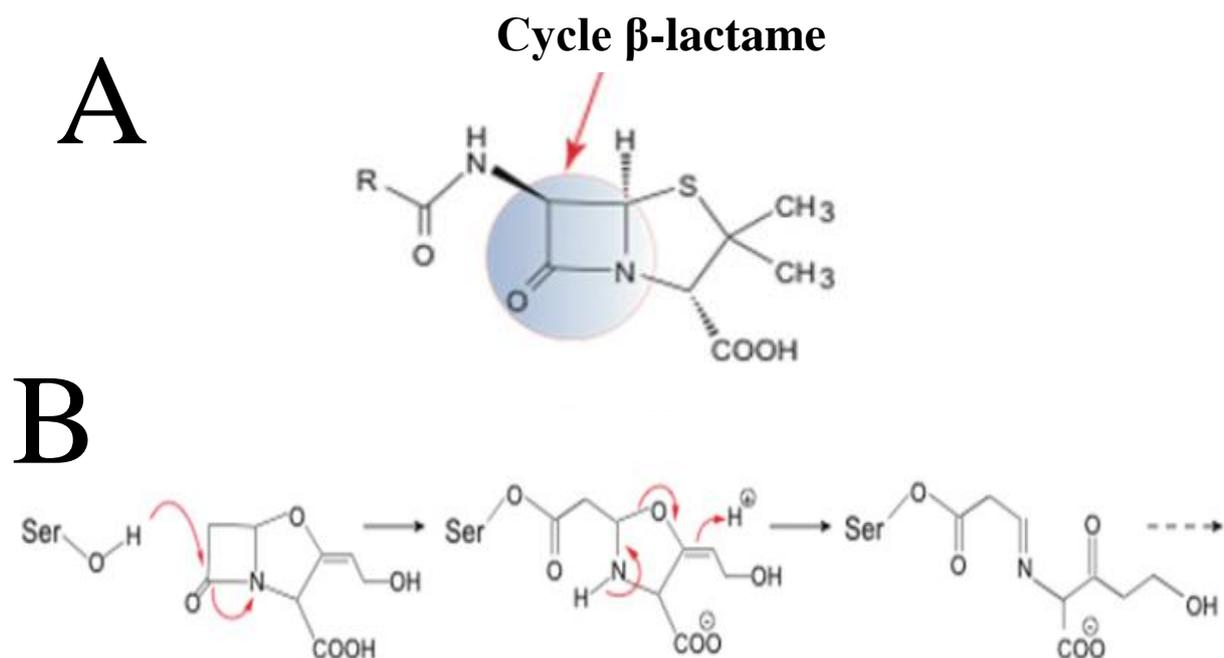


Figure 16 : Structure de la penicilline (A) et un mécanisme de d'hydrolyse du cycle β -lactame (B)

Les β -lactamines vont bloquer la polymérisation de la paroi bactérienne la rendant instable et fragile et provoquant secondairement la lyse de la bactérie (Severin *et al.*, 1997 ; Beveridge, 1999 ; Lee *et al.*, 2001). *Staphylococcus aureus* produit naturellement 4 PLP (Labischinski, 1992). Le principal mécanisme de résistance à la méthicilline est lié à la modification de la cible des β -lactamines (Drawz & Bonomo, 2010 ; Wolff *et al.*, 2011).

Les *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline (SARM) synthétisent une 5^{ème} PLP, la PLP2a (ou 2'), qui a une faible affinité pour les β -lactamines (Hartman & Tomasz, 1984; Utsui & Yokota, 1985). Contrairement aux autres PLP, la PLP2a est capable de réaliser à elle seule la polymérisation de la paroi bactérienne. Cependant la paroi bactérienne synthétisée par la PLP2a comporte des altérations morphologiques (diminution du degré de réticulation, prédominance de monomères ou dimères) qui ne sont pas favorables à la bonne croissance de la bactérie (Labischinski, 1992). La résistance peut être homogène (exprimée par toutes les souches) ou hétérogènes (exprimée par une proportion de colonies filles issues d'une colonie mère exprimant la résistance) (Tomasz *et al.*, 1991).

Le gène qui code pour la PLP2a est le gène *mecA* (Chambers, 1997). Il est transporté dans un élément génétique appelé Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC) *mec* (Katayama *et al.*, 2000). SCC*mec* est un fragment de 21-67 kb qui s'intègre dans un site unique proche de

l'origine de répllication du chromosome de *Staphylococcus aureus*. Il ne contient pas de gènes liés aux phages ni de transposons. Il véhicule des copies de plasmides intégrées responsables de la résistance à des antibiotiques autres que les β -lactamines. Par analogie avec les îlots de pathogénicité décrits dans les entérobactéries, il peut être considéré comme un îlot de résistance aux antibiotiques. Pour se déplacer, SCCmec contient 2 gènes spécifiques qui codent pour des recombinases (*ccrA* et *ccrB*).

Le complexe génétique *mec* comprend le gène de résistance proprement dit et un système complexe de régulation avec deux systèmes répresseurs/anti-répresseurs de la transcription, *mecI/mecR1* et *blaI/blaR1* (Archer & Bosilevac, 2001; Rosato *et al.*, 2003). Le système *mecI/mecR1* exerce une inhibition plus forte que *blaI/blaR1*. Si le système *mecI/mecR1* est fonctionnel, la transcription du gène *mecA* est très fortement inhibée et la souche apparaît sensible avec les techniques usuelles d'antibiogramme. Toutefois, grâce au système *blaI/blaR1*, la méthicilline sera lentement inductrice de la résistance. En pratique clinique, la majorité des souches actuelles ont un système *mecI/mecR1* non fonctionnel et la transcription du gène *mecA* est sous la dépendance de *blaI/blaR1* : dans ce cas la résistance est rapidement inductible par les β -lactamines. Des gènes auxiliaires appelés *femA*, *femB*, *femC*, *femD* sont également impliqués dans l'expression de la résistance à haut niveau chez les souches présentant une résistance hétérogène à la méthicilline (Berger-Bachi, 1994).

Quatre types de SCCmec ont été décrits (type I à IV) sur la base des différents complexes *ccr* (types 1 à 3) et des classes du complexe *mec* (A et B) (Hiramatsu *et al.*, 2001 ; Ito *et al.*, 2004). Le type I a été retrouvé dans les premières souches de SARM dans les années 60. Les types II et III caractérisent les souches de SARM isolées actuellement et disséminées dans le monde. Le type IV a été décrit récemment dans les nouvelles souches émergentes de SARM dites communautaires.

1.4.2.2.3. Résistance à la Vancomycine

La cible des glycopeptides est le résidu D-ala-D-ala (**Figure 17**) du peptidoglycane (Cui *et al.*, 2003). Le mécanisme de résistance hétérogène à la Vancomycine (souches hétéro-VISA et VISA) est lié à un épaississement de la paroi bactérienne qui piègent les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé (Hiramatsu, 2001). La base génétique de la résistance n'est pas encore comprise. Elle n'est pas liée au gène *mecA* (Walsh & Howe, 2002).

Les souches exprimant une résistance de haut niveau à la Vancomycine (VRSA) hébergent le gène *vanA* présent habituellement chez les entérocoques résistants aux glycopeptides (Chang *et al.*, 2003; Weigel *et al.*, 2003).

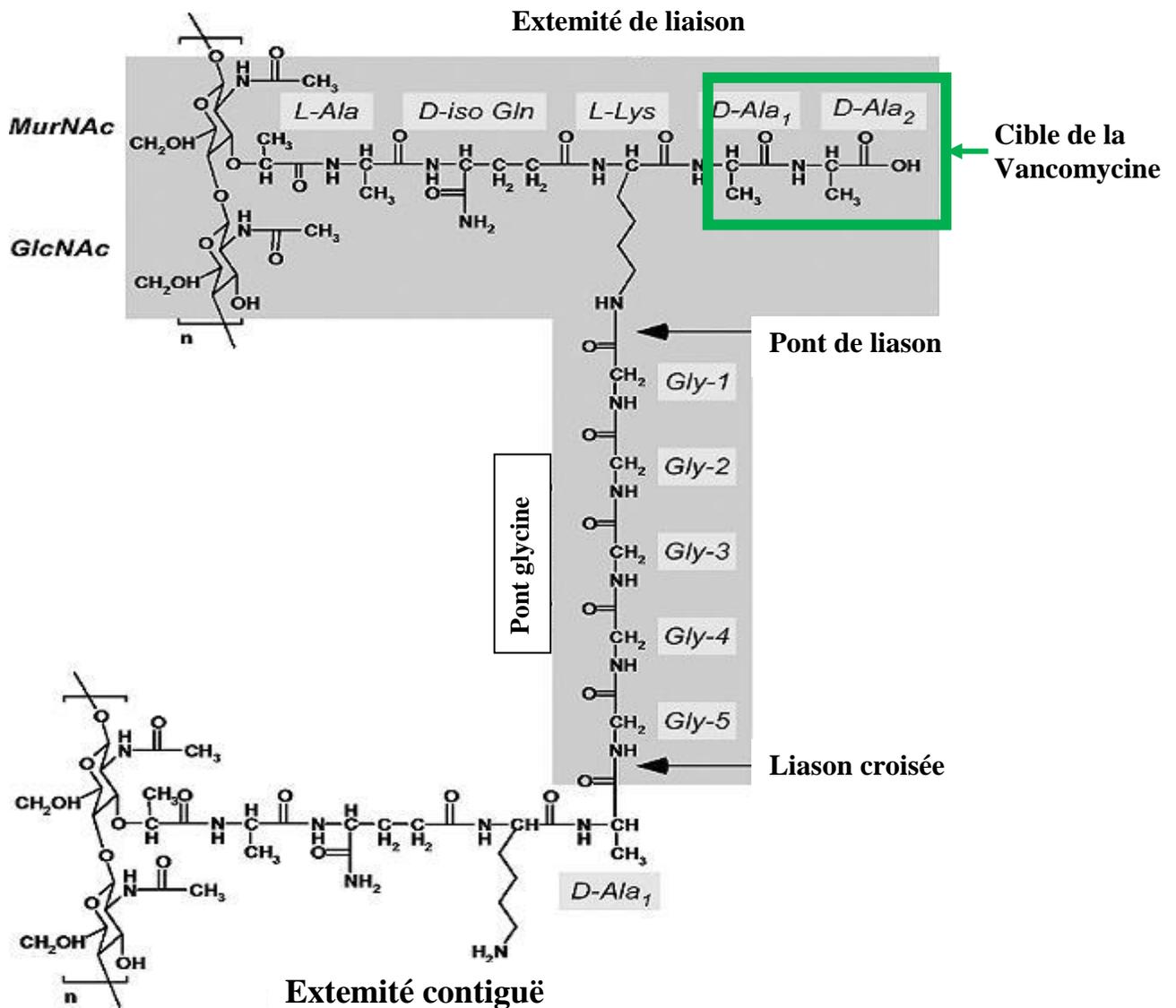


Figure 17 : Structure chimique du peptidoglycane de *S. aureus*

1.4.2.2.4. Autres résistances

Les aminosides inhibent la synthèse d'ARN. Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine) est lié à des modifications de la cible ribosomale par des enzymes codées par des gènes plasmidiques ou transposables. On distingue trois phénotypes de résistance (Bismuth & Leclercq, 2000; Quincampoix & Mainardi, 2001):

- une résistance de haut niveau à la kanamycine et l'amikacine (phénotype K)
- une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine, à la tobramycine (phénotype KT)
- une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine, à la tobramycine, à la gentamicine (phénotype KTG).

Les Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS) inhibent la synthèse protéique en stimulant la dissociation entre ribosome et ARN de transfert (Quincampoix & Mainardi, 2001). Les mécanismes de résistance aux macrolides (érythromycine, spiramycine), lincosamides (clindamycine) et streptogramines (pristinamycine, quinupristine-dalfopristine) comprennent la modification de la cible, des systèmes d'efflux et des enzymes inactivatrices (**tableau VI**). Le mécanisme le plus fréquemment en cause est la modification de la cible : le phénotype associant la résistance aux macrolides, aux lincosamides et au composés B des streptogramines (phénotype MLSb constitutif) prédomine chez les SARM et est lié au gène *ermA* de nature transposable ; la résistance isolée aux macrolides à 14 ou 15 atomes de C (phénotype MLSb inductible) se retrouve plus souvent chez les SASM et est liée au gène *ermC* d'origine plasmidique (Quincampoix & Mainardi, 2001).

Les fluoroquinolones (ofloxacine, pefloxacine, ciprofloxacine) inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la croissance bactérienne. La résistance aux fluoroquinolones est due à une modification de la cible, soit la topo-isomérase IV par mutation des gènes chromosomiques *grlA* ou *grlB* soit les sous-unités de la gyrase par une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*, ou à un système d'efflux grâce à une protéine transmembranaire codée par le gène chromosomique *norA* (Quincampoix & Mainardi, 2001).

La résistance aux sulfamides est de nature chromosomique, liée à une hyperproduction d'acide para-amino-benzoïque. La résistance aux tétracyclines est due soit à un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire codée par les gènes *tetK* ou *tetL* d'origine plasmidique soit une protection de la cible par une protéine codée par le gène transposable *tetM*. La résistance à la rifampicine est liée à la sélection de mutants résistants au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN dépendante. La résistance à la fosfomycine est due à la sélection de mutants au niveau du système de transport de la molécule dans la bactérie (gènes *glpT* et *uhp*). La résistance à l'acide fucidique est secondaire soit à la sélection de mutants résistants au niveau du facteur d'élongation intervenant dans la synthèse protéique soit à une modification de la perméabilité d'origine plasmidique (Bismuth & Leclercq, 2000).

1.5. Chapitre 5 : Impact socio-économique

Dans les hôpitaux, les unités de réanimation représentent moins de 5% des lits mais 8 à 15% des admissions et environ 15% du budget total de l'hôpital (Richards *et al.*, 1999). Vingt à 25% de l'ensemble des infections nosocomiales serait acquises dans un secteur de réanimation et le SARM est l'un des pathogènes les plus fréquemment isolés (Rubinovitch & Pittet, 2001). Pour ces raisons, plusieurs études ont cherché à estimer le surcoût d'une hospitalisation en cas d'infections à SARM en réanimation. La majorité du surcoût semble liée à la prolongation de la durée de séjour et aux coûts de personnels (Chaix *et al.*, 1999; Lepelletier *et al.*, 2004). Le traitement antibiotique représente moins de 10% des coûts directs (Girou & Brun-Buisson, 2002).

Le taux de mortalité des bactériémies à SARM en réanimation varie entre 27% et 53% (Ibelings & Bruining, 1998 ; Blot *et al.*, 2002). Celui des pneumopathies nosocomiales à SARM acquises sous ventilation mécanique atteint 49% (Combes *et al.*, 2004). Les patients infectés à SARM ont-ils un plus mauvais pronostic par rapport à ceux infectés à SASM ? Les résultats sont contradictoires : des études mettent en évidence une mortalité accrue en cas d'infection à SARM et d'autres non (Blot *et al.*, 2002; Cosgrove *et al.*, 2003; Girou & Brun-Buisson, 2002). Plusieurs études semblent montrer une relation entre les infections à SARM et la prolongation de la durée de séjour d'environ une semaine (Girou & Brun-Buisson, 2002; Peres-Bota *et al.*, 2003).

En effet, étant des pathogènes nosocomiaux et communautaires, les SARM sont la cause de plusieurs inquiétudes pour les agences de santé publique. Le traitement des infections à SARM est beaucoup plus onéreux que celui d'une infection à *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (SASM). Des études ont démontré qu'aux États-Unis, le coût d'hospitalisation d'un patient atteint d'un SARM est deux fois plus élevé que celui d'un patient ayant du *Staphylococcus aureus* susceptible à la méthicilline (Lodise & McKinnon, 2007). Au Canada, une étude a démontré que le coût annuel associé à SARM dans les hôpitaux varie entre 42 et 59 millions de dollars (Kim *et al.*, 2001).

Deuxième partie:
MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Types de prélèvements

2.1.1. Souches alimentaires

La gamme d'aliments de rue disponible à Cotonou reflète la richesse culturelle et ethnique des différents habitants du Bénin. La collecte des échantillons a été réalisée durant 3 mois (octobre à décembre 2010) dans la ville de Cotonou. Ces échantillons ont été soigneusement prélevés dans des sachets Stomacher, étiquetés puis acheminés au laboratoire dans des glacières contenant des accumulateurs thermiques. Au laboratoire, les analyses microbiologiques des échantillons ont été réalisées immédiatement sinon, les échantillons ont été conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation.

2.1.2. Souches cliniques

Sur une période de 4 mois, allant du 27 Septembre 2010 au 27 Janvier 2011, 2040 prélèvements d'origines diverses ont été analysés au CNHU - HKM de Cotonou pour la recherche de *Staphylococcus aureus*. Seuls les échantillons où *S. aureus* étaient en culture pure ou majoritaire (10^5 UFC/ml) ont été pris en compte. Les prélèvements traités étaient ceux des patients hospitalisés ou venus en consultation. Des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de pyomyosites et d'ostéomyélites appartenant à la collection du Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie ont été également utilisées.

2.1.2.1. Les urines

Le second jet des urines matinales, ayant fait au moins 3h dans la vessie, a été recueilli dans un flacon stérile. Une partie de l'urine a été centrifugée pendant 10mn à 5000trs/mn. Après cette opération, la coloration de Gram a été faite sur le culot. Le reste de l'urine estensemencé à l'aide d'une anse calibrée de 10µl sur les géloses Chapman et la gélose au sang (GS). Enfin, la coloration Gram des souches soupçonnées a été réalisée.

2.1.2.2. Les prélèvements vaginaux

Les prélèvements vaginaux ont été faits le matin chez les femmes n'ayant pas fait leur toilette intime. Après la pose du spéculum, deux écouvillons ont servi au prélèvement de l'exocol et deux autres à celui de l'endocol. Les premiers écouvillons ont servi àensemencer la gélose Sabouraud et à réaliser l'état frais, la coloration Gram et le test au KOH. A l'aide des seconds écouvillons, la gélose Chapman et la gélose au sang ont étéensemencés.

2.1.2.3. Les spermés

Le sperme a été recueilli par l'homme dans un flacon stérile après une masturbation. Le sperme est ensemencé sur la gélose au sang et la gélose Chapman puis une partie du sperme a été mise dans un bouillon nutritif. Après cette série d'ensemencements, la coloration Gram a été réalisée.

2.1.2.4. Les prélèvements urétraux

Ce prélèvement a consisté, dans le cas des écoulements, à recueillir le pus au méat de l'urètre à l'aide d'un écouvillon stérile. En absence d'écoulement, l'urètre a été gratté par un écouvillon stérile. Les prélèvements ont été ensemencés sur les géloses Chapman et au sang cuit. Ce n'est qu'après cette opération que la coloration Gram a été réalisée.

2.1.2.5. Les prélèvements de pus, ulcères de Buruli, abcès, nasal

Les prélèvements de pus ont été effectués par écouvillonnage pour les infections superficielles (Ulcère de Buruli, Abcès, Nasal). Les écouvillons ont été ensemencés sur la gélose Chapman, la gélose au sang et le bouillon nutritif. La coloration Gram a été réalisée après cette série d'ensemencements sur les colonies suspectées.

2.1.2.6. Les prélèvements de pyomyosites et d'ostéomyélites

Les bactéries atteignent l'os soit de manière hémotogène par le courant sanguin, soit par inoculation directe. Les prélèvements ont été effectués par une hémoculture réalisée après aspiration ou biopsie chirurgicale. Des ponctions de l'abcès musculaire ont été réalisées à l'aide d'une aiguille de 70 mm de long et 16 G.

2.1.2.7. Les hémocultures

L'hémoculture est un examen très performant, essentiel en pathologie infectieuse, sa réalisation doit être conduite avec une grande rigueur. Elle permet de porter un diagnostic étiologique formel, elle est positive au cours des septicémies et des bactériémies. Le sang est prélevé, le plus tôt que possible, après les premières constatations cliniques avant toute antibiothérapie et au moment des frissons ou des élévations thermiques. Dans le cas contraire, on réalise plusieurs hémocultures. Le sang est prélevé après une antisepsie soignée de la peau par ponction veineuse directement dans des flacons d'hémoculture (flacon contenant un bouillon citaté) (Deschamps *et al.*, 1981 ; Reimer *et al.*, 1997). Chez l'adulte, 10 ml ont été prélevés et 1 à 2 ml chez l'enfant par ponction veineuse. Le sang recueilli a été étuvé pendant 24 heures à 37°C. Après incubation, le sang a été ensemencé sur les géloses, au sang frais puis

Chapman et incubé à nouveau à 37°C pendant 18 à 24 heures. Une coloration Gram des souches a été également réalisée ici après cette série d'ensemencements.

2.1.3. Détermination de la séropositivité au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Park, 2005)

2.1.3.1. Détection immunologique

Le dépistage de la séropositivité au virus VIH se fait par mise en évidence de la présence d'anticorps anti-VIH dans le sérum utilisant le test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). C'est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. Les différentes étapes de ce test sont présentées dans la **figure 18** et se résume comme suit:

- **Fixation de l'antigène sur la microplaque de titration** : elle consiste à introduire environ 50 µl de solution d'antigène dans chacun des puits d'une microplaque de 96 puits avant une incubation de 5 min ;
- **Lavage des microplaques de titration** : le lavage se fait en tapotant la microplaque sur un papier absorbant. Une fois que la solution d'antigène est retirée de la microplaque, 250 µl de tampon de lavage ont été introduits dans chaque puits. Le tampon de lavage est également vidé en tapotant la microplaque sur un papier absorbant ;
- **Préparation des contrôles et des échantillons** : 50 µl de chaque échantillon et contrôles (Positif et négatif) sont introduits dans les puits correspondants puis incubés pendant 5 min ;
- **Lavage des microplaques** : l'opération a été réalisée deux fois ;
- **Ajout des anticorps traceur** : 50 µl d'anticorps (immunoglobulines ou Ig) couplé à l'enzyme E ont été introduits dans chaque puits puis incubés pendant 5 min ;
- **Lavage des microplaques** : l'opération a été réalisée également deux fois ;
- **Ajout des anticorps secondaires** : 50 µL de substrat sont introduits dans chacun des puits et laissés incuber pendant 5 minutes ;
- **Résultat** : les échantillons positifs (contenant l'anticorps anti-VIH) sont colorés alors que les négatifs sont incolores.

Pour les tests positifs, une confirmation par immuno-empreinte (*Western blot*) a été faite permettant ainsi d'identifier directement les antigènes du virus¹.

¹ <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article145>

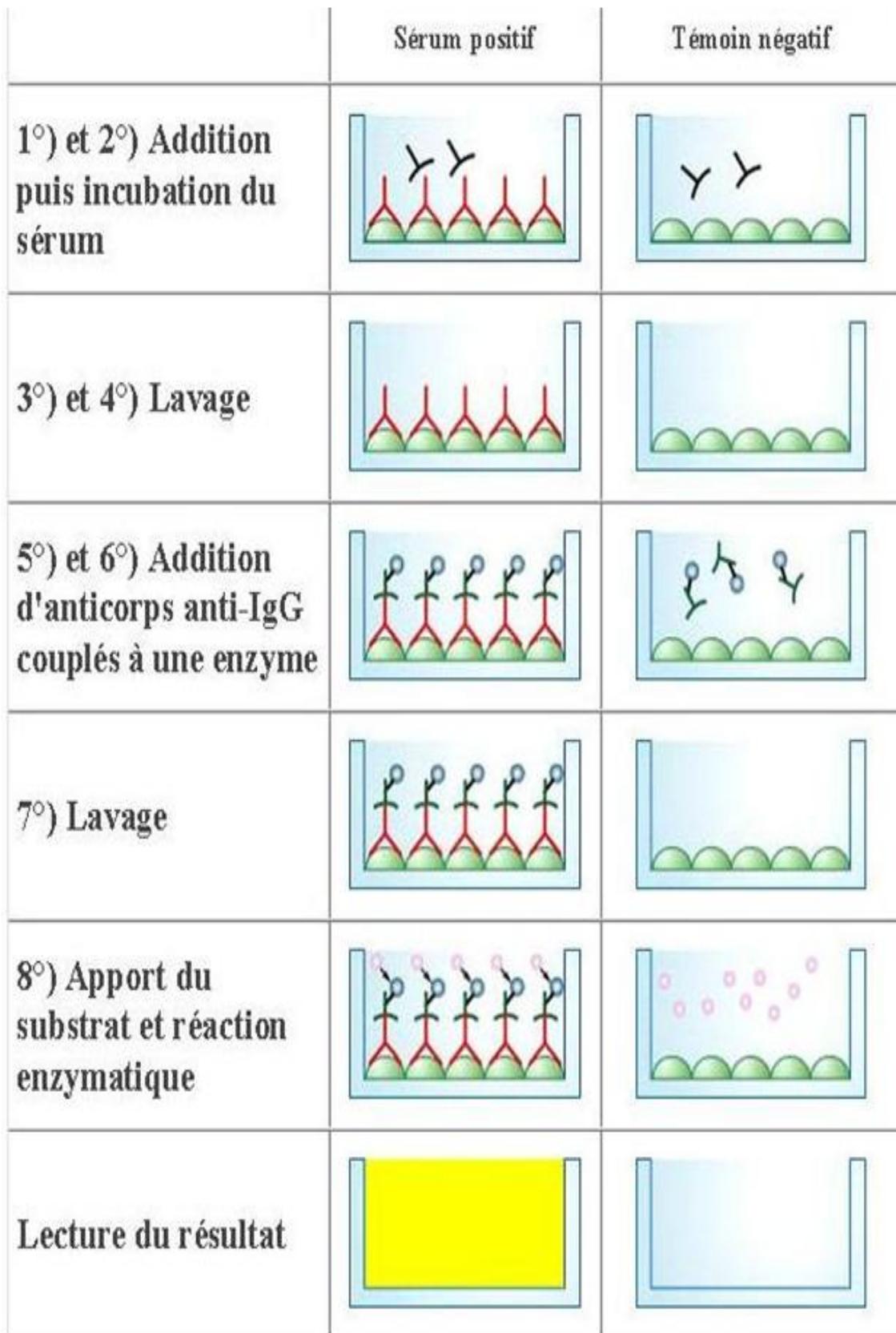


Figure 18: Représentation schématique du test ELISA ²

² <http://www.phonat.fr/charger/ElisatestV2.swf>

2.1.3.2. Confirmation de la séropositivité par immuno-empreinte

L'immuno-empreinte a permis de détecter les Anticorps anti-VIH sériques ou plasmatiques en vue de confirmer une séropositivité anti-VIH. Elle a été utilisée pour caractériser les anticorps digérés par chacune des protéines virales. En effet, les protéines du virus inactivé sont séparées en fonction de leurs poids moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant et réducteur puis transférées sur membrane de nitrocellulose (**Figure 19**).

Après incubation du sérum à tester avec la bandelette de nitrocellulose, le complexe Antigène-Anticorps anti-VIH est révélé par un Anticorps de détection anti-Anticorps humain couplé à une enzyme. Le substrat de l'enzyme une fois dégradé, précipite au lieu même de la réaction Antigène/Anticorps anti-VIH. La bandelette de nitrocellulose présente une bande colorée au niveau des différentes protéines antigéniques fixées spécifiquement sur les anticorps.

2.2. Isolement-Purification-Identification des souches de *S. aureus*

2.2.1. Isolement

L'isolement direct a été pratiqué sur le milieu sélectif (Chapman) et sur le milieu gélose au sang cuit. A l'aide d'une anse de platine, une portion de chaque prélèvement a été ensemencée par épuisement sur gélose en boîte de Pétri ; de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37°C pendant 24 heures.

2.2.2. Identification

Les méthodes microbiologiques standards pour l'identification de *Staphylococcus aureus* ont été la coloration de Gram, la croissance sur milieu gélosé Columbia enrichi en sang ANC (Acide Nalidixique et Colistine) (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France), les tests avec la catalase et la coagulase (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France).

2.2.2.1. Coloration Gram

2.2.2.1.1. Principe

La coloration de Gram est une technique qui doit son nom au bactériologiste danois **Hans Christian Gram** qui mit au point le protocole en 1884. C'est une coloration différentielle basée sur la structure de la paroi bactérienne qui est différente selon qu'il s'agisse de bactérie à Gram positif ou à Gram négatif.

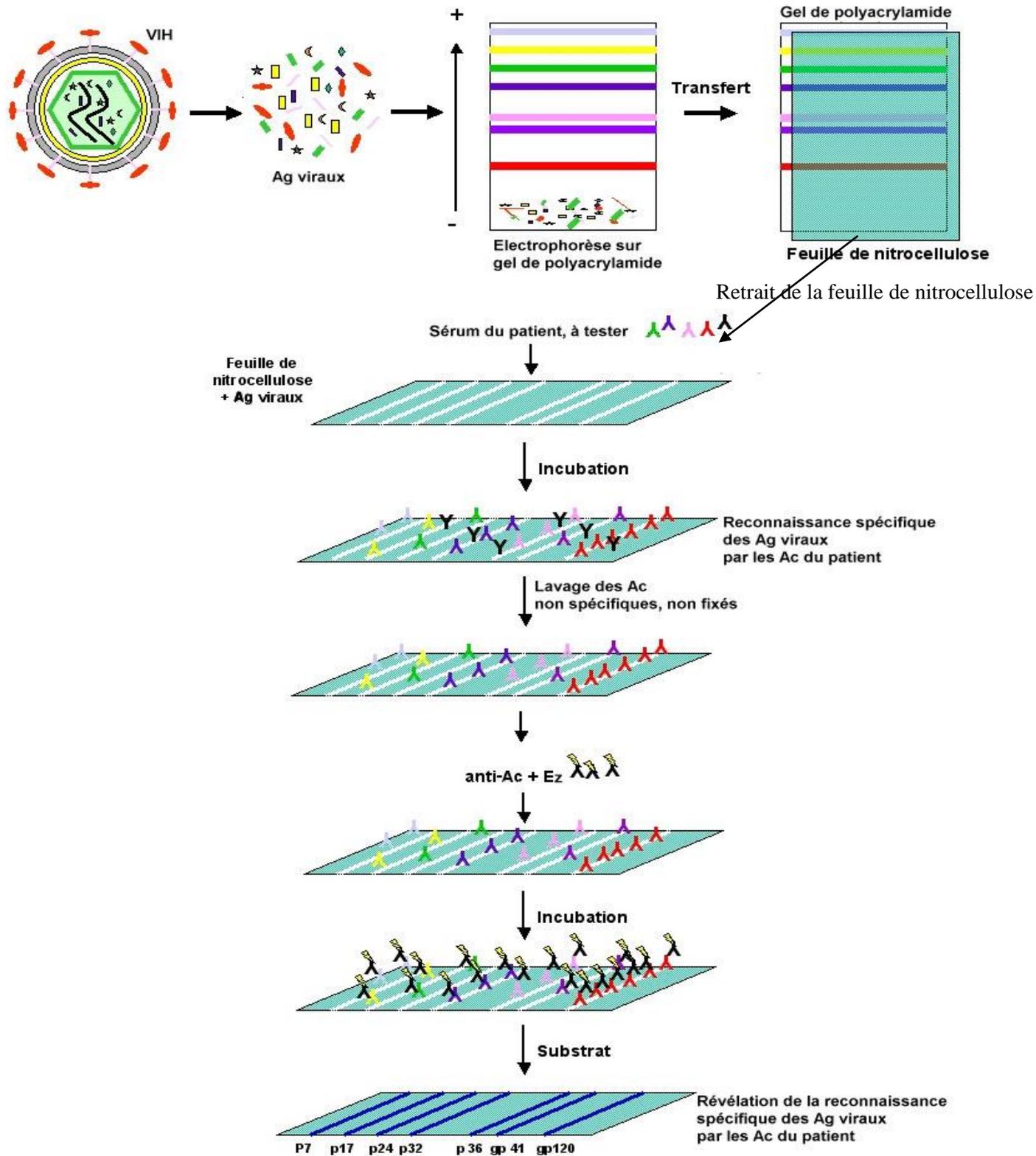


Figure 19: Schéma résumant les différentes étapes du western blot³.

³ <http://www.phonaf.fr/charger/ElisatestV2.swf>

En effet, les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram négatif, tandis que les bactéries à Gram positif en sont dépourvues. Cette paroi de part son organisation permet alors de classer les bactéries soit dans les Gram+ ou les Gram-. C'est une information importante car elle est utilisée dans la taxonomie. Elle permet ainsi, avec la reconnaissance de la morphologique et le mode de groupement des bactéries de renseigner sur l'ordre dont fait partie les bactéries étudiées.

Globalement, la coloration de Gram s'effectue en trois temps :

- Coloration en violet des bactéries par un colorant basique tel que le violet de gentiane puis par une solution de lugol (mordançage) ;
- Différenciation des bactéries sous l'action de l'alcool ou d'un mélange alcool + acétone. Les bactéries se répartissent ainsi en deux catégories : celles qui conservent la coloration violette et qui sont qualifiées de bactéries à Gram positif et celles qui sont décolorées et qui sont qualifiées de bactéries à Gram négatif ;
- La recoloration en rouge (ou en orange) des bactéries à Gram négatif avec un traitement par la fuchsine ou par la safranine.

2.2.2.1.2. Réalisation de la coloration de Gram

La souche présumée a été d'abord fixée sur une lame (frottis) à la chaleur. A la suite de cette fixation, la lame a été recouverte de violet de gentiane pendant 30 à 60 secondes. La lame fut rincée à l'eau de robinet pour éliminer l'excédent de colorant. Une fois le surplus de colorant éliminé, la lame a été recouverte de la solution de lugol pendant 30 à 60 secondes. Une fois encore, l'excédent de solution de lugol a été éliminée par un rinçage à l'eau de robinet. Sur la lame maintenue verticalement, quelques gouttes d'alcool ont été versées et laissées pendant 30 à 60 secondes avant un rinçage à l'eau de robinet. Une seconde fois, le frottis a été coloré à l'aide de la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 pendant 10 à 20 secondes avant un rinçage final. Après avoir séché cette lame, elle a été imbibée d'huile à immersion avant l'observation au microscope optique à l'objectif x100.

Après cette coloration, les staphylocoques apparaissent au microscope comme des cocci (en amas) à Gram positif (coloration violette).

2.2.2.2. Test de la Catalase

2.2.2.2.1. Principe

La catalase est une enzyme produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes. C'est un caractère quasi constant chez les staphylocoques. Cette enzyme catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en oxygène gazeux et en eau.



Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram +. La mise en évidence de la catalase permet de distinguer parmi les cocci à Gram positif, les staphylocoques et les streptocoques (Riegel *et al.*, 2006).

2.2.2.2.2. Réalisation du test de la catalase.

Sur une lame de verre propre et sèche, une goutte d'eau oxygénée a été déposée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Sur cette goutte d'eau, une colonie prélevée de la gélose de culture a été déposée à l'aide d'une anse en platine.

Le test positif, indiquant la famille des *Micrococcaceae*, se présente sous forme d'une effervescence (bulles de gaz). En cas de test négatif, il n'y a pas d'effervescence (Riegel *et al.*, 2006).

2.2.2.3. Test de la Coagulase

2.2.2.3.1. Principe

La coagulase libre (exo-enzyme) est une enzyme libérée dans le milieu au cours de la culture par *Staphylococcus aureus*. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de *S. aureus*. La production de la coagulase libre par *Staphylococcus aureus* provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un caillot de coagulation. Cette enzyme est capable in vitro de coaguler le plasma de lapin lyophilisé (Riegel *et al.*, 2006).



2.2.2.3.2. Réalisation du test de recherche de la coagulase

Ainsi, à partir d'une préculture pure de 18 heures de la souche à identifier, des cultures en bouillon nutritif ont été réalisées. Dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml de plasma de lapin, on a introduit 0,5 ml de la suspension bactérienne jadis préparée, puis incubé à 37 °C. Des lectures ont été effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures.

Le test positif se traduit par l'observation d'une prise en masse après inclinaison du tube. Ceci n'est pas observé dans le cas d'un test négatif. Un caillot moins compact, visible avant la 24^{ème} heure traduit un résultat positif puisqu'il peut subir une ré-dissolution provoquée par la fibrinolysine entraînant une fausse réaction négative.

2.2.3. Purification

Après la période d'incubation, les colonies sont ensemencées sur les milieux adéquats (GN ou milieu de Chapman) selon leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques, celles qui présentent un aspect caractéristique à celui des staphylocoques sont isolées à nouveau à l'aide d'une pipette Pasteur puis sont ensemencées en stries selon la méthode des quatre quadrants de manière à obtenir des colonies bien isolées. Une coloration Gram est refaite chaque fois pour contrôler la pureté des souches. La conservation des souches a été faite dans du MH liquide à 10% de glycérol à -20°C.

2.3. Détermination de la susceptibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus*

Les sensibilités aux antibiotiques ont été déterminées par diffusion sur milieu Mueller-Hinton gélosé conformément aux recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012). Les antibiogrammes ont été effectués par la méthode de diffusion en gélose à partir de disques chargés d'antibiotiques.

2.3.1. Technique de l'antibiogramme

Un inoculum a été préparé à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement (gélose nutritive, Chapman). Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine puis déchargée dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et ajustée jusqu'à atteindre une opacité équivalente à 0.5 Mc Farland.

Le milieu Mueller-Hinton (MH), coulé en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm est utilisé. Un ensemencement par inondation a été faite dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

2.3.2. Les antibiotiques testés

Pour l'étude de la sensibilité du *S. aureus* aux antibiotiques, vingt neuf antibiotiques de différentes familles et reconnus actifs sur cette bactérie ont été testés. Les antibiotiques fabriqués par Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) qui ont été testés sont : Pénicilline G (Benzyl Pénicilline) (10 UI), Oxaciline (5 µg), Kanamycine (30µg), Gentamicine (10 UI), Ofloxacin (5 µg), Pristinamycine (15 µg), Erythromycine (15 µg), Rifampicine (30 µg), Fosfomycine (50 µg), Acide fusidique (10 µg), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (1,25/23,75 µg), Tobramycine (10 µg), Linezolid (30 µg), Chloramphénicol (10 µg), Tétracycline (30 µg), Vancomycine (30 µg), Quinupristine/Dalfopristine (15 µg), Minocycline (30 UI), Tétracycline (30 UI), Mupirocine (5 µg), Nitrofurantoïne (300 µg), Lincomycine (15 µg), Cefoxitin screen (30 µg), Ciprofloxacine (5 µg), Imipénème (10 µg), Cefotaxime (30 µg), Netilmicine (10 µg), Amoxicilline (25 µg), Amoxicilline+acide clavulanique (20/10 µg). La résistance à l'Oxaciline a été déterminée par le diamètre d'inhibition de croissance sur une gélose hyper salée à 6,5% (p/v) NaCl après 24 h d'incubation à 30°C.

2.4. Recherche des toxines

2.4.1. Détection phénotypique des toxines

2.4.1.1. Purification des composés leucotoxiques (LukS-PV et LukF-PV) par chromatographie échangeuse d'ions (FPLC) (Finck-Barbançon *et al.*, 1991 ; Joubert *et al.*, 2006)

2.4.1.1.1. Principes

Un échangeur d'ions est constitué d'une matrice insoluble sur laquelle sont fixés des groupes chargés à caractère acide ou basique. La neutralité électrique est assurée par des ions de signes contraires (contre-ions) qui peuvent être réversiblement échangés avec d'autres ions de même signe électrique apportés par la phase mobile. L'échange d'ions est applicable à toute molécule ionisée. Dans le cas des protéines, une partie des acides aminés qui les composent possède des groupements résiduels acides ou basiques conférant à la molécule un caractère de polyélectrolyte amphotère exploité en chromatographie d'échange d'ions. La somme algébrique de ces charges, la charge nette de la protéine, varie en fonction du pH. Le pH pour lequel la charge nette de la protéine est nulle est le point isoélectrique pI. La variation de l'interaction en fonction de la concentration en ions compétiteurs (contre-ions) et du pH sont exploitées pour adsorber puis éluer sélectivement la protéine.

La leucotoxine clivée de sa protéine de fusion est dialysée contre le tampon de charge. Elle est ensuite capturée à l'aide d'une colonne avec 6 mL de gel ReSource S (Amersham-Biosciences, Saclay) intégré dans un système FPLC puis éluée dans un gradient continu de NaCl. Les tampons utilisés contiennent chacun 1 mM de DTT lorsqu'une cystéine est présente dans la protéine.

2.4.1.1.2. Purification de LukS-PV (Finck-Barbancon *et al.*, 1991)

La colonne est équilibrée avec 10 mL de tampon A, puis on passe 2 mL de NaOH 0,5 M suivis de 10 mL de tampon A (à 2 mL/min). L'équilibrage se poursuit avec 20 mL de tampon B (à 4 mL/min) et finalement 30 mL de tampon A.

Préparation de l'échantillon : il est dilué pour éviter sa précipitation dans le tampon A jusqu'à un volume final de 40 mL puis il est dialysé ensuite pendant 2 heures au moins (SpectraPor 1 de 3,3 mL/min) contre 2 L de tampon A. On applique l'échantillon sur la colonne (à 4 mL/min). La GST est éluée dans l'isocratique.

L'élution se fait dans le gradient suivant à 4 mL/min : 1 min 0%B, 12,9 min 18%B, 13 min 100% B, 18 min 100% B. La protéine S+8 est éluée vers 10% à 11% (150 mM NaCl).

2.4.1.1.3. Purification de LukF-PV (Finck-Barbancon *et al.*, 1991)

Le principe est à peu près le même que précédemment. La colonne est équilibrée avec 10 mL de tampon A puis on passe 2 mL de 0,5M NaOH suivis de 10 mL de tampon A (à 2 mL/min). L'équilibrage se poursuit avec 20 mL de tampon B (à 4 mL/min) et finalement 40 mL de tampon A.

Préparation de l'échantillon : il est dilué jusqu'à un volume de 40 mL dans le tampon de dialyse (10 mM MES, pH 6,2 [NaOH]) pour éviter la précipitation. On dialyse au moins pendant 2 heures (SpectraPor 1 3,3 mL/cm) contre 2 L de tampon de dialyse. Avec un tampon 500 mM MES pH 6,3 on amène la concentration de MES à 30 mM. On applique ensuite l'échantillon sur la colonne (à 4 mL/min). La GST n'est pas retenue par la colonne et est donc éluée dans l'élution isocratique.

L'élution se fait dans le gradient suivant à 4 mL/min : 1 min 0% B, 1,5 min 3% B, 13 min 14% B, 14 min 100% B, 19 min 100% B. La protéine F+8 est éluée vers 10% (100 mM NaCl).

2.4.1.2. Immunoprécipitation des leucotoxines par une diffusion radiale en gel des protéines ou Méthode d'Ouchterlony

2.4.1.2.1. 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 solide (en général un gel d'agarose) à partir de puits placés en face et à équidistance l'un de l'autre.

Les molécules (anticorps et antigènes) diffusent de façon homogène dans toutes les directions autour du puits. Deux auréoles de diffusion peuvent donc entrer en contact lorsqu'elles ont suffisamment progressé. Ainsi, lorsque les molécules d'anticorps rencontrent les molécules d'antigènes, la liaison antigène-anticorps conduit à la précipitation, visible à l'œil nu, des complexes immuns dans la zone de rencontre si l'anticorps reconnaît l'antigène. Cette zone est absente s'il n'y a pas de réaction entre les deux molécules.

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 (**Figure 20**) blanchâtre.

2.4.1.2.2. Réalisation du test d'Ouchterlony

La présence de certaines leucotoxines à savoir la Leucotoxine de Panton et Valentine (PVL), la leucotoxine Luke-LukD et les épidermolysines (ETA, ETB) a été détectée à partir de surnageant des souches après les avoir mises en culture dans le milieu YCP (Yeast Casamino-acid Pyruvate) pendant 18 heures.

2.4.1.2.2.1. Préparation du gel

Un gel d'agarose à 0,6% a été préparé dans du tampon PBS. Une fois dissoute à 100 °C dans un four à microonde, la solution d'agarose a été coulé dans une boîte de pétri carré après un léger refroidissement (environ 60 °C) sur une épaisseur d'environ 1 à 1,5 mm (environ 70 ml). Pour le coulage, les boîtes ont été disposées sur un plan parfaitement horizontal.

Après le coulage, les gels ont été laissés à température ambiante (25 °C) jusqu'à solidification. A la suite de la solidification, les puits ont été percés dans le gel à l'aide d'un emporte-pièce de diamètre 5 mm. Neuf rosaces de 7 puits, espacés de 7 à 8 mm entre eux, ont été réalisées par boîte à l'aide d'un gabarit de perçage.

2.4.1.2.2.2. Dépôt des échantillons

Les anticorps polyclonaux de lapin utilisés pour ce test sont purifiés par affinité et sont donc spécifiques de chaque leucotoxine (Gravet *et al.*, 1998). Ces anticorps anti-leucotoxines ($DO_{280 \text{ nm}} = 3$) ont été déposés dans le puits central dans le but de permettre une réaction spécifique avec les surnageants de culture ou les lysats bactériens déposés dans les 4 puits excentrés (2 heures, 4 heures, 8 heures, 10 heures). Les antigènes témoins (toxines purifiées) à $DO_{280} = 0,2$ ont été également déposés dans des 2 puits (12 heures et 6 heures) adjacents (**Figure 21**). Après une diffusion de 16 heures à 4 °C, les arcs de précipitation sont observés directement à l'œil nu ou après une coloration au bleu de Coomassie.

2.4.1.3. Recherche des entérotoxines par le Test d'agglutination:

Les entérotoxines A, B, C et D, puis la Toxine du Syndrome de Choc Toxique 1 (TSST-1) ont été déterminées par des tests semi quantitatifs utilisant respectivement des kits SET-RPLA (Reversed passive latex agglutination) et TST-RPLA (Oxoid, Hampshire, England) (Brett, 1998). Dans ce type de test, l'anticorps est attaché à des particules en latex et il réagit avec l'antigène soluble (l'entérotoxine). L'agglutination se produit en présence de l'entérotoxine et une couche diffuse se forme. Si l'antigène n'est pas présent les particules forment un « bouton » compact (Pimbley & Patel, 1998).

Les kits SET-RPLA et TST-RPLA (Oxoid) sont des tests immunochimiques pour la détection simultanée de SEA, SEB, SEC et SED dans des filtrats de culture et dans les aliments en une durée approximative de 20 heures. Les quatre entérotoxines peuvent être distinguées et le résultat peut être lu à l'œil nu (Su & Wong, 1997 ; Pimbley & Patel, 1998). Ces tests connus pour être très sensibles et spécifiques sont les moins coûteux, les plus faciles à utiliser et ils ne nécessitent aucun équipement spécifique (Su & Wong, 1997 ; Brett, 1998).

La détection des entérotoxines par agglutination a été réalisée, selon les instructions du fabricant. Les réactions ont lieu dans des microplaques ELISA à 96 puits avec 25 µl de surnageant de culture des souches et 25 µl des billes de latex imbibées d'anticorps adéquats. Les isolats de *S. aureus* ont été incubés dans 5 ml de bouillon BHI pendant 24h à 37°C. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 10000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant de culture a été récupéré, stérilisé par filtration et aliquoté en tubes Eppendorf 1,5 ml stériles à raison de 200 µl par tube avant d'être analysé. Dans le cas où les analyses ne sont pas effectuées, le surnageant est congelés en attendant leurs réalisations.

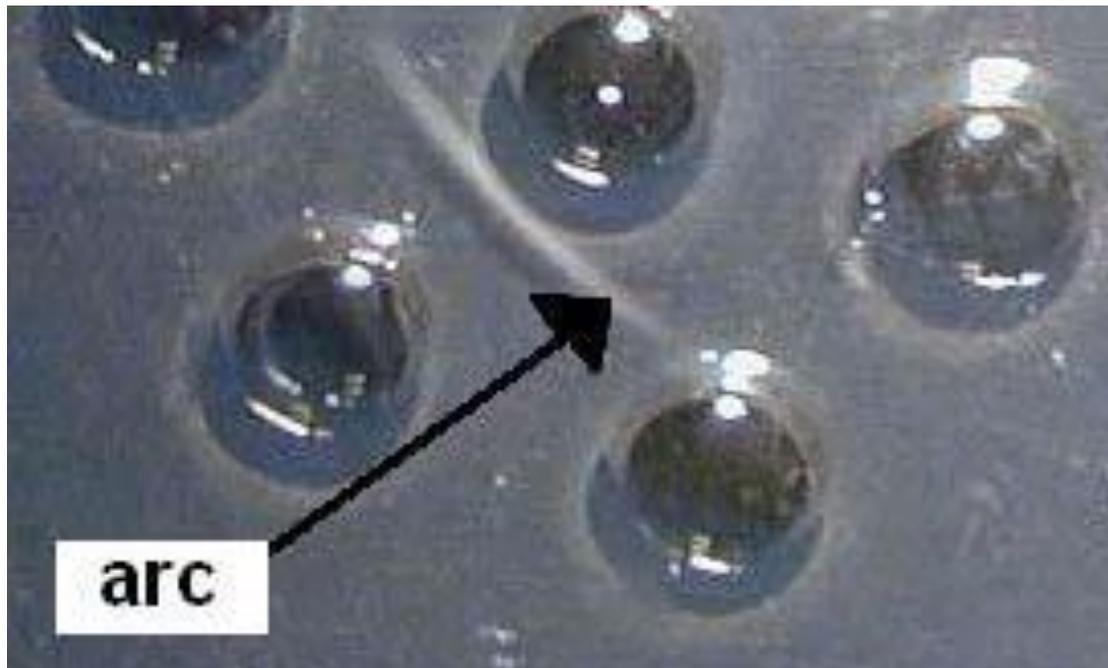


Figure 20: Représentation d'un arc de précipitation suite à un test d'Ouchterlony

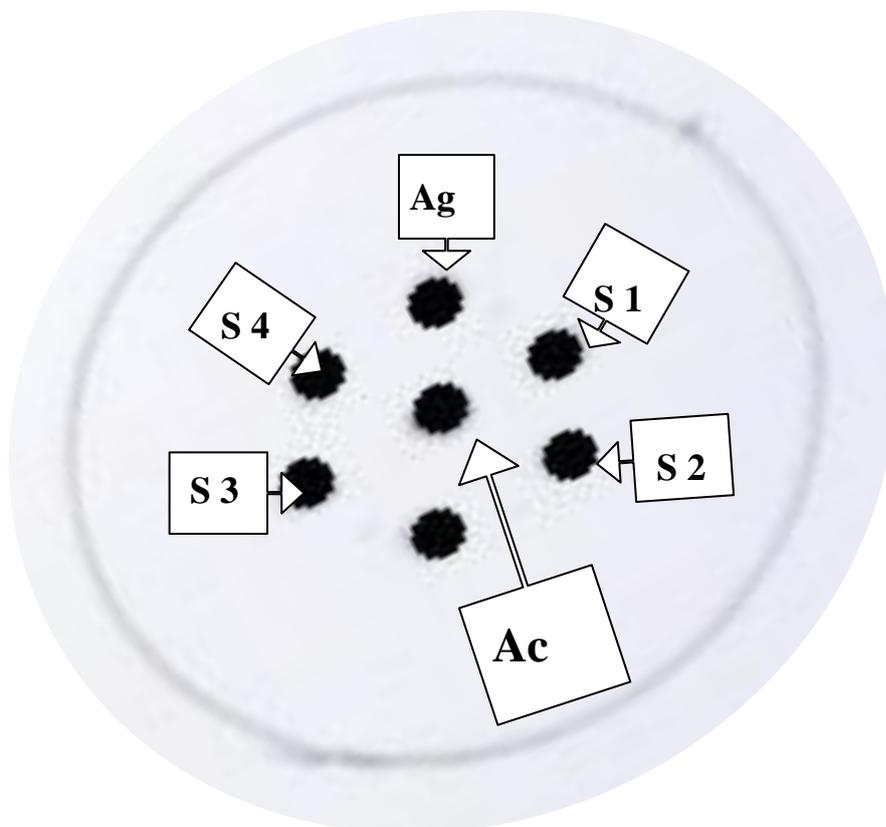


Figure 21: Gabarit de perforation des puits indiquant la disposition des solutions utilisées

S : surnageant ; Ag : Antigène ; Ac : Anticorps.

2.4.1.4. Dosage des entérotoxines (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI) par Bio-Plex (Joubert *et al.*, 2005)

2.4.1.4.1. Principe

Le principe d'une immuno-détection multiplex est basé sur le couplage de la technique immuno-enzymatique (ELISA sandwich) en microplaque de 96 puits, avec comme support des microbilles en polystyrène, à la cytométrie en flux. Cette technologie permet de quantifier simultanément jusqu'à 100 paramètres dans un même puits. Les microbilles (5,6 µm de diamètre) sont identifiées par un code de couleur, qui est constitué de deux spectres de fluorophores rouge et infrarouge, spécifiques de chaque paramètre (**Figure 22**).

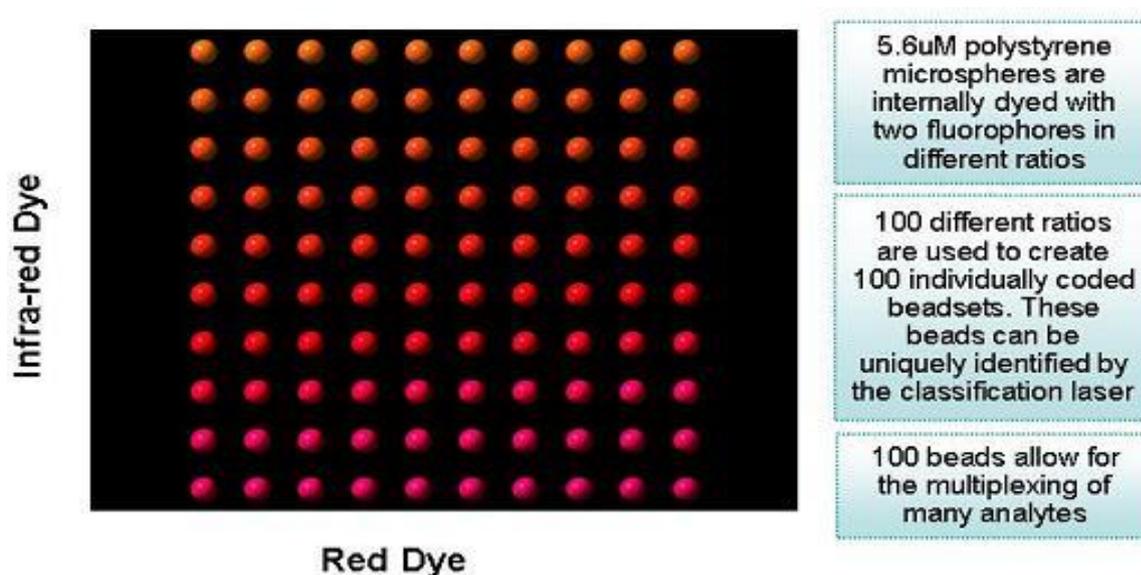
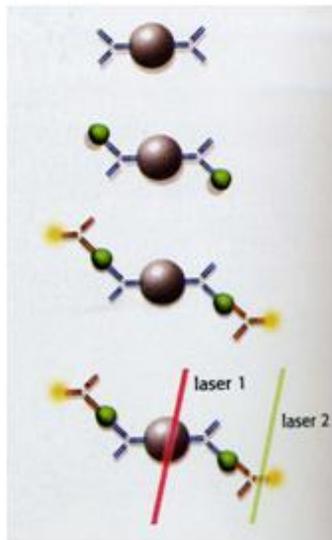


Figure 22: Microbilles du kit Bio-Plex⁴ : 100 billes différentes présentent un spectre de couleur rouge et infrarouge permettant le dosage de 100 analytes différents d'un même échantillon (document Bio-Rad) .

La sensibilisation des microplaques de titration est effectuée par un dépôt d'une suspension de billes de spectres différents chacune portant un anticorps monoclonal anti-toxine spécifique. A la suite d'une incubation, les toxines présentes dans les surnageants des cultures bactériennes vont se fixer sur leur anticorps spécifique. Après un premier lavage, la réaction antigène (entérotoxine)-anticorps est réalisée par addition de l'anticorps biotinylé spécifique de chaque entérotoxine. Suite à un second lavage, la réaction est révélée par addition d'une substance fluorescente, la phycoérythrine liée à la streptavidine, qui reflète la quantité d'entérotoxine présente dans le surnageant de la culture bactérienne (**Figure 23**).

⁴ http://users.stlcc.edu/departments/fvbio/Plate_Readers.pdf



1. Les billes avec l'anticorps de capture

2. Les anticorps des billes lient l'analyte

3. L'anticorps biotinylé se lie à l'analyte, la streptavidine-phycoérythrine se lie à la biotine, puis émet de la fluorescence (MFI)

4. La fluorescence est détectée par les lasers et les photomultiplicateurs du Luminex : Le laser 1 excite le code couleur correspondant à une des 100 molécules proposées, le laser 2 permet la quantification du facteur analyser

Figure 23: Etapes du dosage des entérotoxines par Bio-Plex⁵

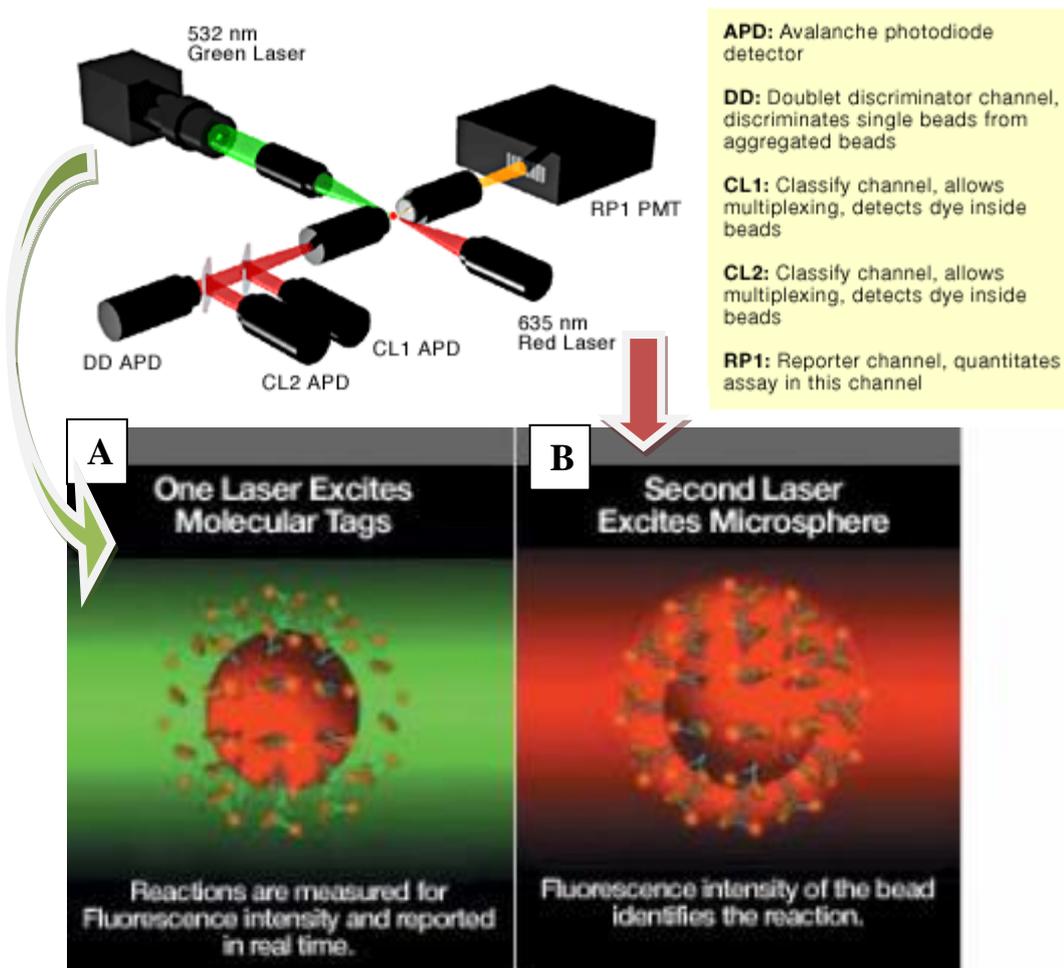


Figure 24: Analyse de la réaction par le Bio-Plex Array Reader⁵.

⁵ http://users.stlcc.edu/departments/fvbio/Plate_Readers.pdf

Le système optique est constitué de deux lasers : le premier laser à une longueur d'onde de 635 nm qui excite le mélange de colorants propre à chaque microbille, permettant d'identifier chacune des billes avec son code de couleur. Le second laser a une longueur d'onde de 532 nm qui excite le fluorophore rapporteur attaché à l'anticorps spécifique de détection (phycoérythrine) permettant de mesurer la quantité de l'entérotoxine à analyser dans chaque puits (**Figure24**). L'appareil de mesure des florescences est le Bio-Plex Array Reader.

2.4.1.4.2. Réalisation du dosage des entérotoxines par Bio-Plex

Le surnageant d'une préculture de *Staphylococcus aureus* a été dilué au 1/2 dans du PBS-Tween-20-IgG de lapin à 100 µg/ml (40mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween-20, pH 7.5) avant d'être incubé à température ambiante pendant 30 min. Le dosage simultané des entérotoxines dans des surnageants de préculture bactérienne a été réalisé à l'aide d'un kit Bio-Plex 100 array reader accompagné du logiciel Bio-Plex Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Les différents dosages ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur dans un volume de 125 µl de PBS-Tween-20 à 0,05 %.

Le test Bio-Plex a consisté à réaliser divers essais avec des microbilles dans un même et unique échantillon. Cette manipulation est composée de trois étapes d'incubation qui ont été faites dans des microplaques à fond plat contenant des millipores comme suit :

- i- Ajout de 50 µl de tampon PBS dilué avec 50 µl d'un mélange de microbilles contenant $5 \cdot 10^3$ de billes de spectre différents chacune portant un anticorps monoclonal de toxine spécifique pendant 1h30 min,
- ii- Ajout de 50 µl de l'anticorps biotinylé spécifique contentement 2,25-0,5 µg/ml de chaque entérotoxine (Patent: PCT/IB2012/050909) pendant 1 heure,
- iii- Ajout de 50 µl de 1,5 µg/ml de substance fluorescente, la phycoérythrine liée à la streptavidine.

Les étapes sont intercalées d'une série de trois lavages avec du tampon PBS PBS-Tween20.

2.4.2. Détection géotypique des toxines

Les toxines et les facteurs d'adhésion pour lesquels nous n'avons pas d'anticorps, ont été détectés par la PCR Multiplexe sur ADN purifié utilisant des primers spécifiques comme décrit précédemment (Baba-Moussa *et al.*, 2010). Ainsi, la présence de gènes codant les entérotoxines E (see), G (seg), H (seh), K(sek), L(sel), T(set), épidermolysine D (etd), de gènes codant les facteurs ADP-ribosylants EDIN-A,-B,-C (Epidermal Cell Differentiation

inhibitor) et de gènes codant 7 facteurs d'adhésion le Collagen Binding Protein (*cna*), Fibronectin Binding Proteins A et B (*fnbA* et *fnbB*), Bone Sialoprotein Binding Protein (*bbp*), Clumping Factor B (*clfB*), Fibrinogen Binding Protein (*fib*), Elastin Binding Protein (*ebp*) et la Laminin Binding Protein (*lbp*) a été recherchée.

2.4.2.1. Principe de la PCR

L'amplification de fragments de gènes (Saiki *et al.*, 1988) est fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase : *Thermus aquaticus* polymérase) capable de copier un brin d'ADN utilisé comme matrice, en un brin complémentaire par élongation à partir de l'extrémité 3'-OH d'une amorce oligonucléotidique. Elle consiste à effectuer un certain nombre (n) de cycles successifs d'amplification en utilisant des amorces de polymérisation complémentaires des extrémités qui encadrent le fragment d'ADN à amplifier. Chaque cycle se déroule en 3 étapes successives : dénaturation de l'ADN à 95°C, refroidissement à une température permettant l'hybridation des amorces, et l'élongation des amorces par la Taq ADN polymérase® (Roche) à la température optimale de l'enzyme (**Figure 25**). Le produit d'un cycle de polymérisation est utilisé pour le cycle suivant, ce qui aboutit à 2ⁿ fragments d'ADN amplifiés en théorie. Dans notre présente étude, la PCR-Multiplexe a été utilisée. Cette dernière présente l'avantage de l'utilisation de plusieurs amorces (primers) au sein de la même réaction. Ceci donne la possibilité d'avoir de multiples amplifications à sélectivité dirigée. La difficulté initiale dans l'établissement d'un tel protocole réside du fait même des différences de propriétés physico-chimiques entre les amorces utilisées ; lesquelles différences croissent avec le nombre de ces amorces. Le paramètre essentiel à prendre en compte est la température de fusion (T_m) de chaque amorce, valeur caractérisant sa capacité de fixation plus ou moins spécifique en fonction des conditions de réaction et qui influence directement la température d'hybridation. Dans l'élaboration du protocole, le but est la réalisation d'un contexte de conditions intermédiaires optimales pour chacun des participants à la réaction, ceci par modulation des températures, des concentrations des matrices et amorces, de leur rapport et des quantités de dNTP, Taq polymérase ou magnésium.

2.4.2.2. Extraction de l'ADN (Adapté de Zimmemann *et al.*, 1998)

L'extraction de l'ADN des isolats de *S. aureus* a été réalisée avec la méthode de thiocyanate-guanidine. Les isolats ont été incubés dans du bouillon TY une nuit à 37°C. Après centrifugation (10 min, 4°C, 3700 g), le culot a été dispersé dans 500 µl de tampon STE

(Trizma-base 50 mM, EDTA 20 mM, saccharose 6,7% (p/v) pH 8, Sigma, France) et ré-centrifugé (10 min, 4°C, 3700 g).

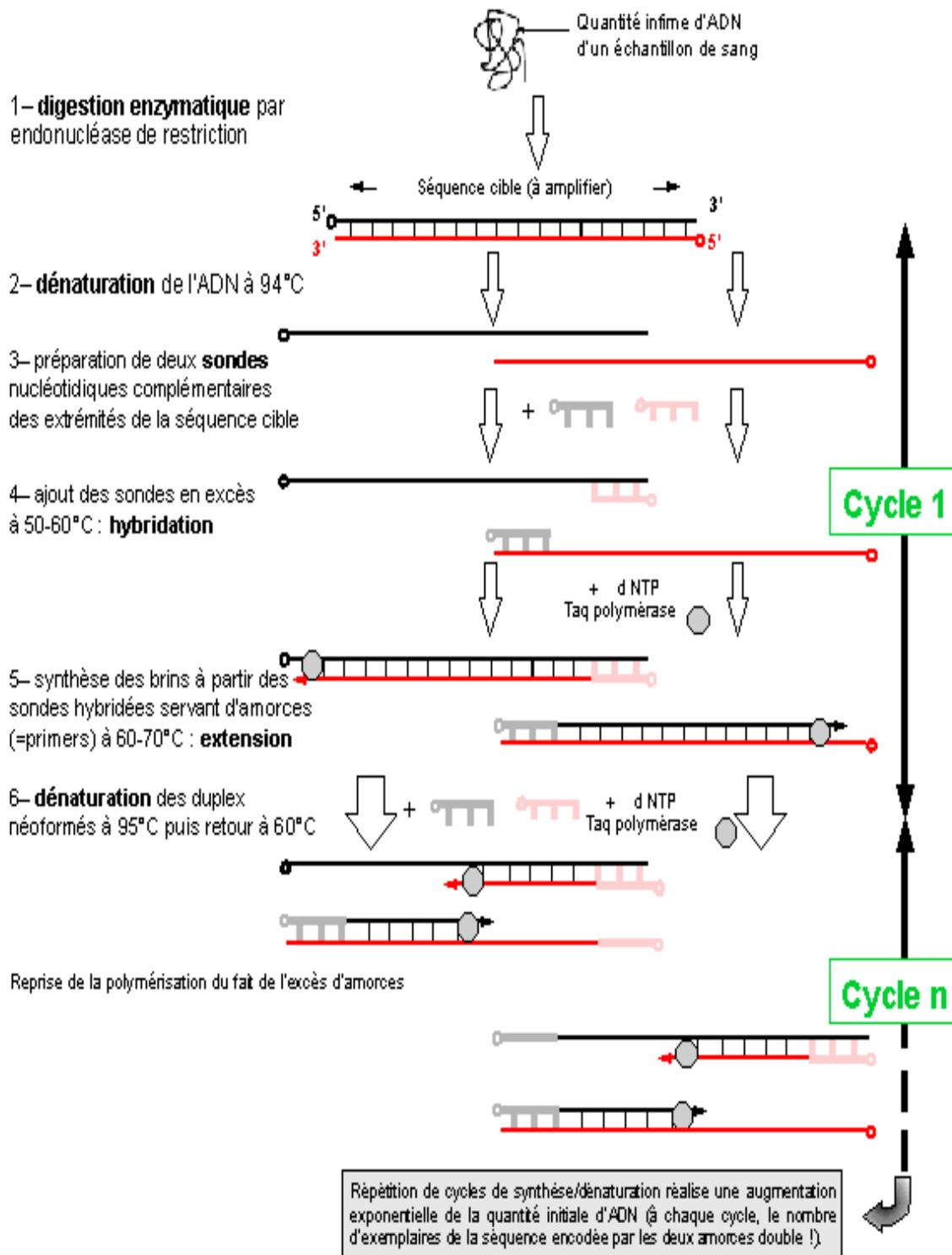


Figure 25: Schéma résumant les différentes étapes de la PCR⁶

⁶ <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/techgen/html/schempcr.htm>

2.4.2.2.1. Lyse des cellules

Il a été ajouté 230 µl du mélange Guanidine thiocyanate (Sigma) 4M, pH 7,5 + N-lauroylsarcosine (Sigma) 10 % aux culots. Les tubes ont été vortexés pour homogénéiser le mélange avant d'être chauffés au four à micro-ondes (433W) pendant 45 secondes. Sortis du four, les tubes sont mis dans de la glace pendant 1 min et réchauffés au four à micro-ondes (433W) pendant 45 secondes. Enfin, 250 µl de N-lauroylsarcosine 5 % ont été ajoutés à chaque tube dont le contenu a été homogénéisé par un vortex, avant d'être centrifugé, pendant quelques secondes.

2.4.2.2.2. Précipitation des acides nucléiques

Un mélange (1 ml, 20/1 v/v) d'éthanol 100 % et d'acétate de sodium 3M (acétate de sodium anhydre, Sigma et acide acétique glacial 100 %, VWR) a été ajouté à chaque tube contenant les surnageants bactériens afin de faire précipiter l'ADN. Après 10 min à température ambiante, les contenus des tubes ont été centrifugés (10 min, 4 °C, 14000 g) et les culots sont repris avec 250 µl du mélange acétate de potassium 0,5M + TE 1X (EDTA, Sigma et Tris base, Sigma, pH 8, HCl 5 N). Les tubes ont été agités, incubés pendant 1 heure 30 min dans de la glace puis centrifugés (30 min, 4 °C, 14000 g). A chaque surnageant récupéré dans un tube Eppendorf, 525 µl du mélange éthanol 100 %/acétate de sodium 3M ont été ajoutés et les tubes sont ensuite retournés et placés à -20 °C pendant au moins 20 min.

2.4.2.2.3. Purification des Acides nucléiques

Après une première centrifugation (10 min, 4 °C, 12000 g), le culot a été repris dans 500 µl d'éthanol 70 %. Cette suspension du culot a subi une nouvelle centrifugation (10 min, 4 °C, 12000 g). Suite à cette seconde opération, le culot a été séché pendant 20 min. Le culot séché est repris dans 40 µl de TE 1X + Rnase (10 mg/ml : Rnase 25 mg, Sigma + tampon Tris-HCl 100mM + NaCl 5M + eau UHQ) 100/1 v/v.

2.4.2.3. Réalisation de la PCR

La PCR a été réalisée avec un thermocycler Gene Amp® PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) dans un volume total de 50µl contenant 25 pmole de chaque amorce, 50 ng d'ADN, 5 mM MgCl₂, 10 mM du mélange de dNTP, Tampon PCR 10x concentré et 5 unités de Fast Taq DNA polymerase (Roche Applied Science, GmbH, Germany). La réaction de la PCR comprend une étape initiale de dénaturation (2 mn à 92 °C) suivie par 35 cycles

d'amplification comprenant chacun 2 mn de dénaturation à 92°C, 1 mn d'hybridation à 50°C et une élongation de 2 mn 30 s à 72°C. La réaction est terminée par une étape d'extension finale de 3 mn à 72°C. Aux produits finaux de la PCR ont été ajoutés 2,5 µl de bleu de bromophénol (Appligène, Ficoll 400 à 30% et Sodium Lauryl Sulphate à 20%, Gibco BRL) dilué dans du tampon TE 10X. Ce mélange a été analysé par une électrophorèse sur agarose 1,4% (Euromedex, Mundolsheim, France). Le gel a été ensuite visualisé sous lumière ultraviolette (UV).

2.4.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,4 % contenant du bromure d'éthidium à la concentration finale de 1µg/ml, et tamponné avec du TBE 1X (Tris Borate Ethylène Diamine Tétracétique Acide). La migration a été réalisée dans un volume constant de tampon TBE 1X sous une tension constante de 100 V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint une distance approximative de 5 cm (environ 30 min). La lecture s'est effectuée sous une lampe à U.V. (Ultra- Violet). Un marqueur de poids moléculaire de 100 paires de bases (Invitrogen, France) a été utilisé.

2.4.3. Electrophorèse en champs pulsé (PFGE)

L'électrophorèse en champs pulsés ou Pulsed-Field Gel Electrophoresis: PFGE (Chu *et al.*, 1986; Dijkshoorn *et al.*, 2001) a été développé par Schwartz et Cantor (1984) afin de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) ; ce qui est impossible avec l'électrophorèse classique sur gel d'agarose même si l'on diminuait au maximum la concentration d'agarose.

2.4.3.1. Principe de la PFGE

La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est d'environ 18 microns. Ainsi, l'effet de filtration ne pouvant plus affecter la vitesse de migration des molécules d'ADN dont la taille est supérieure à 20 kb, celle-ci reste alors constante quelle que soit la grandeur de cette taille. Le principe (**Figure 26**) de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité qu'elle soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel. Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille

(Struelens & de Mendonca, 2001). L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1 kilobase à une dizaine de mégabases. Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car celles-ci les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN les cellules sont incluses dans des blocs d'agarose. Différentes techniques de champ pulsé ont été développées : OFAGE (orthogonal field alternation gel electrophoresis), CHEF (Contour-Clamped Homogeneous Electrophoretic Field), FIGE (field inversion gel electrophoresis), TAFE (Transverse Alternating Field Electrophoresis), etc. Dans le cas du présent travail, c'est la TAFE qui a été utilisée.

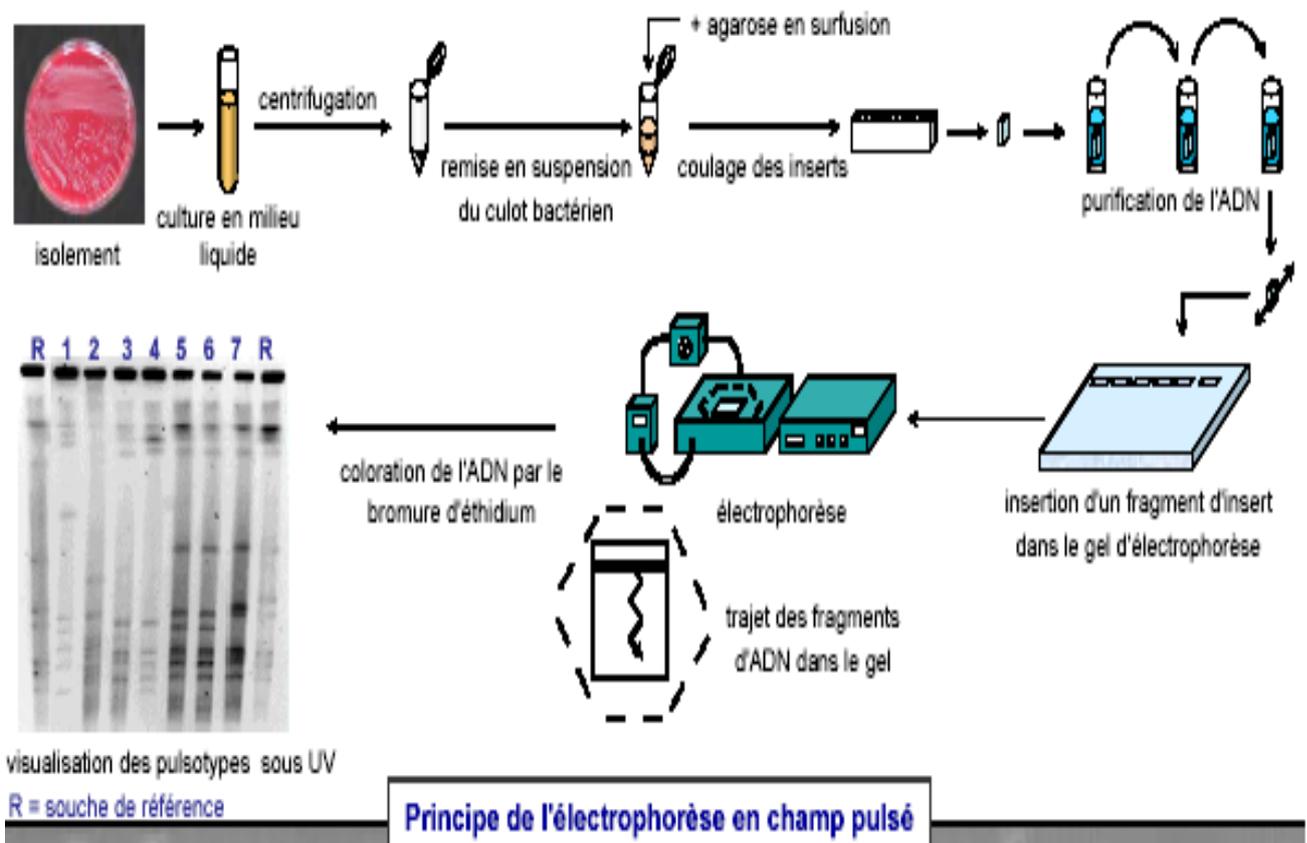


Figure 26: Schéma résumant le principe de l'électrophorèse en champs pulsés (PFGE)⁷

2.4.3.2. Réalisation de la PFGE

Le protocole utilisé pour cette étude s'est inspiré de celui décrit par Peters *et al.* (2003). Ce dernier a été adapté à partir d'un protocole défini pour *Escherichia coli* par le CDC (Center for Diseases Control) d'Atlanta, Etats Unis d'Amérique. Un protocole standardisé de trois phases a également été publié par Ribot *et al.* (2006).

⁷ http://julientap.free.fr/travail_fichiers/htm/ecoli_O111.htm

2.4.3.2.1. Extraction de l'ADN

Au préalable à l'extraction de l'ADN, il est nécessaire de mettre en culture les bactéries. Un premier ensemencement est réalisé sur gélose Chapman (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France), afin de vérifier la pureté des souches. Une colonie de cette gélose est ensuite repiquée sur milieu de Mueller-Hinton gélosé (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England). A partir de ces boîtes, les souches de *Staphylococcus aureus* ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de leur croissance dans 25 ml de milieu TY. Cette suspension a été alors incubée quelques minutes avec de la protéinase K, afin d'améliorer l'étape de lyse en dégradant les protéines. L'électrophorèse en champ pulsé nécessite l'extraction de l'ADN total à partir des souches à analyser. L'un des critères importants du protocole est l'obtention d'un ADN purifié. Il ne doit subir aucune dégradation c'est à dire aucune coupure mécanique ou enzymatique. Pour ce faire, l'ADN a été emprisonné dans des petits blocs d'agarose (plugs) afin de le protéger pour les étapes suivantes. Les plugs sont alors incubés dans une solution de lyse contenant de la protéinase K pendant 18 h à 56°C. L'adjonction d'un détergent (le SDS) au moment de l'inclusion du matériel génétique dans l'agarose permet de délipider la membrane bactérienne et de renforcer l'étape de la lyse. Les plugs sont enfin rincés cinq (05) fois à l'eau puis au TE (Tris-Ethylène Diamine Tétracétique Acide) (Carles-Nurit *et al.*, 1992) et stockés à 4°C ou utilisés directement pour la digestion enzymatique.

2.4.3.2.2. Digestion enzymatique

Le choix des enzymes de restrictions est important et il se porte sur celles ayant des sites de restriction rares sur le chromosome bactérien. Elles permettent de couper le chromosome en 10 à 20 fragments de grandes tailles, qui seront alors séparés par l'électrophorèse en champ pulsé. Différents facteurs entrent en jeu pour le choix des enzymes. Il est important de prendre en compte le pourcentage en guanine et cytosine (GC %) du génome bactérien à analyser. L'utilisation d'enzymes ayant des sites de restriction riches en adénine et thymine telles que *SpeI* ou *XbaI* seront préconisées chez les bactéries Gram négatif dont le chromosome est riche en guanine et cytosine (Grattard, 2000). Dans le cas d'un ADN à un faible pourcentage de CG, on observera des coupures en un petit nombre de fragments si on utilise des enzymes reconnaissant des sites riches en ces deux bases azotées. L'utilisation d'enzymes de ce type permettra sur des séquences riches en adénine et thymine d'obtenir un nombre de fragments limité. Dans notre travail, l'endonucléase *SmaI* a été utilisée. Les Plugs ont été mis à incuber dans une solution contenant l'enzyme *SmaI* au bain-marie, à la température ambiante (25°C) pendant au moins 4 heures (**Figure 27**).

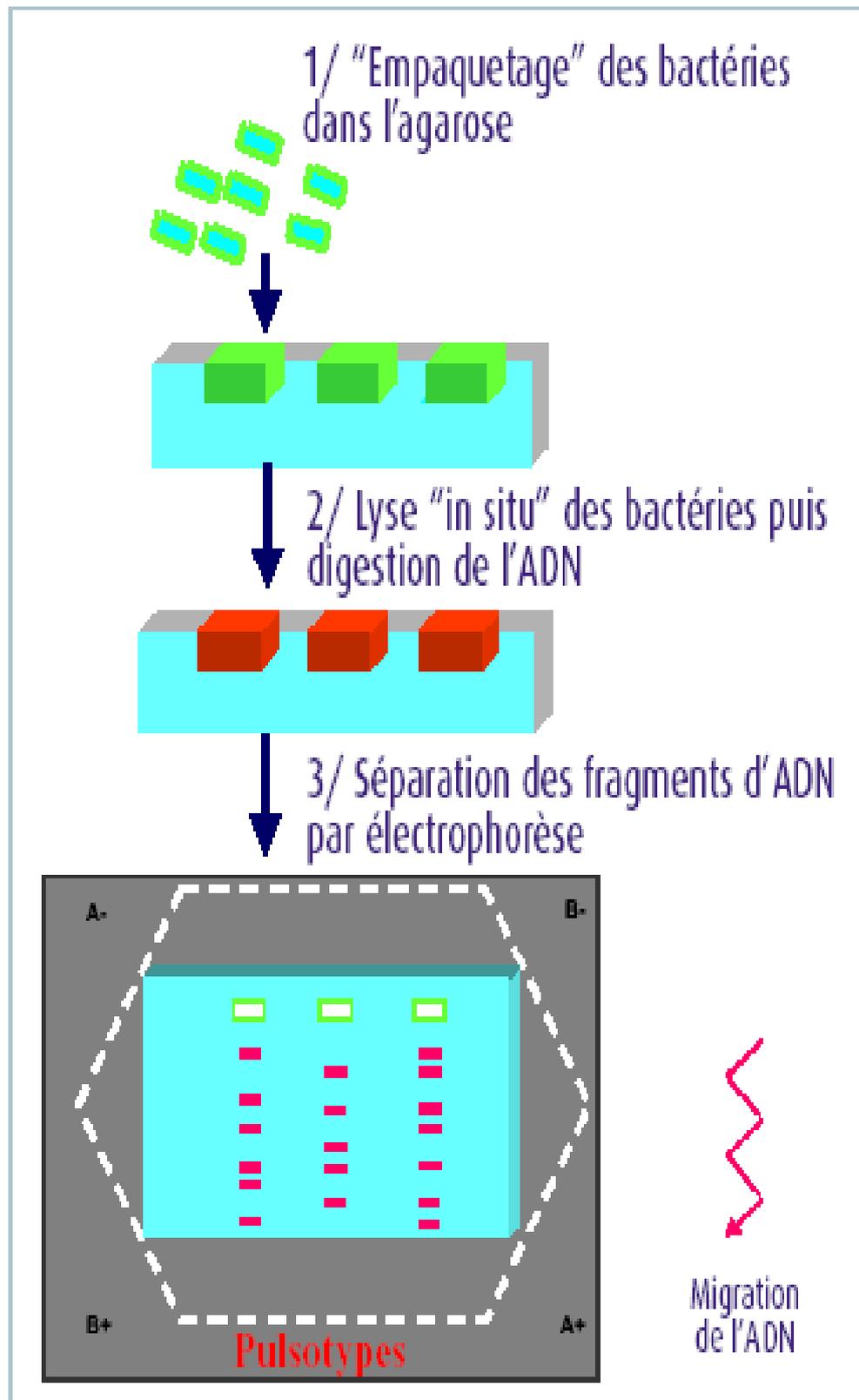


Figure 27 : Schéma résumant les différents traitements subis par les plugs d'ADN⁸

⁸ http://julientap.free.fr/travail_fichiers/htm/ecoli_O111.htm

2.4.3.2.3. Séparation électrophorétique et révélation des profils de macro-restriction

Une fois la digestion terminée, les plugs sont insérés dans un gel d'agarose à 1 % pour permettre une bonne vitesse de migration et une bonne résolution tout en limitant l'éventuelle fragilité du gel. Ce dernier a été ensuite déposé dans une cuve à électrophorèse en champ pulsé (CHEF-DR III, Bio-Rad, Marnes La-Coquette, France) dont le générateur est programmé pour la séparation des fragments d'ADN (**Figure 28**). La migration a été faite à 12 °C pendant environ 20 heures. Les phases de pulsations sont variées au cours de la migration de telle sorte que celles de faibles durées aient été effectuées en début d'électrophorèse pour favoriser la séparation des fragments de petites tailles et celles de longues durées en fin de migration pour permettre une bonne séparation des fragments de grandes tailles (Grattard, 2000).

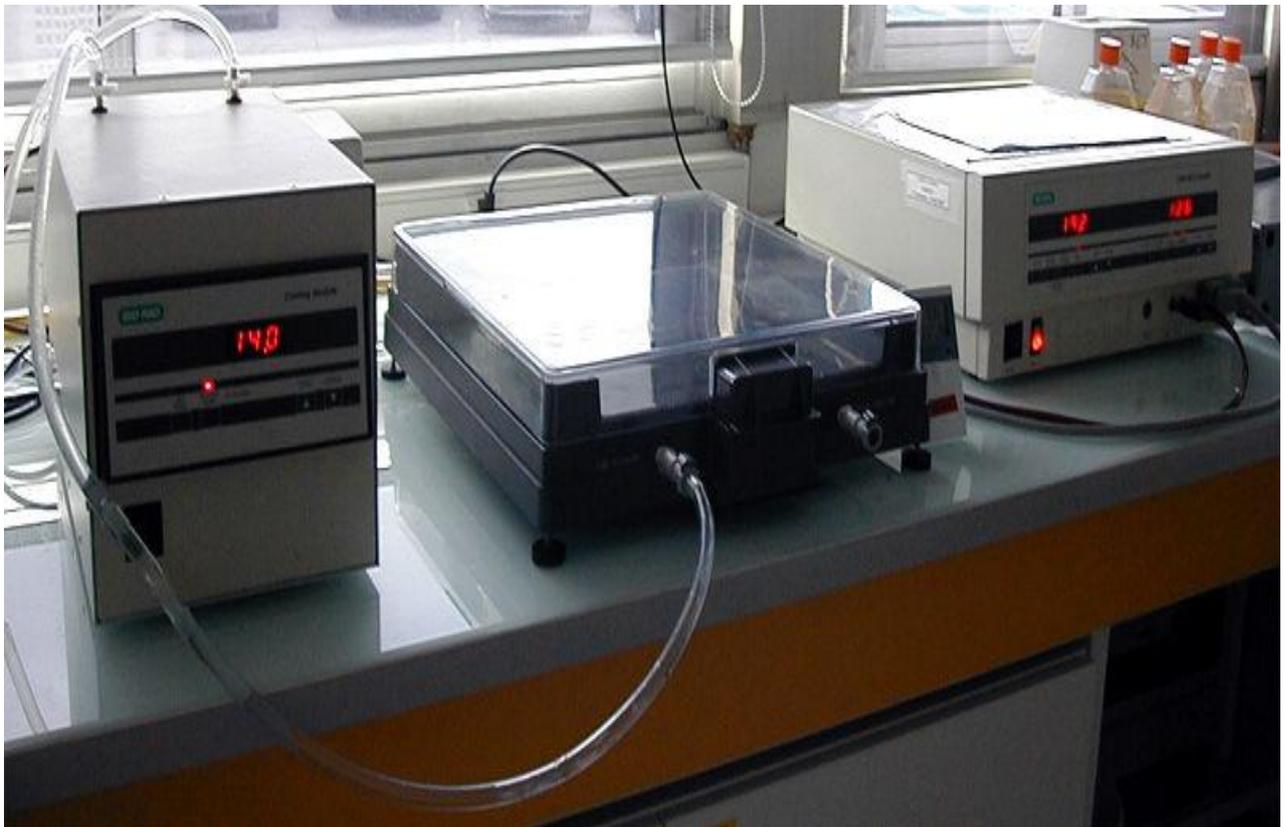


Figure 28: Photo du système d'électrophorèse en champ pulsé

A la fin de la migration, le gel a été enlevé de la cuve et mis à colorer dans une solution de BET (bromure d'éthidium), agent intercalant fluorescent sous lumière ultraviolette, pendant 30 minutes puis rincé 30 minutes à l'eau ultrapure avant la lecture. Le gel a été photographié afin de disposer d'un document archivable.

2.4.3.3. Analyse des résultats

L'analyse des résultats consistait en une comparaison visuelle, et une analyse à l'aide du programme UGPMA fourni par les logiciels Molecula AnalystTM (version 1.5) et Fingerprinting (version 1.12) (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France), des profils PFGE obtenus par rapport à un marqueur de poids moléculaire isolé du bactériophage lambda PFG Marker (New England Biolabs). Le groupement des isolats bactériens en pulsotype s'effectuait selon les critères actuellement admis, proposés par Tenover *et al.* (1995) et récemment confirmés par les travaux de Blanc *et al.* (2001). Selon ces critères, deux isolats sont considérés comme identiques s'ils présentaient le même profil électrophorétique et sont étroitement liés génétiquement s'ils présentaient une différence de profil inférieure ou égale à trois fragments. Ils sont considérés comme ayant une relation clonale si leurs profils diffèrent de quatre fragments. Enfin deux isolats sont considérés comme génétiquement différents et appartenant donc à deux pulsotypes différents si leurs profils présentaient plus de six bandes de différence.

2.5. Traitement des données

Les données ont été recueillies et consignées sur des feuilles de paillasse. Ces informations ont été ensuite saisies dans une base de données Excel. Quant aux différents tests statistiques ils ont été réalisés par des logiciels d'analyses (Statas, Epi info et Graph Pad Prism 5).

Troisième partie:
RÉSULTATS-DISCUSSION

3.1. *Chapitre 1 : Susceptibilité aux antibiotiques et production de toxines par les souches cliniques de Staphylococcus aureus isolées au CNHU de Cotonou.*

3.1.1. Introduction

La bactérie *Staphylococcus aureus* est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections hospitalières et communautaires (Nübel *et al.*, 2008). C'est l'un des microorganismes le plus fréquemment isolé (30 à 50% des sujets sains) chez l'homme (Nauciel & Vilde, 2005). Outre les nombreuses résistances que ce microorganisme peut présenter vis-à-vis des antibiotiques (Schlievert *et al.*, 1995), il peut être étonnant de constater à quel point cette bactérie est également armée pour venir à bout de bon nombre des défenses que son hôte pourrait lui opposer (Baba-Moussa *et al.*, 2008). C'est en fait une véritable ingénierie dont dispose *S. aureus* pour répondre aux périls d'un hôte hostile qui lui oppose anticorps, phagocytose ou cytotoxicité. Ces parades se distribuent en plusieurs groupes de toxines distinctes aux activités cytolytiques, protéolytiques, superantigéniques ou ADP-ribosylantes (Prevost, 2005).

Dans les types de résistance, on note la résistance à la méthicilline. Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) sont des bactéries qui ont une grande importance en médecine humaine. Les souches de SARM sont résistantes à tous les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines. De plus, les SARM sont souvent résistants à un grand nombre d'autres antibiotiques. Étant des pathogènes nosocomiaux et communautaires, les SARM sont la source de plusieurs inquiétudes pour les agences de santé publique. L'émergence des souches des SARM a été observée au début des années 60. La transmission de ces microorganismes est très souvent manu portée à partir de réservoirs essentiellement humains, constitués par les patients et le personnel hospitalier infectés ou colonisés. Ainsi la quasi-totalité des cas de colonisation et d'infection par les SARM résulte d'une transmission exogène d'autres porteurs de SARM dans les Etablissements de soins (Deplano *et al.*, 2000). Ces problèmes ne sont pas méconnus au Bénin (Anagonou *et al.*, 1994). L'utilisation abusive des antibiotiques sans examen microbiologique préalable d'une part et l'automédication d'autre part sont des pressions supplémentaires qui favorisent l'émergence des bactéries multi résistantes en particulier *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM).

Les facteurs de virulence produits par *S. aureus* sont des indications pour la détermination de la sévérité des infections. Entre autres facteurs, on peut citer les hémolysines (α , β , γ , δ), les leucocidines, les épidermolysines (A, B, C et D) et surtout la grande famille des entérotoxines (Dinges *et al.*, 2000). Les entérotoxines sont le plus souvent incriminées dans la survenue des intoxications alimentaires (Barg & Harris, 1997) alors que les épidermolysines agissent sur l'épiderme (Durupt *et al.*, 2007).

Au Bénin, très peu de données existent sur la variabilité des toxines produites par les souches de *S. aureus* ainsi que leurs profils de résistances aux antibiotiques. Cette partie de notre étude a eu pour objectif d'établir le profil toxinogénique et d'étudier l'antibiorésistance des souches hospitalières et communautaires de la bactérie *S. aureus* issues de prélèvements biologiques acheminés au Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou MAGA (CNHU-HKM) du Bénin sur une période de quatre mois (27 Septembre 2010 au 27 Janvier 2011). Au total, 2040 prélèvements ont été analysés durant cette période. Les résultats de cette étude, présentés dans le paragraphe suivant, ont été publiés dans la revue « **African Journal of Microbiology Research** ».

3.1.2. Article N°1

“Antibiotic susceptibility and toxins production of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples from Benin”.

Sina H., Baba-Moussa F., Ahoyo T. A., Mousse W., Anagonou S., Gbenou J. D., Prévost G., Kotchoni S. O. and Baba-Moussa L.

**African Journal of Microbiology Research, 5(18):.2797-2803,
16 September, 2011**

<http://www.academicjournals.org/ajmr/PDF/pdf2011/16Sep/Sina%20et%20al.pdf>

Full Length Research Paper

Antibiotic susceptibility and toxins production of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples from Benin

Sina H.¹, Baba-Moussa F.², Ahoyo T. A.³, Mousse W.¹, Anagonou S.⁴, Gbenou J. D.⁵, Prévost G.⁶, Kotchoni S. O.⁷ and Baba-Moussa L.^{1*}

¹Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, Faculté des Sciences et Techniques/Université d'Abomey-Calavi, 05 BP 1604 Cotonou, Benin.

²Laboratoire de Microbiologie et Technologie Alimentaire, Faculté des Sciences et Techniques/Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin.

³EPAC/ Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Benin.

⁴Laboratoire de Bactériologie, CNHU-HKM, Cotonou, Benin.

⁵Laboratoire de Pharmacognosie et des huiles essentielles. FSS-FAST/ Université d'Abomey-Calavi. ISBA, Champ de foire, Cotonou, Benin.

⁶Institut de Bactériologie, Unité : EA-4438 Physiopathologie et Médecine, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France.
⁷Department of Biology, Rutgers University, Camden, NJ 08102, USA.

Accepted 23 August, 2011

A wide range of clinical samples were screened for identification of *Staphylococcus aureus*, their antibiotic sensitivity profile and the production of different leucotoxin and epidermolysins was evaluated. Out of 2,040 biological samples (collected from pus, urine, sperms, genital, catheter and blood of hospitalized and extra-hospital patients) screened, 123 pure cultures of *S. aureus* colonies were isolated. 48.78% of *S. aureus* were resistant to methicillin (MRSA), while 78% of them were isolated from extra-hospital patients. The *S. aureus* isolated from urines, pus and blood produced Panton and Valentine leukocidin (PVL) toxin, while the leucotoxin luke-lukD was exclusively encountered by *S. aureus* isolated from pus samples. None of the bacterial colony isolated produced epidermolysin toxins A and B. In addition, 3.25% of MRSA and 8.13% of methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) produced PVL respectively. Our results indicated high frequency rate of MRSA in extra-hospital screened samples isolated from various types of infection. This high resistance rate combined with toxin production increases the virulence of *S. aureus* colonies and put therefore at risk the life of the patients in developing countries where auto-medication is not controlled. There is the need to instruct the population in order to avoid further widening of MRSA territory.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine leukocidin (PVL), antibiotic, infection, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Benin.

INTRODUCTION

The animal organisms are often subject to various parasites. These microorganisms are generally viable at

the expense of their hosts, while causing various diseases. The parasitic infectious agents are either specific pathogenic bacteria inducing clinically defined and physio-pathologically specific diseases, or opportunistic bacteria expressing their pathogenicity by exploiting the host physiological deficiency and by taking

*Corresponding author. E-mail: laminesaid@yahoo.fr. Tel: +229 97123468/ 90942906.

advantage of the modification of its environment. *Staphylococcus aureus* is one of the most frequently isolated human pathogenic bacteria in the community and hospital infections (Chambers, 1997; Deresinski, 2005; Friedman et al., 2002; Naimi et al., 2003). It is therefore one of the most devastating and widespread disease causing bacteria in hospital epidemiology due to its ability to produce a wide range of toxins and adhesion factors (Baba-Moussa et al., 2008; Foster and Höök, 1998).

The control of *S. aureus* causing diseases heavily relies on intensive use of antibiotic drugs. However, as a result of increasing use of antibiotics, the pathogenic bacteria become more easily resistant to a wide range of these drugs (Kim et al., 2004; Shittu and Lin, 2006). For instance, a year after the introduction of methicillin as an efficient antibiotic in 1960 (Durand et al., 2006), *S. aureus* has been reported to naturally resist this antibiotic (Deresinski, 2005; Ayliffe, 1997; Jevons, 1961). The emergence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is greatly facilitated by the horizontal transfer of the bacterial virulence factors. Thus, MRSA have been reported in Europe, America (Deresinski, 2005; Ayliffe, 1997) and recently in Africa (Bell and Turnidge, 2002; Hayanga et al., 1997; Klugman, 1998). Later, MRSA cases have been reported in extra-hospital environments notably among the community with no contact to hospitals (Vandenesch et al., 2003; Zetola et al., 2005; Ho et al., 2007; Kuehnert et al., 2006). In contrast to the nosocomial colonies, the community acquired MRSA (CA-MRSA) are most sensitive to almost all antibiotics with the exception of the β -lactam antibiotics (O'Brien et al., 2005). In Benin (West Africa) for example, this case of CA-MRSA emergence has also been reported (Makoutodé et al., 1994). However, relatively few data exist from epidemiological studies on the variability of toxins produced by *S. aureus* colonies as well as their resistance profiles to a wide range of antibiotics in this country.

Therefore, in order to establish the trends of *S. aureus* resistance to antibiotics from clinical samples in Benin, we endeavored in this work to screen various clinical samples collected from Microbiology laboratory of the National Teaching Hospital Center, Hubert Koutoukou Maga (NTH-HKM), the biggest hospital center of Benin and subsequently characterize the isolated bacterial colonies. The ultimate objective of this study was to establish the toxin profile and the antibiotic resistance ability of the clinically isolated *S. aureus*.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and *S. aureus* identification

The sample collection was performed for a 4-month period (September 27, 2010 to January 27, 2011) from 2,040 hospitalized and extra-hospital patients admitted at the laboratory of Bacteriology of the National University Hospital Center (CNUH) of

Cotonou (Benin). In this study, we focused our effort on isolating *S. aureus* in pure culture. In this regard, only samples more than 90% of bacterial colonies identified as *S. aureus* have been considered for further investigation. For epidemiological data analysis, we took into account every patient's clinical data (age, sex, site, hospitalization etc.) and the origin of the bacterial sample collection. The bacterial identification was done through morphological characterization. Gram stain test, catalase activity, production of DNase and coagulation of rabbit lyophilized plasma were tested according to the manufacturer instruction (Bio Mérieux, France).

Antibiotic susceptibility of *S. aureus* colonies

In order to study the effect of antibiotics on the isolated *S. aureus*, we tested the susceptibility or resistivity of *S. aureus* colonies on agar plates containing 20 different antibiotics. The disc diffusion method was employed on Mueller Hinton agar plates (Bio-Rad-Diagnostic Pasteur, Marnes la Coquette, France) according to the recommendations of the Antibiotic Committee of French Society of Microbiology (CA-SFM). Nitrofurantoin antibiotic were only tested against urine samples. Determination of methicillin resistance was performed by the disk diffusion method on Mueller Hinton agar with 5% (wt/v) NaCl at 37°C for 24 h.

Screening and characterization of bacterial toxins

S. aureus isolates are well known to produce different toxins. They were screened for the production of different leucotoxins such as Pantone-Valentine leukocidin ((PVL: LukF-PV et LukS-PV)), leucotoxin LukE-LukD and epidermolysin A (ETA) and B (ETB) using the Ouchterlony method also known as radial gel immunodiffusion (Gravet et al., 1998) in the presence of specific purified anti-leucotoxins and anti-epidermolysin rabbit antibodies .

Statistical analysis

For statistical analysis, biological replicate experiments were conducted throughout this study. Software Microsoft office Excel 2007 was used for the treatment of data. Software Epi Info 6 versions 6.04 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, U.S.A.) easily allowed the statistical test of χ^2 used in the comparison studies to determine the meaning of every factor of bacterial virulence. The test was considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Prevalence of *S. aureus* isolated according to samples origin

The 2,040 analyzed samples were composed of 30 urethral samples, 162 vaginal samples, 93 sperm samples, 89 pus samples, 17 catheter samples, 122 blood samples and 1527 urinal samples. In total, 123 colonies of *S. aureus* were isolated from the 2,040 independent samples analyzed. On the other hand, 24 colonies of *S. aureus* were co-isolated with other enterobacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, Enterococcus, *Pseudomonas aeruginosa*, Acinetobacter spp., *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, β hemolytic Streptococcus, hemolytic Bacillus Gram

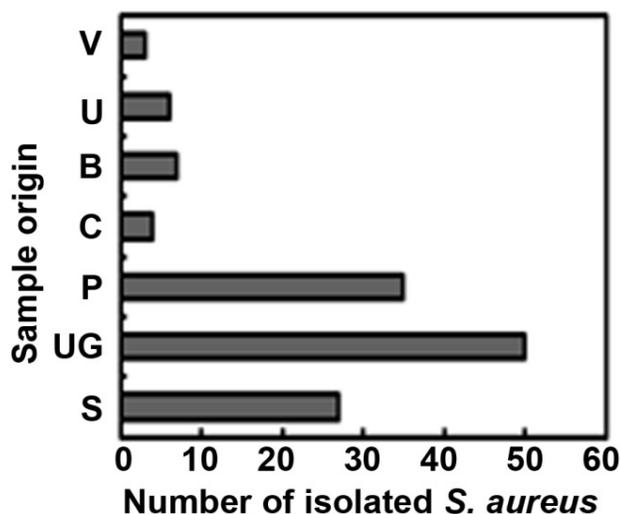


Figure 1. *S. aureus* distribution based on sample provenance. V, Vaginal sample; U, urinal sample; B, blood sample; C, catheter sample; UG, urogenital sample; S, sperm sample.

negative) and/or yeasts (*Candida albicans*). Since we needed to consider only pure cultures of *S. aureus* were not considered in this study.

A prevalence of 6% of *S. aureus* was observed from the entire samples collected. The patient concerned represented 61 and 21% of *S. aureus* isolates originated from hospitalized patients, while the rest (79%) were isolated from samples collected from the community (extra-hospital) patients. *S. aureus* were classified according to their biological provenance (blood, catheters, the pus, the urines, the vaginal samples, the urethral samples and the sperms) (Figure 1). Interestingly, we found the urine samples to be the most contaminated with 33.33% of *S. aureus* colonies followed by pus accounting for 28.45%. The vaginal samples proved to be the least contaminated with 2.44% of *S. aureus*. These infections are induced by the bacterial proliferation, invasion and destruction of local tissues resulting in local and systemic inflammatory response.

Susceptibility studies of *S. aureus* to antibiotics

The antibiotic tests revealed that 118 out of the 123 (95.93%) bacterial colonies were resistant to Penicillin G. Interestingly; the MRSA represented 48.78% of the whole isolates (Table 1). On the other hand, pristinamycin was found to have the greatest inhibiting effect on the *S. aureus* colonies with only 3.25% of bacterial resistance recorded for this antibiotic. In addition, nitrofurantoin antibiotic were specifically efficient against *S. aureus* originated from urinary infections with only 9.75% of bacterial resistance recorded for Nitrofurantoin treatment (Table 2). Out of the 60 *S. aureus* colonies resistant

to methicillin (MRSA), 78% (47/60) were from community (extra-hospital) origin (Figure 2A). As depicted in Figure 2B, we represent the distribution pattern of the 60 MRSA based on their origin. Interestingly, out of the 41 *S. aureus* colonies isolated from urine samples, 22 (53.65%) of them were MRSA, 42.85% MRSA come from the pus, 59.26% from sperm samples, 33.33% from genital samples, 14.28% from blood samples and 75% from catheter samples.

Production of toxins by *S. aureus* colonies

Altogether, the PVL was produced by 14 *S. aureus* isolates out of the 123 bacterial colonies identified (11.38%). Among positive blood cultures, 57.14% (4/7) produced PVL, and 7.31% (3/39) urinal samples produced PVL. However, the leucotoxin lukE-lukD was leucotoxin lukE-lukD was produced by 28% (5/35) of the pus isolated colonies (Table 3). On the other hand, no *S. aureus* was isolated among produced epidermolysin ETA and ETB (Table 3).

DISCUSSION

Our study, revealed a prevalence of 6% of *S. aureus* isolated from various samples assessed from the laboratory of Microbiology of the CHU-HKM, Benin. These bacteria were isolated from almost all the types of samples considered in this study. This result is not surprising because of the opportunistic and ubiquitous nature of *S. aureus* (Nauciel and Vilde, 2005). *S. aureus* is the fourth most common hospital-acquired pathogen among older adults, following *E. coli*, *P. aeruginosa*, and Enterococci. The *S. aureus* isolates from genital samples represented 40.65% of the entire bacteria identified. This is similar to 43% (in Benin) and 40.71% (in Casablanca, Morocco) previously obtained results (Baba-Moussa et al., 1999; Elazhari et al., 2009). Surprisingly, these values are higher than those recorded in developed countries (~0.1 to 2%) (Foster and Höök, 1998). For instance, out of 15,074 infections of all origins, the frequency of urinary infections is 15% and only 2.5% are linked to *S. aureus* in Europe and USA (Fluit et al., 2001).

The strong percentage of *S. aureus* in urogenital infections in Benin can be explained by a passive presence of these germs in the urogenital region (Randrianirina et al., 2007). In addition, this can also be due to the lack of hygiene, the unfavorable climatic conditions and the lack of clean water. In our study, *S. aureus* was also isolated from blood sample. The presence of *S. aureus* in the blood confirms its capacity to provoke septicemia in human. *S. aureus* caused similar proportions of both community-onset (18%) and nosocomial (21%) bloodstream infections (Diekema et al., 2003). In a more recent series, staphylococcal species were the second most common pathogen

Table 1. *Staphylococcus aureus* resistance profile to a wide range of antibiotics

Antibiotics (AB)	Number of colony R (N = 123)	Percentage of AB resistance (%)
Penicillin (Pen G)	118	95.93
Oxacillin (OXA)	60	48.78
Amoxicillin (AMX)	85	69.10
AMX + clavulanate (AMC)	68	55.28
Cefotaxime (CTX)	112	91.05
Cefuroxime (CXM)	102	82.93
Cefixime (FOX)	98	79.67
Ciprofloxacin (CIP)	59	47.96
Ofloxacin (OFX)	51	41.46
Spiramycin (SP)	38	30.89
Lincomycin (L)	29	23.58
Pristinamycin (PT)	4	3.25
Erythromycin (E)	44	35.77
Trimethoprim sulfametoxazole (SXT)	78	63.41
Chloramphenicol (C)	38	30.89
Gentamicin (GEN)	52	42.27
Tobramycin (TM)	64	52.03
Kanamycin (K)	70	56.91
Netilmicin (NET)	51	41.46

Table 2. Antibiotic resistance profile of *S. aureus* according to the types of samples.

Antibiotic	Urine (%)	Pus (%)	Sperm (%)	Genital (%)	Blood (%)	Catheter (%)
Pen G	92.68	97.14	100	88.88	100	100
OXA	53.65	42.85	59.25	33.33	14.28	75.00
AMX	65.85	68.57	74.07	66.66	57.14	100
AMC	53.65	51.42	66.66	55.55	28.57	75.00
CTX	88.48	91.42	100	100	100	100
CXM	88.48	80.00	96.29	77.77	57.14	100
FOX	88.48	77.14	96.29	66.66	28.57	100
CIP	28.17	40.00	55.55	55.55	28.57	75.00
OFX	41.46	51.42	33.33	22.22	14.28	100
SP	19.51	42.85	25.92	11.11	71.42	50.00
L	17.07	40.00	14.81	0.00	14.28	75.00
PT	7.31	0.00	3.70	0.00	0.00	0.00
E	39.02	31.42	25.92	55.55	42.85	50.00
SXT	68.29	51.42	66.66	66.66	57.14	100
C	21.95	40.00	29.62	44.44	0.00	75.00
FT	9.75	NA	NA	NA	NA	NA
GEN	28.17	34.28	55.55	33.33	14.28	25.00
TM	53.65	40.00	62.96	66.66	42.85	50.00
K	63.41	45.71	66.66	66.66	28.57	50.00
NET	46.34	31.42	22.22	55.55	28.57	50.00

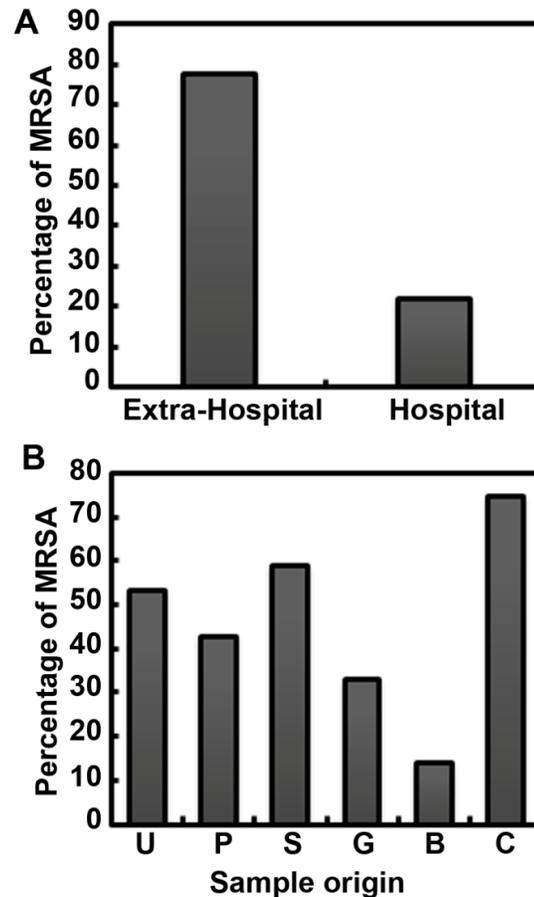


Figure 2. Distribution of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) based on sample provenance. (A): MRSA registered from extra-hospital and hospital based samples. (B): MRSA registered according to the type of samples. U, Urinal sample; P, pus sample; S, sperm sample; G, genital sample; B, blood sample; C, catheter sample.

Table 3. Toxin profile of *S. aureus* according to the type of samples.

Toxins produced by <i>S. aureus</i>	Urine (41)*	Pus (35)*	Sperm (27)*	Genital (9)*	Blood (7)*	Catheter (4)*
PVL (%)	7.31	20	0	0	57.14	0
ETA (%)	0	0	0	0	0	0
ETB (%)	0	0	0	0	0	0
LukE-LukD (%)	0	14.28	0	0	0	0

*Number in parenthesis represents the number of *S. aureus* isolated from indicated biological samples.

(after *E. coli*) reported among older patients hospitalized with bacteremia that was acquired either in the community or hospital (McBean and Rajamani, 2001).

As revealed in Table 1, the *S. aureus* isolates displayed a wide range of antibiotic susceptibility to antimicrobial. Our findings are in agreement with previously reported

data on the effects of antibiotics on clinically isolated *S. aureus* (Shittu and Lin, 2006; Denton et al., 2008, Elahari et al., 2009). The bacterial colonies were highly resistant to the AMC, AMX, FOX, CTX and CXM antibiotic family. This might be due to the fact that certain classes of antibiotics are easily accessible and frequently used by

the patients without medical prescription in Benin. The self medication mediating bacterial resistance to antibiotics has been widely reported in Africa (Sow et al., 1993; Kesah et al., 2003; Randrianirina et al., 2007; Diekema et al., 2001; Elazhari et al., 2009). Several MRSA colonies were lately described in France, but the epidemiology of MRSA is poorly understood (Dauwalder et al., 2008). We observed about 48.78% of MRSA from hospitalized patients and about 78% of MRSA from community patients. This high antimicrobial resistance profile might be due to auto-medication of the community patients. This bacterial resistance occurrence is highly reduced (36% in Ireland in 1999, with only 14.28% of MRSA from blood sample) where auto-medication is not allowed (McDonald et al., 2003).

The pathogenicity of *S. aureus* colonies has been related to a wide range of toxin productions. In agreement with our previous report, 11.3% of *S. aureus* isolated in this study produced PVL (Baba-Moussa et al., 1999). The PVL producing *S. aureus* are classically associated with primitive skin infections, notably the furuncles (Couppie et al., 1994; Durupt et al., 2007). In our study, only 4.06% of bacterial colonies tested produced the leucotoxin lukE-lukD (Table 3). These lukE-lukD producing *S. aureus* were all isolated from the pus. This weak rate of lukE-lukD production is not surprising if we assume that lukE-lukD plays an important role in the occurrence of diarrhetic infections (Gravet et al., 1998). In fact, 93.6% of *S. aureus* isolated from older patient concerned by post-antimicrobial diarrhea produced lukE-lukD toxin (Gravet et al., 2001). In our study, no *S. aureus* colony produced epidermolysins A and B (ETA and ETB). However, sample screening studies done in Guyane proved that 93% of *S. aureus* originating from impetigo infections produced epidermolysin (Couppie et al., 1998). In addition, 3.25% of *S. aureus* tested produced PVL as well as leucotoxin lukE-lukD. The PVL and lukE-lukD producing *S. aureus* were only isolated from pus samples, suggesting that these toxins target different cell types such as the polynuclears, neutrophils, the monocytes and the macrophages that can easily be found in this type of infection (Gravet et al., 1998).

Until recently, cases of *S. aureus* resistant to penicillin M and sometimes to other antibiotics have been rarely recorded outside the hospitals or medical centers. Our study shows a strong prevalence of community based *S. aureus* colonies that are resistant to methicillin. Evidently, this bacterial germ has nowadays widened its infectious territories. The infections linked to MRSA outside hospital environment have been frequently reported in the USA (Fridkin et al., 2005). However, a screening study conducted at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) appearing in the New England Journal of Medicine, revealed that MRSA infections have been frequently reported among people that have never been admitted in hospital or in contact with hospital environment in a period of one year. Our study shows a

variability of toxins produced by *S. aureus* isolated from various types of infections. Interestingly, the production of toxins combined with antibiotic resistance of the bacteria can easily result into disease complication or even death of the patients if appropriate antibiotics are not administered in time.

REFERENCES

- Ayliffe GA (1997). The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis., 24: 74-79.
- Baba-Moussa L, Anani L, Scheffel JM, Couturier M, Riegel P, Harkou N, Hounsou F, Monteil H, Sanni A, Prevost G (2008). Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. J. Hosp. Infect., 68: 32-38.
- Baba-Moussa L, Sanni A, Dagnra AY, Anagonou S, Prince-David M, Edoh V, Befort JJ, Prevost G, Monteil H (1999). Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. Med. Mal. Infect., 29: 689-696.
- Bell JM, Turnidge JD (2002). High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from -SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998-1999. Antimicrob. Agents. Chemother., 46:879-881.
- Chambers HF (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev., 10: 781-791.
- Couppie P, Cribier B, Prevost G (1994). Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. Arch. Dermatol., 130: 1208-1209.
- Couppie P, Sainte-Marie D, Prevost G, Gravet A, Clyti E, Moreau B, Monteil H, Pradinaud R (1998). Impetigo in French Guyana. A clinical, bacteriological, toxicological and sensitivity to antibiotics study. Ann Dermatol. Venerol., 125: 688-693.
- Dauwalder O, Lina G, Durand G (2008). Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. J. Clin. Microbiol., 46:3454-3458.
- Denton M, O'Connell B, Bernard P, Jarlier V, Williams Z, Henriksen AS (2008). The EPISA study: antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing primary or secondary skin and soft tissue infections in the community in France, the UK and Ireland. J. Antimicrob. Chemother., 61: 586-588.
- Deresinski S (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin. Infect. Dis., 40: 562-573.
- Diekema DJ, Beach ML, Pfaller MA, Jones RN (2001). Antimicrobial resistance in viridans group streptococci among patients with and without the diagnosis of cancer in the USA, Canada and Latin America. Clin. Microbiol. Infect., 7: 152-157.
- Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Morel KA, Munson E, Doern GV (2003). Epidemiology and Outcome of Nosocomial and Community-Onset Bloodstream Infection J. Clin. Microbiol., 41: 3655-3660.
- Durand G, Bes M, Meugnier H, Enright MC, Forey F, Liassine N (2006). Detection of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Containing the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene Responsible for Hospital- and Community-Acquired Infections in France. J. Clin. Microbiol., 44: 847-853.
- Durupt F, Mayor L, Bes M, Reverdy ME, 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.
- Elazhari M, Saile R, Dersi N, Timinouni M, Elmalki A, Zriouil SB, Hassar M, Zerouali K (2009). Activité de 16 Antibiotiques vis-à-vis des *Staphylococcus aureus* communautaires à Casablanca (Maroc) et Prévalence des Souches Résistantes à la Méthicilline. Eur. J. Sc. Res., 30: 128-137.
- Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J (2001). Frequency of isolation of

- pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur. J. Clin. Microbiol., Infect. Dis.*, 20: 188-191.
- Foster TJ, Höök M (1998). Surface proteins adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*, 6: 484-488.
- Fridkin S, Hageman J, Morrison M, Sanza L, Como-Sabetti K, Jernigan J (2005). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in Three Communities. *New Engl. J. Med.*, 352: 1436-1444.
- Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ (2002). Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann. Intern. Med.*, 137: 791-797.
- Gravet A, Baba-Moussa L, Werner S (1998). Characterization of a novel 30% distributed staphylococcal leucotoxin and structure comparison with the other members of the toxin family. *Zen. für bakt.*, pp.401-402.
- 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. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 4349-4356.
- Hayanga A, Okello A, Hussein R, Nyong'o A (1997). Experience with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at the Nairobi Hospital. *East Afr. Med. J.*, 74: 203-204.
- Ho PL, Cheung C, Mak, GC, Tse CW, Ng TK, Cheung CH (2007). Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Diagn. Microbiol. Infect.*, 57:145-151.
- Jevons MP (1961). "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br. Med. J.*, 1: 124-125.
- Kesah C, Ben Redjeb S, Odugbemi TO (2003). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9: 153-156.
- Kim HB, Jang HC, Nam HC, Lee YS, Kim BS, Park WB (2004). *In vitro* activities of 28 antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 1124-1127.
- Klugman KP (1998). Emerging infectious diseases-South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 517-520.
- Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim LK, McDougal LK, Chaitram J, Jensen B, Fridkin SK, Killgore G, Tenover FC (2006). Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J. Infect. Dis.*, 193: 172-179.
- Makoutodé M, Ahoyo T, Ahossi C (1994). Épidémiologie des infections des plaies opératoires à *Staphylococcus aureus* au CNHU de Cotonou: aspects bactériologiques. *Med. Mal. Infect.*, 24: 69-79.
- McBean M, Rajamani S (2001). Increased rates of hospitalization due to septicemia in the US elderly population, 1986-1997. *J. Infect. Dis.*, 183: 596-603.
- McDonald P, Mitchell E, Johnson H, Rossney A, Humphreys H, Glynn G, Burd M, Doyle D, McDonnell R (2003). Epidemiology of MRSA: the North/South study of MRSA in Ireland 1999. *J. Hosp. Infect.*, 54: 130-134.
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R (2003). Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA.*, 290: 2976-2984.
- Nauciel C, Vilde JL (2005). *Bactériologie Médicale*, 2ème ed. Paris: Masson : Masson. pp. 49-58.
- O'Brien FG, Coombs GW, Pearson JC, Christiansen KJ, Grubb WB (2005). Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in Community Staphylococci from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 5129-5132
- Randrianirina F, Soares JL, Ratsima E, Carod JF., Combe P, Grosjean P, Richard V, Talarmin A (2007). *In vitro* activities of 18 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from the Institut Pasteur of Madagascar. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 6: 5.
- Shittu AO, Lin J (2006). Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infect. Dis.*, 6: 125.
- Sow AI, Fall MI, Boye CS, Gaye-Diallo A, Diop D, Cisse MF, Mboup S, Samb A (1993). Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées en situation pathogène au chu de Dakar: sécrétion de pénicillinase, résistance hétérogène. *Med. Afr. Noire.*, 40: 407-413.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H (2003). Communityacquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 978-984.
- Zetola N, Francis GS, Nuermberger EL, Bishai WR (2005). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet. Infect. Dis.*, 5: 275-286.

3.1.3. Conclusions et perspectives

Notre étude a permis de recueillir de nouvelles informations sur le profil toxigénique et l'antibiorésistance des souches de *S. aureus* isolées au Bénin. Jusqu'à récemment, les souches SARM, résistantes à la pénicilline M et parfois à d'autres antibiotiques n'apparaissaient que rarement en dehors des hôpitaux ou des centres médicaux. Notre étude montre une forte prévalence des souches de *S. aureus* résistantes à la Mécicilline d'origine communautaire au Bénin. Aujourd'hui, plusieurs études montrent que cette bactérie élargit son territoire. Les infections extrahospitalières liées au *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) progressent aux Etats-Unis. Mais une étude des Centers for Disease Control and Prevention (CDC), parue dans le New England Journal of Medicine, révèle que les infections dites communautaires, étaient survenues chez des personnes n'ayant pas été en contact avec le milieu hospitalier depuis au moins un an, sont plus fréquentes que prévu. Notre étude montre également une variabilité de production de toxines par les souches de *S. aureus* isolées des divers types d'infections au CNHU de Cotonou. Cette production de toxines doublée de la résistance aux antibiotiques met en jeu le pronostic vital des patients en étant responsable d'infections graves pouvant conduire à la mort.

Faute de moyen financier, les analyses se limitent souvent à une identification morphologique des germes et un simple antibiogramme, ce qui ne permet pas toujours la meilleure prise en charge thérapeutique possible. Il faut donc pousser les méthodes de diagnostic un peu plus loin afin de permettre d'identifier avec plus de précisions le profil du germe. Diverses actions doivent être menées à l'endroit des populations telles que la sensibilisation aux différents moyens de transmission du germe *S. aureus*. Il devient urgent de lutter surtout contre l'utilisation abusive des antibiotiques sans examen microbiologique préalable et le recours systématique à la pharmacopée traditionnelle.

La présence dans notre étude d'un nombre relativement élevé de souches de SARM chez des malades n'ayant pas été hospitalisés nous a poussés à une recherche de cette bactérie dans la communauté notamment dans les aliments de rue.

3.2. *Chapitre 2 : Staphylococcus aureus* isolés des aliments de rue au Bénin : facteurs de virulence associés et profils de résistance aux antibiotiques.

3.2.1. Introduction

Les dernières décennies ont fait observer une démographie galopante dans les pays en voie de développement. Cette situation est d'autant plus perceptible en milieu rural. Avec la situation socio-économique très précaire dans les campagnes, on assiste à un phénomène d'exode de leurs populations à la recherche du mieux être vers les grandes villes avec pour conséquence une augmentation de la population des grandes villes. Cette situation fait émerger un mode nouveau de restauration dans le secteur informel avec les « aliments de rue ». Ces derniers se définissent comme étant des aliments prêts à être consommés ; préparés et vendus par des vendeuses ou des colporteurs surtout dans les rues et les lieux les plus fréquentés ou publics (Bryan, 1988 ; Bryan *et al.*, 1988 ; Dawson & Canet, 1991; Jayasuriya, 1994 ; Mosupye & von Holy, 1999). Ces aliments ont pour avantage de permettre à ceux qui en raffolent de s'alimenter aisément et relativement à faible coût (Canet & N'Diaye, 1996 ; Chauliac *et al.*, 1998 ; Azanza *et al.*, 2000; Kubheka *et al.*, 2001) ce qui fait qu'ils occupent une place importante dans la restauration (FAO 1988; Hanashiro *et al.*, 2005). Mais malheureusement ces aliments subissent lors des processus de fabrication et de vente des opérations peu hygiéniques aboutissant pour la plupart du temps à des contaminations microbiennes et/ou toxigéniques.

En effet, la sécurité d'un aliment dépend de plusieurs facteurs tels que la qualité des denrées, des différents matériels à utiliser et les bonnes pratiques de préparation. Or, dans la plupart des cas, cette sécurité n'est pas garantie avec les aliments de rue ; ce qui fait que l'alimentation de rue devient souvent sources d'épidémie et de maladies digestives telles que les gastroentérites et les diarrhées d'origines microbiennes (Tjoa *et al.*, 1977 ; Umoh *et al.*, 1984 ; Chauliac *et al.*, 1998 ; Barro *et al.*, 2006). Il est établi que les aliments de rue sont exposés à de graves conditions environnementales telles que la présence des insectes, des mouches, autres animaux et la pollution de l'air (Owhe-Ureghe *et al.*, 1993 ; Chauliac *et al.*, 1998). Jusqu'à nos jours, la plupart des vendeurs de rue ignorent les bonnes pratiques d'hygiène alimentaire. Ils exposent les aliments dans de mauvaises conditions créant ainsi des contaminations (surtout par les microorganismes) et des défaillances dans la conservation des

aliments. L'un des microorganismes les plus fréquemment isolés dans les aliments (Normanno *et al.*, 2007) et incriminé dans la survenue des intoxications alimentaires est *Staphylococcus aureus* (Atanassova *et al.*, 2001). Les aliments à risques d'intoxication staphylococcique sont très variés (Jett *et al.*, 2001). C'est ainsi que des cas d'intoxications sont reportés dans certains pays après la consommation des aliments (salades, riz..) servis lors des cérémonies ordinaires (Do Carmo *et al.*, 2004). Notons que la présence de *Staphylococcus aureus* dans un aliment ne suffit pas pour l'incriminer comme vecteur d'intoxication alimentaire. Il faut prouver qu'il possède l'équipement toxinogénique. Les intoxications alimentaires à *S. aureus* sont liées à l'ingestion de toxines produites dans les aliments contaminés avant leur consommation. Ainsi, notre étude a eu pour but d'évaluer la qualité microbiologique de quelques aliments de rue vendus dans la ville de Cotonou et particulièrement la recherche des toxines produites par les souches de la bactérie *S. aureus* isolées de ces aliments. Cette recherche a été couplée avec la détermination de l'antibiorésistance desdites souches. La recherche de leurs facteurs de virulence a été faite par la méthode d'immunoprécipitation radiale (Méthode d'Ouchterlony) couplée au test d'agglutination et la PCR. Quatre (4) types d'aliments : la salade, le macaroni, le haricot, le riz à la sauce et quarante (40) vendeurs ont fait l'objet de cette étude à raison de 10 vendeurs pour chaque type d'aliment. Au total, 80 échantillons ont été analysés. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue « **Journal of Applied Biosciences** » présenté dans le paragraphe suivant.

3.2.2. Article N°2

“Characterization of Staphylococcus aureus isolated from street foods: Toxin profile and prevalence of antibiotic resistance”.

Sina H., Baba-Moussa F., Kayodé A.P., Noumavo P.A., Sezan A., Hounhouigan J.D., Kotchoni S.O., Prévost G. and Baba-Moussa L.

Journal of Applied Biosciences 46: 3133–3143, October 28, 2011,

<http://www.m.elewa.org/JABS/2011/46/11.pdf>



Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from street foods: Toxin profile and prevalence of antibiotic resistance

Sina H.¹, Baba-Moussa F.², Kayodé A.A.P.³, Noumavo P.A.¹, Sezan A.⁴, Hounhouigan J.D.⁵, Kotchoni S.O.⁶, Prévost G.⁷, Baba-Moussa L.^{1*}

¹ Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie; Faculté des Sciences et Techniques/Université d'Abomey-Calavi. 05 BP 1604 Cotonou, BENIN.

² Laboratoire de Microbiologie et de Technologie Alimentaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi

³ Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin

⁴ Laboratoire de Biomembrane et de Signalisation Cellulaire. Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi

⁵ Laboratoire de Biotechnologie Alimentaire, Département de Nutrition et Sciences Alimentaires, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526, Cotonou, BENIN.

⁶ Department of Biology, Rutgers University, 315 Penn St., Camden, NJ 08102, USA

⁷ Institut de Bactériologie, Unité : EA-4438 Physiopathologie et Médecine, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France

*Corresponding author e-mail: laminesaid@yahoo.fr

Original Submitted In 8th September 2011. Published online at www.biosciences.elewa.org on October 28, 2011.

ABSTRACT

Objective: In this study, we characterized the toxins profile and occurrence of antibiotic resistant of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) stains isolated from street foods in Cotonou (Benin).

Methodology and results: *S. aureus* was isolated on growth agar media and confirmed by Gram staining, catalase activity, and coagulation of citrated rabbit plasma. The leucotoxins and epidermolysins were identified by radial immunoprécipitation. Enterotoxins and TSST-1 were assessed by agglutination method. The antimicrobial susceptibility was tested by diffusion method on Mueller Hinton agar. About 56.25% of food dishes analyzed were contaminated. They produce Panton and Valentine Leucocidin (13.33%) and various enterotoxins such as, the enterotoxins A (56.29%), B (37.77%), D (13.33%), the TSST (15.92%), the leucotoxin LukE/LukD (69.25%), and the Epidermolysin A (14.07%). About 15.18% of the *S. aureus* colonies were resistant to methicillin.

Conclusions and main findings: This study reveals a wide range of *S. aureus* food contamination producing various disease mediated toxins. Interestingly, we report here the presence of MRSA outside health centers or hospital environments. Our results suggest an urgent need to instruct/educate street food salesmen and the community on food hygiene to avoid food intoxication and subsequent diseases.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, leucotoxins, street foods, antibiotic resistance, Benin.

INTRODUCTION

The poverty level of community, the demographic expansion and a continuous urbanization factors in various developing countries have led to the emergence of a novel and most dominant form of restaurants known as "street foods". Generally, street foods are readymade foods sold by salesmen or by peddlers moving from one location to the other (Canet, 1997). Due to its relatively low cost, street foods represent one of the most cost efficient forms of feeding among low paid public workers, students, craftsmen, and high school students (Chauliac et al., 1998). Unfortunately no hygienic standard is respected during handling or selling of foods.

The security of street foods depends on several factors including the quality of different utensils, the hygienic practices during handling of the foods, the conservation and distribution of the foods. Unfortunately, these hygienic factors are generally ignored in the selling process leading to diseases such as gastroenteritis and the diarrheas of microbial origins (Barro, 2000; Chauliac et al., 1998). Recently, the epidemiological data from various hospitals around the world showed a prevalence of 19% of diarrheal diseases, of which 20 to 70% were linked to lack of hygienic practices in street food handling. According to Chauliac et al. (1998), Street foods are often exposed to dangerous environmental conditions such as presence of insects, flies, other animals and air pollution. In addition, food ingredients used in street foods are below standardized hygienic requirement. This situation is also aggravated by the use of low quality water, various non authorized additives/spices and poorly cleaned food packaging gadgets to mention but a few (Dawson et al., 1991). Moreover, the salesmen have no idea of good practices of food hygiene, exposing the foods to adequate conditions for all

kinds of crossed contaminations (Sansone, 1987).

Various fatal diseases caused by street food intoxications have been lately reported (Barro et al., 2002). Interestingly, there have been ~300 to 350 more street food intoxications than generally reported (Dacosta, 1995). In reported street food epidemiology studies, *Staphylococcus aureus* is the most predominant virulent bacteria responsible for a wide range of human diseases (Lopez et al., 1993). *S. aureus* is the most predominantly virulent human staphylococcus pathogens causing a wide range of diseases (Wertheim et al., 2005). It represents the major causal agent of food intoxication through its enterotoxin products (Le Loir et al., 2003). In recent survey, bacterial infections represented more than 90% of street food contamination; of which and 75% were attributed to *S. aureus* infection alone (China, 2002). In France for instance, *S. aureus* was the second cause of collective food toxi-infections between 1996 and 2005 (Delmas et al., 2006). While the prevalence of bacterial infections and occurrence of antibiotic resistance has been well studied in animal nutrition (Le Hayes et al., 2003), there is elusive understanding of bacterial infection and antibiotic resistance profile of bacterial virulence in human nutrition (Johnston and Jaykus, 2004).

In this paper, we endeavored to isolate and study the toxicity profile as well as the occurrence pattern of antibiotic resistance of different *S. aureus* colonies isolated from street foods in different public places and streets of the city of Cotonou in Benin (West Africa). The ultimate goal was to provide valuable contribution towards establishing national hygienic norms for street foods in rural and urban communities of the city.

MATERIALS AND METHODS

Study area and typology of street food sellers: Five (5) districts namely Agla, Dantokpa, Gbegamé, Avotrou and Zogo in the city of Cotonou were concerning by the present study (Figure 1). Cotonou (6°20 N; 2°20 E) is

in the southern Benin covering 79 Km². Food samples were collected from various public places and streets in districts cited above. A particular attention was focused on the environment and hygiene practices of the

sellers. For the site of sample collections, we took into account: foods prepared by the sellers and brought to a fix located selling point (foods sold on the shoulders of streets without a proper designated selling point) and foods prepared within a restaurant like structure nearby public streets.

Food sampling: Food samples were collected based on the consumers' preference and their tendency to be easily contaminated. The samples were collected in Cotonou, the largest city of Benin, West Africa. Precaution was taken to avoid contamination during sample collection. Four (macaroni, salad, bean cooks in sauce and rice in sauce) most preferable dishes by the consumers were considered in this study. Per dish, 20 vendors (4 vendors per districts) of street food were randomly selected for the food sampling. Two (2) samples were collected per dish per vendor. That made 40 sampling per dish. A total of 160 samples were collected for the 4 dish in the 5 districts. The collected samples were then packaged and immediately (at most 2 hours) transported under hygienic conditions at 4 °C to the laboratory for analysis. Microbial screening was immediately carried out or samples were kept at 4°C to be screened not later than 24 hours.

Isolation and identification of *S. aureus*: For the bacterial colony isolation serial dilutions of the samples were made and diluted sample (100µl) was streaked on Baird-Parker agar supplemented with egg yolk tellurite enrichment suspension (Difco, Detroit, MI, US) and incubated at 37°C for 48 hours as previously described (Speck, 1976). The physical identification characteristics of the bacterial colonies such as black, smooth, convex to uniform outline with one or two halos were recorded (Lancet and Bennett, 2001). *S. aureus* was confirmed by colonial morphology, Gram staining, catalase activity, and coagulation of citrated rabbit plasma (bioMe'rieux, Marcy l'Etoile, France) (Riegel et al., 2006).

Identification of *S. aureus* virulence factors

Identification of leucotoxins and epidermolysins by radial immunoprecipitation: The different leucotoxins (Panton-Valentine leucocidin [PVL], leucotoxins LukE-LukD and epidermolysins A (ETA) and B (ETB) were

evidenced from culture supernatants after 18 h of growth in yeast-Casamino acids-pyruvate (YCP) medium by Ouchterlony method also called radial gel immunodiffusion as previously described (Gravet et al., 1998). Specific anti-rabbit anti-leucotoxins and anti-epidermolysin antibodies were used to detect the presence of respective toxins.

Identification of enterotoxins and TSST-1 by latex agglutination Test: The enterotoxins A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED) and the Toxic shock Syndrome Toxin (TSST-1) were assessed by a sensitive and specific semi-quantitative SET-RPLA™ (Passive Reversed Latex Agglutination) and TST-RPLA™ (Oxoid, Hampshire, England) detection kits respectively (Brett, 1998; Gravet et al., 1999). The test was performed in ELISA 96 well-microplates according to the manufacturer recommendation.

Antibiotic resistance profile of *S. aureus* colonies isolated from street foods: Antimicrobial susceptibility was tested by agar diffusion method on Mueller Hinton agar (Bio-Rad-Diagnostic Pasteur, Marnes la Coquette, France) as recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Interpretation of antimicrobial susceptibility followed the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society (<http://www.sfm.asso.fr>). Evaluation of methicillin resistance was performed by plating the strains on buffered Mueller-Hinton (Bio-Rad-Diagnostic Pasteur, Marnes la Coquette, France) with NaCl 2% (wt/vol) at 37°C for 24 h. Fifteen antibiotics were tested: Penicillin G (PeG), Oxacillin (Ox), Vancomycin (VA), Teicoplanin (TEC), Fosfomycin (Fos), Rifampicin (RA), Fusidic acid (FA), Gentamycin (GM), Linezolid (LZD), Trimetoprim Sulfamethozolin (SXT), Ofloxacin (OXF), Pristinamycin (PT), Erythromycin (E), Tobramycin (T), and Chloramphenicol (C).

Statistic analysis: The statistical analysis was performed using Microsoft office Excel 2007 software. The T-test was used to determine the statistical significance of virulence factors via Epi Info 6 software versions 6.04 cfr January 1999.

RESULTS

Environmental characteristics of the street foods: The street food sellers generally used the sidewalk of streets together with other commercial kiosks (Figure

2). It is often easy to find the street food selling installations nearby stagnant waters (Figure 2A). In almost all street food installation, they are pills of

garbage (Figure 2C) and other kiosks as depicted in Figure 2B. The foods to be sold are generally disposed on tables (Figure 2A) without any continuous re-heating system. In addition, the majority of food sellers served the customers with their hands without using sanitary disposable gloves. Having no cashier personnel, the food street sellers handled the food and the money (mostly dirty and germ carrier agents) with the same hands, increasing therefore the risk of food contamination. The dish washer systems are disposed in open air. They are notoriously dirty and the water used in cleaning and rinsing the plates are generally dirty as well (Figure 2D, E).

S. aureus identification and characterization from street foods: *S. aureus* associated with the street food contamination are summarized in Table 1. Interestingly we found that macaroni and salad dishes were more contaminated than other dishes. As revealed in Table 1, the microbial contamination loads in macaroni and salad dishes were above the admitted norms. The reason of the high contamination of macaroni and salad is because is the fresh dishes. Furthermore, the prevalence of *S. aureus* in the street foods was assessed (Table 2). The microbial screening showed that 56.25% of the food samples were contaminated by *S. aureus* (Table 2), and salad dishes were the most contaminated by *S. aureus* followed by macaroni dishes.

Prevalence of toxins produced by street food S. aureus colonies: As expected, various toxins have been identified in *S. aureus* colonies examined (Figure

3). Among the enterotoxins identified, the SEA (56.29%) and the SEB (37.77%) were predominantly produced. None of the colonies produced SEC toxin. The Pantone and Valentine leucocidin (PVL), one of the most virulent factors of *S. aureus* was produced by 13.33% of all identified colonies. On the other hand, the leucotoxin Luk E/D was produced by the majority of *S. aureus* (69.25%) (Figure 4). However, none of the bacteria produced the epidermolysin B (ETB). Almost all bacterial colonies producing enterotoxin A (SEA) produced Luk E/D as well. Table 3 illustrates the distribution of toxin production according to the food sample varieties. Interestingly, the toxins follow no food variability pattern.

Resistance of S. aureus colonies to different antibiotics: We tested the resistance profile of the bacteria under different antibiotics. The results of the antibiogram profile are summarized in Figure 4. Our data revealed that 15.18% of *S. aureus* were resistant to methicillin. All isolated bacterial colonies are resistant to penicillin G. However, they were all sensitive to Vancomycin, Teicoplanin, ofloxacin and Linezolid. The bacterial colonies resistant to Methicillin were also resistant to Kanamycin, Gentamycin, Tobramycin and to Erythromycin. Our data showed that the bacteria were resistant to most of the antibiotics tested in this study.

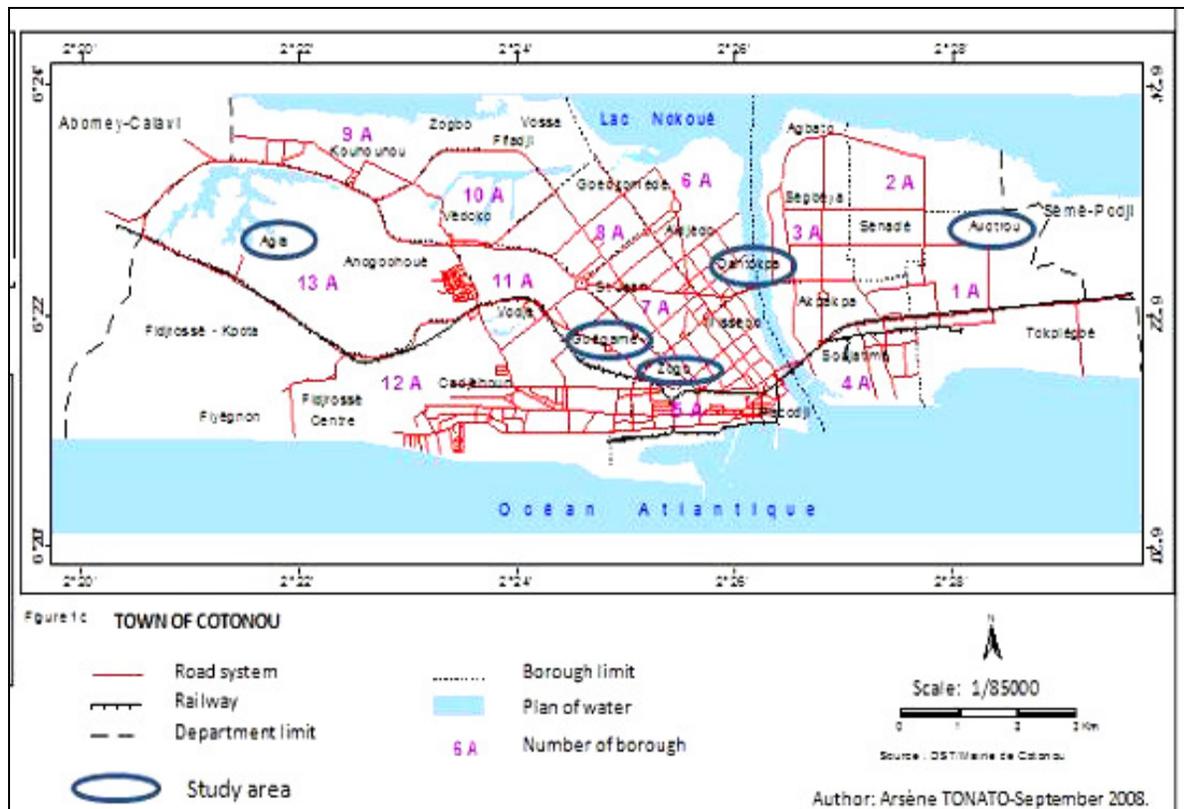


Figure 1: Map of Cotonou showing the study area



Figure 2: Characterization of the street food commercial area.

(A): General overview of the street food location showing polluted stagnating water. (B): Another selling kiosk of vulcanization near the street food. (C-D): The environment of dish washer and the dish cleaning water are depicted.

3137

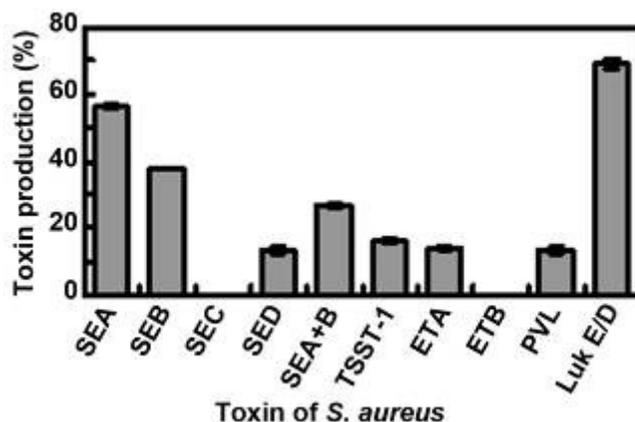


Figure 3: Toxin profile produced by *S. aureus* isolated from street foods

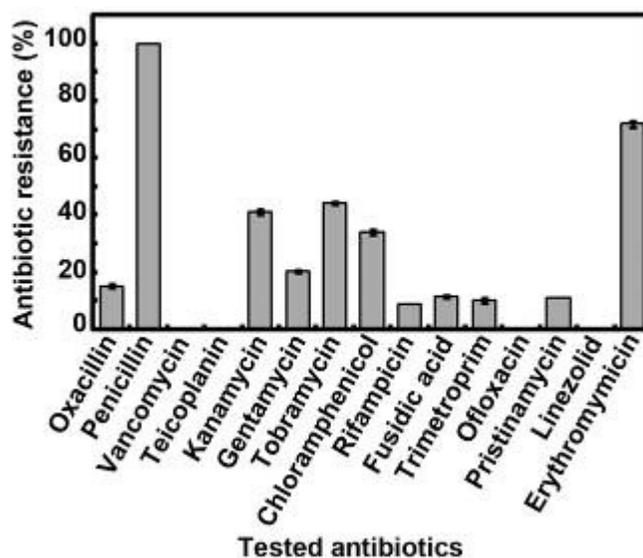


Figure 4: Antibiotic resistance profile of *S. aureus* isolated from street foods

DISCUSSION

This study revealed that street foods are mostly contaminated by *S. aureus* (Table 1), and consequently unsuitable for consumption. Recently, Mensah et al. (2002) showed that salad and macaroni dishes in Accra (Ghana) had unacceptably high levels of *S. aureus* contamination in the range of 3.7 and 4 log₁₀ CFU/g respectively, while the bean dishes contained approximately 0.6 log₁₀ CFU/g. Our results are in

agreement with the data of Mensah et al. (2002) (Table 1, Table 2). Recently, Moushumi et al. (2007) and Barro et al. (2002) in Burkina-Faso confirmed the contamination trends of street foods in India and Burkina-Faso respectively, revealing a crucial need to educate street food sellers about basic hygienic behavior in order to keep the food safe for consumption.

Table 1: Level of microbial contamination on street foods

Food variety	Food microflora*		<i>S. aureus</i> *	
	Measured	Standard limit**	Measured	Standard limit**
Macaroni	6.37 ± 1.52	6.00	4.2 ± 1.68	3.0
Salad	6.42 ± 0.73	6.00	3.9 ± 1.42	3.0
Bean	5.97 ± 0.93	6.00	3.5 ± 1.01	3.0
Rice	5.61 ± 1.97	6.00	2.9 ± 0.55	3.0

* The values are measured in Log₁₀ cfu/g of food.

**According to French Agency for Food Safety

Table 2: Prevalence of sample contaminated by *S. aureus* per type of street food

Food varieties	<i>S. aureus</i> contamination rate (%)
Macaroni	24/40 (60%)
Salad	34/40 (85%)
Bean	18/40 (45%)
Rice	14/40 (35%)
Total	90/160 (56.25%)

Table 3: Production profile of toxins in indicated street foods

Toxins	Macaroni	Salad	Bean	Rice	P-Value	Difference
SEA	58.33	58.82	44.44	57.14	0.9036	NS
SEB	50	47.05	22.22	14.28	0.2663	NS
SEC	0	0	0	0	0	-
SED	8.33	17.65	0	28.57	0.5152	NS
TSST-1	25	14.28	11.11	14.28	0.7662	NS
ETA	8.33	17.65	22.22	0	0.6616	NS
ETB	0	0	0	0	0	-
PVL	8.33	0	11.11	57.14	0.0288	S
LukE/D	75	76.47	44.44	71.47	0.3624	NS

S: Significant (P-Value <0.05); **NS:** Non Significant (P-Value > 0.05); (-): Not applicable

These polluted environmental conditions and the lack of hygienic practices of street food sellers easily attract flies, vectors of toxic microbial germs resulting to disease mediating vectors (Todd et al., 2007). Research evidence showed that a lack of keeping foods in appropriate temperature for long time represents one of the major factors of food toxigenesis (Roberts, 1982). Mensah et al. (2002) showed that 36% of food sellers used their hands to sell foods. This practice increases the contamination risks. Under this condition, the sellers are themselves carriers of pathogenic germs, because the bacterial enteropathogens can survive in the hands, under the fingers for more than 3 hours and be transmitted from mothers to children (Mensah, 1997). The bacterial colonies (*S. aureus*) are predominantly present on the mucous and human skin. Recent study demonstrated

that 20% of collective nutritional intoxication cases resulted from food contamination or from people that have handled contaminated foods (Greig et al., 2007). Without a cashier in street food selling system, the food sellers are the cashiers (handling money) as well as the food servers. This observation has been reported by previous studies (Barro et al., 2000; Tjoa, 1977). In this study, 56.25% of the dishes were contaminated by *S. aureus* (Table 2, Figure 3); while studies carried out in Ghana and Thailand showed 39.1% and 17.9% of dishes contaminated by *S. aureus* respectively (Fang et al., 2003; Mensah et al., 2002). Surprisingly we recorded 85% of contaminated salad dishes. This high level of contamination could not only be explained by handling the food with hands as above mentioned. We suspected that the hygienic practices related to cleaning processing, preparation, and packaging of the

foods was simply ignored by food sellers. This is strengthened by the poor and unsuitable quality of water used to rinse, and clean the food serving accessories (Figure 2D, E). Our results agreed with the recent study of Moushumi et al. (2007) revealing that 86% of salad dishes were also contaminated with *S. aureus* in India.

In order to demonstrate that the contaminated foods could potentially lead to disease and seriously jeopardize human health upon consumption, we next endeavor to prove that the bacterial germs identified in the foods produced disease promoting toxins. As expected, our data revealed that the bacterial germs produced different type of toxins suggesting that the *S. aureus* are highly virulent to cause food mediating human disease upon consumption. In enterotoxins, SEA, were frequently identified in contaminated foods followed by SEB toxins. This observation has been also reported in previous studies (John et al., 2005; Tamarapu et al., 2001). These two classes of toxins were responsible for 80% of collective nutritional intoxication cases in France for instance. In the United States, the SEA is responsible for ~80% of food intoxications, while SEB is responsible for 10% of food contamination (Atanassova et al., 2001). The same observation was made in Miras Gerais in Brazil confirming that SEA and SEB were indeed the major toxins of food intoxications (Veras et al., 2007). In the city of São Paulo in Brazil, a recent study revealed that 41% of bacterial colonies produced SEA toxins, and only 7.7% of the colonies produced SEB toxins (Rall et al., 2008). In the present study, we discovered that SED toxin was produced by 13.33% of isolated bacterial colonies, which is in the range of SED value (12.8%) found by Rall et al. (2008). However, none of our bacterial colonies produced SEC toxins contrary to the findings of Rall et al. (2008) and those of Rosec et al. (1997) showing that 20.5 and 77% of colonies studied in Brazil and France produced SEC toxins respectively. This variability might be explained by differences in the origin of the colonies. In fact, Rosec et al. (1997) worked on meats demonstrated that foods/meats were contaminated with bacteria of human origins. It is therefore desirable to carry out additional bacterial biotype tests to determine/establish the origin of the bacterial germs identified in the study.

Our study showed that all colonies producing SEA produced also leucotoxin LukE/LukD. This is in agreement with our previous findings (Baba-Moussa et al., 2006) and explained the link between food

intoxications and diarrheal diseases. Early studies have proved that LukE/LukD toxins produced by *S. aureus* are responsible for the outbreak of diarrheal diseases in France (Gravet et al., 1998). 80% of diarrheal diseases are associated to post-antibiotic treated *S. aureus*. The ETA toxin was produced by 14.07% of the bacterial colonies. However, none of them produced ETB toxin as previously reported (Baba-Moussa et al., 2010). Our data indicate the important role of *S. aureus* in the outbreak of diarrheas mediated by food contamination. Epidemiological links have been established between the outbreak of diarrheas and the consumption of street foods (Ericsson et al., 1980; Heinze and Yackovich, 1988; Mensah, 1997).

The antibiotic resistance profile revealed that *S. aureus* colonies were resistant to a wide range of antibiotics (figure 4). About 15% of *S. aureus* colonies were resistant to methicillin (Oxacillin), while only 4% of the same colonies found in Tunisia were resistant to methicillin (Ben Hassen, 2003). Likewise, about 3% of *S. aureus* isolated from animal derived foods (meats, milk, etc...) in different cities of Italy were resistant to methicillin (Corrente et al., 2007; Normanno et al., 2007). We found that 15% of colonies resistant to methicillin in our study are too high for the extra-hospital samples. However, an increasing presence of *S. aureus* has been reported outside hospital environment. Indeed reports of *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA) from samples outside hospital environment have been lately more frequent (Mahoudeau, 1997). Until recently, MRSA and other antibiotics appeared rarely in samples collected outside hospitals or health care centers. Recent study of Centers for Disease Control and Prevention revealed that infections linked to MRSA, coming from samples outside the hospital environments have significantly increased (Fridkin, 2005). In addition, epidemiological screening of MRSA mediated diseases in the cities of Baltimore, Atlanta and State of Minnesota between 2001 and 2002 showed that 17% of community based colonies were resistant to antibiotics (Fridkin et al., 2005). From this community based *S. aureus*, 6% of them corresponded to invasive infections (meningitides, pneumonias, etc.) and 77% to coetaneous and skin infections. We therefore postulated that the street food sellers might also be vectors of *S. aureus* mediating street food contamination in Cotonou, Benin. It is therefore important to include an epidemiological study on the food sellers to systematically establish the sources of the contaminations and cross-link

contamination. Interestingly none of the bacteria analyzed in this study was resistant to vancomycin, teicoplanin, ofloxacin and linezolid. This observation has been also confirmed by Ben Hassen (2003) indicating that the *S. aureus* identified in the street foods might not be responsible for the antibiotic resistance phenomena observed in human pathology. In this study, all bacteria were resistant to Penicillin G against 64% of them resistant to the same antibiotic in previous study (Ben Hassen, 2003). Our data revealed that 71.85% of bacteria were resistant to erythromycin, while none of the colonies analyzed by Ben Hassen (2003) was resistant to erythromycin. In addition, we

noticed 20.37% of colonies resistant to gentamycin, 8.88% to rifampicin, 9.99% to trimetoprim-sulfamethozolin, 11.11% to pristinamycin, while none of bacterial colonies studied by Ben Hassen (2003) was resistant to the same above mentioned antibiotics. The occurrence of antibiotic resistance in this study might be explained by self-medication habit of the population in Cotonou, Benin, due to their level of poverty, and the fact that these antibiotics were cheap and can be bought without prescription. This practice enhances a frequent exposure of bacteria to antibiotics leading to a development of antibiotic resistance within the community.

CONCLUSION

This study highlights the toxicity and antibiotic resistance profiles of *S. aureus* isolated from streets foods in public places in Cotonou (Benin). This study reveals a wide range of *S. aureus* food contamination producing various disease mediated toxins. Interestingly, we report here the presence of MRSA outside health centers or hospital environments. Furthermore, the source of *S. aureus* contamination should be known in order to efficiently tackle the

outbreak of bacterial toxin inducing diarrheal diseases. Due to the potential virulence of bacterial toxins and the antibiotic resistance of isolated *S. aureus*, it is evident that street foods might constitute a major problem for public health in Cotonou. However, the poverty level of the community has constrained the population to favor the street food form of alimentation. It is therefore important to educate the community and particularly the street food sellers about food quality and security.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the International Foundation of Science (IFS) for financial support.

REFERENCES

- Atanassova V, Meindl A, Ring C, 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham: a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 68: 105-113.
- Baba-Moussa L, Ahissou H, Azokpota P, Assogba B, Atindéhou M, Anagonou S, Keller D, Sanni A, Prévost G, 2010. Toxins and adhesion factors associated with *Staphylococcus aureus* strains isolated from diarrheal patients in Benin. *African Journal of Biotechnology* 9: 604-611.
- Barro N, 2000. Aliments de rue au Burkina-Faso: caractéristiques des vendeurs et de consommateurs, salubrité des aliments de rues et santé des consommateurs. *Rapports CRSBAN-SADAOC*, 22pp.
- Barro N, Ouattara C, Nikiema A, Ouattara A, Traoré A, 2002. Evaluation de la qualité microbiologique de quelques aliments de rue dans la ville d'Ouagadougou au Burkina Faso. *Santé* 12: 369-374.
- Ben Hassen S, Messadi L, Ben Hassen A, 2003. Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. *Annale de Médecine Vétérinaire* 14: 41-47.
- Bradford P, 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 933-95.
- Brett M, 1998. Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and

- benefits. Journal of Applied Microbiology 84 : 110-118.
- Canet C, 1997. L'alimentation de rue en Afrique. FAO 2: 2-5.
- Chauliac M, Bricas N, Ategbro E, Amoussa W, Zohoun I, 1998. Food habits outside the home by school children in Cotonou (Benin). Santé 8: 101-108.
- China B, Ghafir Y, Daube G, 2002. Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. Annale de Médecine Vétérinaire 147: 99-109.
- Corrente M, Normanno G, Martella V, Bellacicco A, Quaglia N, Dambrosio A, Buonavoglia D, D'Abramo D, Buonavoglia C, 2007. Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from food products. Original article. Letters in Applied Microbiology 45: 535-539.
- Dacosta Y, 1995. Effets comparés des divers modes de conditionnement sur la croissance des bactéries pathogènes responsables des intoxications alimentaires. Lacosta/Lavoisier (Editor), Paris, France. 100pp.
- Dawson R, Canet C, 1991. International activities in street foods. Food Control 2: 135-139.
- Delmas G, Gallay A, Espié E, Haeghebaert S, Pihier N, Weill F, De Valk H, Vaillant V, Désenclos J, 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. BEH 51-52: 418-422.
- Ericsson CD, Pickering LK, Sullivan P, DuPont HL, 1980. The role of location of food consumption in the prevention of travellers' diarrhoea in Mexico. Gastroenterology 7: 812-916.
- Fang T, Wei QK, Liao CW, Hung MJ, Wang TH, 2003. Microbiological quality of 18 jC ready-to-eat food products sold in Taiwan. International Journal of Food Microbiology 80: 241-250.
- Fridkin S, Hageman J, Morrison M, Sanza L, Como-Sabetti K, Jernigan J, Harriman K, Harrison L, Lynfield R, Farley M, 2005. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in Three Communities. New England Journal of Medicine 352: 1436-1444.
- Gravet A, Colin D, 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 Letters 436: 202-208.
- Gravet A, Rondeau M, Harf-Monteil C, Grunenberger F, Monteil H, Scheffel JM,
- Prévost G, 1999. Predominant *Staphylococcus aureus* Isolated from Antibiotic-Associated Diarrhea Is Clinically Relevant and Produces Enterotoxin A and the Bicomponent Toxin LukE-LukD. Journal of Clinical Microbiology 37: 4012-4019.
- Greig J, Todd E, Bartleson C, Michaels B, 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. Journal of Food Protection 70: 1752-1761.
- Heinze JE, Yackovich F, 1988. Washing with contaminated bar soap is unlikely to transfer bacteria. Epidemiology and Infection 101: 135-142.
- John M, Boyce M, Nancy L, Havill M, 2005. Nosocomial antibiotic-associated diarrhea associated with enterotoxins-producing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. American Journal of Gastroenterology 100: 1828-1834.
- Johnston L, Jaykus L, 2004. Antimicrobial resistance of Enterococcus species isolated from produce. Applied Environmental Microbiology 70: 3133-3137.
- Lancette G, Bennett R, 2001. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: Downes F, Ito K. (Editors.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Apha, Washington. 387-403pp.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M, 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research 2: 63-76.
- Lopez H, Noleto A, de las Heras M, Bergdoll M, 1993. Selective enterotoxin production in foods by *Staphylococcus aureus* strains that produce more than one enterotoxin. Journal of Food Protection 56: 538-540.
- Mahoudeau I, Elkhaili H, Delabranche X, Freitas I, Meunier O, Prevost G, 1997. Epidémiologie de *S. aureus* dans les Hôpitaux Universitaire de Strasbourg. Journal de Médecine de Strasbourg 28: 153-159.
- Mensah P, 1997. Persistent diarrhea in Ghana. Report submitted to Japan International Cooperation Agency.

- Mensah P, Yeboah-Manu D, Owusu-Darko K, Ablordey A, 2002. Street foods in Accra, Ghana: how safe are they? Bulletin of the World Health Organization 80: 546-554.
- Moushumi G, Sidhi W, Mukesh K, Abhijit G, 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and Shigella spp. In some raw street vended Indian foods. International Journal of Environmental Health Research 17: 151-156.
- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N, Parisi A, Greco G, Bellacicco A, Virgilio S, Celano G, 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. International Journal of Food Microbiology 117: 219-222.
- Rall V, Vieira F, Rall R, Vieitis R, Fernandes Jr, Candeias G, Cardoso K, Araujo Jr, 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Veterinary Microbiology 132: 408-413.
- Riegel P, Archambaud M, Clavé D, Vergnaud M, 2006. Bactérie de culture et d'identification difficiles. Biomérieux, Nancy l'Etoile, France, 119pp.
- Roberts D, 1982. Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970-1979. Journal of Hygiene 89: 491-498.
- Rosec J, Guiraud J, Dalet C, Richard N, 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. International Journal of Food Microbiology 35: 213-221.
- Sansonetti P, 1987. Facteurs de pathogénicité d'*E. coli*. Médecine et Maladies Infectieuses Numero spécial. 11-16.
- Soussy CJ, 2009. Communiqué du Comité français de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie/CASFM. Consulté le 02 Janvier 2011. <http://www.sfm.asso.fr/>.
- Speck ML, 1976. Compendium of methods for examination of food microbiological. American Public Health Associations, Washington DC, 417-423.
- Tamarapu S, Mckillip J, Drake M, 2001. Development of a multiplex Polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. Journal of Food Protection 64: 664-668.
- Tjoa W, DuPont H, Sullivan P, Pickering L, Holguin A, Olarte J, Evans DG, Evans DJ Jr, 1977. Location of food consumption and travellers diarrhea. American Journal of Epidemiology 106: 61-66.
- Todd E, Greig J, Bartleson C, Michaels B, 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 3. Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories. Journal of Food Protection 70: 2199-2217.
- Veras J, do Carmo L, Tong L, Shupp J, Cummings C, dos Santos D, Cerqueira M, Cantini A, Nicoli J, Jett M, 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.
- Wertheim H, Melles D, Vos M, Van L, Van B, Verbrugh H, Nouwen J, 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infection Disease 5: 751-762.

3.2.3. Recherche d'autres toxines et facteurs d'adhésions produits par les souches de *S. aureus*

En dehors des toxines traitées au 3.2.2., les gènes d'autres facteurs de virulence (toxines et facteurs d'adhésions) ont été recherchés par la PCR. Les Figure 29 et 30 montrent respectivement les résultats de la recherche de sept autres toxines et de 7 facteurs d'adhésion produits par les souches de *Staphylococcus aureus*.

3.2.3.1. Recherche des gènes codant pour des toxines secrétées par les souches alimentaires de *S. aureus*

Les gènes codant certaines toxines secrétées ont été identifiés à partir des souches de *S. aureus* isolées des aliments de rue. Les résultats montraient que la *seh* a été la plus fréquemment retrouvée (56,25%) suivie de la *seg* (18,75%) puis de la *see* (15,62%). Cette proportion pour *seh* est semblable à celle observée par Sakai *et al.* (2008) dans les cas de toxi-infections alimentaire au Japon. Cette forte proportion observée avec les souches isolées des aliments de rue est très inquiétante. En effet, les entérotoxines (surtout l'entérotoxine H) lorsque ingérées et présentes dans l'estomac vont stimuler les nerfs des réflexes vomitifs (Salyesr & Whitt, 2002). Des douleurs abdominales ainsi que des vomissements sont les symptômes les plus fréquemment associés aux empoisonnements alimentaires à *S. aureus* (Salyesr & Whitt, 2002). Ces empoisonnements ne sont généralement pas fatals, mais les symptômes apparaissent rapidement après l'ingestion de nourriture contaminée, habituellement quelques heures et persistent un jour ou deux (Salyesr & Whitt, 2002). Les gènes des entérotoxines L (*sel*), K (*sek*) et T (*set*) puis de l'épidermolysine D (*etd*) n'ont pas été identifiés (0%) (**Figure 29**).

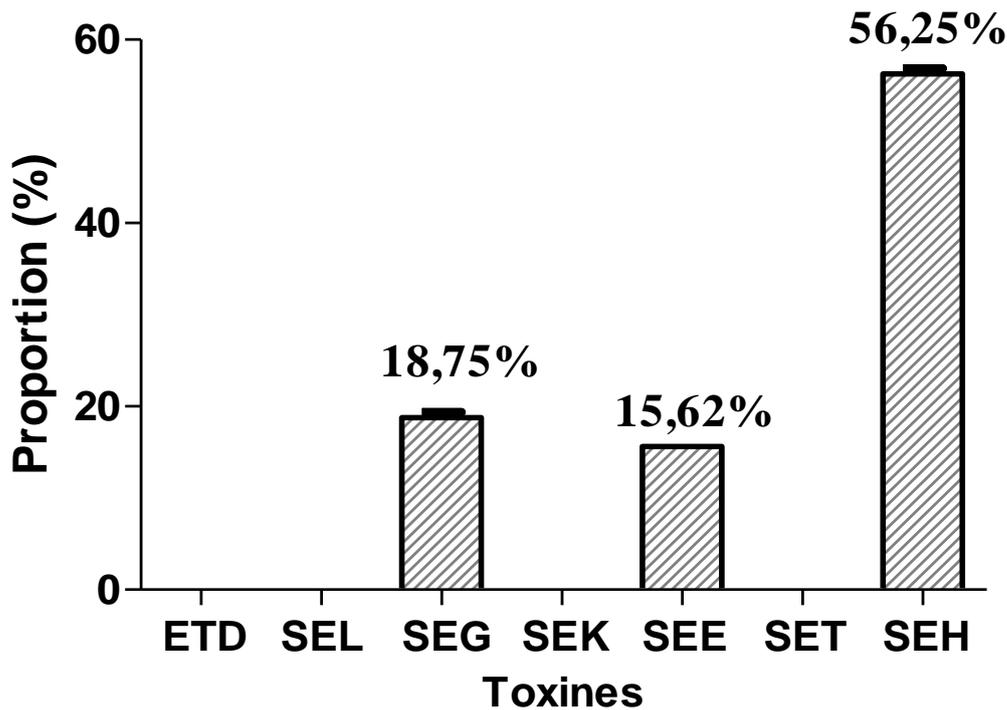


Figure 29: Fréquence des gènes de quelques toxines identifiées chez les souches de *S. aureus* isolées d'aliments de rue à Cotonou (Bénin)

Ladhani (2003) avait trouvé qu'environ 5% des souches de *S. aureus* d'origines cliniques produisaient des toxines exfoliatives. En effet, cette toxine a pour cible l'épiderme où elle induit le syndrome d'exfoliation généralisé (syndrome de la peau ébouillantée chez l'enfant ou syndrome de Ritter chez le nouveau-né) (Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS) (Mehrotra *et al.*, 2000 ; Salyesr & Whitt, 2002).

Malgré la production des entérotoxines, sans l'étape préalable d'invasion et d'adhésion, les bactéries ne peuvent pas être pathogènes. C'est ainsi que certains facteurs d'adhésion ont été recherchés comme présenté dans le paragraphe suivant.

3.2.3.2. Recherche des gènes codant des facteurs d'adhésion chez les souches alimentaires de *S. aureus*

La virulence de la bactérie *S. aureus* passe par une étape de colonisation assurée par la fixation sur les organes cibles. Cette fixation est assurée par des facteurs d'adhésion. Les facteurs d'adhésion les plus identifiés au niveau de ces souches de *S. aureus* isolées des aliments de rue au Bénin sont respectivement le *ClfB* (87,5%), l'*ebp* (87,5%), et le *lbp*

(62,5%). La *fnb* est retrouvée à 25,0% alors qu'aucune des souches ne porte les gènes codant pour *Fib*, la *Cna* et la *bbp* (0,0%) (**Figure 30**).

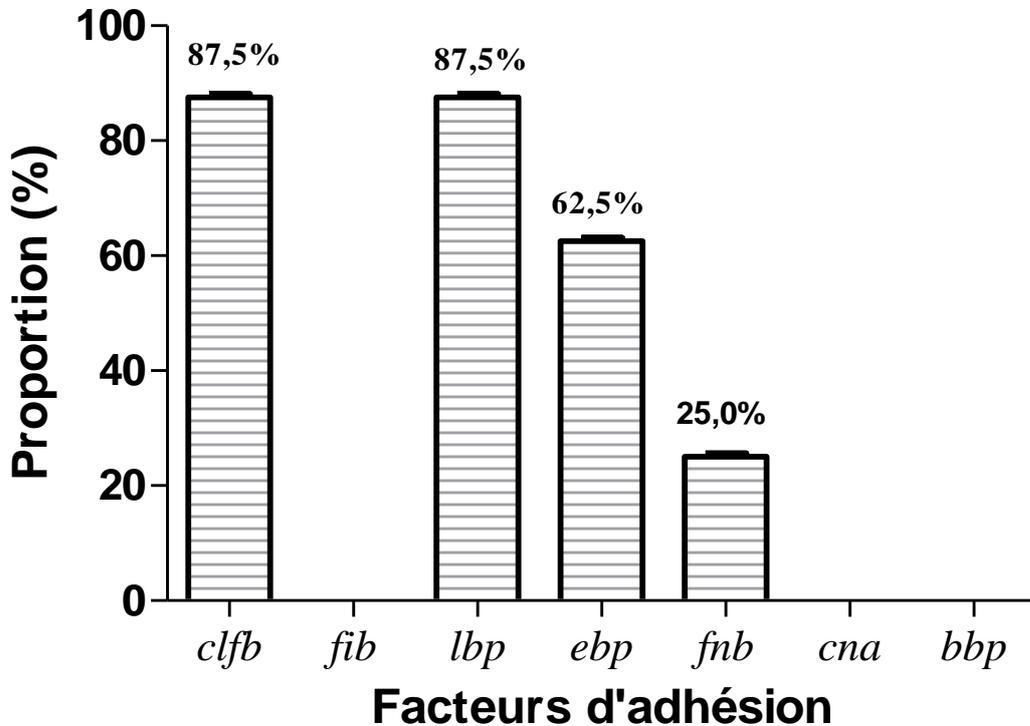


Figure 30: Proportion des gènes codant pour des facteurs d'adhésion chez les souches de *S. aureus* alimentaires

La présence de ces facteurs d'adhésion à des taux élevés dans ces souches peut s'expliquer par le fait que la bactérie *S. aureus* est une bactérie entéropathogène qui peut coloniser la muqueuse de l'intestin grêle sans l'envahir grâce à des facteurs d'attachement. Elle sécrète des toxines qui se fixent spécifiquement sur les cellules de la muqueuse et stimule l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes. Tout ceci explique le rôle que *S. aureus* joue dans la survenue des diarrhées consécutives aux toxi-infections alimentaires. En outre, *S. aureus* est responsable de nombreux types d'infections où les facteurs d'adhésion, d'opsonisation et d'invasion se complètent pour exprimer la virulence de la bactérie. En effet, tous ces facteurs sont des protéines de surface qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte (Buckingham *et al.*, 2004). C'est ainsi que les récepteurs pour la fibronectine contribuent à l'adhérence et à l'agrégation (*clumping factor*) de *S. aureus* aux caillots plasmatiques et aux matériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Ils ont ainsi un rôle important dans l'initialisation des infections sur les corps étrangers et les plaies

Les gènes codant pour la *Fib*, la *Cna* et la *bbp* n'ont pas été détectés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'attachement au collagène est nécessaire et suffisant pour l'adhésion de *S. aureus* au cartilage *in vitro*. Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (Buckingham *et al.*, 2004).

3.2.4. Conclusion et perspectives

La contamination bactérienne des aliments de rue peut donner des symptômes gastro-intestinaux ou des symptômes de maladies généralisées. Parmi les bactéries impliquées dans ces maladies se trouvent *Staphylococcus aureus*. Etant donné que la présence de staphylocoques dans les aliments ne suffisait pas pour l'incriminer dans les intoxications alimentaire, notre étude apporte des connaissances nouvelles sur les profils toxinogéniques des souches de *S. aureus* isolées des aliments de rue. Ainsi les méthodes classiques de numération bactérienne doivent être couplées à la recherche des toxines.

Cette étude a aussi montré que des souches extrahospitalières de *S. aureus* peuvent être résistantes à plusieurs antibiotiques utilisées dans les milieux hospitaliers notamment la méthicilline. Il faut donc pousser les méthodes de diagnostic au delà de la simple numérotation en cas d'intoxication alimentaire afin de permettre d'identifier avec plus de précision le profil des germes incriminés.

Des quatre types d'aliments de rue étudiés, nous avons remarqué que la salade était l'aliment le plus contaminé par *S. aureus*. Le contrôle de la qualité des aliments de rue requiert un effort concerté entre les différents acteurs (politiques, préparateurs, vendeurs et consommateurs des aliments de rue, les services sanitaires) impliqués dans ce qu'on peut appeler « filière aliment de rue ». La présence dans notre étude d'un nombre relativement élevé de souches de SARM parmi les souches isolées des aliments de rue nous a interpellés sur le portage des *S. aureus* par les vendeurs des aliments. Ainsi, étant donné que ces vendeurs servent les aliments à la main, il est probable que le portage cutané, notamment des infections cutanées, joue un grand rôle dans la contamination des aliments.

3.3. *Chapitre 3 : Etude de la corrélation entre l'antibiorésistance et la présence des facteurs de virulence associés aux souches de Staphylococcus aureus isolées d'infections cutanées et profondes.*

3.3.1. Introduction

Staphylococcus aureus est un pathogène et un commensal qui colonise le plus souvent le nez et la peau des patients (Li & Cheung, 2008). C'est une bactérie qui est la cause des infections cutanées, des tissus mous, des septicémies, des pneumonies, des endocardites et des abcès profonds (Holmes *et al.*, 2005).

La diversité dans le pouvoir pathogène des *S. aureus* provient du fait qu'ils peuvent avoir plusieurs facteurs de virulence. Entre autres facteurs, on peut citer les hémolysines (α , β , γ , δ), les leucocidines, les épidermolysine et surtout la grande famille des entérotoxines (Dinges *et al.*, 2000). Les toxines produites par *S. aureus* sont souvent spécifiques aux infections (Durupt *et al.*, 2007).

Pour le traitement des infections causées par *S. aureus*, plusieurs antibiotiques sont utilisés. Cet usage d'antibiotique n'est pas sans conséquence dans le comportement des bactéries. C'est ainsi que des staphylocoques multi-résistants aux antibiotiques sont reportés de part le monde (Moon *et al.*, 2007). Pour les traitements des souches résistantes à la méthicilline et à la pénicilline, une molécule est conseillée depuis plus d'un demi-siècle : la Vancomycine (Holmes *et al.*, 2012). Il a été noté tout de même l'existence des souches de *S. aureus* qui sont résistantes à cette Vancomycine (SARV) environ trois décennies après son introduction pour usage (Hiramatsu *et al.*, 1997).

La présence du gène de résistance n'est pas sans conséquence dans la production des toxines. Cette résistance aux antibiotiques doublée de la production de facteurs de virulence fait de *S. aureus* un pathogène dangereux. Notre étude a donc eu pour objectif d'évaluer la corrélation entre la résistance à certains antibiotiques majeurs, notamment la méthicilline et à la Vancomycine des souches de *S. aureus* isolées de divers types d'infections cutanées et leurs productions des toxines. Ces souches ont été collectées sur une période de seize (16) mois allant de novembre 2009 à mars 2011, à partir des infections cutanées et profondes des patients après leurs consentements verbaux, que ces derniers soient venus en consultation à

l'hôpital ou prélevés sur sites en cas de prélèvement communautaires. Au total, six (06) types d'infections cutanées et profondes (Furoncles, Ostéomyélites, Pyomyosites, Abscess, Pus et Ulcères de Buruli) ont été prises en compte pour cette étude dont les résultats, présentés dans le paragraphe suivant, ont été soumis à la revue « **International Journal of Infectious Diseases** ».

3.3.2. Article N°3

“Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of the *Staphylococcus aureus*’ strains isolated from cutaneous and deep infections.”

Haziz Sina, Théodora A. Ahojo, Wardi Moussaoui, Daniel Keller, Honoré S. Bankolé, Yves Barroguí, Ymke Stienstra, Simeon O. Kotchoni, Gilles Prévost and Lamine Baba-Moussa

Soumis le 09 octobre 2012 à [International Journal of Infectious Diseases \(IJID\)](#)

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Infectious Diseases
Manuscript Draft

Manuscript Number: **IJID-D-12-00772**

Title: Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of the *Staphylococcus aureus*' strains isolated from cutaneous and deep infections.

Article Type: Full Length Article

Keywords: Cutaneous infections, *S. aureus*, MRSA, VRSA, PVL, Antibiotics.

Corresponding Author: Dr Lamine BABA-MOUSSA, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Abomey-Calavi

First Author: Haziz Sina, Msc

Order of Authors: Haziz Sina, Msc; Théodora A Ahoyo, PhD; Wardi Moussaoui, PhD; Daniel Keller, Msc; Honoré S Bankolé, PhD; Yves Barrogui, MD; Ymke Stienstra, MD; Simeon O Kotchoni, PhD; Gilles Prévost, PhD; Lamine BABA-MOUSSA, PhD

Abstract: Objectives: *Staphylococcus aureus* is a pathogenic and commensal bacterium that mostly colonizes the skin and soft tissue. The power of this pathogenic bacterium is both due to its ability to resist antibiotics and its toxinogenetic power. Our work aimed carried out for genes that code toxin production and the antibiotic resistance profile of strains of *S. aureus* isolated from cutaneous and secondary infections.

Methods: Bacteria have been collected from individuals suffering from cutaneous and secondary infections. The susceptibility to 22 different antibiotics had been determined. The production of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and epidermolysins A (ETA) and B (ETB) were screened using radial gel immunodiffusion. Genes encoding staphylococcal entérotoxines (SE) A to E and *tsst-1* have been researched by multiplexPCR.

Results: 136 strains of *S. aureus* have been collected from 6 different infections notably Pus, Pyomyositis, Abscess, Buruli Ulcer and Osteomyelitis. All tested strains were resistant to Benzyl Penicillin while 25% were resistant to Methicillin and 10% to Vancomycin. Seventy percent of the strain produced PVL (70%) followed by SEB (44.25%). The ETB was produced by the strains isolated from Buruli Ulcer (1.25%). The genes encoding for *tsst-1*, *sec* and *seh* were weakly detected ($\leq 1\%$).

Conclusions: Fusidic Acid and other antibiotics (Fosfomycin, Linezolid, Mupirocin, Quinupristin/Dalfopristin and Nitrofurantoin) may be right for the cure of *S. aureus* strains involved in cutaneous and secondary infections. PVL were strongly associated to cutaneous and secondary infection and resistance has a cost on the production of toxins.



Université d'Abomey-Calavi,
Faculté des Sciences et Techniques,
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire.
Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie. 05
BP 1604 Cotonou, Bénin, Email : laminesaid@yahoo.fr



Lamine Saïd Baba-Moussa
Associate Professor
PhD, Biochemistry and Molecular Biology
Tel : +(229) 97123468.
Cotonou, 07th October, 2012

COVERING LETTER

To The Managing Editor,

of

International Journal of Infectious Diseases (IJID)

Subject: Submission of Manuscript

Title: Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of the *Staphylococcus aureus*' strains isolated from cutaneous and deep infections.

Dear Editor,

In reference to the above subject, we are honor to submit a manuscript entitled “**Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of the *Staphylococcus aureus*' strains isolated from cutaneous and secondary infections**” for publication in your prestigious journal, *International Journal of Infectious Diseases (IJID)*.

Staphylococcus aureus is a pathogen and commensal that mostly dwell the skin of a patient. His importance is not only because of its distribution and pathogenicity but especially due to its ability to overcome antimicrobial effects. In addition to the production of virulence factors, the resistance to antibiotics makes *S. aureus* a dangerous pathogen. In this paper, we evaluate the correlation between *S. aureus* isolated from various types of cutaneous and secondary infections resistance to certain major antibiotics, notably to Methicillin and to Vancomycin, and the production of toxins in Republic of Benin because there is a lack of data. Our data indicated that the Pantone-Valentine Leukocidins, secreted by *S. aureus*, were strongly associated to cutaneous and secondary infections and resistance has a cost on the production of toxins. This work complements current knowledge of *S. aureus*' strains implication in cutaneous and deep infections, their antibioresistances profile and their toxins productions variability in Africa particularly in Benin. The results reported in this manuscript has not been published or considered for publication in any other journal or elsewhere. This is an interesting body of work, and we hope that it will be considered for publication in *International Journal of Infectious Diseases (IJID)*.

Sincerely yours

L. Baba-Moussa

Corresponding author

1 **Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of the**
2 ***Staphylococcus aureus*' strains isolated from cutaneous and deep**
3 **infections.**

4
5 Haziz Sina¹, Théodora A. Ahoyo², Wardi Moussaoui³, Daniel Keller³, Honoré S. Bankolé⁴,
6 Yves Barrogui⁵, Ymke Stienstra⁶, Simeon O. Kotchoni⁷, Gilles Prévost³, Lamine Baba-
7 Moussa^{1*}

8
9 1- Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie; Faculté des Sciences
10 et Techniques/Université d'Abomey-Calavi. 05 BP 1604 Cotonou, BENIN.

11 2- EPAC/ Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, BENIN

12 3- Institut de Bactériologie, Unité : EA-4438 Physiopathologie et Médecine, 3 rue Koeberlé,
13 F-67000 Strasbourg, France

14 4- Laboratoire National de Santé Publique, Cotonou Bénin

15 5- Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli, Cotonou Benin

16 6- University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Internal
17 Medicine/Infectious Diseases, P.O. Box 30.001, 9700 RB Groningen, The Netherlands

18 7- Department of Biology, Rutgers University, Camden, NJ 08102, USA

19 *Corresponding author: laminesaid@yahoo.fr , tel: +229 97123468

20

21

22 Abstract

23 **Objectives:** *Staphylococcus aureus* is a pathogenic and commensal bacterium that mostly
24 colonizes the skin and soft tissue. The power of this pathogenic bacterium is both due to its
25 ability to resist antibiotics and its toxinogenetic power. Our work aimed carried out for genes
26 that code toxin production and the antibiotic resistance profile of strains of *S. aureus* isolated
27 from cutaneous and secondary infections.

28 **Methods:** Bacteria have been collected from individuals suffering from cutaneous and
29 secondary infections. The susceptibility to 22 different antibiotics had been determined. The
30 production of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and epidermolysins A (ETA) and B (ETB)
31 were screened using radial gel immunodiffusion. Genes encoding staphylococcal
32 entérotoxines (SE) A to E and *tsst-1* have been researched by multiplexPCR.

33 **Results:** 136 strains of *S. aureus* have been collected from 6 different infections notably Pus,
34 Pyomyositis, Abscess, Buruli Ulcer and Osteomyelitis. All tested strains were resistant to
35 Benzyl Penicillin while 25% were resistant to Methicillin and 10% to Vancomycin. Seventy
36 percent of the strain produced PVL (70%) followed by SEB (44.25%). The ETB was
37 produced by the trains isolated from Buruli Ulcer (1.25%). The genes encoding for *tsst-1*, *sec*
38 and *seh* were weakly detected ($\leq 1\%$).

39 **Conclusions:** Fusidic Acid and other antibiotics (Fosfomycin, Linezolid, Mupirocin,
40 Quinupristin/ Dalfopristin and Nitrofurantoin) may be right for the cure of *S. aureus* strains
41 involved in cutaneous and secondary infections. PVL were strongly associated to cutaneous
42 and secondary infection and resistance has a cost on the production of toxins.

43 **Key words:** Cutaneous infections, *S. aureus*, MRSA, VRSA, PVL, Antibiotics.

44

45 Introduction

46 *Staphylococcus aureus* is a pathogen and commensal that mostly dwell the nose and
47 skin of a patient.¹ It is a Gram-positive spherical bacterium that is frequently isolated in
48 hospital area and is responsible for multiple infections and toxicoses.² *S. aureus* is the most
49 common cause of skin and soft-tissue infections such as septicemia, pneumonia, endocarditis
50 and deep abscess.³ His importance is not only because of its distribution and pathogenicity^{4,5}
51 but especially due to its ability to overcome antimicrobial effects.⁶⁻⁸

52 Virulence factors produced by *S. aureus* are signs that enable the identification of
53 severe infections. Among those factors there are the exotoxins from human infections that
54 include exfoliative toxins (ETs), toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), staphylococcal
55 enterotoxins (SEs), leukocidins (PVL, Luke/D) and hemolysins (α , β , γ , δ).⁹ Enterotoxins are
56 most of time incriminate for being the cause of food poisoning¹⁰ while exfoliative toxins
57 (also call epidermolysins) act upon the skin.¹¹

58 Among leukocidins, Pantone – Valentine leukocidin (PVL) is an extracellular which
59 consists of two subunits F and S that act together and are leucocidal and dermonecrotic. This
60 toxin targets the outer membrane of polymorphnuclear cells, monocytes and macrophages.¹²⁻
61 ¹⁵ *S. aureus* strains which are positive for PVL are usually associated with skin infections and
62 soft-tissues since 1960s.¹⁶⁻¹⁹ Nowadays, PVL positive strains are basically associated to
63 furuncles.^{11, 17, 20} Indeed, it's shown that 90% of *S. aureus* strains producing PVL come out
64 from furuncles and inversely 96% of furuncles cases are associated to *S. aureus* strains
65 producing PVL. PVL is also associated, at least partially, to severe and deep infections:
66 essentially necrotizing pneumonia,^{19, 21-24} but also osteomyelitis²⁵ and even cases of *Purpura*
67 *fulminans*²⁶. This toxin has been recently identified in a pseudo-syndrome case of Lemierre²⁷
68 and in a case of Fournier's gangrene.²⁸ PVL has been associated to the occurrence of

69 community-acquired necrotizing and hemorrhagic pulmonary infections which generally
70 affect previously healthy children and young adults.^{22, 29}

71 To overcome the infections caused by *S. aureus*, several antibiotics are used out. Such
72 usages induce to bacteria a changing of behavior. Among the changing induced, we can have
73 the resistance phenomena. Widespread resistance to antibiotics severely complicates
74 management of *S. aureus* infections. *S. aureus* strains that are resistant to methicillin
75 (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) in particular are widespread in the hospital setting
76 and have recently also caused a global epidemic of community-associated infections.³⁰
77 Vancomycin has been used successfully for over 50 years for the treatment of *Staphylococcus*
78 *aureus* infections, particularly methicillin-resistant *S. aureus*.³¹ We do note trains of *S. aureus*
79 strains displaying vancomycin heteroresistance (hVISA) and vancomycin intermediate
80 resistance (VISA) about three decades after their introduction for use.³²

81 The presence of the resistant gene has an effect in the production of toxins. In addition
82 to the production of virulence factors, the resistance to antibiotics makes *S. aureus* a
83 dangerous pathogen. The aim of our study is to evaluate the correlation between *S. aureus*
84 isolated from various types of cutaneous and deep infections resistance to certain major
85 antibiotics, notably to Methicillin and to Vancomycin, and the production of toxins in Benin
86 because there is a lack of data.

87 **Material and Methods**

88 **Samples collection**

89 Clinical samples were collected from patients with cutaneous and secondary infections
90 presenting at hospital for various bacteriological exams from November 2009 to March 2011.

91

92

93 ***S. aureus*' identification**

94 Standard microbiological methods for identification of microorganisms were applied.
95 All swabs were inoculated onto mannitol salt agar, incubated at 37°C and inspected visually
96 for three days. Any suspected colony was subcultured on tryptic soy agar (bioMérieux) and
97 identified by subsequent Gram staining, catalase test and Slidex Staph Plus (bioMérieux) and
98 the coagulase test with the rabbit plasma.³³

99 Bacterial identification was performed by colony isolation on sheep blood agar plates
100 and the automated Vitek 2 system.

101 **Antibiotic susceptibility**

102 Antimicrobial susceptibility was determined by the disc diffusion method of Kirby-Bauer on
103 agar Mueller-Hinton (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) as recommended by the
104 AntibioGram Committee of the French Microbiology Society (CASFM).³⁴ After 24 h at 37°C,
105 the zone of inhibition was measured. For susceptibility to oxacillin, an inoculum of 10⁷
106 CFU/ml was prepared and the plate was incubated at 37°C for 24 hours on Mueller-Hinton
107 agar + 2% NaCl. Antibiotic disks were obtained from Biorad, Marne la Coquette, France.

108 The 22 tested antibiotics were: Benzyl penicillin (BP), Oxacillin (Ox), Cefoxitin
109 screen (Cef), Gentamicin (Gen), Tobramycin (Tob), Kanamycin (Kan), Vancomycin (Van),
110 Teicoplanin (Tei), Fusidic acid (FA), Fosfomycin (Fos), Rifampicin (Rif),
111 Trimetropim/Sulfamethoxazole (T/Sul), Levofloxacin (Lev), Erythromycin (Ery),
112 Lincomycin (Lin), Pristinamycin (Pri), Quinupristin/ Dalfopristin (Q/Dal), Linezolid (Line),
113 Minocyclin (Min), Tetracyclin (Tet), Mupirocin (Mup), Nitrofurantoin (Nit).

114

115 **Toxins detection**

116 *Phenotypic detection of toxins*

117 The production of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and epidermolysins A (ETA)
118 and B (ETB) were evidenced from culture supernatants after 18 h of growth in Yeast
119 Casamino-acid Pyruva (YCP) medium ³⁵ by radial gel immunodiffusion in 0.6% (wt/vol)
120 agarose in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 with component-specific rabbit polyclonal
121 and affinity-purified antibodies. ^{36, 37} For a better determination, gels were dried, stained in
122 Coomassie blue and destained in 10% (vol/vol) acetic acid.

123

124 *Genotype detection of toxins*

125 Presence of genes encoding for the 12 toxins, for which we don't have antibody, was
126 detected by Multiplex PCR using specific primers (Table 1) previously used for. ³⁸ Then, the
127 genes encoding for enterotoxins A (*sea*), B (*seb*), C (*sec*), D (*sed*), E (*see*), G (*seg*), H (*seh*), I
128 (*sei*) and *tsst* were reserched. Additionally, genes encoding PVL, ETA and ETB were also
129 detected. Briefly, total DNA was purified using QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, GmbH,
130 Germany) with a Gene Amp® PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) and
131 amplified in a total volume of 50 µl containing 25 pmoles of each primer, 50 ng of total DNA,
132 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of dNTP mixture, 1x PCR reaction Buffer and 5 units of Taq™ DNA
133 polymerase (Invitogen™). The thermal cycling conditions included an initial denaturation step
134 (2 min at 92°C) followed by 35 cycles of amplification comprising three steps: 2 min
135 denaturation for 92°C, 1 min annealing at 50°C, 2 min extension at 72°C. The reaction was
136 terminated with 3 min extension at 72°C. PCR products were analysed by electrophoresis
137 through 1.4% (wt/vol) agarose gel (Euromedex, Mundolsheim, France).

138 **Staphylococcal enterotoxins production (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH,**
139 **SEI) by Bio-Plex Assay (xMAP Multiplex assay)**

140 The centrifuged supernatant (3ml) of *S. aureus* grown on BHI at 37°C (night) was
141 recovered and diluted ½ in (TBS-Tween20-IgG rabbit nonspecific at 100µg/mL). (40mM
142 Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20, pH 7.5), and incubated for 30 min at room
143 temperature. Bio-Plex analyses consisted of different microsphere assays performed
144 simultaneously on a single sample. The Bio-Plex assays consisted of three incubation steps
145 that were performed into flat-bottom Multiscreen microplates (pores diameter= 1.2 µm,
146 Millipore): i) mixing 50 µL of TBS buffer diluted sample with 50 µL of a microsphere
147 cocktail containing 5×10^3 beads of each capture antibody-fluorophore-encoded bead (1h30
148 min), ii) mixing 50 µL of biotinylated detector antibody cocktail containing 0.25–0.5 µg/mL
149 of each detector antibody (Patent: PCT/IB2012/050909) with the analyte-capture antibody-
150 bead complex (1H min), and iii) mixing 50 µL of 0.5 µg/mL Streptavidin-phycoerythrin
151 (Molecular Probes) with the biotinylated detector antibody-analyte-capture antibody-bead
152 complex (15 min). Any steps were separated by three washes into???. The bead complexes
153 were suspended in 125 µL of TBS-Tween 20 0.05% and transferred into polypropylene
154 microtiter plates and the median fluorescence intensity (MFI) of the beads was determined
155 using a Bio-Plex 100 array reader. The assay was performed at room temperature (21-23 °C)
156 with the plate shielded from light and shaken at 750 rpm during each incubation step. Assays
157 involving the use of MicroPlex microsphere polystyrene beads were performed using
158 MultiScreen-BV filter plates (Millipore Corp.) and included three washes with TBS after each
159 incubation step. xMAP multiplex assays were run on a Bio-Plex 100 array reader with Bio-
160 Plex Manager 4.0 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The Bio-Plex was
161 configured to count each sample for a maximum of 45 s with gates of 4335-10000 for the
162 MicroPlex polystyrene beads. The Bio-Plex 100 was calibrated using calibration and
163 validation microspheres supplied by Bio-Rad Laboratories.

164

165 **Statistical analysis**

166 Microsoft Excel Spreadsheet has been used for data processing. For comparison tests
167 of positive isolates of each patient group, we used the Student T test, and the Fischer's test for
168 lower number series (GraphPad Prism 5). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

169

170 **Results**

171 **Prevalence of *S. aureus* strains according to the origin of sample**

172 A total of 136 strains of *S. aureus* have been collected during this study. Strains'
173 proportions vary depending on the six (6) types of collection: Pus, Furuncle (Fur),
174 Osteomyelitis (Ost), Pyomyositis (Pyo), Abscess (Abc) and Buruli ulcer (Ulc). Almost 27%
175 (37 out of 136) of the collected strains originated from Pyomyositis (Figure 1) followed
176 respectively by isolated from pus (22.06%), abscess (14.71%), furuncles (13.97%), Buruli
177 ulcer (11.76%) and osteomyelitis (10.29%). In spite of the differences in terms of proportions
178 during the collection of the strains, it's not recorded any significant difference in statistics
179 between these different types of collection ($p = 0.0007$).

180 **Susceptibility to antibiotics**

181 The susceptibility of *S. aureus* strains isolated from divers cutaneous infections is
182 variable depending on antibiotic tested. All the strains were resistant to Benzyl penicillin
183 while other antibiotics showed up various actions on collected strains. Thus, some antibiotics
184 (Fusidic acid, Fosfomycin, Quinupristin/ Dalfopristin, Linezolid, Muprocine, Nitrofurantoin)
185 were active upon the tested strains while the other 13 tested antibiotics were not active upon
186 collected *S. aureus* (Figure 2).

187 Depending on the origin of strains, we can figure out that there's any difference of
188 susceptibility in presence of antibiotics (Figure 3). *S. aureus* strains originating from Pus
189 collection had been most resistible to a great number (14/22) of antibiotics (Figure 3.c).
190 Strains originating from furuncle (Figure 3.b) and from osteomyelitis (Figure 3.d) had shown
191 up a resistance to 5 of the 22 tested antibiotics (Benzyl penicillin, Rifampicin, Minocyclin,
192 Tetracyclin and Trimetropim / Sulfamethoxazol). Except strains isolated from Pus and Buruli
193 ulcer, others hadn't displayed any resistance to Oxacillin.

194 Of the 136 isolated *S. aureus* strains, 34 (25%) were resistant to methicillin (MRSA)
195 and 13 (10%) have presented a resistance to Vancomycin (VRSA) (Figure 4).

196 **Production of toxin**

197 There's a significant difference ($p < 0.0001$) in the production and/or the presence of
198 genes encoding the 12 toxins. Thus, a high production (70.0%) of PVL is observed, followed
199 by the SEB (44.25%). None production of ETB and gene encoding SED was detected while
200 some toxins (SEC, SEE and TSST) are produced in a proportion of 1% down (Figure 5). The
201 observed difference was function to the origin of tested *S. aureus* strains. Yet, we figure out
202 that the proportion of strains producing PVL was the highest no matter the origin of collection
203 data (Figure 6). Such toxin can be found in the strains coming from furuncles (89.5%),
204 pyomyositis (89.2%), and abscess (95%). The others (toxins) have been produced in various
205 proportions depending on the origin of the strain ($p < 0.0001$). There's a difference in the
206 detection of genes encoding toxins, both with MRSA and VRSA.

207 **Discussion**

208 All the *S. aureus* isolated showed a variable sensitivity with regard to the 22 tested
209 antibiotics. Generally, Benzyl penicillin wasn't efficient over the collected strains of

210 cutaneous infection (Figure 2). Some authors observed out very high rates of resistance
211 (>90%) of *S. aureus* strains towards this antibiotic.^{39,40} This molecule, one of the first to be
212 introduced on the market of antibiotics, seems no longer active over *S. aureus*.⁴¹ Very high
213 proportions of strains showed resistance to Rifampincin (67%), to Tetracyclin (60%) and
214 Trimetropim / Sulfamethoxazol (57%). Those results match with others works performed in
215 Africa.⁴²⁻⁴⁵ The great proportions of resistant strains observed out with the penicillin and the
216 3 other antibiotics may be explained by the auto medication and mainly by the availability and
217 low price of those antibiotics on the market, which ever are most of time delivered without
218 any medical prescription for the cure of skin infections in developing countries such as Benin.
219 In our *in vitro* study, 6 out 22 tested antibiotics (Fusidic acid, Fosfomycin, Quinupristin/
220 Dalfopristin, Linezolid, Muprocin, Nitrofurantoin) are very efficient over *S. aureus* strains
221 isolated from these infections.

222 Out of all the 6 cutaneous and secondary infections studied, collections of pus present
223 a total sensitivity to only 8 of the tested antibiotics. In contrary, with the strains coming from
224 furuncles (Figure 3.b) and from osteomyelitis (Figure 3.d) 17 antibiotics are totally active
225 (Figure 3). The likely explanation to this observation would be the origin of strains
226 responsible for these infections. In our study, the trains of furuncles and osteomyelitis are
227 from community origin, which is extra-hospital. Indeed, the means of contamination are
228 multiform and the selection pressure observed out by usage of antibiotic in hospital area make
229 nosocomial strains develop multi-resistance in opposition to strains of community origin.

230 Over the 136 tested strains, 34 (25%) were resistant to methicillin (Figure 4). This
231 proportion of 25% observed seem to be raised up but still relatively weak in comparison with
232 the reported rates in the other countries,⁴⁵ even though methicillin is the preferred molecule
233 for treatment of staphylococcus infections.⁴⁶ In order to face MRSA, the Vancomycin is a

234 good antibiotic ⁴⁷ but in our study, we observed out 10% of resistance strains to the
235 Vancomycin. It seems that a beginning in the emergence of the resistance to Vacomycin is
236 real, and we should be put question about the way we use out antibiotics.

237 Concerning the whole strains of *S. aureus* coming from cutaneous and secondary
238 infections, PVL production was the most important (70%) followed by SEB (44.24%), SEG
239 (35.5%), SEA (32.02%) then SEH (28.8%) and SEI (28.92%). The gene encoding for ETB
240 and the SED were not detected at all while the SEE (0.8%), SEC (0.6%) and the TSST (1%)
241 were detected but in very low proportion (Figure 5). This high frequency of detection of the
242 gene encoding for PVL ($p < 0.0001$) was observed out no matter the origin of collected sample
243 (Figure 6). PVL appears on the basis of this observation to be a primordial toxin of *S. aureus*
244 strains associated to skin infections. These results confirm the ones obtained by Baba-Moussa
245 *et al.*, ²⁰ on the furuncles strains and by Gillet *et al.* ²⁵ on the osteomyelitis. The high
246 production of this toxin our collected strains may then explain the seriousness of skin
247 infections. On the clinical field, the effects of positive PVL *S. aureus* strains are more serious
248 than the negative PVL ones. ²² This is explained by the fact that the spectrums of lytic activity
249 of PVL are directed towards monocytes, macrophages, polynuclear neutrophils and the
250 metamyelocytes, ¹² the erythrocytes are not lysed up in their presence. ⁴⁸ This toxin known as
251 making a cytolytic effect only over polynuclear neutrophils is identified as an important
252 indicator of the *Staphylococcus* strains virulence. ¹⁶ Moreover, this toxin's cytolytic activity is
253 expressed by strong concentration while an apoptosis is observed at a low concentration. ⁴⁹

254 Concerning the epidermolysins, only the gene encoding for epidermolysin A was
255 product by *S. aureus* strains isolated of Buruli ulcer (Figure 6.e). Such specific production of
256 ETA by isolated strains of Buruli ulcer may be explained by the fact that epidermolysins are
257 known as being the serine active proteases that's activity is highly specialized on the
258 desmoglein-1, an important protein of epidermis. ^{50,51} So, the production of that toxin by *S.*

259 *aureus* strains isolated from Buruli ulcer might explain the stripping of the skin observed on
260 infected patients.

261 Out of all the 8 encoding genes for enterotoxins sought for, three (SEC, SED, SEE)
262 have not been detected while three others (SEA, SEB, SEH) were observed out at various
263 proportions no matter the origin of the isolated strains (Figure 6). Depending on the homology
264 of their sequences, these three enterotoxins whose genes have been highly detected belong to
265 three different groups.⁵² This explains the diversity of enterotoxins produced by *S. aureus*
266 isolated from skin infections. Those toxins associated to food poisoning⁵³⁻⁵⁵ are known to have
267 antigenic and emetic activities. The presence of those enterotoxins genes in the isolated
268 strains of cutaneous and secondary infections may be explained by a manual or environment
269 contamination. This is explained by the fact that cutaneous infections are opened up. The
270 same observations are reported with the TSST-1 which is the most incriminated toxin in case
271 of food poisoning.⁵⁶

272 Our study revealed that resistance to methicillin (Figure 7.a) and to vancomycin
273 (Figure 7.b) influenced toxin production. The difference in toxin production is
274 extremely significant with PVL and some enterotoxins (B, G and I) ($p < 0.0001$). Indeed, we
275 figure out that MSSAs produce two times more those toxins than MRSA. The difference in
276 terms of proportion observed for genes encoding toxins between VSSA and VRSA (Figure
277 7.b) isn't statistically significant ($p < 0.05$). Focusing on the duality of observed activity between
278 the resistance to methicillin and the PVL encoding gene detection, we may deduce the
279 existence of a repressive activity of the resistant gene over PVL's. This shows up that the
280 presence of the resistant gene to methicillin doesn't promote PVL gene's expression. This
281 remark had already been made by Baldwin and Lowe⁵⁷ and mostly for SARM hospital
282 strains. Thus, the presence of the resistant gene to methicillin induces a cost for bacteria
283 concerning the presence of genes encoding for toxins especially LPV. The emergence of MRSA

284 strains may be guessed as a disadvantageous pressure in the selection of strains producing
285 toxins notably PVL. This case is not one that is observed out with strains showing a resistance
286 to vancomycin. Except SEA, the production of toxin wasn't made easy by the feature of
287 resistance to Methicillin in comparison with the resistance to Vancomycin. A significant
288 difference in the production of toxins ($p=0.0005$) by those two types of strains (MRSA and
289 VRSA) (Figure 8.a) is indeed remarkable. The difference in toxins production between the
290 two types of phenotypic resistance to antibiotics should be due to the difference of mode of
291 action as far as the 2 antibiotics are concerned. Indeed, resistance to Methicillin enables β -
292 Lactamases production; following *mecA* gene⁵⁸ which is not favorable for the bacteria
293 development.⁵⁹ Unlike, as far as VRSA is concerned, Vancomycin target is the D-ala-D-ala
294 residue of peptidoglycane.⁶⁰ The mechanism of resistance to Vancomycin is then linked to a
295 thickening bacteria wall that caught the glycopeptides in the superficial layers blocking to
296 reach out the cytoplasmic membrane where the peptidoglycane is synthesized.⁶¹ Even if the
297 genetic base of the resistance is not included yet, it's obvious that it's not linked to *mecA*
298 gene.⁶²

299

300 Conclusion

301 Our study showed that *S. aureus* strains, isolated from cutaneous and secondary
302 infections, resistance to antibiotics depends on the origin of the collection. We attempted to
303 perform a correlation between toxin production, resistance to antibiotic and the origin of
304 samples. *S. aureus* strains from cutaneous and secondary infections produce a variety of
305 toxins with predominance of Panton - Valentine Leucotoxin which is one of the most severe.
306 Moreover, resistance to methicillin is unfavorable to toxins production while resistance to
307 vancomycin has no influence over toxins production. It'd be amazing pair henceforth

308 morphological identification tests, biochemical with the research of virulence factors in order
309 to raise more accurately diagnosis up. A more accurate diagnosis will allow a better care of
310 patients. This study concerning skin and secondary infections should be extended to others
311 strains of *S. aureus*.

312 **Acknowledgements**

313 This work was supported by Benin Government which granted Haziz Sina and by
314 grant EA-4438 from Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales.

315 **Authorship**

316 (1) Conception and design of the study: LB-M and GP

317 (2) Acquisition of data: HS, AT-A, WM, YB, HB.

318 (3) Analysis and interpretation of data: LB, GP, YS

319 (4) Drafting the article: LB-M, SOK, HS

320 (5) Revising it critically for important intellectual content: LB-M, GP, SOK, YS

321 (6) Final approval of the version to be submitted: All the co-authors

322 **Financial disclosure:**

323 The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or
324 preparation of the manuscript.

325 **CONFLICT OF INTEREST:** Author declare no conflict of interest

326 **ETHICAL APPROVAL** The authors had no access to the patient medical data, with the
327 exception of anonymous clinical sample data such as ages and the kind of infections. This

328 work is mainly focused on the bacterium *S. aureus* and not on the patients, and was therefore
329 exempted from ethical approval.

330 **References**

- 331 1. Li D, Cheung A. Repression of *hla* by rot is dependent on *sae* in *Staphylococcus aureus*.
332 *Infect Immun* 2008; 76: 1068-75.
- 333 2. Nubel U, Roumagnac P, Feldkamp M, Song JH, Ko KS, Huang YC, Coombs G, Ip M,
334 Westh H, Skov R, Struelens MJ, Goering RV, Strommenger B, Weller A, Witte W,
335 Achtman M. Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant
336 *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14130–5
- 337 3. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus*
338 *aureus* Isolates Carrying Panton-Valentine Genes in England and Wales: Frequency,
339 Characterization, and Association with Clinical Disease. *J Clin Microbiol* 2005;
340 43(5):2384-90.
- 341 4. Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, Couturier M, Riegel P, Haikou N, Hounsou F,
342 Monteil H, Sanni A, Prevost G. Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus*
343 *aureus* isolated from urinary tract infections. *J Hosp Infect* 2008; 68: 32-8.
- 344 5. Baba-Moussa L, Ahissou H, Azokpota P, Assogba B, Atindéhou M, Anagonou S, Keller
345 D, Sanni A, Prévost G. Toxins and adhesion factors associated with *Staphylococcus aureus*
346 strains isolated from diarrheal patients in Benin. *Afr J Biotechnol* 2010; 9: 604–11.
- 347 6. Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal
348 pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev*
349 *Microbiol* 1990; 17: 251–72.
- 350 7. Breneman DL. Bacterial infection of the skin and soft tissues and their treatment. *Curr*
351 *Opin Infect Dis* 1993; 6: 678–82.
- 352 8. Murray DL, Ohlendorf DH, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal
353 superantigens: their role in human diseases. *ASM News* 1995; 61: 229–35.

- 354 9. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin
355 Microbiol Rev 2000; 13: 16–34.
- 356 10. Barg NL, Harris T. Toxin-mediated syndromes. In Crossley KB, Archer GL, editors. The
357 staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, 1997 p. 527-44.
- 358 11. Durupt F, Mayor L, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Thomas L, Etienne J. Prevalence
359 of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. Br J
360 Dermatol 2007; 157:1161-7.
- 361 12. Gladstone GP, Van Heyningen WE. Staphylococcal leucocidins. Br J Exp Pathol 1957; 38:
362 123–37.
- 363 13. Woodin AM. Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*. Bioch J 1959; 73:
364 225–237.
- 365 14. Szmigielski S, Sobiczewska E, Prévost G, Monteil H, Colin DA, Jeljaszewicz J. Effect of
366 purified staphylococcal leukocidal toxins on isolated blood polymorphonuclear leukocytes
367 and peritoneal macrophages *in vitro*. Zentralbl Bakteriell 1998; 288: 383-94.
- 368 15. Hongo I, Baba T, Oishi K, Morimoto Y, Ito T, Hiramatsu K. Phenol-soluble modulin alpha
369 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Panton- Valentine leukocidin. J Infec
370 Dis 2009, 200: 715–23.
- 371 16. Cribier B, Prevost G, Couppie P, Finck-Barbancon V, Grosshans E, Piemont Y.
372 *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An
373 epidemiological and experimental study. Dermatology 1992; 185: 175-80.
- 374 17. Couppié P, Cribier B, Prévost G, Grosshans E, Piémont Y. Leucocidin from
375 *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiological study. Arch Dermatol
376 1994; 130:1208-9.
- 377 18. Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, Monteil H,
378 Piemont Y. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus*

- 379 aureus ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological
380 activities. Infect Immun 1995; 63: 4121-9.
- 381 19. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bès M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F,
382 Etienne J. Involvement of Panton Valentine leukocidine-producing *Staphylococcus aureus*
383 in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29:1128-32.
- 384 20. Baba-Moussa L, Sina H, Scheftel JM, Moreau B, Sainte-Marie D, Kotchoni SO, Prevost G,
385 Couppie P. Staphylococcal Panton-Valentine leucocidin as a major virulence factor
386 associated to furuncles. PLoS One 2011; 6: e25716.
- 387 21. Couppié P, Hommel D, Prévost G, Godart MC, Moreau B, Sainte-Marie D, Peneau C,
388 Hulin A, Monteil H, Pradinaud R. Septicémie à *Staphylococcus aureus*, furoncle et
389 leucocidine de Panton et Valentine : 3 observations. Ann Dermatol Venereol 1997; 124:
390 684-6.
- 391 22. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y,
392 Brousse N, Floret D, Etienne J. Association between *Staphylococcus aureus* strains
393 carrying gene for Panton Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in
394 young immunocompetent patients. Lancet 2002; 359:753-9.
- 395 23. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, Barbu EM,
396 Vazquez V, Höök M, Etienne J, Vandenesch F, Bowden MG. *Staphylococcus aureus*
397 Panton Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science 2007;
398 315(5815):1130-3.
- 399 24. Diep BA, Palazzolo-Ballance AM, Tattevin P, Basuino L, Braughton KR, Whitney AR,
400 Chen L, Kreiswirth BN, Otto M, DeLeo FR, Chambers HF. Contribution of Panton
401 Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
402 pathogenesis. PLoS One 2008; 3: e3198.

- 403 25. Gillet Y, Dohin B, Dumitrescu O, Lina G, Vandenesch F, Etienne J, Floret D.
404 Osteoarticular infections with *Staphylococcus aureus* secreting Panton Valentine
405 leukocidin. Arch Pediatr 2007; 14 Suppl 2: 102-7.
- 406 26. Hussain A, Robinson GO, Malkin J, Duthie M, Kearns A, Perera N. *Purpura fulminans* in
407 a child secondary to Panton Valentine leukocidinproducing *Staphylococcus aureus*. J Med
408 Microbiol 2007; 56:1407-9.
- 409 27. Shivashankar GH, Murukesh N, Varma MP, Sharif IM, Glynn G. Infection by Panton
410 Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* clinically mimicking Lemierre's
411 syndrome. J Med Microbiol 2008; 57: 118-20.
- 412 28. Burton MJ, Shah P, Swiatlo E. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus*
413 *aureus* as a cause of Fournier's gangrene. J Med Sci 2008; 335: 327-8.
- 414 29. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy ME, Vandenesch F,
415 Etienne J, Lina G. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-
416 Valentine leukocidin. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1515-9.
- 417 30. Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-
418 resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2010; 375:1557-68.
- 419 31. Holmes NE, Johnson PD, Howden BP. Relationship between Vancomycin-Resistant
420 *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-Intermediate *S. aureus*, High Vancomycin MIC, and
421 Outcome in Serious *S. aureus* Infections. J Clin Microbiol 2012; 50: 2548-52.
- 422 32. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Kobayashi I. Dissemination in
423 Japanese hospitals of strains of *S. aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet
424 1997; 350: 1670-3.
- 425 33. Cheesbrough M. District Laboratory Practice in Tropical Countries: Part 2. Cambridge
426 University Press, Cambridge, UK. 2004; p: 299-329.

- 427 34. SFM (Société Française de Microbiologie) Recommandations du Comité de
428 l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2012; 59p.
- 429 35. Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA. Flow cytometric determination
430 of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* 2001; 69: 2390–2395.
- 431 36. Prévost G, Couppie P, Prévost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, Monteil H, Piemont Y.
432 Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic
433 toxins. *J Med Microbiol* 1995; 42:237-45.
- 434 37. Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, Prevost G. Characterization of a
435 novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins
436 family. *FEBS Lett* 1998;436:202-8.
- 437 38. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J,
438 Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background,
439 virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70:631-41.
- 440 39. Denton M, O'Connell B, Bernard P, Jarlier V, Williams Z, Santerre Henriksen A. The
441 EPISA Study: antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing primary or
442 secondary skin and soft tissue infections in the community in France, the UK and Ireland. *J*
443 *Antimicrobial Chemother* 2008; 61(3):586-588.
- 444 40. Elazhari M, Saile R, Dersi N, Timinouni M, Elmalki A, Zriouil SB, Hassar M, Zerouali K.
445 Activité de 16 Antibiotiques vis-à-vis des *Staphylococcus aureus* communautaires à
446 Casablanca (Maroc) et Prévalence des Souches Résistantes à la Méthicilline. *Eur J Sci Res*
447 2009; 30:128-37.
- 448 41. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era.
449 *Science* 1992; 257: 1050-5.
- 450 42. Sina H, Baba-Moussa F, Ahoyo TA, Mousse W, Anagonou S, Gbenou JD, Prévost G,
451 Kotchoni SO, Baba-Moussa L. Antibiotic susceptibility and Toxins production of

- 452 *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples from Benin. Afr J Microbiol Res
453 2011; 5: 2797-808.
- 454 43. Randrianirina F, Soares JL, Ratsima E, Carod JF, Combe P, Grosjean P, Richard V,
455 Talarmin A. In vitro activities of 18 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*
456 isolates from the Institut Pasteur of Madagascar. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2007; 6:5
- 457 44. Kesah C, Ben Redjeb S, Odugbemi TO, Boye CS, Dosso M, Ndinya Achola JO, Koulla-
458 Shiro S, Benbachir M, Rahal K, Borg M. Prevalence of methicillin-resistant
459 *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. Clin Microbiol Infect 2003;
460 9:153-6.
- 461 45. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones R N, Beach M. Survey
462 of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial
463 susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe,
464 and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program,
465 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32 (suppl 2): 114-32.
- 466 46. Belabbès H, Elmdaghri N, Hachimi K, Marih L, Zerouali K, Benbachir M. Résistance de
467 *Staphylococcus aureus* isolé des infections communautaires et hospitalières à Casablanca.
468 Communication brève. Med Mal Infect 2001; 31: 25-8.
- 469 47. Maor Y, Hagin M, Belausov N, Keller N, Ben-David D, Rahav G. Clinical features of
470 heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia versus those
471 of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia. J Infect Dis 2009; 199: 619-24.
- 472 48. Prévost G, Mourey L, Colin DA, Menestrina G. Staphylococcal pore-forming toxins. Curr
473 Top Microbiol Immunol 2001; 257: 53-83.
- 474 49. Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F,
475 Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F, Genestier L. *Staphylococcus aureus*

- 476 Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent
477 apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 2005; 115: 3117-27.
- 478 50. Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of
479 *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 39:181-9.
- 480 51. Prevost G, Couppie P, Monteil H. Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis*
481 2003; 16: 71-6.
- 482 52. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes
483 M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne. Community acquired methicillin-resistant
484 *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide
485 emergence. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:978-84.
- 486 53. Morris CA, Conway HD, Everall PH. Food-poisoning due to staphylococcal enterotoxin E.
487 *Lancet* 1972; 2:1375-6.
- 488 54. Chen TR, Chiou CS, Tsen HY. Use of Novel PCR Primers Specific to the Genes of
489 Staphylococcal Enterotoxin G, H, I for the Survey of *Staphylococcus aureus* Strains
490 Isolated From Food-Poisoning Cases and Food Samples in Taiwan. *Int J Food Microbiol*
491 2004; 92: 189–97.
- 492 55. Ikeda, T.; Tamate, N.; Yamaguchi, K.; Makino, S. Mass Outbreak of Food Poisoning
493 Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. *Appl Environ*
494 *Microbiol* 2005, 71, 2793–5.
- 495 56. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A New Staphylococcal
496 Enterotoxin, Enterotoxin F, Associated with Toxic-Shock-Syndrome *Staphylococcus*
497 *aureus* Isolates. *Lancet* 1981; 1: 1017–21.
- 498 57. Baldwin LN, Lowe AD. Panton-Valentine Leukocidin associated with community
499 acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a case report and review of interim
500 guidelines. *Anaesthesia* 2008; 63:764-6.

- 501 58. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis
502 and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 781-91.
- 503 59. Labischinski H. Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin
504 binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. Med
505 Microbiol Immunol 1992; 181: 241-65.
- 506 60. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, Kim MN,
507 Ploy M C, El-Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K. Cell wall thickening is a common feature of
508 vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41: 5-14.
- 509 61. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic
510 resistance. Lancet Infect Dis 2001; 1: 147-55.
- 511 62. Walsh TR, Howe RA. The prevalence and mechanisms of Vancomycin resistance in
512 *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Microbiol 2002; 56: 657-675.
- 513

514 **FIGURE LEGENDS.**

515 **Figure 1. *Staphylococcus aureus* distribution based on sample provenance.**

516 Abc. : Abscess, Fur. Furuncle: Ost. : Osteomyelitis, Pyo. : Pyomyesitis, Ulc. : Buruli ulcer

517

518 **Figure 2. Global *Staphylococcus aureus* strains isolated from cutaneous and secondary**
519 **infections resistance profile to 22 antibiotics.**

520 Benzyl Penicillin (BP), Oxacillin (Ox), Cefoxitin screen (Cef), Gentamicin (Gen),
521 Tobramycin (Tob), Kanamycin (Kan), Vancomycin (Van), Teicoplanin (Tei), Fusidic acid
522 (FA), Fosfomycin (Fos), Rifampicin (Rif), trimetropim/sulfamethoxazole (T/Sul),
523 Levofloxacin (Lev), Erythromycin (Ery), Lincomycin (Lin), Pristinamycin (Pri),
524 Quinupristin/ Dalfopristin (Q/Dal), Linezolid (Line), Minocyclin (Min), Tetracyclin (Tet),
525 Mupirocin (Mup), Nitrofurantoin (Nit).

526

527 **Figure 3. *Staphylococcus aureus* strains resistance profile to 22 antibiotics according to**
528 **their origin.**

529 Benzyl Penicillin (BP), Oxacillin (Ox), cefoxitin screen (Cef), Gentamicin (Gen), Tobramycin
530 (Tob), Kanamycin (Kan), Vancomycin (Van), Teicoplanin (Tei), Fusidic acid (FA),
531 Fosfomycin (Fos), Rifampicin (Rif), trimetropim/sulfamethoxazole (T/Sul), Levofloxacin
532 (Lev), Erythromycin (Ery), Lincomycin (Lin), Pristinamycin (Pri), Quinupristin/ Dalfopristin
533 (Q/Dal), Linezolid (Line), Minocyclin (Min), Tetracyclin (Tet), Mupirocin (Mup),
534 Nitrofurantoin (Nit).

535

536 **Figure 4. Distribution of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cutaneous and**
537 **secondary infections according to their resistance to Methicillin (a) and to Vancomycin**
538 **(b).**

539

540 **Figure 5. Toxins production by the *Staphylococcus aureus* strains isolated from**
541 **cutaneous and secondary n and deep infections.**

542

543 **Figure 6. Specificity of the toxins production by the *S. aureus* strains isolated from**
544 **cutaneous and secondary infections.**

545

546 **Figure 7. Effect of Methicillin resistance (a) and Vancomycin resistance (b) on the**
547 **encoding toxins genes presence**

548

549 **Figure 8. Comparison of the effects of the resistance (a) and the sensibility (b) on the**
550 **toxins production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cutaneous and**
551 **secondary infections.**

552

553

554 **Table 1.**

555 Primers sequences used in this study for the detection of genes encoding toxins.

Primers	Sequences	Polarity	Expected fragment (base pair)	accession N°
<i>eta</i>	5'-GCAGGTGTTGATTTAGCATT-3'	Sens	93	A8658-043
	5'-AGATGTCCCTATTTTTGCTG-3'	Antisens		A8658-044
<i>etb</i>	5'-ACCCCTGTTCCCTTATCATC-3'	Sens	226	A8659-036
	5'-GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG-3'	Antisens		A8659-037
<i>lpv</i>	5'-AAAATGCCACTGTTATCCAGAGGTA-3'	Sens	433	A8658-029
	5'-TTTGCAGCGTTTTGTTTTTCG-3'	Antisens		A8658-030
<i>sea</i>	5'-ATGGTTATCAATGTGCGGGTGIIIIICCAAACAAAAC-3'	Sens	520	A8658-031
	5'-TGAATACTGTCCTTGAGCACCAIIIIATCGTAATTAAC-3'	Antisens		A8658-032
<i>seb</i>	5'-TGGTATGACATGATGCCTGCACIIIIIGATAAATTTGAC-3'	Sens	163	A8658-033
	5'-AGGTA CTCTATAAGTGCCTGCCTIIIIACTAACTCTT-3'	Antisens		A8658-034
<i>sec</i>	5'-GATGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCIIIIACTATGTAAAC-3'	Sens	283	A8658-035
	5'-AGATTGGTCAAACCTTATCGCCTGGIIIIIGCATCATATC-3'	Antisens		A8658-036

Primers	Sequences	Polarity	Expected fragment (base pair)	accession N°
<i>sed</i>	5'-CTGAATTAAGTAGTACCGCGCTIIIIATATGAAAC-3'	Sens	384	A8658-037
	5'-TCCTTTTGCAAATAGCGCCTTGIIIIIGCATCTAATTC-3'	Antisens		A8658-038
<i>see</i>	5'-CTTACCGCCAAAGCTGTCTG-3'	Sens	159	A8658-039
	5'-GTCCACTTGTAATGGTAGCGAGAA-3'	Antisens		A8658-040
<i>seg</i>	5'-AATTATGTGAATGCTCAACCCGAT-3'	Sens	408	HA01804615-
	5'-CTTTAGTGAGCCAGTGTCTTGCTTTG-3'	Antisens		HA01804616
<i>seh</i>	5'-CATCTACCCAAACATTAGCACC-3'	Sens	222	HA01804617
	5'-AGAAATCAAGGTGATAGTGGCAA-3'	Antisens		HA01804618
<i>sei</i>	5'-AGGCGTCACAGATAAAAACCTACCIIIIICAAATCAACTC-3'	Sens	454	HA01804619
	5'-ACAAGGACCATTATAATCAATGCCIIIIITATCCAGTTTC-3'	Antisens		HA01804620
<i>tsst-1</i>	5'-ACCCCTGCCTTTCCATCATC-3'	Sens	209	A8658-041
	5'-TTTTTCAGTATTTGTAACGCC-3'	Antisens		A8658-042

556

557

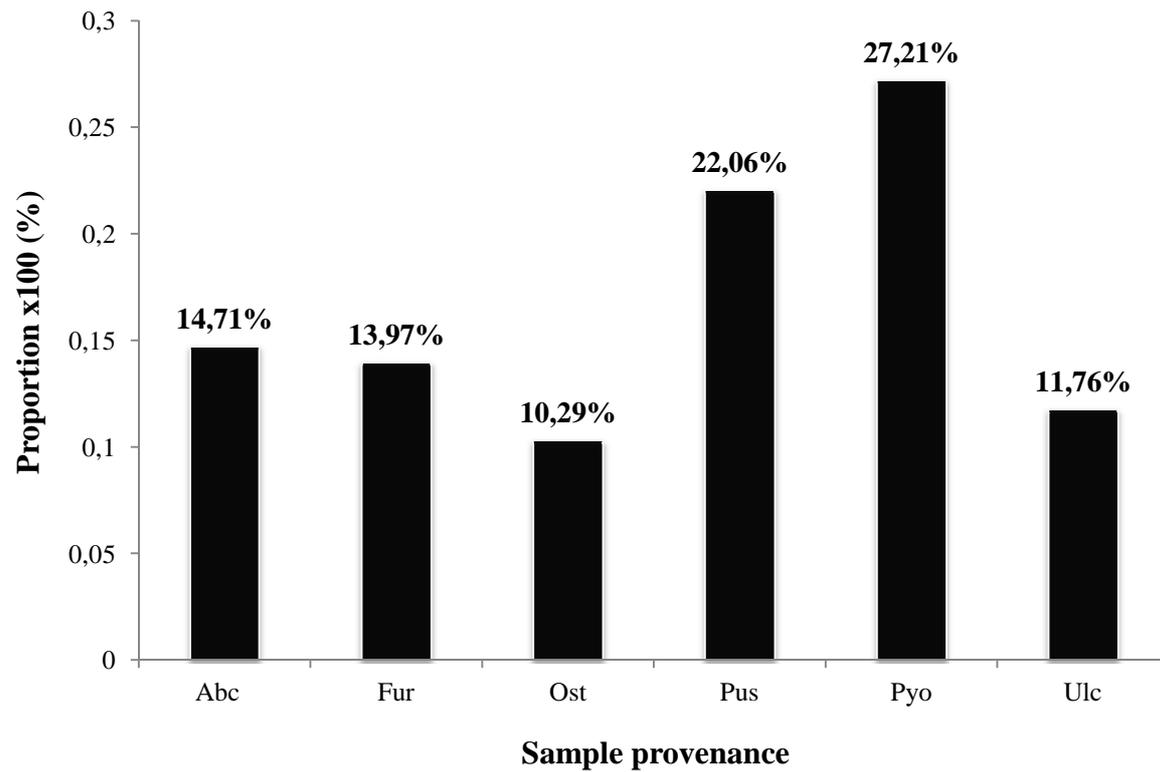


Figure 1. *Staphylococcus aureus* distribution based on sample provenance.

Abc. : Abscess, Fur. Furuncle: Ost. : Osteomyelitis, Pyo. : Pyomyesitis, Ulc. : Buruli ulcer.

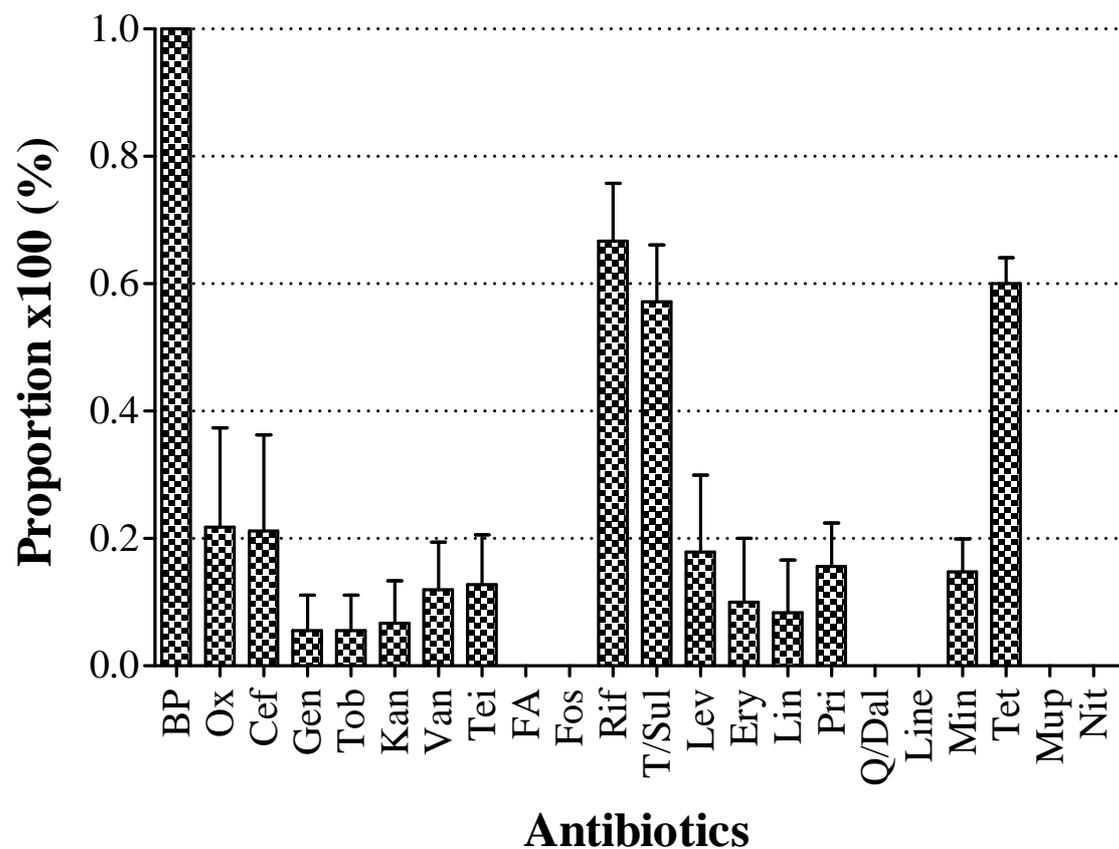


Figure 2. Global *Staphylococcus aureus* strains isolated from cutaneous and secondary infections resistance profile to 22 antibiotics.

Benzyl Penicillin (BP), Oxacillin (Ox), Cefoxitin screen (Cef), Gentamicin (Gen), Tobramycin (Tob), Kanamycin (Kan), Vancomycin (Van), Teicoplanin (Tei), Fusidic acid (FA), Fosfomycin (Fos), Rifampicin (Rif), trimetropim/sulfamethoxazole (T/Sul), Levofloxacin (Lev), Erythromycin (Ery), Lincomycin (Lin), Pristinamycin (Pri), Quinupristin/ Dalfopristin (Q/Dal), Linezolid (Line), Minocyclin (Min), Tetracyclin (Tet), Mupirocin (Mup), Nitrofurantoin (Nit).

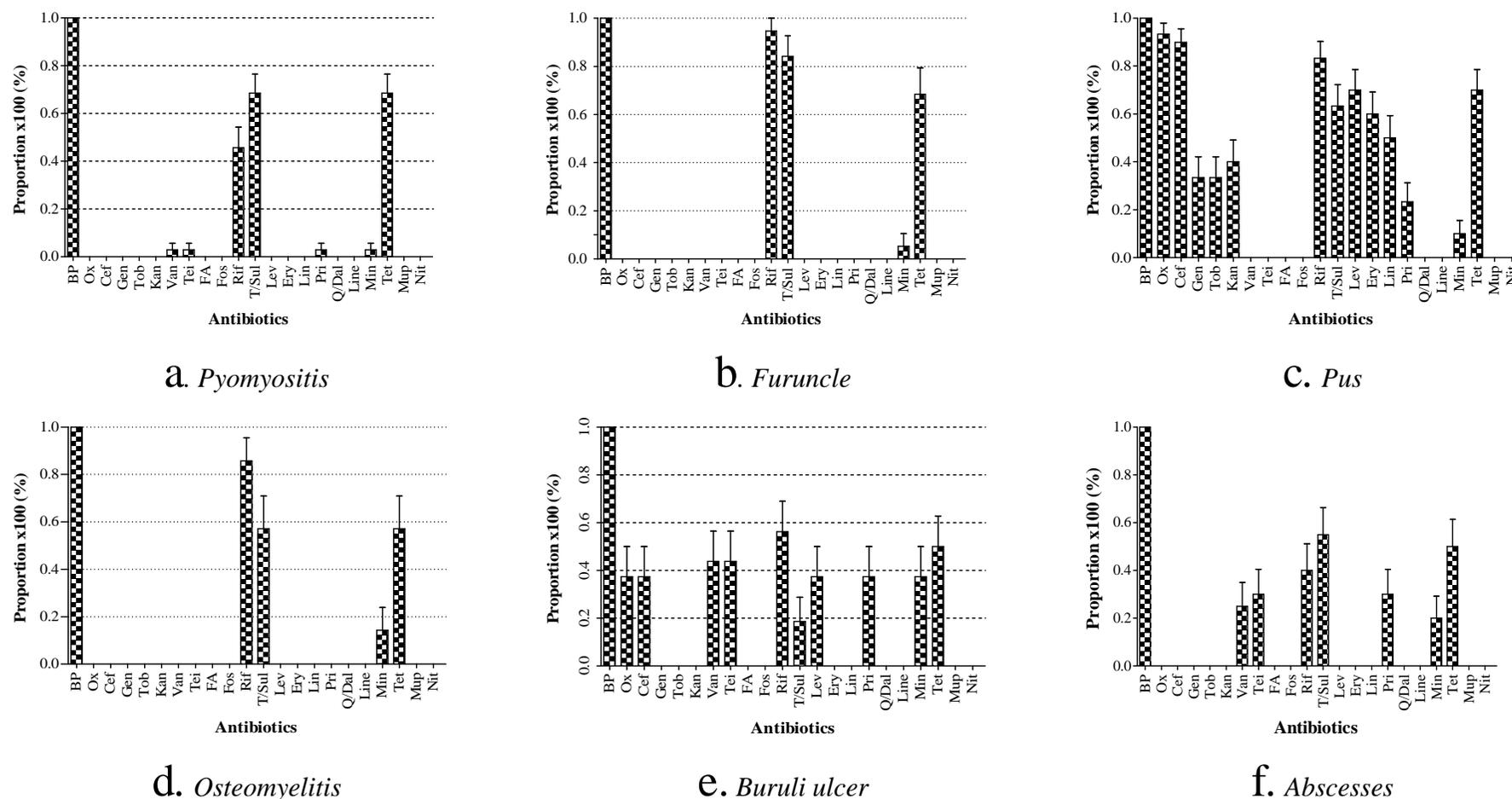


Figure 3. *Staphylococcus aureus* strains resistance profile to 22 antibiotics according to their origin.

Benzyl Penicillin (BP), Oxacillin (Ox), cefoxitin screen (Cef), Gentamicin (Gen), Tobramycin (Tob), Kanamycin (Kan), Vancomycin (Van), Teicoplanin (Tei), Fusidic acid (FA), Fosfomycin (Fos), Rifampicin (Rif), trimetropim/sulfamethoxazole (T/Sul), Levofloxacin (Lev), Erythromycin (Ery), Lincomycin (Lin), Pristinamycin (Pri), Quinupristin/ Dalfopristin (Q/Dal), Linezolid (Line), Minocyclin (Min), Tetracyclin (Tet), Mupirocin (Mup), Nitrofurantoin (Nit).

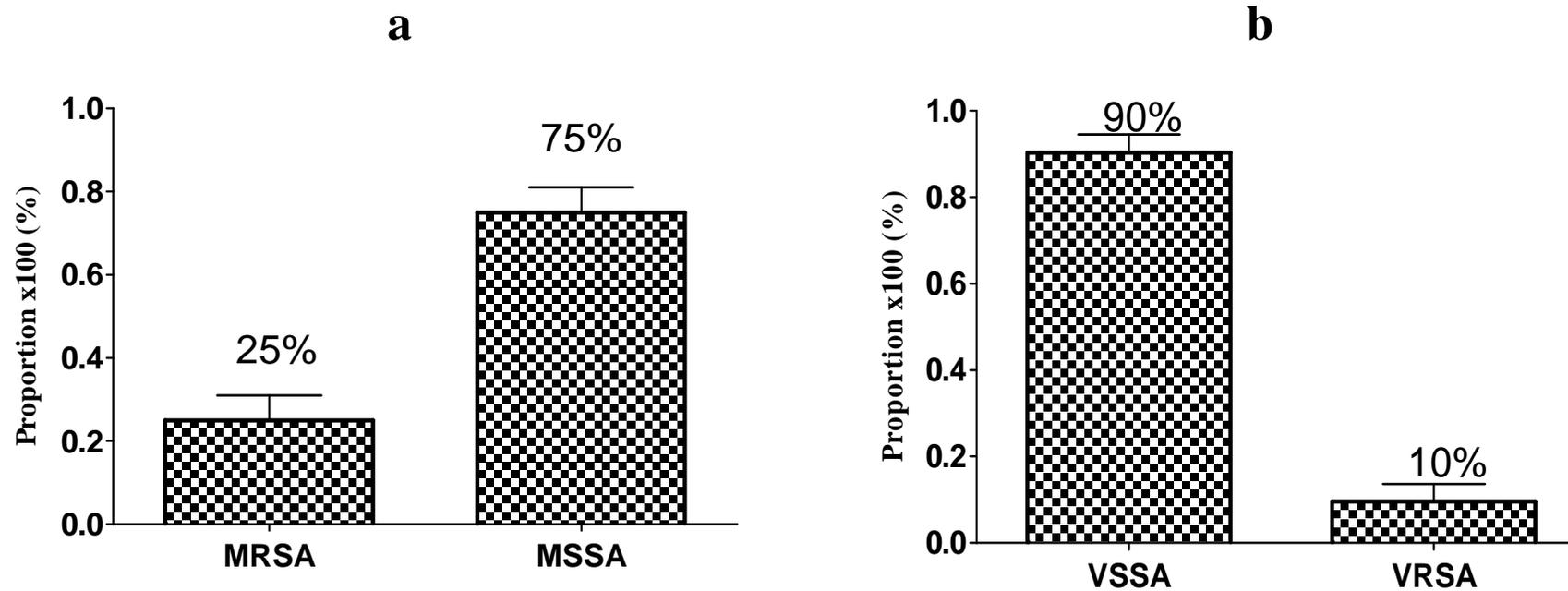


Figure 4. Distribution of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cutaneous and secondary infections according to their resistance to Methicillin (a) and to Vancomycin (b).

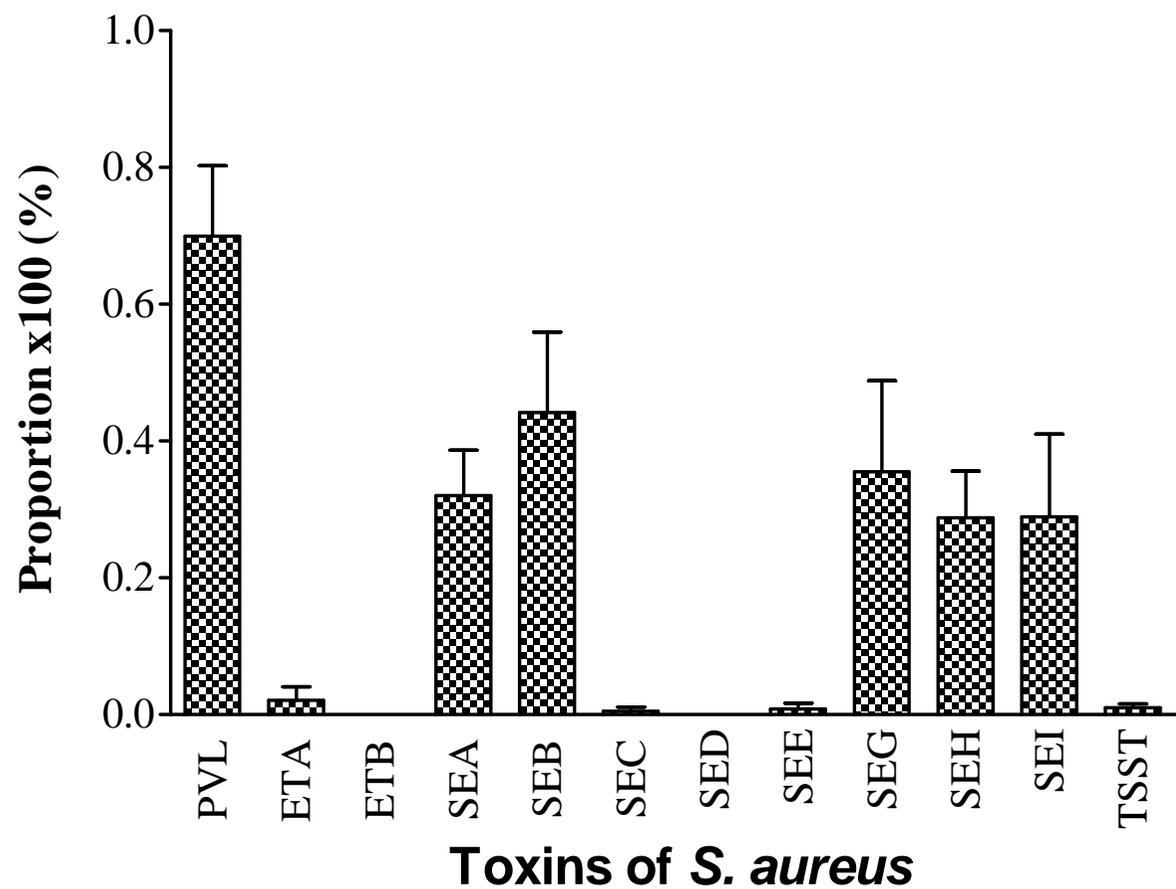
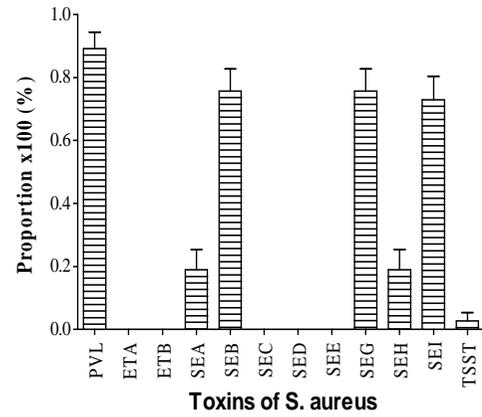
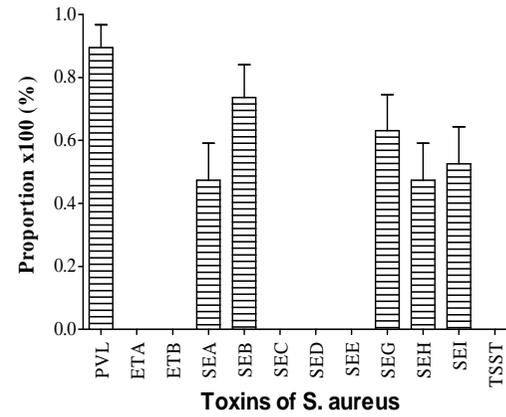


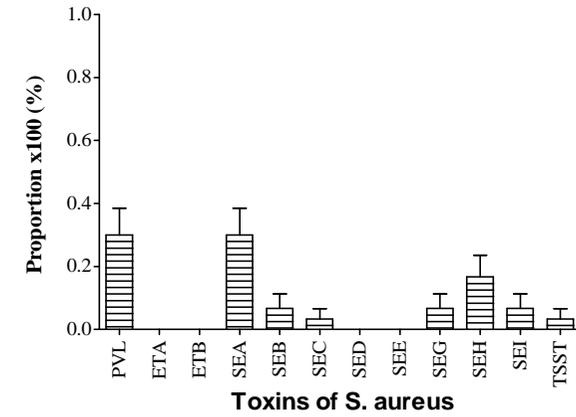
Figure 1. Toxins production by the *Staphylococcus aureus* strains isolated from cutaneous and secondary n and deep infections.



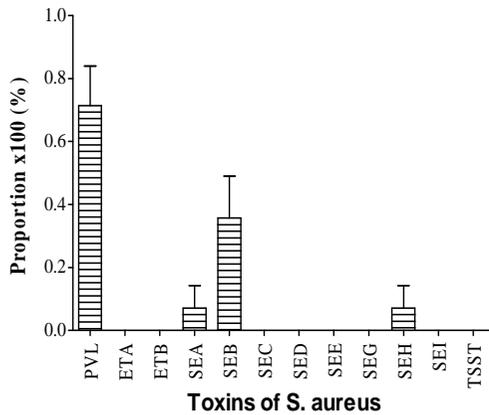
a. *Pyomyositis*



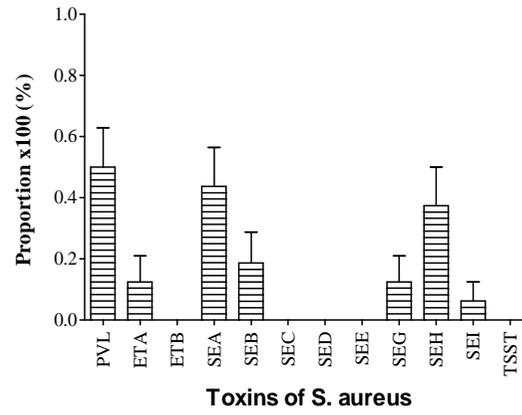
b. *Furoncle*



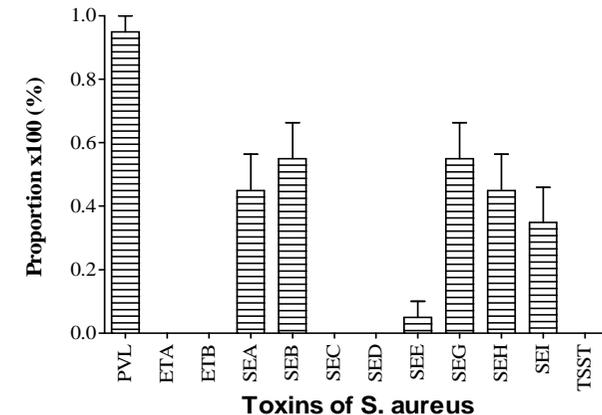
c. *Pus*



d. *Osteomyelitis*



e. *Buruli ulcer*



f. *Abscesses*

Figure 1. Specificity of the toxins production by the *Staphylococcus aureus* strains isolated from cutaneous and secondary infections.

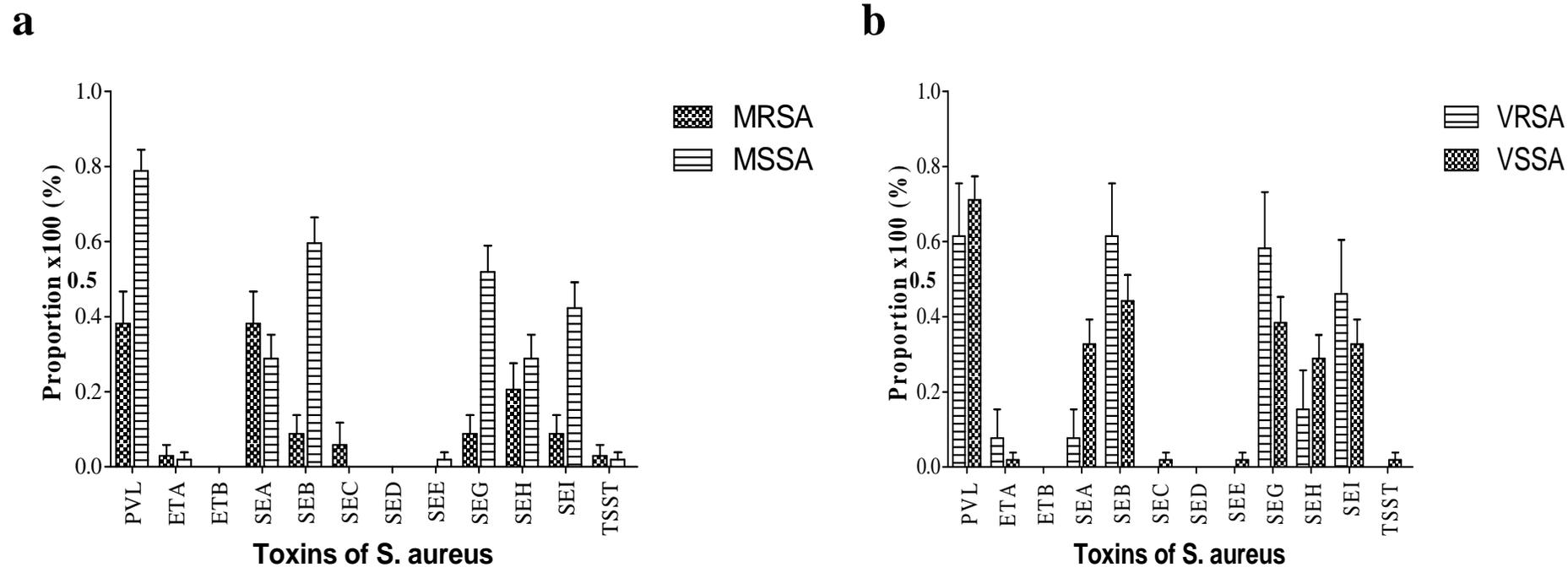


Figure 1. Effect of Methicillin resistance (a) and Vancomycin resistance (b) on the encoding *Staphylococcus aureus* toxins genes presence

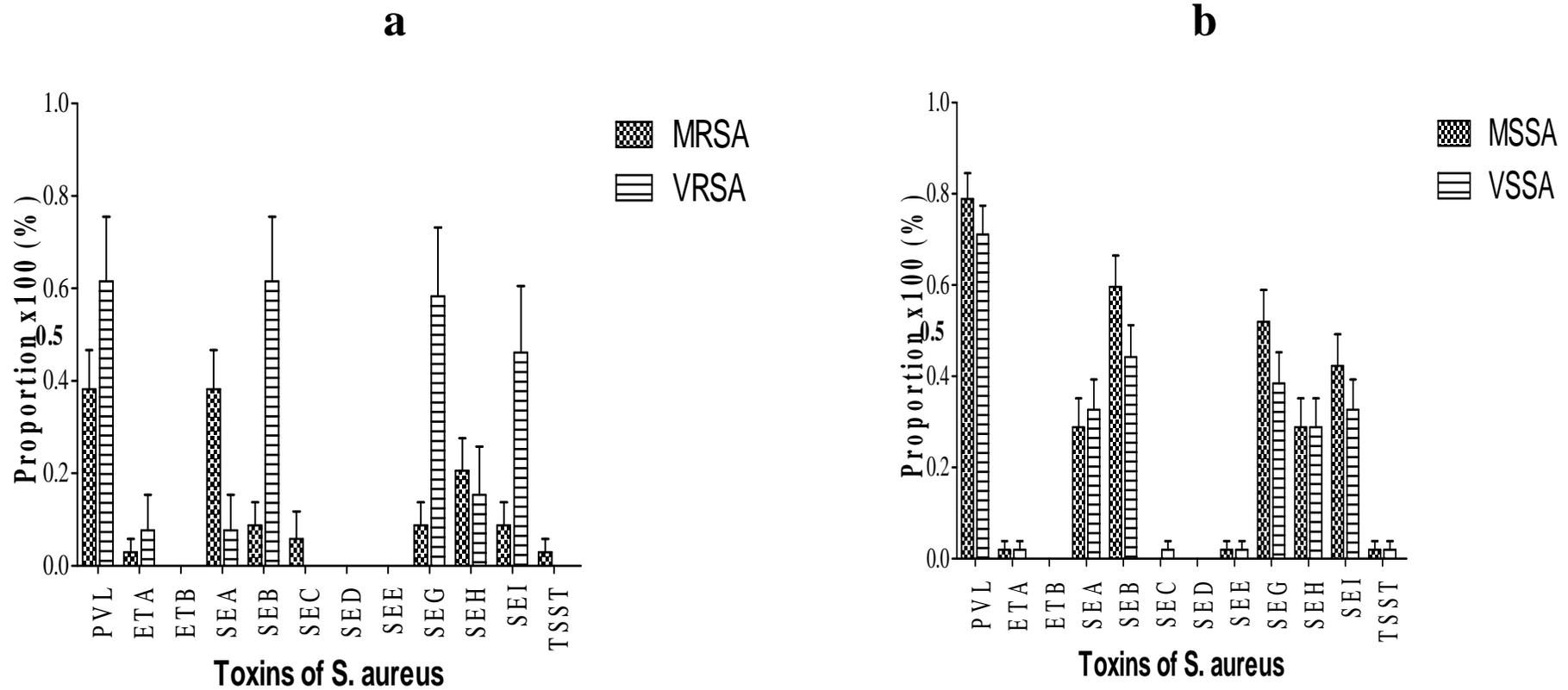


Figure 1. Comparison of the effects of the resistance (a) and the sensibility (b) on the toxins production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cutaneous and secondary infections.

3.3.3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude a montré que la résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* provenant des infections cutanées est fonction de l'origine du prélèvement. Nous avons tenté de faire une corrélation entre la production de toxines, la résistance à l'antibiotique et l'origine du prélèvement. Les souches de *S. aureus* provenant des infections cutanées produisent une gamme variée de toxines avec une prédominance de la Leucotoxine de Panton et Valentine qui est l'une des toxines les plus sévères.

Les souches ont présenté une susceptibilité variable aux antibiotiques testés. Ainsi, il est constaté que la totalité des souches étaient résistantes à la Benzyle Pénicilline. Une forte proportion de souches est résistante à la méthicilline. De plus, on a constaté que la résistance à la méthicilline est défavorable à la production des toxines alors que la résistance à la Vancomycine n'a pas d'effet sur la production des toxines.

La présence dans notre étude d'une proportion relativement élevée de souches de LPV + nous fait penser à une spécificité de la production de cette toxine par un type d'infection donné. Ainsi, étant donné que cette toxine a une action lytique sur les PN, il est probable qu'elle soit la toxine majeure et responsable des infections cutanées primaires et particulièrement des furoncles. La baisse de l'immunité aussi peut être un facteur aggravant de la virulence de *S. aureus*. Pour répondre à ces questions, il serait alors opportun de faire une étude dans le but d'évaluer la production de toxines et de facteurs d'adhésions impliqués dans la virulence des souches de *S. aureus* isolées chez les infectés cutanés primaires et particulièrement ceux souffrant de furoncle dans un contexte d'immunodépression.

3.4. *Chapitre 4* : La Leucocidine de Panton et Valentine (LPV) : facteur de virulence majeur associé aux infections cutanées ?

3.4.1. Introduction

Le furoncle est une pathologie cutanée très fréquemment associée à un *S. aureus* producteur de Leucocidine de Panton et Valentine. Les patients infectés par le VIH développent fréquemment des infections cutanées à *Staphylococcus aureus* de type folliculites et furoncles. Dans une précédente étude réalisée à Strasbourg (France), il a été mis en évidence une association entre *Staphylococcus aureus* producteurs la Leucocidine de Panton et Valentine (LPV) et furoncles (Couppié *et al.* 1997). Les *S. aureus* producteurs de PVL sont fortement associés aux lésions cutanées. Fink-Barbançon *et al.* (1991) avaient montré que les souches de *S. aureus* d'origine cutanée produisaient la LPV. Couppié *et al.* (1997) ont montré que ce sont essentiellement des souches de *S. aureus* isolées de pyodermites primitives qui produisent la LPV plutôt que les souches isolées de pyodermites secondaires, de lésions d'eczéma atopiques. Parmi les pyodermites primitives ce sont surtout les furoncles (85%) et dans une moindre mesure les abcès (40%) et les panaris (33%) qui sont concernés par les *Staphylococcus aureus* productrice de la LPV (Couppié, 1994).

Les travaux effectués par Baba-Moussa *et al.* (1999) montraient que 50 à 55% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de suppuration superficielles et profondes au Bénin, en Côte d'Ivoire et au Togo étaient productrices de LPV. Selon ces mêmes auteurs, la majorité (75%) des staphylococcies cutanées primaires à savoir furoncles et panaris étaient productrices de LPV.

A partir de souches de *Staphylococcus aureus* isolées de patients indépendants vus consécutivement au Centre Hospitalier de Cayenne pour furoncles dans le cadre de l'activité de consultation ambulante de dermatologie, la présente étude est menée. Dans cette étude, nous avons réalisé l'étude comparative de différentes toxines staphylococciques pour évaluer l'association éventuelle de la production d'une toxine par les *Staphylococcus aureus* isolés des furoncles en Guyane et la comparaison des profils toxiques des *Staphylococcus aureus* isolés de furoncles chez des patients positifs au VIH versus ceux négatifs au VIH. Nous avons également tenté de mettre en évidence en Guyane une éventuelle association entre

Staphylococcus aureus producteurs de LPV et furoncles à la fois chez les patients VIH (+) et VIH (-).

Pour ce faire nous avons recherché la présence de 27 facteurs de virulence (Toxines et facteurs d'adhésion) produits par des souches de *Staphylococcus aureus* isolées des furoncles et abcès chez des malades immunodéprimés notamment ceux atteints du VIH et aussi chez des malades non porteur du VIH. Au total, 55 patients de l'hôpital Générale de la Cayenne (Guyane Française) ont été pris en compte par cette étude. Ces patients ont été classés en trois groupes en considérant l'origine de leur infection. Pour cette étude, seuls les cas concernant les lésions de type furoncle ou type d'infections cutanées secondaires d'une dermatose préexistante ont été inclus. Les caractéristiques démographiques anamnestiques et cliniques des patients étaient enregistrées avant la réalisation d'un prélèvement bactériologique de la lésion. Pour les patients présentant un furoncle et non suivi pour une infection par le VIH, une sérologie VIH (ELISA) était systématiquement proposée. En cas de test ELISA positif, un Western Blot était réalisé ainsi qu'un prélèvement sanguin pour mesure du taux des Lymphocytes CD4+.

Ainsi, dans le premier groupe, on avait 30 patients avec des infections staphylococciques secondaire (13 eczéma, 7 plaies, 6 prurigos et 4 diverses dermatoses). Le second groupe comptait 16 patients avec des furoncles ayant une sérologie HIV négative et le troisième groupe étaient composé de 9 patients ayant une sérologie HIV positive avec des furoncles. Les résultats de cette étude, présentés dans le paragraphe suivant, ont été publiés dans la revue « **PLoS ONE** ».

3.4.2. Article N°4

**“Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin
as a Major Virulence Factor Associated to
Furuncles”.**

*Lamine Baba-Moussa, Haziz Sina, Jean-Michel Scheftel,
Brigitte Moreau, Dominique Sainte-Marie, Simeon O.
Kotchoni, Gilles Prévost, Pierre Couppié.*

PLoS ONE 6(10): e25716. doi:10.1371/journal.pone.0025716

Received July 19, 2011; Accepted September 8, 2011; Published October 12, 2011

Staphylococcal Panton-Valentine Leucocidin as a Major Virulence Factor Associated to Furuncles

Lamine Baba-Moussa^{1*}, Haziz Sina¹, Jean-Michel Scheftel², Brigitte Moreau³, Dominique Sainte-Marie⁴, Simeon O. Kotchoni⁵, Gilles Prévost², Pierre Couppié⁴

1 Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin, **2** Institut de Bactériologie, Unité EA-4438 Physiopathologie et Médecine, Strasbourg, France, **3** Service de Biologie Polyvalente, Centre Hospitalier de Cayenne, Cayenne, Guyane Française, **4** Service de Dermatologie, Centre Hospitalier de Cayenne et Institut Guyanais de Dermatologie Tropicale, Cayenne, Guyane Française, **5** Department of Biology, Rutgers University, Camden, New Jersey, United States of America

Abstract

Panton-Valentine Leucocidin (PVL), one of the β -barrel pore-forming staphylococcal leucotoxins, is known to be associated to furuncles and some severe community pneumonia. However, it is still uncertain how many other virulence factors are also associated to furuncles and what the risk factors of furuncles are in immuno-compromised status of patients, especially the HIV (+) patients. In this paper, we use antigen immunoprecipitation and multiplex PCR approach to determine the presence of 19 toxins, 8 adhesion factors and the PFGE profiles associated to furuncles in three independent patient study groups of *S. aureus* (SA) isolates collected from the Cayenne General Hospital (French Guiana). The patient groups were made of: 16 isolates from HIV (–) patients, 9 from HIV (+) patients suffering from furuncles, and 30 control isolates from patients with diverse secondary infected dermatitis. Our data reveals that the majority (96%) of SA strains isolated from HIV patient-derived furuncles significantly produced PVL ($p < 10^{-7}$), whereas only 10% of SA strains produced this toxin in secondary infected dermatosis. A high prevalence of LukE-LukD-producing isolates (56 to 78%) was recorded in patient groups. Genes encoding clumping factor B, collagen- and laminin-binding proteins (*clfB*, *cna*, *lbp*, respectively) were markedly frequent (30 to 55%), without being associated to a specific group. Pulse field gel electrophoresis evidenced 24 overall pulsotypes, whereas the 25 PVL-producing isolates were distributed into 15 non clonal fingerprints. These pulsotypes were not specific PVL-producing isolates. PVL appears to be the major virulence factor associated to furuncles in Europe and in South America regardless of the immune status of the HIV patients.

Citation: Baba-Moussa L, Sina H, Scheftel J-M, Moreau B, Sainte-Marie D, et al. (2011) Staphylococcal Panton-Valentine Leucocidin as a Major Virulence Factor Associated to Furuncles. PLoS ONE 6(10): e25716. doi:10.1371/journal.pone.0025716

Editor: Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, Brazil

Received: July 19, 2011; **Accepted:** September 8, 2011; **Published:** October 12, 2011

Copyright: © 2011 Baba-Moussa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: These authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: laminesaid@yahoo.fr

Introduction

Staphylococcus aureus (SA) are known to produce a large series of toxins [1,2] and adhesion factors [3,4] considered as virulence-associated factors. Among the virulence factors associated to clinical syndromes, only few were initially considered in most of original studies [5,6,7]. For example, the Panton Valentine leucocidin (PVL)-producing SA strains were successively associated to furuncles and carbuncles [5,6,8,9] and/or to community pneumonia with lung abscesses [10,11,12].

PVL was initially identified because of the acute cytotoxicity of some culture supernatants of SA isolates from furuncles and staphylococcal necrotizing follicular infections of the skin [13,14]. PVL is a skin-necrotizing toxin when intradermally injected into rabbits [15]. This bipartite toxin is an active pore-forming toxin against human polymorphonuclear cells, monocytes and macrophages [16]. However, the two protein components of PVL, LukS-PV and LukF-PV, may recombine with other related leucotoxins components, to generate new leucotoxins with specific cell spectra [17]. The newly formed toxins such as PVL and gamma-hemolysins (HlgA-HlgB or HlgC-HlgB sometimes called LukS-LukF) may be expressed at different levels [18] with highly variable

binding constants to cells [19]. Sequence and three-dimensional structures of LukS-PV and LukF-PV have been determined [20,21], and the interaction of LukS-PV with a membrane receptor was strongly suggested [19].

The origin and recurrence of furuncles as primary infections, and their severity in some patients remain unclear. This has been related to the nasal carriage of the bacterium [14], but this may suggest a role of innate immunity. Immunosuppressed HIV (+) patients develops frequently SA skin infections such as folliculitis and sometimes furuncle [22]. There is still no evidence of virulence factors in SA isolated from staphylococcal infections in HIV (+) patients. In addition, the possibility that immunodeficiency status of the patient may modify susceptibility to SA virulence has never been proved.

In this work we analyzed the toxin profile and adhesion factors of SA isolated from HIV positive and negative patients at the Cayenne General Hospital, the principal hospital in French Guiana, in South America, where HIV prevalence in adults was 1,6%. SA was isolated from independent furuncle and furuncle free patients. A comparative study of different SA toxins and adhesion factors was performed in order to establish the eventual association of virulence factors other than PVL, especially in HIV positive and negative patients with respect to secondary skin infections.

Materials and Methods

Ethics Statement

Samples collected from patients at French Guiana hospital center were anonymously sent to the University of Abomey-Calavi, Benin (West Africa) for microbial screening, while PFGE analysis were performed at Strasbourg University, Strasbourg, France. The authors had no access to the patient medical data, with the exception of anonymous clinical sample data such as ages, HIV status, skin infections. This work is mainly focused on the bacterium *SA* virulence factors and not on the patients, and was therefore exempted from ethical approval.

Collected samples and clinical data

We collected *SA* isolates from 55 patients in Cayenne General Hospital (French Guiana). These patients were classified in three groups according to infectious origin: 30 patients with staphylococcal secondary skin infections (eczema: 13, wound: 7, prurigo: 6 and diverse dermatosis: 4), 16 HIV (−) patients with furuncles and 9 HIV (+) patients with furuncles. The HIV (+) status was discovered for 2 patients with furuncles by ELISA and Western blot, consecutively confirmed by dermatology consultation test (where HIV test was systematically proposed when a furuncle was diagnosed) and 7 patients were previously diagnosed as HIV (+) and they were regularly followed at hospital. The median of the CD4+ lymphocytes in HIV (+) patients was 225 U/mm³ (42–896). Four patients had CD4+ lymphocytes <200/mm³ and one <100/mm³. Among the HIV (+) patients, only one suffered of cerebellar toxoplasmosis.

The other patients were consecutively seen at dermatological consultation. In this study, only patients presenting lesions like furuncles or secondary skin infections of a pre-existing non infectious dermatosis due to *SA* were included. The demographic and clinical characteristics of patients were recorded before the bacteriological sampling on the lesion. The mean age of all 55 patients was 25.4 year old (1–69). It was 18.3 (1–55), 28.8 (2–56), 44.6 (20–69), respectively, for the patients with secondary infections, HIV (−) patients and HIV (+) patients. The sex ratio was 1.3.

Susceptibility to antibiotics

Antibiograms for the isolates were obtained by the disk diffusion method (Bio-Rad-Diagnostic Pasteur, Marnes la Coquette, France). Isolates were inoculated and antibiotics were tested according to the 2010 Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology and the NCCLS recommendations [23]: Oxacillin (Oxa), Penicillin G (PeG), Vancomycin (Va), Teicoplanin (Tec), Kanamycin (Kan), Tobramycin (Tob), Chloramphenicol (Chl), Rifampicin (Rif), Fusidic acid (Fus), Gentamicin (Gm), Trimetoprim Sulfamethoxolin (Sxt), Ofloxacin (OXF), Pristinamycin (Pt), Linezolid (Lzd) and Erythromycin (Ery) have been tested. Evaluation of methicillin resistance was performed by plating the strains on buffered Mueller-Hinton agar with 2% (wt/vol) NaCl at 37°C for 24 h.

Phenotypic detection of toxins

Enterotoxins A, B, C, and D and TSST-1. *SA* cultures were carried out overnight in 3 mL of Brain-Heart (Difco) medium under shaking, and toxins were detected using the semi-quantitative reversed passive latex agglutination detection kits SET-RPLATM and TST-RPLATM (Oxoid, Basingstoke, England). These tests were reported to be sensitive and specific, although large amounts of enterotoxin E may be detected as low levels of enterotoxin A [24].

Bicomponent leucotoxins and epidermolysins. The different leucotoxins (PVL, LukE-LukD, LukM-LukF-PV, and the gamma-hemolysin proteins HlgA, HlgB, and HlgC), epidermolysins A and B were evidenced from culture supernatants after 18 h of growth in YCP medium [19] by radial gel immunodiffusion in 0.6% (wt/vol) agarose in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 with component-specific rabbit polyclonal and affinity-purified antibodies [14]. For a better determination, gels were dried, stained in Coomassie blue, and destained in 10% (vol/vol) acetic acid.

Genotype detection of toxins and adhesion factors

Presence of genes encoding enterotoxins SEE, SEG, SEH, SEK, SEL, SET, epidermolysin D (*etd*), Edin factors (*edinA*, *edinB*, *edinC*) and of genes encoding eight adhesion factors: Collagen Binding Protein (*Cna*), Fibronectin Binding Proteins A and B (*fnbA* and *fnbB*), Bone Sialoprotein Binding Protein (*bbp*), Clumping Factor B (*clfB*), Fibrinogen Binding Protein (*fib*), Elastin Binding Protein (*ebp*) and Laminin Binding Protein (*lbp*) was detected by Multiplex PCR (Table 1). Additionally, genes encoding PVL were also detected with oligonucleotides previously used for expression studies [18]. Total DNA was purified using QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, GmbH, Germany) with a Gene Amp[®] PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) and amplified in a total volume of 50 µl containing 25 pmoles of each primer, 50 ng of total DNA, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of dNTP mixture, 1× PCR reaction Buffer and 5 units of FastTaqTM DNA polymerase (Roche Applied Science, GmbH, Germany). The thermal cycling conditions included an initial denaturation step (2 min at 92°C) followed by 35 cycles of amplification comprising three steps: 2 min denaturation for 92°C, 1 min annealing at 50°C, 2 min extension at 72°C. The reaction was terminated with 3 min extension at 72°C. PCR products were analysed by electrophoresis through 1.4% (wt/vol) agarose gel (Euromedex, Mundolsheim, France).

Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

SA strains at mid-exponential growth in 25 ml of TY (1.6% [w/v] BioTrypcase, 1% [w/v] yeast extract, 0.5% [w/v] NaCl), were embedded in agarose plugs as described previously [25]. After lysis of plugs by proteinase K (Sigma) for 18 h at 56°C, plugs were washed and stored at 4°C in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0). Plugs (agarose plugs, 2.5 by 5.0 by 1 mm) were equilibrated in 300 µL of restriction enzyme buffer for 30 min at 4°C. DNA macro-restriction was then accomplished in 60 µL with 10 U of *Sma* I (New England Biolabs, Beverly, Mass.) for 4 h at room temperature. Electrophoresis was performed at 12°C with a Beckman GenelineTM Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE) system at 150 mA in 0.5× TAFE system buffer (TAFE buffer is 0.2 M Tris, 10 mM free acid EDTA, and 87 mM CH₃COOH [pH 8.2]) in a 1% (w/v) agarose gel. Electrophoresis of *Sma*I-fragmented DNA was carried out with 2-s pulses for 1 h, followed by 14-s pulses for 1 h, 12-s pulses for 1.5 h, 10-s pulses for 2.5 h, 8-s pulses for 6 h, and 6-s pulses for 6 h. Bacteriophage lambda PFG Marker (New England Biolabs) was used as a molecular marker. The gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV trans-illumination. Pulsotypes were compared and classified in a dendrogram using the Dice coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering provided by Molecular AnalystTM (version 1.5) and FingerprintingTM (version 1.12) softwares (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). Isolates that differed by no more than three fragments were considered to be subtypes of a given clonal type.

Table 1. Primers used for PCR detection of genes encoding virulence factors.

Oligonucleotides sequences	size pb/ PCR set	accession n°
<i>edinA</i> 1: 5'-TCATAGAAGTATCTAATACTTCTTAGCA-3'	604/2	M63917
<i>edinA</i> 2: 5'-TCCAACACGGTATTCTGTGCCTCTAGGTA-3'		
<i>edinb</i> 1: 5'-ACAGACTTAGTTGAAGCTACT-AAATG-3'	522/5	AB057421
<i>edinb</i> 2: 5'-TGCCCTGTAGCCAAAGAAC-TTCTTG-3'		
<i>edinC</i> 1: 5'-AGGTCTCCAGCTAATGCAGC-TCCTT-3'	543/6	NC 003265
<i>edinC</i> 2: 5'-ACAGTTCAAAAGACAAAGAA-GCTATT-3'		
<i>etd</i> 1: 5'-AATACATATGAAGAATCTGAAATTTA3'	800/4	AB057421
<i>etd</i> 2: 5'-AAGTTATCCATAATGATTAGAATGA-3'		
<i>lukE-lukD</i> 1: 5'-AATACTAATATTGAAAATATTGGTGATGG-3'	1882/8	Y13225
<i>lukE-lukD</i> 2: 5'-CTTAAATTTCCGGTTAACTCCTCTATTTC-3'		
<i>see</i> 1: 5'-CTTACCGCAAAGCTGTGC-3'	159/3	M21319
<i>see</i> 2: 5'-GTCCACTTGTAATGGTAGCGAGAA-3'		
<i>seg</i> 1: 5'-AATTATGTGAATGCTCAACCCGAT-3'	408/3	AF064773
<i>seg</i> 2: 5'-CTTTAGTGAGCCAGTGTCTTCTTTG-3'		
<i>seh</i> 1: 5'-CATCTACCAACATTAGCACC-3'	222/5	U11702
<i>seh</i> 2: 5'-TAGAAATCAAGGTGATAGTGCAA-3'		
<i>sek</i> 1: 5'-TGATACTCTATAGCTAATCAACTACA-3'	300/3	U93688
<i>sek</i> 2: 5'-ACATCAATCTCTTGAGCGGTAACA-3'		
<i>sel</i> 1: 5'-ACCAGAATCACACCGCTTAGAATAC-3'	422/2	AF217235
<i>sel</i> 2: 5'-TGAAATACTACTCCCTTATCAAAG-3'		
<i>set1-1</i> : 5'-GAAGGTCTACAAGCCAAAATGTCT-3'	363/6	BX571856
<i>set1-2</i> : 5'-TCAACACATCGCCATGCGCTCGA-3'		
<i>bbp</i> 1: 5'-CGGCTAGTGATAAAGAAGTAGTG-3'	550/1	BA000018
<i>bbp</i> 2: 5'-CTTGTGGAGCTGTAGCAACTGGTTT-3'		
<i>clfB</i> 1: 5'-ATTAGTGCAAACACAACAGTGCG-3'	305/4	AJ224764
<i>clfB</i> 2: 5'-AGTTCCTTGCGCATTGGAAATCGT-3'		
<i>cna</i> 1: 5'-CGGGAGATATGCTACCAAGATA-3'	278/1	BX571857
<i>cna</i> 2: 5'-ATAGCCTTGGAATTGTTACATCA-3'		
<i>ebp</i> 1: 5'-AGACCAATCAGAATTAGAATCA-3'	378/4	U48826
<i>ebp2</i> : 5'-TCAGAACTGTTGAATGCTCAGTGT-3'		
<i>fib</i> 1: 5'-AGCGGCAATAGGTATTACTACAAC-3'	220/2	X72013
<i>fib</i> 2: 5'-CGAATGTACCATCGTTAAATTCAT-3'		
<i>fnbA</i> 1: 5'-TTAACTGGGATAATGGTTTAGTTT-3'	273/7	AJ629521
<i>fnbA</i> 2: 5'-GCTGATGAATCCGTTTCTTATTG-3'		
<i>fnbB</i> 1: 5'-TGGAAGAACTAAAGCGACAGGTAC-3'	317/1	AJ629502
<i>fnbB</i> 2: 5'-TTCTTTAAACGTATATCAACTTTTC-3'		
<i>lbp</i> 1: 5'-TGGTGATATGACTACAGTAAGT-3'	410/5	AF065394
<i>lbp</i> 2: 5'-CGTTTGTAGCAACAGCAATATCAGC-3'		

Other virulence factors have been detected by multiplex PCR onto purified total DNA (Qiagen). Presence of genes encoding enterotoxins E, G, H, K, L, T, epidermolysin D (Etd), genes encoding Edin A and EDIN B and the genes encoding seven adhesion factors (Cna, FnBA, FnBB Bbp, ClfB, Fib, Ebp and Lbp) was checked in 8 set in function of base size.
doi:10.1371/journal.pone.0025716.t001

Statistical analysis

For comparison tests of positive isolates of each patient group, we used the Student T test, and the Fischer's test for lower number series (SPSS Ltd software, version 10.1). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Susceptibility to antibiotics

In this study, no isolate was resistant to oxacillin or gentamicin. However, production of β -lactamase was observed for all isolates of the three groups with the exception of one isolate of the control group. In addition, the isolates were generally sensitive to all tested antimicrobials with the exception of few SA that were resistant to fusidic acid, *i.e.* 9 of the 10 fusidic acid resistant isolates were from the control group, or to erythromycin, *i.e.* 9 of the 11 erythromycin resistant isolates were also issued from the control group.

Comparative analysis of toxins production

The presence of the staphylococcal toxins in the different groups is detailed in the Table 2. A great majority (96%) of the SA strains isolated from furuncles regardless of status of the HIV patient produced PVL, while only 10% of the isolates originated from secondary infected dermatosis produced this toxin (Table 2). This difference between furuncles and non-furuncles populations was significant ($p < 10^{-7}$). All the strains isolated from furuncles of HIV (-) patients produced PVL, while it is produced by 89% of the isolates obtained from furuncles of HIV (+) patients. Only PVL-producing isolates were also detected for the presence of corresponding genes, conversely to the Luke/LukD leucotoxin. In fact, the *lukE/lukD* locus was detected in most SA isolates (92%), but the effective production of the corresponding Luke/LukD leucotoxin was observed only for 64% of isolates obtained from furuncles and for 76% of those from secondary infected dermatosis (Table 2). Therefore, no noticeable difference between groups could be drawn in this study. This result illustrates heterogeneity between SA isolates from our sample collection in regards to the occurrence of Luke/LukD production [24,26,27]. Epidermolysin A (ETA) is produced by 16% of isolates from secondary infected dermatosis. The presence of enterotoxins A and G yielded 23% and 16% in the group of secondary infections respectively, while only 4% and 16% in the cumulated groups of furuncles, respectively. Finally, no more than 40% (12/30) of the secondary dermatitis- and no more than 36% (9/25) of the furuncle-originated isolates produced one at least of the most encountered superantigens.

Comparative analysis of the presence of adhesion factors

The distribution of 8 genes encoding adhesion factors were examined (Table 3). Gene encoding *FnBA* was carried out in all tested isolates. In the groups of the strains isolated from furuncles and the secondary infected dermatitis, no isolate carries genes encoding *Fib*, *Cna*, *FnBb*, *Bbp*. The presence of *ClfB* seemed to be linked to the presence of *Lbp*, since all the strains carrying *clfB* also carried *lbp*. *Ebp* is produced by 48% of the isolates from furuncles, while it is produced by 30% in the case of non-infected dermatitis. Concerning the two HIV (+) and HIV (-) patient groups, the genes encoding the adhesion factors *ClfB*, *Lbp*, and *EBP* are present respectively at 6/16, 6/16 and 7/16 for HIV (-) group and 4/9, 4/9 and 5/9 for HIV (+) group.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Pulsed field gel electrophoresis defined 24 *SmaI*-pulsotypes differing by more than two DNA fragments for the 55 different isolates, which

Table 2. Production of toxins and identification of genes encoding toxins in *Staphylococcus aureus*.

Toxins and genes encoding toxins	Infected dermatosis (n = 30)	Furuncles (n = 25)		
		All	HIV (-) (n = 16)	HIV (+) (n = 9)
SEA	7 (23.3%)	1 (4.0%)	1 (6.3%)	0
SEB	3 (10.0%)	5 (20.0%)	2 (12.5%)	3 (33.3%)
SEC	4 (13.3%)	4 (16.0%)	1 (6.3%)	3 (33.3%)
SED	2 (6.7%)	1 (4.0%)	1 (6.3%)	0
TSST1	1 (3.3%)	0	0	0
ETA	5 (16.7%)	0	0	0
ETB	0	1 (4.0%)	1 (6.3%)	0
PVL	3 (10.0%)	24 (96.0%)	16 (100.0%)	8 (88.9%)
LukE/LukD	23 (76.7%)	16 (64.0%)	9 (56.3%)	7 (77.8%)
<i>lukE-lukD</i>	29 (96%)	22 (88%)	13 (81.5%)	9 (100%)
<i>etd</i>	0	0	0	0
<i>see</i>	0	0	0	0
<i>seg</i>	5 (16.7%)	7 (28.0%)	2 (12.5%)	5 (55.6%)
<i>seh</i>	0	0	0	0
<i>sek</i>	0	0	0	0
<i>sel</i>	0	0	0	0
<i>set</i>	0	0	0	0
<i>edinB</i>	0	0	0	0
<i>edinC</i>	0	0	0	0
<i>edinA</i>	0	0	0	0

The majority of SA strains isolated from HIV patient-derived furuncles significantly produced PVL ($p < 0.05$), whereas only 10% of SA strains produced this toxin in secondary infected dermatosis. A high prevalence of LukE-LukD-producing isolates (56 to 78%) was recorded in patient groups. doi:10.1371/journal.pone.0025716.t002

therefore, exclude clonal relationships between isolates (Figure 1). Among the different pulsotypes, which account for a diverse collection of SA genotypes in French Guiana, some were identified in both furuncles and secondary pyodermites isolates. Therefore, PVL-producing isolates cannot be referred to as a specific category of pulsotype. According to the isolates, 9 to 14 defined DNA fragments of lengths comprised between 20 kb and 600 kb after *SmaI* restriction. Six of these pulsotypes were displayed by isolates belonging to different groups including secondary dermatitis. The most represent-

ed pulsotypes n° 1, 8, 13 are composed of 7, 6, and 6 isolates respectively. The diversity of the pulsotypes accounts for an endemic polymorphic SA isolates in French Guiana and reinforces the PVL as a main causative agent of furuncles.

Discussion

This study reinforces PVL as probably the major staphylococcal virulence factor in furuncles as it is produced by almost all SA

Table 3. Presence of genes encoding adhesion factors of *Staphylococcus aureus*.

Gene encoding adhesion factors	Infected dermatosis (n = 30)	Furuncles (n = 25)		
		All	HIV (-) (n = 16)	HIV (+) (n = 9)
<i>bbp</i>	0	0	0	0
<i>cna</i>	0	0	0	0
<i>clfb</i>	16 (53.3%)	10 (40%)	6 (37.5%)	4 (44.4%)
<i>ebp</i>	9 (30%)	12 (48%)	7 (43.8%)	5 (55.6%)
<i>fib</i>	0	0	0	0
<i>fmbA</i>	30 (100%)	25 (100%)	16 (100%)	9 (100%)
<i>fmbB</i>	0	0	0	0
<i>lbp</i>	16 (53.3%)	10 (40%)	6 (37.5%)	4 (44.4%)

Genes encoding clumping factor B, collagen- and laminin-binding proteins (*clfb*, *cna*, *lbp*, respectively) were markedly frequent (30 to 55%), without being associated with a specific group.

doi:10.1371/journal.pone.0025716.t003

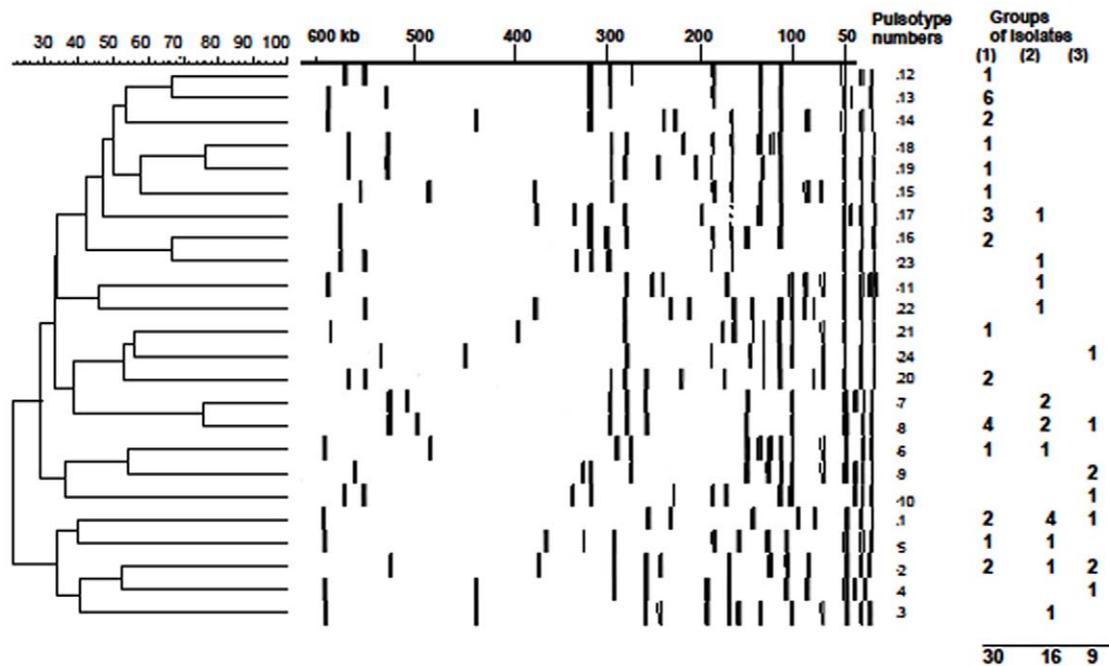


Figure 1. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) dependent dendrogram of isolated *Staphylococcus aureus*. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) proves no specific clonal relationship between PVL-producing isolates issued from furuncles or secondary dermatosis. The similarity of the different pulsotypes was established by using Molecular Analyst™ software. Twenty four pulsotypes corresponded to the 55 isolates and their distribution is given according to the groups of isolates issued from secondary infected dermatosis (1), furuncles from HIV (-)(2) or HIV (+)(3) patients.

doi:10.1371/journal.pone.0025716.g001

isolates, i.e. 96% from furuncles and (10%) ($p < 10^{-7}$) from control group constituted of *SA* isolates from non furunculous skin infections. These results are comparable with those previously obtained in Europe [28,29,30]. In Strasbourg (France), 85.7% of *SA* strains isolated from a series of 35 furuncles produced this toxin, while it was produced by less than 2% of strains issued from healthy patients or patients with other staphylococci affections [8,14]. In former studies, PVL production from routine isolates represented 3 to 12% of isolates according to collections [14,31]. Other authors established the association with furuncles at 93% within a series of 30 furuncles [11]. Together with other research group, we have previously noticed that isolates obtained simultaneously from different furuncles, or from different episodes or in a same family were comparable. However, they are less comparable if they are isolated from individuals, except when they were obtained from outbreaks [6,32,33]. All together, the absence of clonal relationships between these American isolates confirms the significance of the association of PVL with furuncles.

A furuncle is characterized by necrosis of body hair follicles and adjacent tissues. In rabbit skin, PVL induces necrosis after intradermal injection [14,15]. The *SA* PVL-producing strains were also associated to severe primitive staphylococci pneumonia with high mortality rate, and with multiple consecutive lung abscesses to metastatic diffusion from furuncles [10]. However, it could not be excluded from any of these studies that another virulence factor may be also associated with PVL. We almost excluded the role of superantigens and other major toxins, while no specific adhesion factor can be suspected. In fact, despite the presence of such a factor, adhesion of *SA* provides a benefit to the bacterial colonisation, but a specific adhesion remains questionable.

Our study did not found a significant difference ($p = 0.36$) between the PVL produced by *SA* strains responsible for the

furuncles regardless of the status of HIV patient considered: HIV (+) (89%), HIV (-) (100%). Among HIV (+) patients, the chronic nasal carriage of *S. aureus* is more frequent [34]. The frequency of *SA* infections increased with the decreasing of immunity. Severe *SA* infections are generally described among the patients with CD4+ lymphocytes less than 100 cells/mm³ [22,35]. In the case of a chronic nasal carriage, the risk for *SA* infection rose to 20% per year among patients with CD4+ <100 cell/mm³ [35]. The frequency of *SA* skin infections increased with the immunodeficiency. At an advanced stage of the disease, 20% of the patients may be concerned by a *SA* skin infection [22]. The furuncles or carbuncles are within the first reported *SA* skin infections among the HIV (+) patients [35,36]. Like in HIV (-) patients, in HIV (+) patients the principal bacterial factor associated with furuncle is PVL-producing *SA* infecting a follicle body hair. This data argued for the association of PVL-production with some necrotic lesions like furuncles and carbuncles.

For HIV (+) patients and others, furuncle is a sign of the presence of a virulent *SA*-strain, which produces PVL. In the context of advanced immunodeficiency, this infection must be particularly cured as well as the bacterial carriage, because of the risk of consecutive septicaemia due to this kind of strain. Recently, the emergence of Methicillin Resistant *SA* (*MRSA*) isolates producing Pantone-Valentine Leucocidin (PVL) have been observed [37,38,39], thus highlighting additional seriousness of potential complication.

In our study, the *SA* strains isolates involved in furuncles did not harbour any specific resistance to antibiotics. The high frequency of LukE/LukD-producing isolates observed in the groups of strains (55 to 85%), may be due to an endemic situation, which should be further confirmed. A markedly high frequency of some adhesion factors *Clf*, *Lbp* and *Ebp* does not seem to be associated to any particular group of isolates.

In conclusion, and like in Europe, we demonstrate here a strong association between SA-producing PVL isolates in South America and necrotic skin lesions such as furuncles. This association is similar in HIV (+) and in HIV (–) patients. It remains unclear whether such skin lesions might be considered as risk markers in exposed patient's populations. Absence of clonal relationships between SA strains isolated from furuncles is an important argument for a causal relationship between capacity of PVL production by the SA and the development of furuncles.

References

- Prévost G (2005) Toxins in *Staphylococcus aureus* pathogenesis. In: Proft T, ed. Microbial toxins: molecular and cellular biology. Norfolk: Horizon Bioscience Press. pp 243–83.
- Baba-Moussa L, Anani L, Scheffel JM, Couturier M, Riegel P, et al. (2008) Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. J Hosp Infect 68: 32–38.
- Foster JT, Höök M (1998) Surface protein adhesions of *S. aureus*. Trends Microbiol 6: 484–488.
- Baba-Moussa L, Ahissou H, Azokpota P, Assogba B, Atindéhou M, et al. (2010) Toxins and adhesion factors associated with *Staphylococcus aureus* strains isolated from diarrheal patients in Benin. Afr J Biotechnol 9: 604–611.
- Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, Akiyama H, Arata J, et al. (2005) The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. Clin Infect Dis 40: 381–395.
- Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, Bruden D, Reasonover A, et al. (2004) Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. J Infect Dis 189: 1565–1573.
- Seiberling KA, Conley DB, Tripathi A, Grammer LC, Shuh L, et al. (2005) Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal exotoxins in nasal polyps. Laryngoscope 115: 1580–1585.
- Couppié P, Cribier B, Prévost G (1994) Leucocidin from *Staphylococcus aureus* and skin infections: an epidemiological study. Arch Dermatol 130: 1208–1209.
- Carré N, Herbreteau N, Askeur N, Dabas JP, Sillam F, et al. (2011) Outbreak of skin infections due to *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes in pupils and their relatives. Med Mal Infect 10: 1016–1017.
- Defres S, Marwick C, Nathwani D (2009) MRSA as a cause of lung infection including airway infection, community-acquired pneumonia and hospital-acquired pneumonia. Eur Respir J 34: 1470–1476.
- Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, et al. (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 29: 1128–1132.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fourmet JC, Lina G, et al. (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet 359: 753–759.
- Panton PN, Valentine FCO (1932) Staphylococcal toxin. Lancet 222: 506–508.
- Prévost G, Couppié P, Prévost P, Gayet S, Petiau P, et al. (1995) Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohemolytic toxins. J Med Microbiol 42: 237–245.
- Ward PD, Turner WH (1980) Identification of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin. Infect Immun 28: 393–397.
- Prévost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, et al. (1995) Panton-Valentine leukocidin and gamma-haemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. Infect Immun 63: 4121–4129.
- Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, et al. (1998) Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component leucotoxins family. FEBS Lett 436: 202–208.
- Bronner S, Stoessel P, Gravet A, Monteil H, Prévost G (2000) Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bi-component leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol 66: 3931–3938.
- Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA (2001) Flow cytometric determination of Panton-Valentine leukocidin S component binding. Infect Immun 69: 2390–2395.
- Pédelaq JD, Maveyraud L, Prévost G, Baba-Moussa L, Gonzalez A, et al. (1999) The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. Structure 7: 277–287.
- Guillet V, Roblin P, Werner S, Coraiola M, Menestrina G, et al. (2004) Crystal Structure of Leucotoxin S Component: New Insight into the Staphylococcal Beta-Barrel Pore-Forming Toxins. J Biol Chem 279: 41028–41037.
- Smith KJ, Wagner KF, Yeager J, Skelton HG, Ledsky R (1994) *Staphylococcus aureus* carriage and HIV-1 disease: association with increased mucosin infections as well as deep soft-tissue infections and sepsis. Arch Dermatol 130: 521–522.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2010) Performance standards for antimicrobials susceptibility testing. NCCLS, Wayne, Pa. Supplement; M100-S12.
- Gravet A, Rondeau M, Harf-Monteil C, Grunenberger F, Monteil H, et al. (1999) Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bi-component toxin LukE-LukD. J Clin Microbiol 37: 4012–4019.
- Prévost G, Pottecher B, Dahlet M, Bientz M, Mantz JM (1991) Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. J Hosp Infect 17: 255–269.
- Gravet A, Couppié P, Meunier O, Clyti E, Moreau B, et al. (2001) *Staphylococcus aureus* isolated from impetigo produces both epidermolysins A or B and LukE+LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. J Clin Microbiol 39: 4349–4356.
- von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K (2004) Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 49: 157–162.
- Naas T, Fortineau N, Spicq C, Robert J, Jarlier V, et al. (2005) Three-year survey of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a French university hospital. J Hosp Infect 61: 321–329.
- Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, et al. (2005) *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. J Clin Microbiol 43: 2384–2390.
- Del Giudice P, Bes M, Hubiche T, Blanc V, Roudière L, et al. (2011) Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains are associated with follicular skin infections. Dermatology 222: 167–170.
- Baba-Moussa L, Sanni A, Dagnra AY, Anagonou S, Prince-David M, et al. (1999) Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. Med Mal Infect 29: 689–696.
- Diep BA, Sensabaugh GF, Somboona NS, Carleton HA, Perdreau-Remington F (2004) Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. J Clin Microbiol 42: 2080–2084.
- Linde H, Wagenlehner F, Strommenger B, Drubel I, Tanzer J, et al. (2005) Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24: 419–422.
- Ravigione MC, Mariuz P, Pablos-Mendez A, Battan R, Ottuso P, et al. (1990) High *Staphylococcus aureus* nasal carriage rate in patients with acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. Am J Infect Control 18: 64–69.
- Nguyen MH, Kauffman CA, Goodman RP, Squier C, Arbeit RD, et al. (1999) Nasal carriage of and infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients. Ann Intern Med 130: 221–225.
- Pitche P, Tchanganai-Walla K, Napo-Koura G, Mijiyawa M, Agbere A, et al. (1995) Prevalence of skin manifestations in AIDS patients in the Lomé-Tokoin University Hospital (Togo). Santé 5: 349–352.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright M, Lina G, Nimmo GR, et al. (2003) Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 9: 978–984.
- Liassine N, Auckenthaler R, Descombes MC, Bes M, Vandenesch F, et al. (2004) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes. J Clin Microbiol 42: 825–828.
- Mithoe D, Rijnders MI, Roede BM, Stobberingh E, Möller AV (2011) Prevalence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine leucocidin-positive *S. aureus* in general practice patients with skin and soft tissue infections in the northern and southern regions of The Netherlands. Eur J Clin Microbiol Infect Dis;doi:10.1007/s10096-011-1316-90.

3.4.3. Conclusion et perspectives

Dans cette partie de notre étude, nous avons caractérisé des souches de *Staphylococcus aureus* en recherchant la production de 27 facteurs de virulence potentiels y compris les toxines et adhésines ainsi que la résistance aux antibiotiques. Nous avons tenté d'établir la corrélation entre le type de maladie cutanée et la production de PVL en rapport avec le statut VIH. Le typage par PFGE a été utilisé pour discriminer les souches. Les résultats ont montré une très haute corrélation entre la furonculose et la production de PVL. Nos données révèlent que la majorité (96%) des souches de *S. aureus* isolées de furoncles des patients à VIH produisent de manière significative la PVL ($p < 10^{-7}$), alors que seulement 10% des souches de *S. aureus* isolées des dermatites secondaires produisent cette toxine. Chez le patient VIH+, les folliculites et les furoncles sont fréquemment rapportés. Notre étude ne met pas en évidence de différence significative quand à la production de LPV par les souches de *Staphylococcus aureus* responsables des furoncles que le patient soit infecté par le VIH (88,9%) ou pas (100%) ($p=0,36$). Cette plus grande fréquence du furoncle chez le patient VIH+ n'est donc pas liée à une plus grande susceptibilité à des souches de moindre virulence mais peut-être due à une baisse de l'immunité humorale vis à vis de la LPV. L'électrophorèse en champ pulsé montre 24 pulsotypes globaux, alors que les 25 isolats producteurs de PVL ont été répartis en 15 pulsotypes non spécifiques. Il s'avère donc qu'il n'y a pas de lien de clonalité entre les souches de *S. aureus* isolées des furoncles. Ceci constitue un argument important pour l'établissement d'un lien de causalité entre la capacité à produire la LPV et le développement des furoncles. De plus une prévalence élevée de LukE-Luk D producteurs (56 à 78%) a été enregistrée chez l'ensemble des souches indifféremment du statut des patients. Les gènes codant pour les *clfB*, *cna*, *lbp*, respectivement sont nettement fréquents (30 à 55%), sans être associés à un groupe spécifique. Nous pouvons donc conclure que la PVL est le facteur de virulence majeur associé aux furoncles.

Pour les patients à VIH (+) et d'autres patients, le furoncle est un signe de la présence d'une souche virulente de *S. aureus* productrice de PVL. Dans le cadre d'immunodéficience avancé, cette infection doit être particulièrement traitée ainsi que le portage des bactéries, en raison du risque de septicémie consécutive à ce genre de souche.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La raison probable de la grande pathogénicité pour l'homme de *Staphylococcus aureus* réside dans l'extraordinaire variété de facteurs de virulence qui peuvent être produits et sécrétés sous différents panels d'une souche à l'autre. Ces souches sont souvent résistantes à plusieurs antimicrobiens classiques. *Staphylococcus aureus* montre une évolution très dynamique en ce qui concerne ces facteurs de virulence variables et une adaptation très sélective à des conditions défavorables. Outre les multiples facteurs d'adhésion qui initient la colonisation de la bactérie, les toxines de *Staphylococcus aureus* appartiennent à plusieurs familles fonctionnelles. Peu d'entre elles sont directement associées à des syndromes cliniques tandis qu'il existe d'autres liées à la structure des toxines et peuvent constituer des pièges pour la réponse immunitaire.

Les objectifs de ce travail étaient de réaliser d'une part une étude génotypique et phénotypique intégrée afin d'appréhender la variabilité des facteurs concourant à la virulence de *Staphylococcus aureus* hospitalières et communautaires et d'autre part, une étude de la diversité de la susceptibilité aux antibiotiques n'a pas été occultée.

L'identification des souches de *Staphylococcus aureus* par les méthodes conventionnelles et la mise en évidence de leur résistance aux antibiotiques ont révélé l'importance de la fréquence des souches de *Staphylococcus aureus* multi résistantes à divers antibiotiques spécifiquement aux β -lactamines (méthicilline), aux aminosides, aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine, massivement utilisés en antibiothérapie. L'usage abusif des antibiotiques exerce une pression sur les micro-organismes qui développent alors de la résistance par plusieurs mécanismes dont l'inhibition enzymatique, la réduction de la perméabilité cellulaire, l'altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique et la production de pompes à efflux. La résistance se développe selon différentes étapes. À la suite de l'émergence de microorganismes résistants, nous observons l'élimination graduelle de la flore normale sensible aux médicaments et la colonisation par des micro-organismes résistants. Le contact d'une personne à l'autre favorise leur transmission dans l'environnement et finalement la transmission globale notamment par l'alimentation à lieu. Le traitement antibiotique n'est pas toujours nécessaire. Il doit être, si possible, guidé par la mise en évidence de l'agent pathogène. Il est indiqué dans certaines conditions notamment dans un tableau clinique grave, un syndrome dysentérique. Son but est d'abroger l'évolution des symptômes, de limiter le risque de dissémination et d'éviter les complications en cas de bactériémie.

Les *Staphylococcus aureus* résistante à la Méthicilline (SARM) d'origine communautaire sont, depuis quelques années, des bactéries qui gagnent en importance dans le monde de la recherche en santé publique.

En milieu hospitalier, le traitement des infections causées par le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et à la Vancomycine devient de plus en plus problématique. En réalité, l'émergence des résistances est inévitable, puisque les bactéries continueront d'évoluer en réponse aux antibiotiques présents dans leur environnement. Il est cependant possible d'accroître le rendement des antibiotiques existants et de réduire la menace que constitue la résistance bactérienne. Parmi les stratégies de prévention, l'usage optimal des antibiotiques constitue la pierre angulaire de la réduction de l'antibiorésistance. La lutte contre les infections et les mesures préventives contribueraient également à limiter la propagation de souches bactériennes résistantes. Une collaboration multidisciplinaire et la mise sur pied d'un programme de surveillance efficace de l'usage des antimicrobiens devraient être intégrées dans les objectifs d'amélioration de la qualité des soins dans tous les établissements de santé.

En vue de mesurer le danger que peut constituer les souches de *Staphylococcus aureus*, la recherche de leurs capacités à produire et/ou héberger des gènes codant certains facteurs de virulence a été effectuée. Les résultats ont démontré que les souches de *Staphylococcus aureus* produisent une multitude de facteurs de virulence de façon variées en fonction du type de prélèvement. Ainsi, la Leucocidine de Pantou et Valentine a été confirmée comme le facteur de virulence majeur spécifiquement produit par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées de furoncles alors que les toxines exfoliatives sont en totalité produites par les souches isolées d'Ulcère de Buruli. La production des toxines est observée aussi bien chez les souches hospitalières que chez les souches communautaires.

Faute de moyen financier, les analyses se limitent souvent à une identification morphologique des germes et un simple antibiogramme, ce qui ne permet pas toujours la meilleure prise en charge thérapeutique possible. Il faut donc pousser les méthodes de diagnostic un peu plus loin afin de permettre d'identifier avec plus de précisions le profil du germe.

Notre étude apporte des connaissances nouvelles sur les profils toxinogéniques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de divers types de prélèvements au Bénin. Grâce à l'utilisation d'antigènes et d'anticorps spécifiques purifiés nous avons pu rechercher des toxines de *Staphylococcus aureus* par la méthode d'immunoprécipitation radiale encore

appelée méthode d'Ouchterlony. La méthode de PCR a permis la recherche de toxines non identifiables par les méthodes sérologiques. La présence d'une bactérie dans un prélèvements cliniques ou dans un aliments ne suffit pas pour dire qu'elle est responsable de la maladies. Il faut prouver, au-delà de la numération bactérienne qu'elle possède l'équipement toxigénique. Ainsi les méthodes de numération bactérienne doivent être couplées à la recherche de facteurs de virulence. Ceci est très important surtout dans nos pays africains où les méthodes de diagnostics phénotypiques ne sont pas souvent très fiables à cause de la qualité et de la conservation des consommables. Notamment, en ce qui concerne l'antibiogramme, les disques d'antibiotiques sont très souvent sous-dosés ce qui donne des fausses résistances. La recherche des facteurs de virulence permet de contourner cette limite.

Perspectives

Dans ce travail, tous les types d'infections liées à la bactérie *Staphylococcus aureus* n'ont pas pu être étudiés. Il serait important de poursuivre cette étude en élargissant la gamme de prélèvement. Nous avons pu rechercher la production ou la présence de gènes codant pour plus de 27 facteurs de virulence de la bactérie *S. aureus* notamment les toxines et les facteurs d'adhésion. Il serait important de rechercher des gènes codant pour les résistances aux antibiotiques classiques à savoir la série de cassettes chromosomiques SCCmec et Van A. Face à ces résistances il urge également d'explorer la recherche de nouvelles sources de molécules antimicrobiennes. Une des pistes possible serait la médecine traditionnelle à travers ses plantes médicinales du fait que les populations y font souvent recours avec plus ou moins de satisfaction. L'absence de norme dans l'achat d'antibiotiques, parfois de mauvaise qualité peut être à l'origine de la sélection dans la population de souches résistantes. Il y a donc une urgence à approfondir l'observation épidémiologique de ces infections afin de pouvoir mettre en œuvre une politique cohérente de prévention en dominant la pression de sélection d'antibiotiques inadaptés par des mesures économiques et sanitaires

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed AO, van Belkum A, Fahal AH, Elnor AE, Abougroun ES, VandenBergh MF, Zijlstra EE & Verbrugh HA. (1998): Nasal carriage of *staphylococcus aureus* and epidemiology of surgical-site infections in a Sudanese university hospital. *J Clin Microbiol* 36: 3614-3618.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J & Handelsman J. (2010): Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8: 251-259.
- Al-Talib H, Yean CY, Al-Khateeb A, Hassan H, Singh KK, Al-Jashamy K & Ravichandran M. (2009): A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin. *BMC Microbiol* 9: 113-120.
- Altboum Z, Hertman I & Sarid S. (1985): Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 47: 514-521.
- Aman MJ, Karauzum H, Bowden MG & Nguyen TL. (2010): Structural model of the prepore ring-like structure of Panton-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *J Biomol Struct Dyn* 28: 1-12.
- Anagonou SY, Eslahpazire J, Makoutode M, Josse R, Massougbodji A & Sadeler BC. (1994): antibiotic sensitivity of gram negative bacilli isolated from urinary tract infections at NUHC of Cotonou (Benin) from March to December 1992. *Bull Soc Pathol Exot* 87: 223-225.
- Arbuthnott JP, Coleman DC & de Azavedo JS. (1990): Staphylococcal toxins in human disease. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 19: 101S-107S.
- Archer GL & Bosilevac JM. (2001): Signaling antibiotic resistance in staphylococci. *Science* 291: 1915-1916.
- Atanassova V, Meindl A & Ring C. (2001): Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int J Food Microbiol* 68: 105-113.
- Aubert C, Capelle N, Jeanson S, Eckert H, Diviès C & Cachon R. (2002): Le potentiel d'oxydoréduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Sci Aliments* 22: 177-187.

- Azanza MP, Gatchalian CF & Ortega MP. (2000): Food safety knowledge and practices of street food vendors in a Philippines university campus. *Int J Food Sci Nutr* 51: 235-246.
- Baartmans MG, Maas MH & Dokter J. (2006). Neonate with staphylococcal scalded skin syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 91, F25.
- Baba-Moussa L, Werner S, Colin DA, Mourey L, Pedelacq JD, Samama JP, Sanni A, Monteil H & Prevost G. (1999): Discoupling the Ca⁽²⁺⁾-activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Lett* 461: 280-286.
- Baba-Moussa L, Werner S, Coraiola M, Colin DA, Keller D, Sanni A, Serra MD, Monteil H & Prevost G. (2006): Site-directed mutagenesis to assess the binding capacity of class s protein of *Staphylococcus aureus* leucotoxins to the surface of polymorphonuclear cells. *J Biomed Biotechnol* 2006: 1-8.
- Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, Couturier M, Riegel P, Haikou N, Hounsou F, Monteil H, Sanni A & Prevost G. (2008): Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. *J Hosp Infect* 68: 32-38.
- Balaban N & Rasooly A. (2000): Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61: 1-10.
- Barg NL & Harris T. (1997): Toxin-mediated syndromes. In Crossley KB & Archer GL. (Editors): The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, p. 527-544.
- Barro N, Aly S, Tidiane OC & Sababenedjo TA. (2006): Carriage of bacteria by proboscises, legs, and feces of two species of flies in street food vending sites in ouagadougou, burkina faso. *J Food Prot* 69: 2007-2010.
- Bayles KW & Iandolo JJ. (1989): Genetic and molecular analysis of gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol* 171: 4799-4806.
- Benkerroum N, Oubel H & Mimoun LB. (2002): Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *J Food Prot* 65: 799-805.
- Bennett RW. (2005). Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *J Food Prot* 68 (6): 1264-1270.

- Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN & Davis JP. (1981): A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* 1: 1017-1021.
- Bergdoll MS. (1988): Monkey feeding test for staphylococcal enterotoxin. *Methods Enzymol* 165: 324-333.
- Berger-Bachi B. (1994): Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol* 2: 389-393.
- Bergmans D, Bonten M, Gaillard C, de Leeuw P, van Tiel F, Stobberingh E & van der Geest S. (1996): Clinical spectrum of ventilator-associated pneumonia caused by methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 437-445.
- Bespalov VA, Zhulin IB & Taylor BL. (1996): Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10084-10089.
- Betley MJ & Mekalanos JJ. (1985): Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* 229: 185-187.
- Betley MJ, Borst DW & Regassa LB. (1992): Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem Immunol* 55: 1-35.
- Beveridge TJ. (1999): Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 181: 4725-4733.
- Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Weller U, Kehoe M, Palmer M. (1996): Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of poreforming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 165:73-79.
- Bismuth R & Leclercq R. (2000): *Staphylococcus aureus* et antibiotiques. In Freyney JRF, Hansen W & Bollet C. (Editors): Précis de bactériologie clinique. ESKA, Paris, pp. 611-918.
- Blanc DS, Struelens MJ, Deplano A, De Ryck R, Hauser PM, Petignat C & Francioli P. (2001): Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 39: 3442-3445.
- Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA & Colardyn FA. (2002): Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med* 162: 2229-2235.

- Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, de Groot R, Rumke HC, Verbrugh HA & Hermans PW. (2004): Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 363: 1871-1872.
- Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD & Schlievert PM. (1990): Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev Microbiol* 17: 251-272.
- Bolin Z, Libudzisz Z & Moneta J. (1998): Viability loss of some food-borne pathogens in milk fermented with *Lactobacillus acidophilus*. *Pol J Food Nutr Sci.* 748: 713-722.
- Borst DW & Betley MJ. (1994): Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. *Infect Immun* 62: 113-118.
- Boyle-Vavra S & Daum RS. (2007): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* 87: 3-9.
- Brett MM. (1998): Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. *J Appl Microbiol* 84: S110-S118.
- Bronner S, Stoessel P, Gravet A, Monteil H & Prevost G. (2000): Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 66: 3931-3938.
- Bronner S, Monteil H & Prevost G. (2004): Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 28: 183-200.
- Brun Y & Bes M. (2000): *Staphylococcus*. In Freyne JRF, Hansen W & Bollet C. (Editors): Précis de bactériologie clinique. ESKA, Paris, pp. 783-830.
- Bryan FL. (1988): Risk associated with practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *J Food Prot* 51: 663-673.
- Bryan FL, Michanie SC, Alvarez P & Paniagua A. (1988): Critical control points of street-vended foods in dominican republic. *J Food Prot* 51: 373-383.
- Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, Comeaux K, Craig AS, Fridkin SK & Tenover FC. (2004): Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J* 23: 619-624.
- Burton MJ. (2008): Commentary: Tonsillectomy-then and now. *Int J Epidemiol* 37: 23-25.
- Campbell W, Hendrix E, Schwalbe R, Fattom A & Edelman R. (1999): Head-injured patients who are nasal carriers of *Staphylococcus aureus* are at high risk for *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Crit Care Med* 27: 798-801.

- Canet C & N'Diaye C. (1996): L'alimentation de rue en Afrique. *FNA/ANA* 17/18: 4-13.
- Carles-Nurit MJ, Christophe B, Broche S, Gouby A, Bouziges N & Ramuz M. (1992): DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 30: 2092-2096.
- Chaix C, Durand-Zaleski I, Alberti C & Brun-Buisson C. (1999): Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cost-benefit analysis in an intensive care unit. *JAMA* 282: 1745-1751.
- Chambers HF. (1997): Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10: 781-791.
- Chambers HF. (2001): The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 7: 178-182.
- Chambers HF. (2005): Community-associated MRSA: resistance and virulence converge. *N Engl J Med* 352: 1485-1487.
- Chambers HF & DeLeo FR. (2009): Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7: 629-641.
- Chang HC & Bergdoll MS. (1979): Purification and Some Physicochemical Properties of Staphylococcal Enterotoxin D. *Biochemistry* 18: 1937-1942.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D & Fridkin SK. (2003): Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* 348: 1342-1347.
- Chauliac M, Bricas N, Ategbro E, Amoussa W & Zohoun I. (1998): Food habits outside the home by school children in Cotonou (Benin). *Sante* 8: 101-108.
- Chen LF, Chastain C & Anderson DJ. (2011): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections: management and prevention. *Curr Infect Dis Rep* 13: 442-450.
- Cheung AL, Koomey JM, Butler CA, Projan SJ & Fischetti VA. (1992): Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6462-6466.

- Choorit W, Kaneko J, Muramoto K & Kamio Y. (1995): Existence of a new protein component with the same function as the LukF component of leukocidin or gamma-hemolysin and its gene in *Staphylococcus aureus* P83. *FEBS Lett* 357: 260-264.
- Chu G, Vollrath D & Davis RW. (1986): Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582-1585.
- Coelho SMO, Reinoso E, Pereira IA, Soares LC, Demo M, Bogni C & Souza, MMS. (2009): Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29: 369-374.
- Colin DA, Mazurier I, Sire S & Finck-Barbançon V. (1994): Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun* 62: 3184-3188.
- Combes A, Luyt CE, Fagon JY, Wollf M, Trouillet JL, Gibert C & Chastre J. (2004): Impact of methicillin resistance on outcome of *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 786-792.
- Cooney J, Kienle Z, Foster TJ & O'Toole PW. (1993): The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect Immun* 61: 768-771.
- Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW & Carmeli Y. (2003). Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 36: 53-59.
- Cosgrove SE, Carroll KC & Perl TM. (2004): *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Clin Infect Dis* 39: 539-545.
- Couch JL, Soltis MT & Betley MJ. (1988): Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol* 170: 2954-2960.
- Couppie P, Cribier B & Prevost G. (1994): Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. *Arch Dermatol* 130: 1208-1209.
- Couppie P, Hommel D, Prevost G, Godart MC, Moreau B, Sainte-Marie D, Peneau C, Hulin A, Monteil H & Pradinaud R. (1997) : *Staphylococcus aureus* septicemia producing Panton-Valentine leukocidin. 3 cases. *Ann Dermatol Venereol* 124: 684-686.

- Cribier B, Prevost G, Couppie P, Finck-Barbancon V, Grosshans E & Piemont Y. (1992): *Staphylococcus aureus* leukocidin: A new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology* 185: 175-180.
- Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, Kim MN, Ploy MC, El-Solh N, Ferraz V & Hiramatsu K. (2003): Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41: 5-14.
- Cunha Mde L, Rugolo LM & Lopes CA. (2006): Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 661-668.
- Cupane L, Pugacova N, Berzina D, Cauce V, Gardovska D & Miklasevics E. (2012): Patients with Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3: 48-55.
- Dajcs JJ, Thibodeaux BA, Girgis DO & O'Callaghan RJ. (2002): Corneal virulence of *Staphylococcus aureus* in an experimental model of keratitis. *DNA Cell Biol* 21: 375-382.
- Danen EH, Sonneveld P, Brakebusch C, Fassler R & Sonnenberg A. (2002): The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* 159: 1071-1086.
- Dawson RJ & Canet C. (1991): International activities in street foods. *Food Control* 2135-139.
- DeLeo FR, Diep BA & Otto M. (2009): Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am* 23: 17-34.
- DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN & Chambers HF. (2010): Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375: 1557-1568.
- Deplano A, Schuermans A, Van Eldere J, Witte W, Meugnier H, Etienne J, Grundmann H, Jonas D, Noordhoek GT, Dijkstra J, van Belkum A, van Leeuwen W, Tassios PT, Legakis NJ, van der Zee A, Bergmans A, Blanc DS, Tenover FC, Cookson BC, O'Neil G & Struelens MJ. (2000): Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant staphylococcus aureus strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. *J Clin Microbiol* 38: 3527-3533.

- Deschamps PH, Fauchère JL, Simonet M & Veron M. (1981): Comparaison des performances de milieux commercialisés pour hémocultures : étude faite sur 1580 prélèvements. *Ann Biol clin* 39: 29-32.
- Diekema DJ, Beach ML, Pfaller MA & Jones RN. (2001): Antimicrobial resistance in viridans group streptococci among patients with and without the diagnosis of cancer in the USA, Canada and Latin America. *Clin Microbiol Infect* 7: 152-157.
- Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF & Perdreau-Remington F. (2006): Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 193: 1495-1503.
- Diep BA, Palazzolo-Ballance AM, Tattevin P, Basuino L, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, Kreiswirth BN, Otto M, DeLeo FR & Chambers HF. (2008): Contribution of Panton Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One* 3: e3198.
- Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR & Chambers HF. (2010): Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 5587-5592.
- Dijkshoorn L, Towner KJ & Struelens M. (2001): New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Elsevier Science. Amsterdam, the Netherlands. pp: 353.
- Dinges MM, Orwin PM & Schlievert PM. (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13: 16-34.
- Do Carmo LS, Cummings C, Linardi VR, Dias RS, De Souza JM, De Sena MJ, Dos Santos DA, Shupp JW, Pereira RK & Jett M. (2004): A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog Dis* 1: 241-246.
- Domart Y. (2002): Therapeutic principles of staphylococcal infections--Role and limitations of standard compounds. *Ann Fr Anesth Reanim* 21: 392-398.
- Drawz SM & Bonomo RA. (2010): Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23: 160-201.

- Dubin G, Wladyka B, Stec-Niemczyk J, Chmiel D, Zdzalik M, Dubin A & Potempa J. (2007): The staphostatin family of cysteine protease inhibitors in the genus *Staphylococcus* as an example of parallel evolution of protease and inhibitor specificity. *Biol Chem* 388: 227-235.
- Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy ME, Vandenesch F, Etienne J & Lina G. (2007): Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1515–1519.
- Durupt F, Mayor L, Bes M, Reverdy ME, 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.
- Eady EA & Cove JH. (2003): Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*--an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 16: 103-124.
- Eck A & Gillis J. (1997): Le Fromage. Paris, *Lavoisier*.
- Empinotti JC, Uyeda H, Ruaro RT, Galhardo AP & Bonatto DC. (2012): Pyodermitis. *An Bras Dermatol* 87: 277-284.
- Emori TG & Gaynes RP. (1993): An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 6: 428-442.
- Espersen F & Gabrielsen J. (1981): *Staphylococcus aureus* pneumonia as a complication during treatment of neurosurgical patients with mechanical ventilation. *Scand J Infect Dis* 13: 161-163.
- Fagon JY, Maillet JM & Novara A. (1998): Hospital-acquired pneumonia: methicillin resistance and intensive care unit admission. *Am J Med* 104: 17S-23S.
- FAO. (1988): Street foods: Report of an FAO expert consultation, Yogyakarta, Indonesia. FAO Rome, Food Nutr paper 1988 n°46.
- Farr BM. (2006): What to think if the results of the National Institutes of Health randomized trial of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus control measures are negative (and other advice to young epidemiologists): a review and an au revoir. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27: 1096-1106.

- Ferreras M, Hoper F, Dalla Serra M, Colin DA, Prevost G & Menestrina G. (1998): The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1414: 108-126.
- Fierobe L, Decre D, Muller C, Lucet JC, Marmuse JP, Mantz J & Desmonts JM. (1999): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a causative agent of postoperative intra-abdominal infection: relation to nasal colonization. *Clin Infect Dis* 29: 1231-1238.
- Finck-Barbancon V, Prevost G & Piemont Y. (1991): Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Res Microbiol* 142: 75-85.
- Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR & Musser JM. (2001): Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8821-8826.
- Flock JI. (1999): Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus aureus* infections. *Mol Med Today* 5: 532-537.
- Foster TJ & Höök M. (1998): Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6: 484-488.
- Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ & Hook M. (2000): Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol* 79: 672-679.
- Fox P. (1993a): General Aspects. In Fox P. (Editor): Cheese: chemistry, physics and microbiology *Chapman and Hall*. 1.
- Fox P. (1993b): Major Cheese Groups. In Fox P. (Editor): Cheese: chemistry, physics and microbiology *Chapman and Hall*. 2.
- Fraser JD & Proft T. (2008): The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev* 225: 226-243.
- Frazer BW, Lynn J, Charlebois ED, Lambert L, Lowery D & Perdreau-Remington F. (2005): High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. *Ann Emerg Med* 45: 311-320.
- Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muñoz J, Alvarez MA & Martín MC. (2005). Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus*

- associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol* 43(3): 1278-1284.
- Garcia-Lara J, Masalha M & Foster SJ. (2005): *Staphylococcus aureus*: the search for novel targets. *Drug Discov Today* 10: 643-651.
- Gauduchon V, Werner S, Prevost G, Monteil H & Colin DA. (2001): Flow cytometric determination of Pantone-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun* 69: 2390-2395.
- Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F & Genestier L. (2005): *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 115: 3117-3127.
- Ghuysen JM. (1994): Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol* 2: 372-380.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piemont Y, Brousse N, Floret D & Etienne J. (2002): Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359: 753-759.
- Gillet Y, Dohin B, Dumitrescu O, Lina G, Vandenesch F, Etienne J & Floret D. (2007): Osteoarticular infections with *Staphylococcus aureus* secreting Pantone-Valentine leukocidin. *Arch Pediatr* 14 Suppl 2, S102-107.
- Gilligan K, Shipley M, Stiles B, Hadfield TL & Sofi Ibrahim M. (2000): Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Mol Cell Probes* 14: 71-78.
- Gilmore KS, Gilmore MS & Sahm DF. (2008): Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. In Wax RG, Lewis K, Salyers AA & Taber H. (Editor): Bacterial Resistance to Antimicrobials, Second ed. CRC Press, Boca Raton. p. 291-312.
- Girou C & Brun-Buisson C. (2002): Conséquences de l'acquisition de staphylocoques dorés résistants à la méticilline en réanimation : morbidité, mortalité et coûts. *Reanimation* 11: 193-199.
- Gladstone GP & Van Heyningen WE. (1957): Staphylococcal leucocidins. *Br J Exp Pathol* 38: 123-137.

- Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A & Prince A. (2004): *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 10: 842-848.
- Gomez-Lucia E, Goyache J, Orden JA, Domenech A, Javier Hernandez F, Ruiz-Santa Quiteria JA, Lopez B, Blanco JL & Suarez G. (1992): Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J Dairy Sci* 75: 19-26.
- Gonzalez C, Rubio M, Romero-Vivas J, Gonzalez M & Picazo JJ. (2003): *Staphylococcus aureus* bacteremic pneumonia: differences between community and nosocomial acquisition. *Int J Infect Dis* 7: 102-108.
- Gordon RJ & Lowy FD. (2008): Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 5: S350-359.
- Grattard F. (2000): Electrophorèse en champ pulsé. In Freney J, Renaud F, Hansen W & Bollet C. (Editors): Précis de bactériologie clinique, Paris: Editions ESKA. p. 267-277.
- Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H & Prevost G. (1998): Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett* 436: 202-208.
- 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. *J Clin Microbiol* 39: 4349-4356.
- Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N & Seeger W. (1997): Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 159: 1909-1916.
- Guyonnet F & Plommet M. (1970): Gamma hemolysin of *Staphylococcus aureus*: purification and properties. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 118: 19-33.
- Hanashiro A, Morita M, Matte GR, Matte MH & Torres EA. (2005): Microbiological quality of selected street foods from a restricted area of Sao Paulo city, Brazil. *Food Control* 16: 439-444.

- Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F & Oppenheim BA. (2004): Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br J Anaesth* 92: 121-130.
- Harris TO, Grossman D, Kappler JW, Marrack P, Rich RR & Betley MJ. (1993): Lack of complete correlation between emetic and T-cellstimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect Immunol* 61: 3175-3183.
- Hartman BJ & Tomasz A. (1984): Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158: 513-516.
- Hermier J, Lenoir J & Weber F. (1992): Les groupes microbiens d'intérêt laitier. *CEPIL (Paris)*.
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y & Kobayashi I. (1997): Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350: 1670-1673.
- Hiramatsu K. (2001): Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 1: 147-155.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M & Ito T. (2001): The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9: 486-493. .
- Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD & Kearns AM. (2005): *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: Frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 43: 2384-2390.
- Holmes NE, Johnson PD & Howden BP. (2012): Relationship between vancomycin-resistant *staphylococcus aureus*, vancomycin-intermediate *S. aureus*, high vancomycin MIC, and outcome in serious *S. aureus* infections. *J Clin Microbiol* 50: 2548-2552.
- Hongo I, Baba T, Oishi K, Morimoto Y, Ito T & Hiramatsu K. (2009): Phenol-soluble modulins alpha 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Panton-Valentine leukocidin. *J Infect Dis* 200: 715-723.
- Hovde CJ, Hackett SP & Bohach GA. (1990): Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxine C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol Gen Genet* 220: 329-333.
- Hovde CJ, Marr JC, Hoffmann ML, Hackett SP, Chi YI, Crum KK, Stevens DL, Stauffacher CV & Bohach GA. (1994): Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1. *Mol Microbiol* 13: 897-909.

- Hu DL, Omoe K, Shimoda Y, Nakane A & Shinagawa K. (2003): Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Infect Immun* 71: 567-570.
- Hu DL, Zhu G, Mori F, Omoe K, Okada M, Wakabayashi K, Kaneko S, Shinagawa K & Nakane A. (2007): Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. *Cell Microbiol* 9: 2267-2277.
- Hu DL, Omoe K, Sashinami H, Shinagawa K & Nakane A. (2009): Immunization with a nontoxic mutant of staphylococcal enterotoxin A, SEAD227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. *J Infect Dis* 199: 302-310.
- Hussain A, Robinson G, Malkin J, Duthie M, Kearns A & Perera N. (2007): *Purpura fulminans* in a child secondary to Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 56: 1407-1409.
- Ibelings MM & Bruining HA. (1998): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: acquisition and risk of death in patients in the intensive care unit. *Eur J Surg* 164: 411-418.
- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H & Hiramatsu K. (2004): Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2637-2651.
- Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M & Lina G. (2001): *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 166: 42-60.
- Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J & Vandenesch F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 70 (2): 631-641.
- Jayaraman R. (2009): Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Current Science* 96: 1475-1484.
- Jayasuriya DC. (1994): Street food vending in Asia: some policy and legal aspects. *Food Control* 5: 222-226.

- Jett M, Ionin B, Das R & Neill R. (2001): The staphylococcal enterotoxins. In Sussman M. (Editor): Molecular medical microbiology, San Diego, CA, USA: Academic Press. p. 1089-1116.
- Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J & Tarkowski A. (2004): *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* 72: 1169-76.
- John CC & Schreiber JR. (2006): Therapies and vaccines for emerging bacterial infections: learning from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Clin North Am* 53: 699-713.
- Johns MB Jr & Khan SA. (1988). Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J Bacteriol* 170, 4033-4039.
- Jonas D, Walev I, Berger T, Liebetrau M, Palmer M & Bhakdi S. (1994): Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun* 62: 1304-1312.
- Jones CL & Khan SA. (1986): Nucleotide sequence of enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 166: 29-33.
- Jongerius I, Köhl J, Pandey MK, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA & Rooijackers SH. (2007): Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med* 204:2461-71.
- Joubert O, Keller D, Pinck A, Monteil H & Prevost G. (2005): Sensitive and specific detection of staphylococcal epidermolysins A and B in broth cultures by flow cytometry-assisted multiplex immunoassay. *J Clin Microbiol* 43: 1076-1080.
- Joubert O, Viero G, Keller D, Martinez E, Colin DA, Monteil H, Mourey L, Dalla Serra M & Prevost G. (2006): Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochem J* 396: 381-389.
- Kamio Y, Rahman A, Nariya H, Ozawa T & Izaki K. (1993): The two Staphylococcal bi-component toxins, leukocidin and gamma-hemolysin, share one component in common. *FEBS Lett* 321: 15-18.
- Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, Tomita T & Kamio Y. (1997): Panton-Valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 1960-1962.

- Katayama Y, Ito T & Hiramatsu K. (2000): A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1549-1555.
- Kim T, Oh PI & Simor AE. (2001): The economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 22: 99-104.
- Klein E, Smith DL & Laxminarayan R. (2007): Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis* 13: 1840-1846.
- Kloos W & Schleifer KH. (1986): Genus IV. *Staphylococcus*. in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath PH.. Baltimore, Williams & Wilkins. 2: 1013-1035.
- Kloos WE, Ballard DN, George CG, Webster JA, Hubner RJ, Ludwig W, Schleifer KH, Fiedler F & Schubert K. (1998): Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equiperficus* sp. nov., and *Macrococcus bovicus* sp. no. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3: 859-877.
- Kluytmans J, van Belkum A & Verbrugh H. (1997): Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10: 505-520.
- Koch AL. (2003): Cell wall-deficient (CWD) bacterial pathogens: could amyotrophic lateral sclerosis (ALS) be due to one? *Crit Rev Microbiol* 29: 215-221.
- Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ & Johannes RS. (2005): Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest* 128: 3854-3862.
- Kosikowski FV & Mistry VV. (1997): Cheese and Fermented Milk Foods. In Kosikowski FV. Editor): Origins and Principles, Westport CT 3rd edn, Vol. 1, 729pp, L.L.C.
- Kreft B, Eckstein S, Kahl A, Frei U, Witte W & Trautmann M. (2001): Clinical and genetic analysis of *Staphylococcus aureus* nasal colonisation and exit-site infection in patients undergoing peritoneal dialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 734-737.
- Kubheka LC, Mosupye FM & von Holy A. (2001): Microbiological survey of street-vended salad and gravy in Johannesburg city, South Africa. *Food Control* 12: 127-131.

- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H & Hiramatsu K. (2001): Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357: 1225-1240.
- Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, Barbu EM, Vazquez V, Hook M, Etienne J, Vandenesch F & Bowden MG. (2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315: 1130-1133.
- Labischinski H. (1992): Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Med Microbiol Immunol* 181: 241-265.
- Ladhani S. (2003): Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39: 181-189.
- Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T & Stiles BG. (2009): *Staphylococcus aureus*: the Toxic Presence of a Pathogen Extraordinaire. *Curr Med Chem* 16: 4003–4019.
- Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR & Davies HD. (2003): Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis* 187: 1452-1459.
- Le Loir Y, Baron F & Gautier M. (2003): *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2: 63-76.
- Lee W, McDonough MA, Kotra L, Li ZH, Silvaggi NR, Takeda Y, Kelly JA & Mobashery S. (2001): A 1.2-A snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1427-1431.
- Lepelletier D, Ferreol S, Villers D & Richet H. (2004): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections in ICU: risk factors, morbidity and cost. *Pathol Biol (Paris)* 52: 474-479.
- Lesieur C, Vecsey-Semjen B, Abrami L, Fivaz M & Gisou van der Goot FG. (1997): Membrane insertion: the strategies of toxins. *Mol Membr Biol* 14:45-64.

- Letertre C, Perelle S, Dilasser F & Fach F. (2003): A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes* 17: 227–235.
- Li D & Cheung A. (2008): Repression of *hla* by *rot* is dependent on *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 76: 1068-1075.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F & Etienne J. (1999): Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29: 1128-1132.
- 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. *Appl Environ Microbiol* 69: 18-23.
- Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N & Novick RP. (1998): The Gene for Toxic Shock Toxin Is Carried by a Family of Mobile Pathogenicity Islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 29: 527–543.
- Lisa RW. (2004): *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. *Derm Foundat* 122: 1070-1077.
- Lodise TP Jr & McKinnon PS. (2007): Burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: focus on clinical and economic outcomes. *Pharmacother* 27: 1001-12.
- Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA & Peters G. (2010): *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* 6: e1000715.
- Lowy FD. (1998): *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520-532.
- Lowy FD. (2003): Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111: 1265-1273.
- Ludwig W, Schleifer KH & Whitman WB. (2009): Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf, pp. 1-32.
- Mahoudeau I, Delabranche X, Prevost G, Monteil H & Piemont Y. (1997): Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *J Clin Microbiol* 35: 2153-2154.

- Mamo W, Froman G & Muller HP. (2000): Protection induced in mice vaccinated with recombinant collagen-binding protein (CnBP) and alpha-toxoid against intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 44: 381-384.
- Marrack P & Kappler J. (1990): The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248: 705-711.
- McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W & Zhang K. (2006): Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. *J Clin Microbiol* 44: 1141-1144.
- McCormick JK, Yarwood JM & Schlievert PM. (2001): Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Ann Rev Microbiol* 55:77-104.
- McCulloch JA. (2006): Avaliação da funcionalidade do locus accessory gene regulator (agr) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- McDevitt D, Francois P, Vaudaux P & Foster TJ. (1994): Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 11: 237-248.
- McNamara PJ, Milligan-Monroe KC, Khalili S & Proctor RA. (2000): Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182: 3197-3203.
- Mehrotra M, Wang G & Johnson WM. (2000): Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 38: 1032-1035.
- Melish ME & Glasgow LA. (1970): The staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med* 282: 1114-1119.
- Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, Werner S, Colin DA, Monteil H & Prevost G. (2003): Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 552:54-60.
- Montoya M & Gouaux E. (2003): Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin. *Biochim Biophys Acta* 1609: 19-27.

- Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS & Koo HC. (2007). Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci* 90: 1176-1185.
- Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB & Talan DA. (2006): Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department treatment of MRSA soft tissue infections: an overview. *N Engl J Med* 355: 666–674.
- Morgan MS. (2010): Diagnosis and management of necrotising fasciitis: a multiparametric approach. *J Hosp Infect* 75: 249–257.
- Mossel DA & van Netten P. (1990): *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 19: 123S-145S.
- Mosupye FM & von Holy A. (1999): Microbiological quality and safety of ready-to-eat street-vended foods in Johannesburg, South Africa. *J Food Prot* 62: 1278-1284.
- Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ & Welch RA. (1998): Identification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin Types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 66: 3337-3348.
- Murray DL, Ohlendorf DH & Schlievert PM. (1995): Staphylococcal and streptococcal superantigens: their role in human diseases. *ASM News* 61: 229–235.
- Nariya H, Shimatani A, Tomita T & Kamio Y. (1997): Identification of the essential amino acid residues in Luk S for the hemolytic activity of staphylococcal leukocidin towards rabbit erythrocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 2095-2099.
- Nauciel C & Vilde JL. (2005): *Bactériologie Médicale*, 2ème éd. Paris: Masson.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S & von Heijne G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1-6.
- Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E & Celano GV. (2007): Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol* 115: 290-296.

- Noto MJ & Archer GL. (2006): A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV is deficient in CcrAB-mediated SCCmec excision. *Antimicrob Agents Chemother* 50(8): 2782-2788.
- Nouwen JL, van Belkum A & Verbrugh HA. (2001): Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Neth J Med* 59: 126-133.
- Novick RP. (2003): Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49: 93-105.
- Nubel U, Roumagnac P, Feldkamp M, Song JH, Ko KS, Huang YC, Coombs G, Ip M, Westh H, Skov R, Struelens MJ, Goering RV, Strommenger B, Weller A, Witte W & Achtman M. (2008): Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14130-14135.
- O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ & Foster TJ. (2002): *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol* 4: 759-770.
- Ogston A. (1882): Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* 17: 24-58.
- Ohlsen K & Lorenz U. (2010): Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections. *Int J Med Microbiol* 300: 402-410.
- Oliveira DC & de Lencastre H. (2002): Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2155-2161.
- Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A & Shinagawa K. (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun* 71: 6088-6094.
- Omoe K, Imanishi K & Hu DL. (2004): Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like type R. *Infect Immun* 72: 3664-3667.
- Omoe K, Imanishi K, Hu D, Kato H, Fugane Y, Abe Y, Hamaoka S, Watanabe Y, Nakane A, Uchiyama T & Shinagawa K. (2005): Characterization of Novel Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxin Type P. *Infect Immun* 73: 5540-5546.

- Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T & Shinagawa K. (2008): Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect Immun* 76: 4999-5005.
- Onoue Y & Mori M. (1997): Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *Int J Food Microbiol* 36: 77-82.
- Orwin PM, Leung DYM, Donahue HL, Novick RP & Schlievert PM. (2001): Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun* 69: 360-366.
- Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DYM, Gutierrez JA, Bohach GA & Schlievert PM. (2003): Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. *Infect Immun* 71: 2916-2919.
- Ouvry A, Wache Y, Tourdot-Marechal R, Divies C & Cachon R. (2002): Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* 214: 257-261.
- Owhe-Ureghe OE, Ekundayo AO, Agboniahor DE, Oboh PA & Orhue P. (1993): Bacterial examination of Somme ready-to-eat foods marketed in Ekpoma, Edo state of Nigeria. *Nigeria Food J* 11: 45-52.
- Panton PN & Valentine FCO. (1932): Staphylococcal toxin. *Lancet* 222:506-508.
- Park (2005). "Fiche technique, dépistage du VIH." http://www.groupecida.ch/04/elements/-documents/article_depistage.pdf
- Parker MW & Feil SC. (2005): Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88: 91-142.
- Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Ryden C & Hook M. (1994): The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun* 62: 152-161.
- Peacock SJ, de Silva I & Lowy FD. (2001): What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9: 605-610.
- Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J & Schlievert P. (1988): Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 170: 4365- 4372.

- Peres-Bota D, Rodriguez H, Dimopoulos G, DaRos A, Melot C, Struelens MJ & Vincent JL. (2003): Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? *J Infect* 47: 307-316.
- Peters JE, Thate TE & Craig NL. (2003): Definition of the Escherichia coli MC4100 genome by use of a DNA array. *J Bacteriol* 185: 2017-2021.
- Pignatari A, Pfaller M, Hollis R, Sesso R, Leme I & Herwaldt L. (1990): *Staphylococcus aureus* colonization and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 28: 1898-1902.
- Pimbley DW & Patel PD. (1998): A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 27: 98S-109S.
- Pinchuk IV, Beswick EJ & Reyes VE. (2010): Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins* 2: 2177-2197.
- Plano LR. (2004): *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: how they cause disease. *J Invest Dermatol* 122: 1070-1077.
- Prevost G, Couppié P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, Monteil H & Piémont Y. (1995a): Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 42: 237-245.
- Prevost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, Finck- Barbancon V, Monteil H & Piémont Y. (1995b): Panton Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 63:4121-4129.
- Prevost G. (1999): The bi-component staphylococcal leucocidins and γ -haemolysins (toxins). In Alouf JE & Freer JH. (Editors): The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. London San Diego Boston New York Sydney Tokyo Toronto: *Academic Press*, pp. 402-418.
- Prevost G, Mourey L, Colin DA & Menestrina G. (2001): Staphylococcal pore-forming toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 257: 53-83.
- Prevost G, Menestrina G, Colin DA, Werner S, Bronner S, Dalla Serra M, Baba Moussa L, Coraiola M, Gravet A & Monteil H. (2003): Staphylococcal bicomponent leucotoxins, mechanism of action, impact on cells and contribution to virulence. In Menestrina G, Dalla Serra M & Lazarovici P. (Editors): Pore-forming peptides and protein toxins, Taylor & Francis Press, London, New York, pp. 3-26.

- Prevost G. (2004): Toxins in *Staphylococcus aureus* pathogenesis. In Proft M. (Editor): Microbial toxins: molecular and cellular biology, Horizon Bioscience, Norfolk, England, ISBN: 1-904933-08-04 pp: 243-284.
- Prevost G, Mourey L, Colin DA, Monteil H, Dalla Serra M & Menestrina G. (2006): Alpha-helix and beta-barrel pore-forming toxins (leucocidins, alpha-, gamma- and delta-cytolysins) of *Staphylococcus aureus*. In Alouf JE & Popoff MR. (Editors): Chapter 32, The comprehensive sourcebook of bacterial toxins, ISBN: 0-12-088445-3, Academic Press, London. pp 590-607.
- Pujol M, Pena C, Pallares R, Ariza J, Ayats J, Dominguez MA & Gudiol F. (1996): Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am J Med* 100: 509-516.
- Qi Y & Miller KJ. (2000): Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J Food Prot* 63: 473-478.
- Que YA, Francois P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P & Moreillon P. (2001): Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun* 69: 6296-6302.
- Que YA, Haefliger JA, Piroth L, Francois P, Widmer E, Entenza JM, Sinha B, Herrmann M, Francioli P, Vaudaux P & Moreillon P. (2005): Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med* 201: 1627-1635.
- Quincampoix JC & Mainardi JL. (2001): Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation* 10: 267-275.
- Reimer LG, Wilson ML & Wernstein MP. (1997): Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 10: 445-465.
- Rello J, Quintana E & Ausina V. (1990): Risk factors for *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia in critically ill patients. *Am Rev Respir Dis* 142: 1320-1324.
- Ren K, Bannan JD, Pancholi V, Cheung AL, Robbins JC, Fischetti VA & Zabriskie JB. (1994): Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J Exp Med* 180: 1675-1683.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B & Barrett TJ. (2006): Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping

- of *Escherichia coli* o157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3: 59-67.
- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH & Gaynes RP. (1999): Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 27: 887-892.
- Riegel P, Archambaud M, Clavé D & Vergnaud M. (2006). Bactérie de culture et d'identification difficiles. Edition Bio Mérieux, France. p. 93-112.
- Riondet C, Cachon R., Waché Y, Alcaraz G & Diviès C. (1999): Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *Eur J Biochem* 262: 595-599.
- Rooijackers SH, Ruyken M, van Roon J, van Kessel KP, van Strijp JA & van Wamel WJ. (2006): Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol* 8: 1282-1293.
- Rosato AE, Kreiswirth BN, Craig WA, Eisner W, Climo MW & Archer GL. (2003): MecA-blaZ corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1460-1463.
- Rubinovitch B & Pittet D. (2001): Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the endemic hospital: what have we learned? *J Hosp Infect* 47: 9-18.
- Ryding U, Flock JI, Flock M, Soderquist B & Christensson B. (1997): Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 176: 1096-1099.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sakai F, Ihara H, Aoyama K, Igarashi H, Yanahira S, Ohkubo T, Asao T & Kozaki S. (2008): Characteristics of enterotoxin h-producing staphylococcus aureus isolated from clinical cases and properties of the enterotoxin productivity. *J Food Prot* 71: 1855-1860.
- Salyers AA & Whitt DD. (2002): Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach, Second Edition. ASM Press, Washington, D.C. pp

- Sato H, Matsumori Y, Tanabe T, Saito H, Shimizu A & Kawano J. (1994): A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. *Infect Immun* 39:369-377.
- Shafer WM & Iandolo JJ. (1979). Genetics of staphylococcal enterotoxin B in methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 25: 902-911.
- Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiario J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E, Foster T & Lee JC. (2006): Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infect Immun* 74: 2145-2153.
- Schlievert PM, Bohach GA, Ohlendorf DH Stauffacher CV, Leung DY, Murray DL, Prasad GS, Earhart CA, Jablonski LM, Hoffmann ML & Chi YI. (1995). Molecular structure of staphylococcus and streptococcus superantigens. *J Clin Immunol* 15, 4S-10S.
- Schlievert PM & Case LC. (2007): Molecular analysis of staphylococcal superantigens. *Methods Mol Biol* 391:113-126.
- Schlievert PM, Strandberg KL, Lin YC, Peterson ML & Leung DY. (2010). Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 125: 39-49.
- Schmitz FJ, Steiert M, Hofmann B, Verhoef J, Hadding U, Heinz HP & Kohrer K. (1998): Development of a multiplex-PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol* 47: 335-340.
- Schroder A, Schroder B, Roppenser B, Linder S, Sinha B, Fassler R & Aepfelbacher M. (2006): *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. *Mol Biol Cell* 17: 5198-5210.
- Schwartz DC & Cantor CR. (1984): Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- Sesques M. (1994) : Staphylocoques à coagulase positive dans le fromage fermier au lait cru de St. Nectaire. *Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon 1*.
- Sesques M & Ballot N. (1998): *Staphylococcus aureus* dans les fromages d'AOC du Massif central. *Rev ENIL* 214: 23-24.

- Severin A, Severina E & Tomasz A. (1997): Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 504-510.
- SFM (Société Française de Microbiologie) (2012): Recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 59p.
- Shafer WM & Iandolo JJ. (1978): Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect Immun* 20: 273-278.
- Shalita Z, Hertman I & Sarid S. (1977): Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 129: 317-325.
- Shivashankar GH, Murukesh N, Varma MP, Sharif IM & Glynn G. (2008): Infection by Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* clinically mimicking Lemierre's syndrome. *J Med Microbiol* 57: 118-120.
- Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J & Kreiswirth BN. (2003): Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. *J Clin Microbiol* 41: 456-459.
- Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M & Krause KH. (1999): Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha 5 beta 1. *Cell Microbiol* 1: 101-117.
- Smeltzer MS & Gillaspay AF. (2000): Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poult Sci* 79: 1042-1049.
- Smith JL, Buchanan RL & Palumbo SA. (1983): Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *J Food Prot* 46: 545-55.
- Soboll H, Ito A, Schaeg W & Blobel H. (1973) Leukocidin from staphylococci of different origin (author's transl). *Zentralbl Bakteriologie [Orig A]* 224: 184-193
- Sohl G & Willecke K. (2004): Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232.
- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H & Gouaux JE. (1996): Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274: 1859-1866.

- Stewart CM, Cole MB, Legan JD, Slade L, Vandeven MH & Schaffner DW. (2002): *Staphylococcus aureus* growth boundaries: moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects. *Appl Environ Microbiol* 68: 1864-1871.
- Struelens MJ & de Mendonca R. (2001): The emerging power of molecular diagnostics: towards improved management of life-threatening infection. *Intensive Care Med* 27: 1696-1698.
- Su YC & Wong AC. (1995): Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. *Appl Environ Microbiol* 61: 1438-1443.
- Su YC & Wong AC. (1998): Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. *Int J Food Microbiol* 39: 87-91.
- Sugai M, Hashimoto K, Kikuchi A, Inoue S, Okumura H, Matsumoto K, Goto Y, Ohgai H, Moriishi K, Syuto B, Yoshikawa K, Suginaka & Takai Y. (1992): Epidermal cell differentiation inhibitor ADP-ribosylates small GTP-binding proteins and induces hyperplasia of epidermis. *J Biol Chem* 267: 2600-2604.
- Sugiyama H & Hayama T. (1964): Comparative Resistance of Vagotomized Monkeys to Intravenous Vs. Intragastric Staphylococcal Enterotoxin Challenges. *Proc Soc Exp Biol Med* 115: 243-246.
- Sugiyama H, Hayama T & Yagasaki O. (1966): Emetic action of bacterial endotoxin in the cat. *Proc Soc Exp Biol Med* 121: 278-281.
- Sung JM, Chantler PD & Lloyd DH. (2006): Accessory gene regulator locus of *Staphylococcus intermedius*. *Infect Immun* 74: 2947-2956.
- Supersac G, Piemont Y, Kubina M, Prevost G & Foster TJ. (1998): Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a *hlg*-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* 24: 241-251.
- Szmigielski S, Sobiczewska E, Prevost G, Monteil H, Colin DA & Jeljaszewicz J. (1998): Effect of purified staphylococcal leukocidal toxins on isolated blood polymorphonuclear leukocytes and peritoneal macrophages *in vitro*. *Zentralbl Bakteriol* 288: 383-394.
- Tamashiro H, Maskill W, Emmanuel J, Fauquex A, Sato P & Heymann D. (1993): Reducing the cost of HIV antibody testing. *Lancet* 342: 87-90.
- Taylor AG & Bernheimer AW. (1974): Further characterization of staphylococcal gamma-hemolysin. *Infect Immun* 10: 54-59.

- Taylor D & Holland KT. (1989): Amino acid requirements for the growth and production of some exocellular products of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol* 66: 319-329.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH & Swaminathan B. (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasserieu K, Etienne J, Gougeon ML, Lina G & Vandenesch F. (2006): Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect Immun* 74: 4724-4734.
- Thota H, Tatini SR & Bennett RW. (1973): Effects of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F. Abstr. Ann. Meet. *Am. Soc. Microbiol* **E1**, 1.
- Tjoa WS, DuPont HL, Sullivan P, Pickering LK, Holguin AH, Olarte J, Evans DG & Evans DJ, Jr. (1977): Location of food consumption and travelers' diarrhea. *Am J Epidemiol* 106: 61-66.
- Todd J, Fishaut M, Kapral F & Welch T. (1978): Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. *Lancet* 2: 1116-1118.
- Tomasz A, Nachman S & Leaf H. (1991): Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 124-129.
- Tomita T & Kamio Y. (1997): Molecular biology of the pore-forming cytolysins from *Staphylococcus aureus*, alpha- and gamma-hemolysins and leukocidin. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 565-572.
- Tremaine MT, Brockman DK & Betley MJ. (1993): Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). *Infect Immun* 61: 356-359.
- Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, Vandenesch F & Etienne J. (2007): Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 65 (Suppl. 2): 105-109.
- Umoh VJ, Dangana A & Umoh JU. (1984): Isolation of yersinia enterocolitica from milk and milk products in Zaria, Nigeria. *Int J Zoonoses* 11: 223-228.

- Utsui Y & Yokota T. (1985): Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 397-403.
- Valeva A, Hellmann N, Walev I, Strand D, Plate M, Boukhallouk F, Brack A, Hanada K, Decker H & Bhakdi S. (2006): Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J Biol Chem* 281: 26014-26021.
- van der Flier M, van Dijk NB, Fluit AC, Fleer A, Wolfs TF & van Gestel JP. (2003): Fatal pneumonia in an adolescent due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive for Panton-Valentine-leukocidin. *Ned Tijdschr Geneesk* 147: 1076-1079.
- Vandenbergh MF & Verbrugh HA. (1999): Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. *J Lab Clin Med* 133: 525-534.
- Vasconcelos NG & Cunha MLRS. (2010): Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *J Public Health Epidemiol* 2: 29-42.
- Vianello MA. (2006): Caracterização genotípica dos fatores de virulência e seu regulador *agr* em cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis à oxacilina. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo.
- Vilhelmsson O & Miller KJ. (2002): Synthesis of pyruvate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* is stimulated by osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* 68: 2353-2358.
- Vincenot F, Saleh M & Prévost G. (2008): Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francophone des Laboratoires* 407: 61-69.
- Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, Wolff M, Spencer RC & Hemmer M. (1995): The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 274: 639-644.
- Walsh TR & Howe RA. (2002): The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 56: 657-675.
- Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR & Otto M. (2007): Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 13: 1510-1514.

- Wann ER, Gurusiddappa S & Hook M. (2000): The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* 275: 13863-13871.
- Waxman DJ, Yocum RR & Strominger JL. (1980): Penicillins and cephalosporins are active site-directed acylating agents: evidence in support of the substrate analogue hypothesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289: 257-271.
- Weems JJ, Jr. (2001): The many faces of *Staphylococcus aureus* infection. Recognizing and managing its life-threatening manifestations. *Postgrad Med* 110: 24-26, 29-31, 35-26.
- Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neumeister B, Mond JJ & Peschel A. (2004): Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* 10: 243-245.
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE & Tenover FC. (2003): Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302: 1569-1571.
- Werner S, Colin DA, Coraiola M, Menestrina G, Monteil H & Prevost G. (2002): Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leucotoxins. *Infect Immun* 70:1310-1318.
- Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH & Verbrugh HA. (2004): Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364: 703-705.
- Williams RE. (1963): Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* 27: 56-71.
- Wolff KA, Sherman M & Nguyen L. (2011): Potentiation of Available Antibiotics by Targeting Resistance – An Emerging Trend in Tuberculosis Drug Development. In Rundfeldt C. (Editor): Drug development—A case study based insight into modern strategies. ISBN 978-953-307-257-9. Chapter 8. pp 183-208. www.intechopen.com
- Wolff M. (2002): The management of treatment failures for staphylococcal infections. *Ann Fr Anesth Reanim* 21: 418-423.

- Woodin AM. (1959): Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 73: 225-237.
- Woodin AM. (1960): Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 75: 158-165.
- 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*. *Microb Drug Resist* 2: 435-441.
- Yamaguchi T, Hayachi T, Takami H, Nakasome K, Ohnishi M, Nakayama K, Yamada S, Komatsuzawa H & Sugai M. (2000): Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 38: 694-705.
- Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, Asakawa K, Ohara M, Komatsuzawa H & Sugai M. (2001): Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADPribosyltransferase, EDIN-C. *Infect Immun* 69: 7760-7771.
- Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fubada Y, Aefelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M & Sugai M. (2002): Identification of the *Staphylococcus aureus etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect Immun* 70: 5835-5845.
- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T & Conly JM. (2008): Novel multiplex PCR assay for simultaneous identification of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains USA300 and USA400 and detection of *mecA* and Panton-Valentine leukocidin genes, with discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J. Clin Microbiol* 46: 1118- 1122.
- Zhang S, Iandolo JJ & Stewart GC. (1998): The Enterotoxin D Plasmid of *Staphylococcus aureus* Encodes a Second Enterotoxin Determinant (Sej). *FEMS Microbiol Lett* 168: 227-233.
- Zhou H, Xiong ZY, Li HP, Zheng YL & Jiang YQ. (2006): An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model. *Vaccine* 24: 4830-4837.
- Zimmermann A, Lüthy J & Pauli U. (1998): Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 207: 81-90.