

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie



# THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génomique Microbienne

Par

**Namoune Rachida**

Thème :

### **Caractérisation moléculaire des bactéries responsables d'infections nosocomiales isolées au niveau des hôpitaux de Chlef**

Soutenue le : 26/06/2024, devant le jury composé de :

Mr. SETTI Benali	Professeur	Université de Chlef	Président
Mr. SEBAIHIA Mohammed	Professeur	Université de Chlef	Directeur de thèse
Mme NEHAL Fatma	MCA	Université de Chlef	Examinatrice
Mr. DRICHE El Hadj	MCA	Université de Chlef	Examinateur
Mr. REBIAHI Sid Ahmed	Professeur	Université de Tlemcen	Examinateur
Mme ALOUACHE Souhila	Professeur	ENSSMAL	Examinatrice

2023-2024

## Table des matières

<b>Remerciements</b>	I
<b>Dédicace</b>	III
<b>Résumé</b>	IV
<b>Abstract</b>	V
<b>ملخص</b>	VI
<b>Liste des figures</b>	VII
<b>Liste des tableaux</b>	X
<b>Liste des abréviations</b>	XI
<b>Introduction générale</b>	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
I.1 Découverte et classification taxonomique de <i>S. aureus</i>	3
I.2 Généralités sur <i>S. aureus</i>	4
I.3. Caractères biochimiques et culturels de <i>S. aureus</i>	4
I.4 Les infections à <i>S. aureus</i>	5
I.4.1 Les infections de la peau et des tissus mous	5
I.4.2 Les infections profondes et systémiques	6
I.5 Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	7
I.5.1 Facteurs de virulence associés à la surface cellulaire	8
a. La protéine staphylococcique A	8
b. La protéine de liaison au collagène	9
c. Les protéines de liaison au fibronectine	9
d. Les protéines de liaison au fibrinogène	9
e. La protéine de liaison à l'élastine	9
f. Les acides téichoïques	9
g. La capsule polysaccharidique	9
I.5.2 Facteurs de virulence extracellulaires	10
I.5.2.1 Les enzymes extracellulaires	10
a. Les coagulases	10
b. La staphylokinase	11
c. La hyaluronidase	11
d. Les protéases	11
e. Les lipases	11
f. Les nucléases	11
I.5.2.2 Les toxines	12
I.5.2.2.1 Les cytotoxines	12
I.5.2.2.2 Les toxines exfoliatives	12
I.5.2.2.3 Les toxines superantigéniques	12
a. La toxine du syndrome du choc toxique staphylococcique	12
b. Les entérotoxines	14
I.5.2.3 Autres facteurs de virulence	14
a. Les biofilms	14
I.5.2.4 Régulation de la virulence chez <i>S. aureus</i>	14

## Table des matières

I.6 Le génome de <i>S. aureus</i>	15
I.7 Épidémiologie de <i>S. aureus</i>	16
I.7.1 Réservoirs de <i>S. aureus</i>	16
I.7.2 Modes de transmission de <i>S. aureus</i>	16
I.7.3 Facteurs de risques d'infection à <i>S. aureus</i>	17
I.7.4 Émergence de <i>S. aureus</i> résistant à la méthicilline	17
I.7.4.1 Les différents groupes de SARM	18
a. SARM d'origine hospitalière	18
b. SARM d'origine communautaire	19
c. SARM d'origine animale	20
d. <i>S. aureus</i> résistant à la vancomycine	21
I.8 Caractérisation des souches de <i>S. aureus</i> par typage moléculaire	21
a. L'électrophorèse en champ pulsé	22
b. <i>Multi-Locus Variable number tandem repeat Analysis</i> (MLVA)	23
c. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	23
d. Le typage Spa	24
e. Le typage SCCmec	25
f. Le typage <i>agr</i>	27
I.9 Épidémiologie génomique de <i>S. aureus</i>	28
I.9.1 Les technologies séquençage de nouvelle génération (NGS)	28
I.9.2 Les différentes approches de séquençage NGS	31
a. Illumina	31
b. Roche	33
c. Ion Torrent	33
d. SOLID	34
e. MinION	36
f. PacBio	36
I.9.3 Analyses des séquences des génomes	37
I.9.3.1 Contrôle de la qualité des données de séquençage	38
I.9.3.2 Assemblage des séquences	38
I.9.3.3 Annotation des génomes	39
I.9.3.4 Génomique comparative	39
I.9.4 Application du WGS en santé publique	39
a. Le typage par WGS	40
I.9.5 Principaux complexes clonaux de SARM et répartition géographique	43
I.9.6 Principaux clones de SARM en Algérie	44
I.10 Méthodes d'isolement et d'identification de <i>S. aureus</i>	45
I.10.1 Méthodes d'identification des SARM	47
I.11 Traitement des infections staphylococciques	48
I.12 Prévention et control des infections staphylococciques	48
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes</b>	
II.1 Lieu, période et population d'étude	50

## Table des matières

II.2 Milieux de culture et solutions	50
II.3 Prélèvements et enrichissement	50
II.4 Isolement et identification de <i>S. aureus</i>	50
II.4.1 Identification microscopique par coloration de Gram	51
II.4.2 Identification biochimique	51
II.4.2.1 Recherche de catalase	51
II.4.2.2 Tests de coagulase	51
II.4.3 Identification de <i>S. aureus</i> par PCR	51
II.4.3.1 Extraction d'ADN chromosomique	51
II.4.3.2 Réactions de PCR et programme d'amplification	52
II.4.3.3 Migration sur gel d'agarose	52
II.5 Séquençage des génomes complets des isolats de <i>S. aureus</i>	52
II.5.1 Extraction d'ADN génomique	53
II.5.2 Préparation de la bibliothèque d'ADN	54
II.5.3 Formation de clusters d'ADN	55
II.5.4 Réactions de séquençage	56
II.5.5 Démultiplexage	59
II.5.6 Analyses des séquences	59
II.5.6.1 Contrôle de la qualité des séquences	59
II.5.6.2 Assemblage des séquences	59
II.5.6.3 Annotation des génomes	60
II.5.6.4 MLST	60
II.5.6.5 Typage SCCmec et <i>Spa</i>	61
II.5.6.6 Analyses des SNPs	61
II.5.6.7 Analyses des gènes de virulence	62
II.5.6.8 Analyse génotypique de la résistance aux antimicrobiens	62
II.6 Tests de sensibilité aux antibiotiques	62
<b>Chapitre III : Résultats</b>	
III.1 Caractéristiques des patients et des prélèvements	63
III.2 Isolement et identification de <i>S. aureus</i>	64
III.2.1 Identification macroscopique et microscopique de <i>S. aureus</i>	64
III.2.2 Identification biochimique de <i>S. aureus</i>	65
III.2.3 Identification moléculaire de <i>S. aureus</i>	65
III.2.4 Identification des SARM	66
III.2.5 Caractéristiques des isolats des SARM et SASM	66
III.3 Analyses bioinformatiques des séquences des génomes des isolats de <i>S. aureus</i>	67
III.3.1 Assemblage des séquences	66
III.3.2 Annotation des génomes	69
III.3.3 Analyse du pangéome	71
III.4 Typage des isolats de <i>S. aureus</i>	71
III.4.1 Typage MLST	71
III.4.2 Typage SCCmec	73

## Table des matières

III.4.3 Typage Spa	74
III.4.4 Analyse phylogénomique	75
III.5 Détection des gènes de virulence	76
III.6 Détection des déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques	79
III.6.1 Profils de résistance aux antibiotiques des isolats <i>S. aureus</i>	80
III.6.2 Corrélation entre les profils phénotypiques et génotypiques de résistance aux antibiotiques	83
<b>Chapitre IV : Discussion</b>	84
<b>Conclusion générale</b>	91
<b>Références bibliographiques</b>	92
<b>Annexes</b>	116
<b>Article</b>	125

## *Remerciements*

Avant tout je remercie **Dieu, Allah tout puissant**, pour le courage et la volonté qu'il m'a accordé pour mener à bien ce travail de recherche.

Je tiens à remercier tout d'abord, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) et la Direction Générale de la Recherche Scientifique et Technologie (DGRST) pour leurs soutiens financiers.

J'aimerais en premier lieu adresser mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, le **Professeur Sebahia Mohammed**, qui m'a permis de réaliser ce travail. Je vous suis reconnaissante pour votre écoute, votre bienveillance et votre confiance tout au long de ma formation. Vous m'avez appris à travailler avec rigueur.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent à :

**Monsieur SETTI Benali**, Professeur à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef ; de m'avoir fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse et d'évaluer ce travail.

**Madame ALOUACHE Souilla** Professeur à ENSSMAL, d'avoir accepté d'examiner ce travail, que vous trouvez ici le témoignage de ma gratitude.

**Madame NEHAL Fatma**, Maître de Conférences A à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, pour l'honneur qu'elle m'a fait et le temps précieux accordé pour examiner et juger ce travail

**Monsieur REBIAHI Sid Ahmed**, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen ; de m'avoir honoré en acceptant d'examiner ce travail.

**Monsieur DRICHE El Hadj**, Maître de Conférences A à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, pour sa présence honorable en tant qu'examinateur.

Je souhaite grandement remercier Professeur **Holden T. Matthew** à l'Université de St-Andrews, UK de m'avoir accueillie dans son Laboratoire. Votre précieuse aide, vos remarques et conseils m'ont beaucoup aidé à progresser dans mon projet de thèse. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie tous les membres de l'équipe de l'Université de St-Andrews, UK pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler. Merci à **Rebecca, Arun, Martin, Mark, Everlin, Gabriella, Rob, Emmanuel, Tom, et Joanna**.

Je tiens aussi à remercier les directeurs des deux hôpitaux **Merouani Abed** et **Sœurs Bedj** de la Wilaya de Chlef pour leur contribution dans la réalisation de ce travail de recherche.

Je remercie Monsieur **Bekara Mohamed El-Amine** pour son aide précieuse. Mes vifs remerciements s'adressent à tous mes enseignants de tous les niveaux.

A tous ceux qui m'ont accompagné et soutenu durant toutes mes longues années d'études jusqu'ici, particulièrement :

Ma très chère **Abla**, tu m'as apporté tout le soutien dont tu es capable. Merci d'être à mes côtés durant les bons et les mauvais moments.

**Fatiha**, quoi que je dise ne vaut ton soutien approuvé pendant mes longues années d'études. Que tu trouves ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

*A ma très chère famille*

## Résumé

*Staphylococcus aureus* est la principale cause d'infections nosocomiales et communautaires dans le monde. Les objectifs de cette thèse étaient de génotyper et de déterminer les profils de résistance aux antibiotiques et de virulence de 17 isolats cliniques de *S. aureus* isolés de patients admis dans deux hôpitaux dans la région de Chlef en Algérie, par séquençage de leurs génomes entiers.

En premier lieu, les génomes entiers des isolats ont été séquencés, puis analysés par les approches de typages *in silico* MLST, Spa, SCC*mec* et par *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), suivi par des analyses phylogénétiques et épidémiologiques.

Les profils génotypiques de résistance et de virulence aux antimicrobiens ont été déterminés par analyse des génomes. La résistance phénotypique aux antibiotiques des isolats a été testée sur un panel de 21 antibiotiques par la méthode de diffusion de disque et le système automatisé Vitek 2.

Les typages MLST, Spa et SCC*mec* ont séparé les isolats en cinq types de séquence (ST), ST1, ST22, ST45 et ST80 et un nouveau ST désigné slvST15, quatre types de spa (t044, t127, t368, t386) et deux types SCC*mec* (IVc et IVa), respectivement. Le clone ST80 était le plus prédominant dans cette étude.

Le typage basé sur l'analyse des SNP a permis de mettre en évidence des potentiels événements de transmission intra- et inter-hospitalière.

L'analyse des génomes entiers a révélé une prévalence et une distribution différentes de 15 déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques parmi les isolats. Les isolats ont été séparés en deux groupes, 10 *S. aureus* sensibles à la méthicilline (SASM) et 7 *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM), sur la base de la présence du gène *mecA* et de leur résistance à la céfoxitine. Les isolats ont montré des taux de résistance différents aux autres antibiotiques testés.

Les taux de multirésistance aux antibiotiques étaient très élevés, avec 71,42% et 60%, parmi les isolats de SARM et de SASM, respectivement. Près de 100 gènes de virulence ont été identifiés, avec des proportions différentes, dans les 17 génomes.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude basée sur le séquençage des génomes entiers en Algérie qui a fourni une caractérisation détaillée et à haute résolution des isolats cliniques de SARM et de SASM. Les résultats de cette étude soulignent l'importance d'une surveillance continue de *S. aureus* dans les établissements de santé en Algérie.

**Mots clés :** SNP, Génome, *S. aureus*, MRSA, MLST, *in silico*, Algérie.

## **Abstract**

*Staphylococcus aureus* is the leading cause of healthcare- and community-acquired infections worldwide. The aims of this thesis were to genotype and determine the antimicrobial resistance and virulence profiles of 17 clinical isolates of *S. aureus* isolated from patients admitted to two hospitals in Algeria, using whole genome sequencing (WGS).

*S. aureus* isolates were first subjected to WGS, then to *in silico* Multi-Locus Sequence Typing (MLST), spa, SCCmec and WGS-based single nucleotide polymorphism typing (SNP) were performed, followed by phylogenetic and epidemiological analyses.

The genotypic profiles of antimicrobial resistance and virulence were determined by analysis of their genomes. Phenotypic antibiotic resistance of the isolates was tested against a panel of 21 antibiotics by the disk diffusion method and the Vitek 2 automated system.

The MLST, Spa and SCCmec typing separated the isolates into four sequence types (STs), ST1, ST22, ST45 and ST80 as well as a new ST designated slvST15, four spa types (t044, t127, t368, t386) and two SCCmec types (IVc and IVa), respectively. The MRSA clone ST80 was the most predominant in this study.

Genome-based SNP typing of the isolates allowed the identification of potential intra and inter-hospital transmission events.

Whole genome analysis revealed different prevalence and distribution of 15 genetic determinants of antibiotic resistance among the isolates. The isolates were separated into two groups, 10 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and 7 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), on the basis of the presence of the *mecA* gene and their resistance to cefoxitin. The isolates showed differing resistance rates to the other antibiotics tested.

The rates of multidrug resistance (MDR) were very high, with 71.42% and 60% among MRSA and MSSA isolates, respectively. Nearly 100 virulence genes were identified, with different proportions, in the 17 genomes.

To our knowledge, this is the first WGS-based study in Algeria that provided a detailed and high-resolution characterization of clinical MRSA and MSSA isolates. The results of this study emphasize the importance of continuous surveillance of *S. aureus* in healthcare settings in Algeria.

**Keywords:** WGS, SNP, *S. aureus*, MRSA, MLST, *in silico*, Algeria.

## ملخص

المكورات العنقودية الذهبية هي السبب الرئيسي للعدوى المكتسبة من الرعاية الصحية والمجتمع في جميع أنحاء العالم. كانت أهداف هذه الأطروحة هي التمييز الجيني وتحديد مقاومة مضادات الميكروبات و عوامل الخطورة لـ 17 عزلة سريرية من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من المرضى المقبولين في مستشفيات في الجزائر، وذلك باستخدام تسلسل الجينوم الكامل (WGS).

تم إخضاع عزلات المكورات العنقودية الذهبية أولاً إلى تسلسل الجينوم الكامل (WGS) ثم إلى MLST (*in silico Multi-Locus Sequence Typing*)، *spa*، *SCCmec* وتم إجراء كتابة تعدد الأشكال النوكليوتيدات الفردية المستندة إلى WGS (SNP) عليها التحليلات التطورية والوبائية.

تم تحديد العلامح الوراثية لمقاومة مضادات الميكروبات والفوعة من خلال تحليل الجينوم الخاص بها. تم اختبار مقاومة النمط الظاهري للمضادات الحيوية للعزلات ضد مجموعة مكونة من 21 مضاداً حيويًا بواسطة طريقة انتشار القرص والنظام الألي 2 *Vitek*.

MLST و *spa* و *SCCmec* قامت الكتابة بفصل العزلات إلى أربعة أنواع متسلسلة (STs) ST1، ST22، ST45، ST80 بالإضافة إلى نوع بالإضافة إلى نوع جديد *slvST15*، وأربعة أنواع *spa* (t368، t127، t044) ونوعين *SCCmec* (IVa و IVc) على التوالي. MRSA ST80 كان الاستنساخ الأكثر شيوعاً في هذه الدراسة.

سمحت SNP المستندة إلى الجينوم للعزلات بتحديد أحداث الانتقال المحتملة داخل المستشفيات وفيما بينها. أظهر تحليل الجينوم الكامل مدى انتشار وتوزيع 15 محددًا وراثيًا لمقاومة المضادات الحيوية بين العزلات. تم فصل العزلات إلى مجموعتين، 10 عزلات من المكورات العنقودية الذهبية مُعرضة لمقاومة للميثيسيلين (MSSA) و 7 عزلات من المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) على أساس وجود جين *mecA* ومقاومتها للسيفوكسينين. أظهرت العزلات معدلات مقاومة مختلفة للمضادات الحيوية الأخرى التي تم اختبارها حيث كانت معدلات المقاومة، للأدوية المتعددة عالية جدًا (MDR) حيث بلغت 71.42% و 60% بين عزلات MRSA و MSSA على التوالي. وتم التعرف على ما يقرب من 100 جينة فوعة، بنسب مختلفة، في الجينومات السبعة عشر على حد علمنا، هذه هي أول دراسة تعتمد على WGS في الجزائر والتي قُمت وصفاً تفصيليًا وعالي الدقة لعزلات MRSA و MSSA السريرية.

تؤكد نتائج هذه الدراسة على أهمية المراقبة المستمرة لبكتيريا المكورات العنقودية الذهبية في أماكن الرعاية الصحية في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: WGS، SNP، المكورات العنقودية الذهبية، MRSA، MLST، *in silico*، الجزائر.

## Liste figures

	Titre	Page
<b>Figure 1.</b>	Les staphylocoques à coagulase positive (SCoP) et les staphylocoques à coagulase négative (SCoN).	4
<b>Figure 2.</b>	(A) : <i>Staphylococcus aureus</i> sous microscope optique (coloration de Gram) (G x100) ; (B) : Microscopie électronique à balayage de <i>S. aureus</i> . Agrandie 10 000X	5
<b>Figure 3.</b>	Les infections staphylococciques de la peau et des tissus mous.	6
<b>Figure 4.</b>	Types de maladies systémiques causées par <i>S. aureus</i> .	7
<b>Figure 5.</b>	Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> .	8
<b>Figure 6.</b>	Mécanismes d'actions des coagulases, Coa et vWbp, et de la staphylokinase (Sak) de <i>S. aureus</i> .	10
<b>Figure 7.</b>	Mécanismes d'activation des lymphocytes T.	13
<b>Figure 8.</b>	Schéma du système de régulation de gènes accessoires ( <i>agr</i> ) de <i>S. aureus</i> .	15
<b>Figure 9.</b>	Voies de transmission de <i>S. aureus</i> en milieux hospitaliers.	17
<b>Figure 10.</b>	La structure de l'élément SCC <i>mec</i> .	18
<b>Figure 11.</b>	Prévalence mondiale des SARM.	19
<b>Figure 12.</b>	L'émergence de la résistance aux antibiotiques chez <i>S. aureus</i> .	21
<b>Figure 13.</b>	Schéma de typage par PFGE.	23
<b>Figure 14.</b>	Schéma de typage par MLST.	24
<b>Figure 15.</b>	Représentation schématique du typage spa des isolats de <i>S. aureus</i> .	25
<b>Figure 16.</b>	La structure essentielle des éléments SCC <i>mec</i> .	25
<b>Figure 17.</b>	Comparaison structurale des types d'éléments SCC <i>mec</i> actuels.	26

<b>Figure 18.</b>	Illustration d'un SCCmec de type I.	27
<b>Figure 19.</b>	Carte schématique du locus <i>agr</i> de <i>S. aureus</i> , montrant les emplacements des différentes amorces utilisées pour l'amplification de la région hypervariable.	28
<b>Figure 20.</b>	Représentation des principes et du flux de travail des différentes technologies NGS.	30
<b>Figure 21.</b>	Représentation schématique des processus de multiplexage et de démultiplexage des banques génomiques d'ADN.	31
<b>Figure 22.</b>	Une représentation schématique du séquençage par la technologie Illumina.	32
<b>Figure 23.</b>	Une représentation schématique du pyroséquençage par la technologie 454 (Roche).	33
<b>Figure 24.</b>	Une représentation schématique du principe de séquençage avec la technologie Ion Torrent.	34
<b>Figure 25.</b>	Une représentation schématique du principe de séquençage avec la technologie SOLiD.	35
<b>Figure 26.</b>	Principe du séquençage nanopore par la technologie MinION.	36
<b>Figure 27.</b>	Principe du séquençage nanopore par la technologie PacBio.	37
<b>Figure 28.</b>	Schématique illustration de l'approche de l'épidémiologie génomique pour l'identification des événements de transmission.	42
<b>Figure 29.</b>	Distribution des principaux clones de SARM en Afrique en 2014 et 2020.	45
<b>Figure 30.</b>	Flux de travail pour la préparation de la bibliothèque d'ADN par le kit Nextera® XT (Illumina).	53
<b>Figure 31.</b>	Le processus de tagmentation par le kit Nextera® XT (Illumina).	55
<b>Figure 32.</b>	Formation de clusters sur Flow Cell pour le séquençage Illumina.	56
<b>Figure 33.</b>	Structure d'un dNTP terminateur réversible.	57
<b>Figure 34.</b>	Principe du séquençage Illumina.	58

<b>Figure 35.</b>	Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu Chapman.	64
<b>Figure 36.</b>	Aspect microscopique d'un isolat de <i>S. aureus</i> après coloration de Gram (G x100).	64
<b>Figure 37.</b>	Résultat positif du test de catalase pour l'isolat RN7.	65
<b>Figure 38.</b>	Résultats positifs du test de coagulase, libre (A) et liée (B), pour l'isolat RN7.	65
<b>Figure 39.</b>	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR avec les amorces NucF et NucR.	66
<b>Figure 40.</b>	Classification fonctionnelle des protéines codées par le génome de l'isolat de <i>S. aureus</i> 10RN.	70
<b>Figure 41.</b>	Représentation circulaire de l'annotation et des caractéristiques générales du génome de l'isolat 10RN.	70
<b>Figure 42.</b>	Diagramme du pangénome, illustrant le core génome (blue) et le génome accessoire (orange), de 16 isolats de <i>S. aureus</i> .	71
<b>Figure 43.</b>	Prévalence des STs des isolats.	72
<b>Figure 44.</b>	Prévalence des types SCCmec des isolats.	73
<b>Figure 45.</b>	Prévalence des types Spa des isolats.	74
<b>Figure 46.</b>	Les différences de SNP entre les 17 isolats de <i>S. aureus</i> .	75
<b>Figure 47.</b>	Arbre phylogénétique de des 17 isolats de <i>S. aureus</i> et du génome de référence de la souche <i>S. aureus</i> MSSA476 visualisé à l'aide de Phandango.	76

## Liste des tableaux

	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1.</b>	Types de SCC <i>mec</i> actuels.	27
<b>Tableau 2.</b>	Clones pandémiques de SARM et leur répartition mondiale.	44
<b>Tableau 3.</b>	Liste des amorces utilisées pour la détection du gène <i>nuc</i> par PCR.	52
<b>Tableau 4.</b>	Programme d'amplification par PCR.	52
<b>Tableau 5.</b>	Caractéristiques des patients et des prélèvements.	63
<b>Tableau 6.</b>	Caractéristiques des isolats des SARM et SASM.	67
<b>Tableau 7.</b>	Métriques de la qualité des génomes des isolats de <i>S. aureus</i> séquencés dans cette étude.	68
<b>Tableau 8.</b>	Caractéristiques des génomes des isolats de <i>S. aureus</i> .	69
<b>Tableau 9.</b>	Résultats de l'analyse par <i>in silico</i> MLST.	72
<b>Tableau 10.</b>	Facteurs de virulence détectés dans les génomes de <i>S. aureus</i> .	77
<b>Tableau 11.</b>	Déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques identifiés dans les génomes des isolats de <i>S. aureus</i> .	80
<b>Tableau 12.</b>	Profils phénotypiques de résistance aux antimicrobiens des isolats de <i>S. aureus</i> .	82

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AIP</b>	Autoinducteur peptidique ( <i>autoinducer peptide</i> )
<b>AMK</b>	Amikacine
<b>APC</b>	Cellules présentatrices d'antigène
<b>API</b>	<i>Analytical Profile Index</i>
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>CA-SARM</b>	SARM d'origine communautaire
<b>CA-SFM</b>	Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
<b>CA-SFM VET</b>	Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
<b>CARD</b>	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
<b>CC</b>	Complexe Clonal
<b>Ccr</b>	Cassette chromosome recombinase
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CDS</b>	<i>Coding sequences</i>
<b>CHL</b>	Chloramphénicol
<b>CHM II</b>	Complexe d'histocompatibilité majeure de classe II
<b>CIP</b>	Ciprofloxacine
<b>CifA</b>	<i>Clumping factor A</i> (protéines de liaison au fibrinogène A)
<b>CifB</b>	<i>Clumping factor B</i> (protéines de liaison au fibrinogène B)
<b>CLI</b>	Clindamycine
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>Cna</b>	Protéine de liaison au collagène
<b>Coa</b>	Coagulase
<b>COVID-19</b>	Coronavirus Disease 2019 (Maladie à coronavirus 2019)
<b>DNase</b>	Désoxyribonucléase
<b>dNTPs</b>	Désoxynucléotides triphosphates
<b>EbpS</b>	Protéine de liaison à l'élastine de <i>S. aureus</i>
<b>EGM</b>	Éléments Génétiques Mobiles
<b>ERY</b>	Érythromycine
<b>Fc</b>	Fragment cristallisable
<b>FnBPA</b>	Protéines de liaison à la fibronectine A
<b>FnBPB</b>	Protéines de liaison à la fibronectine B

<b>FOX</b>	Céfoxitine
<b>FUS</b>	Acide fusidique
<b>GC</b>	Guanine-Cytosine
<b>GEN</b>	Gentamycine
<b>H</b>	Heure
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HA-SARM</b>	SARM associé aux hôpitaux
<b>IgG</b>	Immunoglobuline de type G
<b>IsdA</b>	<i>Iron-regulated surface determinant protein A</i>
<b>KAN</b>	Kanamycine
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>LA-SARM</b>	SARM associés aux animaux ( <i>livestock-associated MRSA</i> )
<b>LCR</b>	Liquide céphalo-rachidien
<b>LPV</b>	Leucocidine de Panton Valentine
<b>LVX</b>	Lévofloxacine
<b>LZD</b>	Linézolide
<b>m/z</b>	Masse sur charge
<b>MALDI-TOF MS</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
<b>Mb</b>	Megabases
<b>MDR</b>	Multidrug-resistance
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de magnésium
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>Min</b>	Minute
<b>ml</b>	Millilitre
<b>MLS<sub>B</sub></b>	Macrolide, lincosamide and streptogramine B
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
<b>MLVA</b>	<i>Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis</i>
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
<b>MSCRAMMs</b>	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
<b>MXF</b>	Moxifloxacine
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>NCBI</b>	<i>National Centre for Biotechnology</i>
<b>NGS</b>	<i>New Generation Sequencing</i> (Séquençage de Nouvelle Génération)
<b>NIT</b>	Nitrofurantoïne
<b>OFX</b>	Ofloxacine

<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>pb</b>	Paire de base
<b>PBP2a</b>	Protéine de liaison à la pénicilline 2a
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PFGE</b>	<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i>
<b>pH</b>	Potentiel d'Hydrogène
<b>QD</b>	Quinupristine/Dalfopristine
<b>QUAST</b>	<i>Quality Assessment Tool for Genome Assemblies</i>
<b>R</b>	Resistant
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
<b>RAxML</b>	<i>Randomized Axelerated Maximum Likelihood</i>
	recommandations Vétérinaires
<b>RIF</b>	Rifamycine
<b>S</b>	Susceptible
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Sak</b>	Staphylokinase
<b>SAL1</b>	<i>S. aureus</i> lipase 1
<b>SAL2</b>	<i>S. aureus</i> lipase 2
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
<b>SASM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méthicilline
<b>SCC</b>	<i>Staphylococcus Cassette Chromosome</i>
<b>SCCmec</b>	Cassette chromosomique staphylococcique
<b>SCoN</b>	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative
<b>SCoP</b>	<i>Staphylococcus</i> à coagulase positive
<b>SCT</b>	Syndrome du Choc Toxique
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphisme</i> (polymorphisme d'un seul nucléotide)
<b>SOLiD</b>	<i>Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection</i>
<b>Spa</b>	Protéine Staphylocoque A
<b>ST</b>	<i>Sequence Type</i> (Type de séquence)
<b>SXT</b>	Sulfaméthoxazole+Triméthroprime
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i> (Cellules T Réceptrices)
<b>TEC</b>	Teicoplanine
<b>TET</b>	Tétracycline

<b>TGC</b>	Tigécycline
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Facteur de nécrose tumorale)
<b>tr/min</b>	Tours par minutes
<b>TSST-1</b>	Toxine du syndrome de choc toxique
<b>UE</b>	Union européenne
<b>USA</b>	United States of America
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>V</b>	Volt
<b>VAN</b>	Vancomycine
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>VISA</b>	<i>Vancomycin-Intermediate S. aureus</i> ( <i>S. aureus</i> à résistance intermédiaire à la
<b>VNTR</b>	<i>Variable-Number Tandem Repeat</i>
<b>VRSA</b>	<i>Vancomycin-Resistant S. aureus</i> ( <i>S. aureus</i> résistant à la vancomycine)
<b>vWbp</b>	Protéine de liaison au facteur von Willebrand
<b>WGS</b>	<i>Whole Genome Sequencing</i> (séquençage du génome entier)
<b>μM</b>	Micro molaire
<b>%</b>	Pourcentage
<b>°C</b>	Degré Celsius

*Introduction*

---

*générale*

## Introduction générale

---

*Staphylococcus aureus* est à la fois une bactérie commensale, qui fait partie de la flore naturelle de la peau et des muqueuses des humains et de plusieurs espèces animales, et un pathogène opportuniste capable de causer un large éventail d'infections, allant d'infections superficielles mineures aux infections systémiques graves et souvent mortelles telles que le syndrome du choc toxique (SSTI), la pneumonie, l'endocardite et la septicémie (Tong, *et al.*, 2015). *S. aureus* est également un pathogène zoonotique, capable de se transmettre aux humains, et vice versa (Pal *et al.*, 2023).

L'épidémiologie de *S. aureus* a connue des changements radicaux au cours des dernières décennies, notamment par l'émergence d'un groupe de souches, connues collectivement sous le nom de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Les SARM ont développé une résistance à la méthicilline et à la majorité des antibiotiques  $\beta$ -lactamines suite à l'acquisition du gène *mecA*, qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline (PBP2a) avec une faible affinité pour les antibiotiques  $\beta$ -lactamines, et qui réside sur un élément génétique mobile appelé « Cassette Chromosomique Staphylococcique » (SCC*mec*) (Lakhundi et Zhang, 2018). Bien que les infections à SARM étaient considérées depuis longtemps comme confinées en milieux hospitaliers, elles sont actuellement de plus en plus rencontrées en milieux communautaires et vétérinaires (Tang et Stratton, 2010 ; Tong, *et al.*, 2015). De plus, la majorité des souches de SARM sont connues comme étant multirésistantes, constituant ainsi un défi thérapeutique et une préoccupation majeure en santé publique (Gould *et al.*, 2012).

Alors que la prévalence et l'épidémiologie moléculaire des SARM en Europe et en Amérique du Nord sont largement documentées (Köck *et al.*, 2010) ; en comparaison, les données disponibles en Algérie sont limitées. D'après les données disponibles, il semble que la prévalence des SARM dans notre pays soit en augmentation (Borg *et al.*, 2007 ; Falagas *et al.*, 2013). Les quelques études, basées sur les méthodes conventionnelles de typage, ont permis d'identifier certains clones de *S. aureus*/SARM circulant en Algérie ainsi que les prédominants d'entre eux (Djoudi *et al.*, 2013 ; Antri *et al.*, 2011 ; Ramdani-Bouguessa *et al.*, 2006 ; Djahmi *et al.*, 2013).

Les stratégies de contrôle et de prévention des infections à *S. aureus*/SARM dépendent d'une caractérisation précise des clones en circulation et de l'identification de leurs réservoirs et voies de transmission. De plus, une surveillance continue des changements dans l'épidémiologie des *S. aureus*/SARM est cruciale, car les clones prédominants évoluent continuellement, ce qui pose des défis dans le contrôle de leurs infections (Stefani *et al.*, 2012).

## Introduction générale

---

Le typage moléculaire est un outil important pour les études épidémiologiques des *S. aureus*/SARM et pour le contrôle et la prévention de leurs infections. Il existe différentes méthodes de typage moléculaire pour discriminer les isolats de *S. aureus*/SARM, telles que le typage *SCCmec*, *spa* (gène de la protéine staphylococcique A) et *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) (Stefani *et al.*, 2012). Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients différents, ainsi qu'un pouvoir de résolution différent. Cependant, l'approche basée sur le séquençage du génome entier a révolutionné le typage en offrant un pouvoir discriminant sans précédent. Le séquençage des génomes entiers permet de distinguer entre les isolats d'un pathogène même s'ils diffèrent au niveau d'une seule base nucléotidique (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), et peut donc démontrer, avec un très haut degré de certitude, si les isolats sont étroitement liés les uns aux autres ou non, ce qui ne peut pas être réalisé avec les approches de typage conventionnelles (Jian et Li, 2021). Grâce à l'avènement récent des technologies de séquençage de nouvelle génération, le séquençage des génomes entiers est devenu plus rapide et moins cher ; et c'est pour cette raison que l'approche de typage basée sur le séquençage du génome entier est de plus en plus adoptée comme remplacement des méthodes de typage conventionnelles dans les enquêtes épidémiologiques. Cependant, ce genre d'études fait défaut en Algérie.

Le principal objectif de ce travail de thèse était la caractérisation moléculaire, par séquençage des génomes entiers, d'un groupe de 17 d'isolats cliniques de *S. aureus*/SARM isolés à partir de patients admis dans deux hôpitaux de la Wilaya de Chlef.

Les objectifs secondaires étaient : 1) l'évaluation des liens génétiques entre les isolats par des approches de typage basées sur l'analyse des génomes (*SCCmec*, *Spa*, MLST et SNP) ; 2) la détermination des profils phénotypiques et génotypiques de résistance aux antibiotiques des isolats ; et 3) la détermination des profils génotypiques de virulence des isolats.

*Synthèse*

---

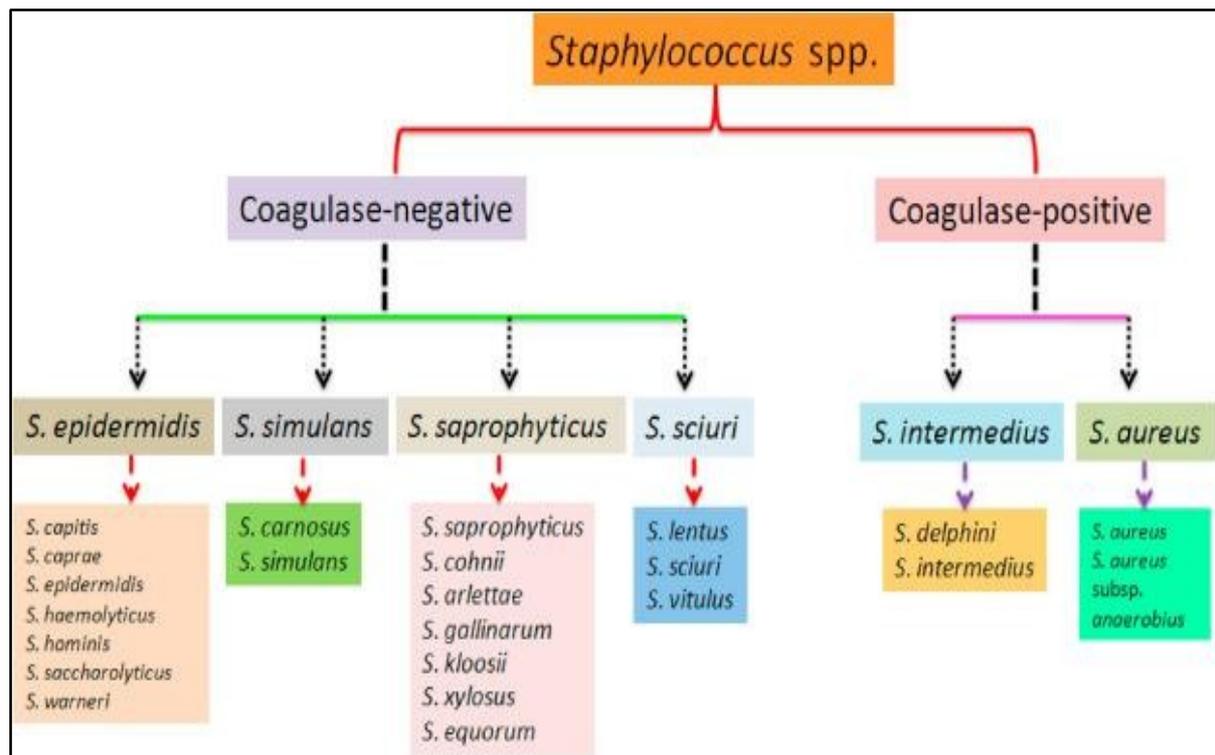
*bibliographique*

### I.1 Découverte et classification taxonomique de *S. aureus*

Les staphylocoques ont été découverts pour la première fois en 1880 dans un pus d'abcès humain par le chirurgien Ecossais Sir Alexander Ogston, qui, après l'observation que ces bactéries apparaissent comme des grappes de raisin, les nomma *Staphylococcus*, qui vient des mots grecques « *Staphylé* », qui signifie grappe de raisin, et "*kokkos*", qui signifie baie (**Ogston, 1881 ; Ogston, 1882**). Quatre ans plus tard (1884), le médecin Allemand Friedrich Rosenbach a pu isoler et cultiver cette bactérie, également à partir d'abcès, et l'a nommé *Staphylococcus aureus*, en raison de la pigmentation dorée de ses colonies (le mot latin « *aureus* » signifie « doré ») (**Rosenbach, 1884**), et pour la distinguer de *Staphylococcus albus* (le mot latin « *albus* » signifie « blanc »), qui a ensuite été renommée *Staphylococcus epidermidis*, en raison de son omniprésence sur la peau humaine (**Licitra, 2013**).

Le genre *Staphylococcus* a été initialement classé dans la famille des *Micrococcaceae*. Plus tard, des analyses moléculaires et phylogénétiques ont révélé que les staphylocoques ne sont plus étroitement liés aux microcoques, et ont été donc classés dans une nouvelle famille, nommée *Staphylococcaceae*, qui appartient à l'Ordre des *Bacillales*, Classe des *Bacilli*, Phylum des *Firmicutes*.

Le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 85 espèces et 30 sous-espèces (**Parte et al., 2020**), qui sont divisées en deux groupes, en fonction de la production d'une coagulase, les staphylocoques à coagulase positive (SCoP), qui comprend *S. aureus* et *S. intermedius* (**Figure 1**), et les staphylocoques à coagulase négative (SCoN), tels que *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. hyicus* et *S. lentus* (**Figure 1**) (**Murray et al., 2020; Khusro et Aarti, 2022**).



**Figure 1.** Les staphylocoques à coagulase positive (SCoP) et les staphylocoques à coagulase négative (SCoN) (Khusro et Aarti, 2022).

### I.2 Généralités sur *S. aureus*

Parmi les espèces du genre *Staphylococcus*, *S. aureus* est la plus importante du point de vue médical et vétérinaire. *S. aureus* est à la fois un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et une variété d'espèces animales, et un agent pathogène opportuniste, capable de provoquer une large gamme d'infections chez l'homme et les animaux, allant d'infections superficielles et relativement bénignes aux infections systémiques et potentiellement mortelles, telles que la pneumonie, l'endocardite et la septicémie. *S. aureus* est considérée comme l'un des principaux agents responsables d'infections nosocomiales (Tang et Stratton, 2010). Certaines souches de *S. aureus* sont résistantes à plusieurs antibiotiques, ce qui peut compliquer le traitement. Ainsi, les infections à *S. aureus* constituent un important problème de santé publique majeur dans le monde entier (Otto, 2009 ; Tong et al., 2015).

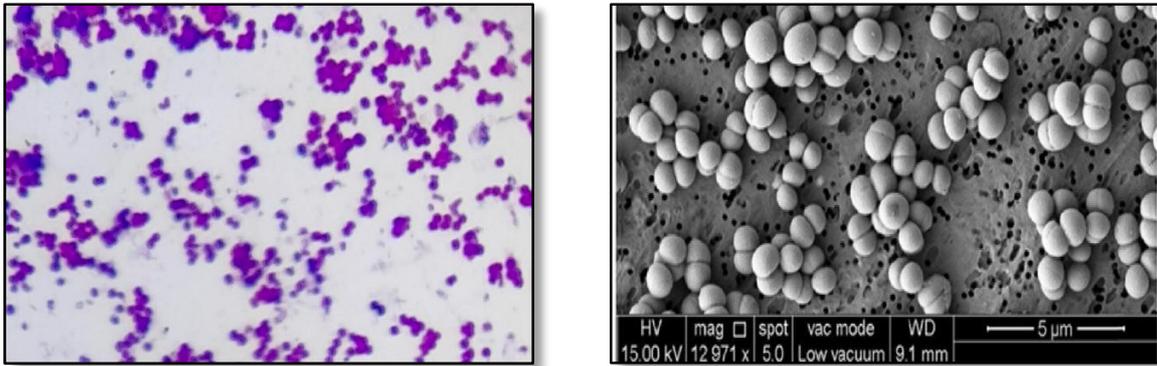
### I.3 Caractères biochimiques et cultureux de *S. aureus*

*S. aureus* est une bactérie à Gram positif, de 0,8 à 1 µm de diamètre, non sporulée, non mobile, qui se présente généralement sous forme de cocci isolés ou groupés en paires, tétrades ou en amas (Figure 2) (Kloos et Schleifer, 1975). *S. aureus* est aéro-anaérobie facultative, oxydase négative, catalase positive, fermentaire et/ou respiratoire (Becker et al., 2015).

La majorité des souches de *S. aureus* produisent une coagulase et une nucléase (**Jacobs et al., 1963 ; Morton et Cohn, 1972 ; Gudding, 1983**).

Sa croissance est optimale à un pH entre 7,0 et 7,5, et une température entre 15 et 45°C.

*S. aureus* est connu pour sa capacité à se développer dans des concentrations élevées de sels, allant jusqu'à 10% de NaCl (**Parfentjev et Catelli, 1964**). Sur milieu solide, les colonies sont rondes, lisses et varient du blanc au jaune.



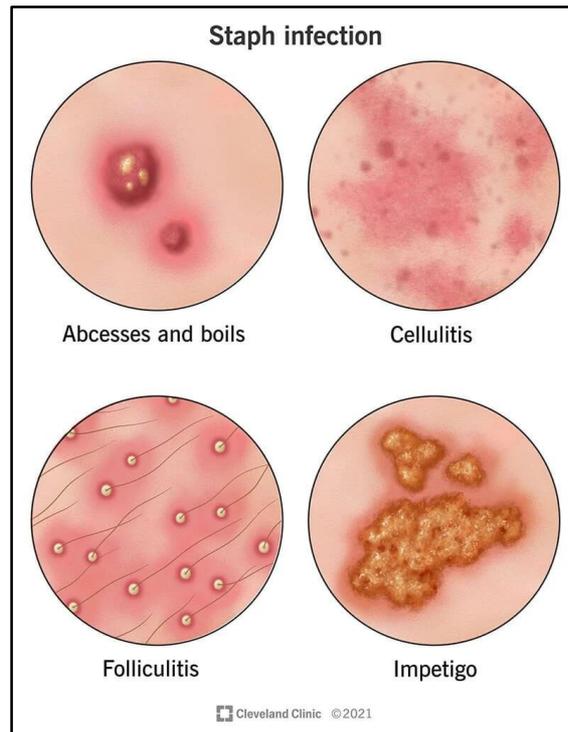
**Figure 2.** (A) : *Staphylococcus aureus* sous microscope optique (coloration de Gram) (G x100) ; (B) : Microscopie électronique à balayage de *S. aureus*. Agrandie 10 000X (Public Health Image Library).

#### I.4 Les infections à *S. aureus*

*S. aureus* peut provoquer diverses infections, allant des infections de la peau et des tissus mous à des infections profondes et systémiques plus graves (**Tong et al., 2015**).

##### I.4.1 Les infections de la peau et des tissus mous

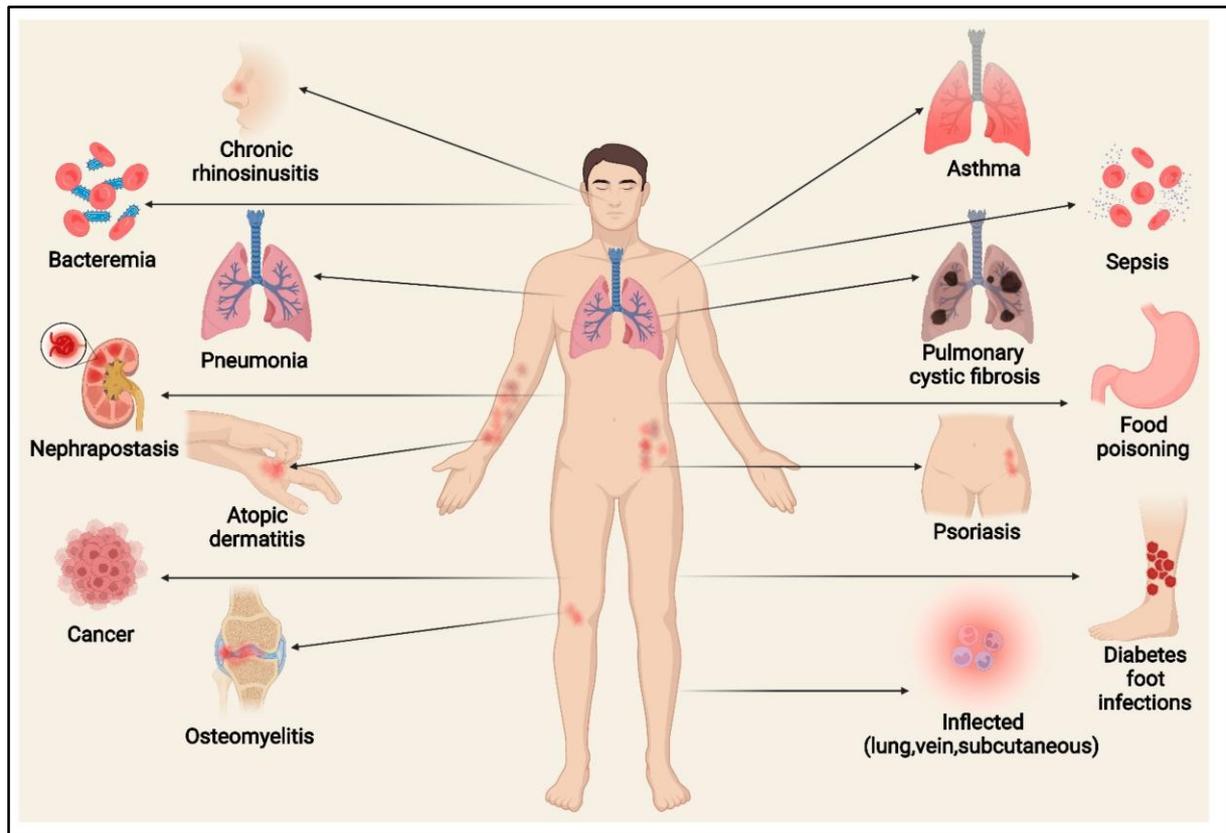
*S. aureus* est responsable de plusieurs infections cutanées notamment l'impétigo, la folliculite, les furoncles et la cellulite (**Figure 3**) (**Tong et al., 2015**).



**Figure 3.** Les infections staphylococciques de la peau et des tissus mous (Public Health Image Library).

#### I.4.2 Les infections profondes et systémiques

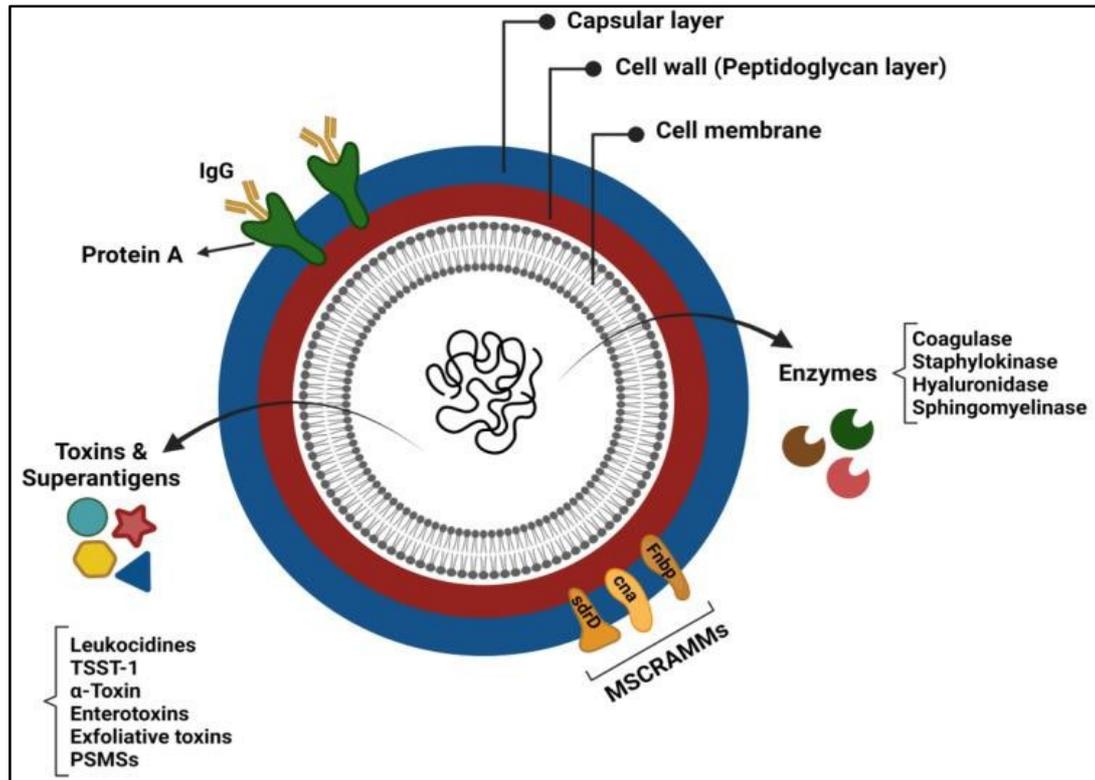
*S. aureus* est responsable de plusieurs infections profondes et systémiques comme l'ostéomyélite, l'endocardite, la pneumonie, l'arthrite, la méningite, la bactériémie et la septicémie (**Figure 4**) ; ainsi que des infections toxiques, qui regroupent le syndrome de la peau ébouillantée, le syndrome de choc toxique et les toxi-infections alimentaires (**Dinges et al., 2000 ; Tong et al., 2015 ; Chen et al., 2022**).



**Figure 4.** Types de maladies systémiques causées par *S. aureus*, y compris les maladies de la peau, les maladies respiratoires, les intoxications alimentaires, les maladies auto-immunes, l'ostéomyélite, les infections du pied diabétique (Chen *et al.*, 2022).

### I.5 Facteurs de virulence de *S. aureus*

Pour causer un grand éventail d'infections, *S. aureus* est capable de produire un grand nombre de facteurs de virulence qui interviennent dans les différentes étapes du processus infectieux (l'adhésion, l'échappement au système immunitaire, la colonisation et l'invasion). Ces facteurs peuvent être catégorisés en facteurs associés à la surface de la paroi cellulaire, en facteurs extracellulaires, ou en biofilms (Figure 5) (Tam et Torres, 2019 ; Cheung *et al.*, 2021).



**Figure 5.** Facteurs de virulence de *S. aureus* (Shaghayegh *et al.*, 2022).

### I.5.1 Facteurs de virulence associés à la surface cellulaire

*S. aureus* est capable d'exprimer plus de 21 protéines de surface différentes. Ces protéines sont collectivement appelées MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Ces protéines jouent un rôle très important dans la capacité de la bactérie à coloniser les tissus de l'hôte, en assurant l'attachement aux cellules, aux composants des matrices extracellulaires ou au plasma sanguin. Les plus importants membres des MSCRAMM sont la protéine staphylococcique A (Spa), la protéine de liaison au collagène (Cna), les protéines de liaison au fibronectine (FnBPA et FnBPB), les protéines de liaison au fibrinogène (ClfA et ClfB) et la protéine de liaison à l'élastine (EbpS) (Speziale *et al.*, 2009 ; Foster *et al.*, 2014).

#### a. La protéine staphylococcique A

La protéine staphylococcique A (Spa) se lie d'une manière non spécifique du fragment constant (Fc) des immunoglobulines G (IgG). Cette liaison permet la création d'une couche de molécules d'IgG (qui sont dans la mauvaise orientation) sur la surface cellulaire. Cette couche d'IgG sert comme moyen de protection contre l'opsonisation et la phagocytose par les cellules du système immunitaire de l'hôte (Kobayashi et DeLeo, 2013 ; Falugi *et al.*, 2013).

**b. La protéine de liaison au collagène**

La protéine de liaison au collagène (Cna) confère à *S. aureus* la capacité de se lier au collagène des tissus conjonctifs (**Madani et al., 2017**).

**c. Les protéines de liaison au fibronectine**

Les deux protéines de liaison à la fibronectine, FnBPA et FnBPB, se lient au fibronectine, favorisant l'adhésion de *S. aureus* aux caillots plasmidiques ainsi qu'aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang tels que les cathéters et les prothèses (**Speziale et Pietrocola, 2020**).

**d. Les protéines de liaison au fibrinogène**

Les protéines de liaison au fibrinogène ClfA et ClfB, également appelées facteurs d'agglutination A et B, sont impliquées dans la liaison au fibrinogène, favorisant l'agrégation des bactéries en présence de plasma (**Foster, 2019**).

**e. La protéine de liaison à l'élastine**

La protéine de liaison à l'élastine de *S. aureus* (EbpS) est responsable de la fixation des cellules bactériennes à l'élastine, une composante majeure des matrices extracellulaires (**Downer et al., 2002**).

**f. Les acides téichoïques**

Les acides téichoïques, sont des composants majeurs de la paroi cellulaire de *S. aureus*. Les acides téichoïques sont soit ancrés dans la membrane plasmique sous forme d'acide lipotéichoïque, soit liés de manière covalente au peptidoglycane sous forme d'acide téichoïque de paroi. Les deux types d'acides téichoïques sont importants dans l'adhésion de *S. aureus* à la surface des cellules de l'hôte (**Van Dalen et al., 2020**).

**g. La capsule polysaccharidique**

*S. aureus* est entourée d'une capsule polysaccharidique qui joue un rôle important dans la colonisation, la pathogenèse et l'évasion de *S. aureus* des défenses immunitaires de l'hôte. Il existe 11 sérotypes de capsules polysaccharidiques identifiés et la majorité de souches expriment des capsules de type 5 (CP5) ou 8 (CP8) (**Visansirikul et al., 2020**).

## I.5.2 Facteurs de virulence extracellulaires

*S. aureus* est capable de sécréter plusieurs facteurs de virulence extracellulaires qui facilitent l'invasion des tissus de l'hôte. Ces facteurs peuvent être divisés en deux groupes, les enzymes extracellulaires et les exotoxines (Shaghayegh *et al.*, 2022).

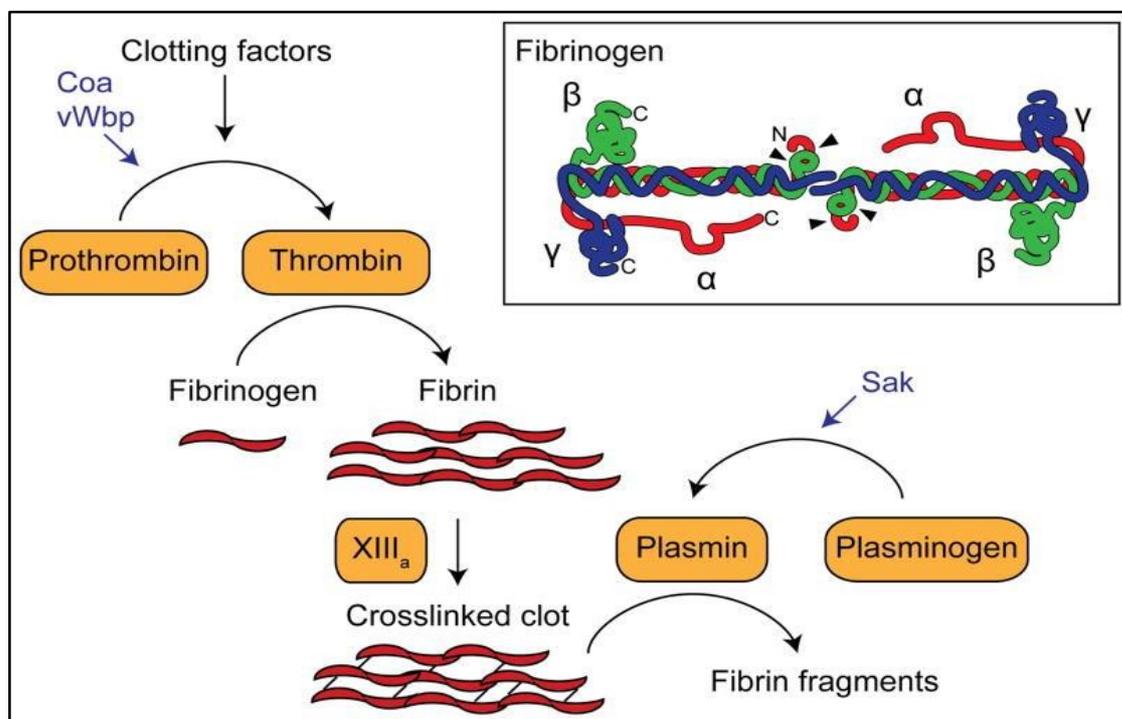
### I.5.2.1 Les enzymes extracellulaires

Les enzymes extracellulaires secrétées par *S. aureus* comprennent des coagulases, une staphylokinase, une hyaluronidase, des protéases, des lipases, des nucléases et une collagénase (Dinges *et al.*, 2000).

#### a. Les coagulases

*S. aureus* sécrète deux protéines qui favorisent la coagulation, la coagulase (Coa) et la protéine de liaison au facteur von Willebrand (vWbp) (McAdow *et al.*, 2012). Ces deux coagulases activent la prothrombine en thrombine, qui à son tour convertit le fibrinogène en fibrine, qui forme des caillots de fibrine (Figure 6), au sein desquels la bactérie se protège contre les mécanismes de défense de l'hôte (Crosby *et al.*, 2016 ; Tam et Torres, 2019).

La coagulase est couramment utilisée au laboratoire comme marqueur d'identification de *S. aureus* (Rakotovao-Ravahatra *et al.*, 2019).



**Figure 6.** Mécanismes d'actions des coagulases, Coa et vWbp, et de la staphylokinase (Sak) de *S. aureus* (Crosby *et al.*, 2016).

**b. La staphylokinase**

La staphylokinase (Sak), appelée également fibrinolysine forme un complexe avec le plasminogène pour activer son activité protéolytique de type plasmine, qui intervient dans la dissolution des caillots de fibrine (**Figure 6**), favorisant ainsi la diffusion des bactéries (**Kwiecinski *et al.*, 2013 ; Crosby *et al.*, 2016 ; Nguyen et Vogel, 2016**).

**c. La hyaluronidase**

C'est une enzyme qui hydrolyse l'acide hyaluronique, qui est un composant de la matrice de tissus conjonctifs, pour faciliter l'invasion de *S. aureus* des tissus de l'hôte (**Makris *et al.*, 2004 ; Buhren *et al.*, 2016**).

**d. Les protéases**

*S. aureus* est capable de produire 12 protéases : une métalloprotéase, deux protéases à cystéine (staphopaïne A et staphopaïne B), et neuf sérine protéases. Ces protéases sont impliquées dans la dégradation d'une variété de protéines de l'hôte pour acquérir les nutriments, et pour contribuer également à la virulence par les dommages qu'elles causent aux tissus de l'hôte et à la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (**Karlsson et Arvidson, 2002 ; Tam et Torres, 2019**).

*S. aureus* produit également une collagénase (une métalloprotéase) impliquée dans la dégradation des matrices extracellulaires des cellules de l'hôte, du fait de sa capacité à digérer le collagène (**Hong-Ki, 2006**).

**e. Les lipases**

La plupart des souches de *S. aureus* sécrètent au moins deux lipases SAL1 et SAL2. Ces lipases, qui diffèrent en termes de leur spécificité au substrat, jouent un rôle dans le métabolisme des lipides et influencent indirectement le processus de pathogénèse, en favorisant la persistance des bactéries dans les sécrétions grasses de la peau et les abcès (**Götz, 1991 ; Götz *et al.*, 1998 ; Tam et Torres, 2019**).

De plus, *S. aureus* produit une phospholipase C qui clive le glycosyl phosphatidylinositol de certaines protéines ancrés à la surface de cellules hôtes, causant des lésions tissulaires (**Lin *et al.*, 2019**).

**f. Les nucléases**

Les nucléases Nuc1 et Nuc2 de *S. aureus* sont des 5'-phosphodiesterases capables d'hydrolyser l'ADN (acide désoxyribonucléique) et l'ARN (acide ribonucléique) simple ou double brin,

provoquant la destruction tissulaire et la propagation de *S. aureus*. La présence d'une activité nucléase est également utilisée comme un marqueur spécifique pour la détection de *S. aureus* au laboratoire (**Blickwede, 2010 ; Berends *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2013**).

### **I.5.2.2 Les toxines**

Les principales exotoxines secrétées par *S. aureus* peuvent être divisées en trois groupes : les cytotoxines, les toxines exfoliatives et les toxines superantigéniques (**Grumann *et al.*, 2014 ; Oliveira *et al.*, 2018 ; Mansour *et al.*, 2021**).

#### **I.5.2.2.1 Les cytotoxines**

Les cytotoxines sont des toxines qui agissent en formant des pores dans la membrane des cellules hôtes, conduisant à la lyse et la mort cellulaire. *S. aureus* produit deux types de cytotoxines, les hémolysines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) et la Leucocidine de Panton Valentine (LPV). Les hémolysines exercent un effet cytolytique sur les leucocytes et les érythrocytes (**Divyakolu *et al.*, 2019**), tandis que la LPV cible principalement les leucocytes et les cellules épithéliales (**Gillet *et al.*, 2002 ; Labandeira-Rey *et al.*, 2007**).

#### **I.5.2.2.2 Les toxines exfoliatives**

Les toxines exfoliatives, aussi appelées exfoliatines ou épidermolysines, sont des sérines protéases qui clivent les cadhérines desmosomiques uniquement dans les couches superficielles de la peau, provoquant la séparation entre les couches superficielles et les couches internes vivantes de l'épiderme, et sont responsables de la manifestation clinique appelée syndrome de la peau ébouillantée (**Ladhani, 2001 ; Ladhani, 2003 ; Plano, 2004 ; Oliveira *et al.*, 2018**).

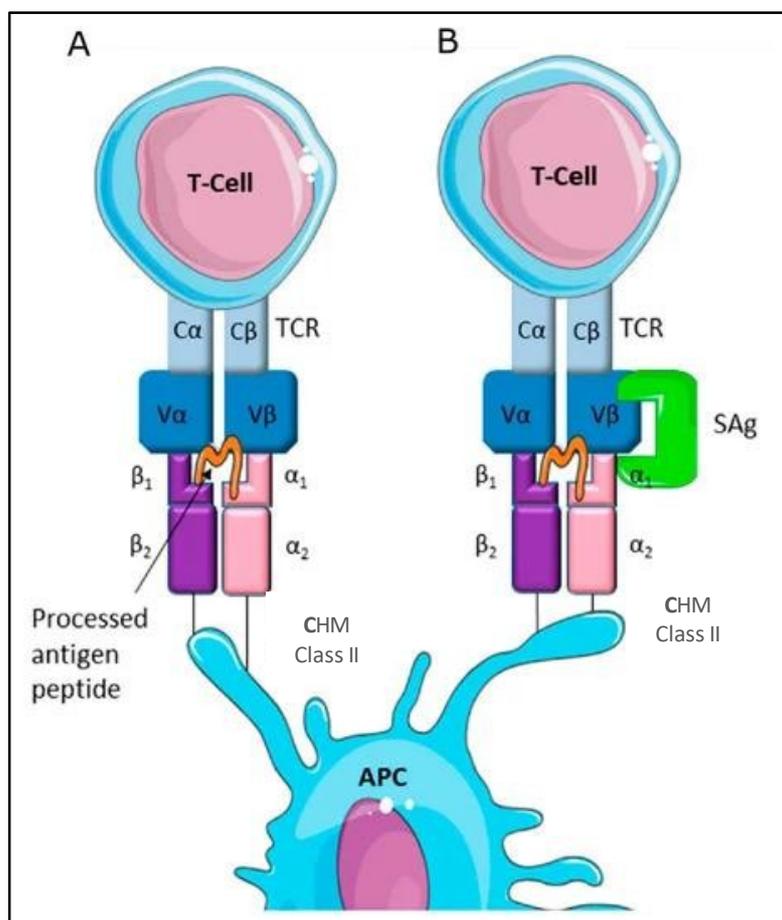
#### **I.5.2.2.3 Les toxines superantigéniques**

Les toxines superantigéniques, ou superantigènes, interfèrent avec le processus immunitaire en formant une liaison avec le complexe d'histocompatibilité majeure de classe II (CHM II) et à la région variable de la chaîne  $\beta$  du récepteur des lymphocytes T (**Figure 7.A**). Cette co-liaison active les lymphocytes T, entraînant la libération d'importantes quantités de cytokines.

*S. aureus* produit deux types de toxines superantigéniques, la toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1) et les entérotoxines staphylococciques.

**a. La toxine du syndrome du choc toxique staphylococcique :** La toxine du Syndrome du Choc Toxique Staphylococcique (TSST-1, *toxic shock syndrome*

*toxin-1*) agit comme un superantigène (SAg) qui forme une co-liaison entre le CHM II sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et aux cellules T réceptrices d'antigène (*T cell receptor*, TCR) (**Figure 7.B**). Cette liaison non spécifique provoque une prolifération polyclonale des lymphocytes T, ce qui entraîne la libération massive de cytokines pro-inflammatoires (interleukine, interféron gamma, TNF alpha et bêta). Cette tempête de cytokines entraîne les symptômes cliniques du Syndrome du Choc Toxique (SCT) Staphylococcique, qui comprennent une forte fièvre, une éruption cutanée, une desquamation, une hypotension artérielle et des troubles vasculaires (**Silversides et al., 2010**).



**Figure 7. Mécanismes d'activation des lymphocytes T :** (A) L'activation conventionnelle des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène (APC) se produit lorsque la cellule présentatrice d'antigène (APC) présentant un peptide antigénique traité sur la molécule du CHM de classe II qui, à son tour, est présenté à un récepteur de lymphocytes T (TCR) spécifique ; et (B) L'activation non conventionnel des lymphocytes T se produit lorsque le SAg se lie au CHM de classe II en dehors du site de présentation de l'antigène et de la chaîne bêta variable ( $V\beta$ ) du récepteur des lymphocytes T. Cette association de trois protéines, *S. aureus* Sag, CHM de classe II, et la chaîne  $\beta$  du TCR, déclenche l'activation incontrôlée des lymphocytes T (**Tuffs et al., 2018**).

### b. Les entérotoxines

Les entérotoxines sont responsables d'intoxications alimentaires staphylococciques, provoquant les diarrhées et les vomissements en cas d'ingestion d'aliments contaminés par cette toxine. Comme la TSST-1, les entérotoxines peuvent aussi agir comme superantigènes (Stewart, 2003 ; Bhatia et Zahoor, 2007 ; Argudín *et al.*, 2010).

### I.5.2.3 Autres facteurs de virulence

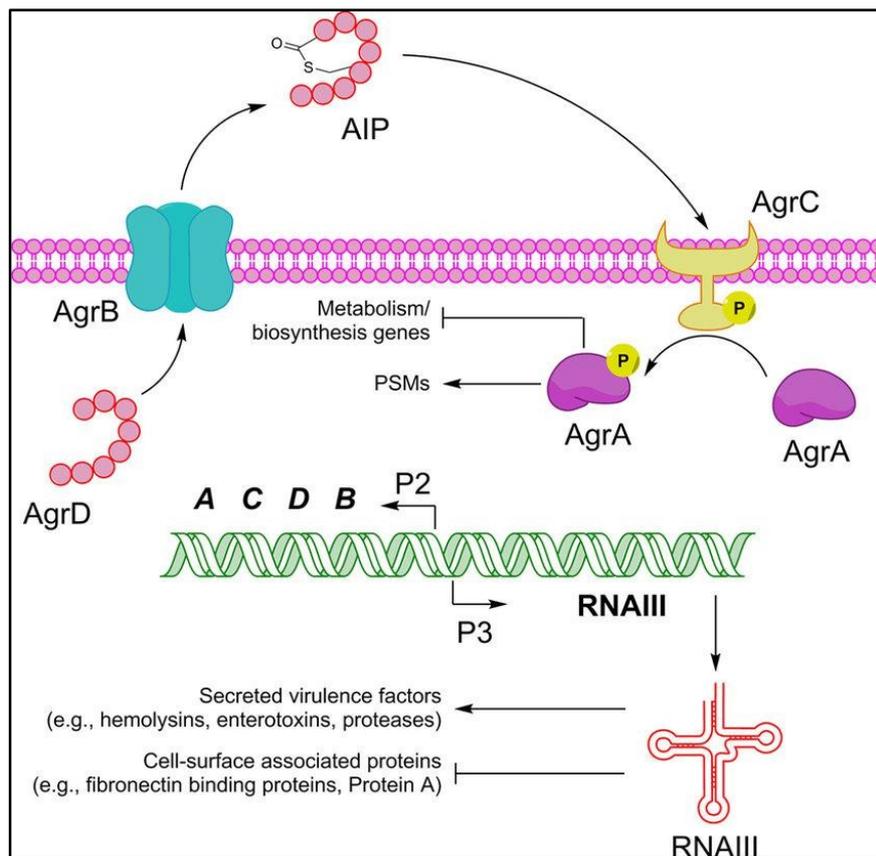
#### a. Les biofilms

Les biofilms sont des communautés bactériennes organisées et intégrées dans une matrice de substances polymères extracellulaires composée de polysaccharides et de protéines sécrétées par les bactéries. Les biofilms se développent en quatre étapes principales : adhésion, prolifération, maturation et détachement. Les biofilms peuvent se former sur des surfaces biotiques (tissus et matrices extracellulaires) et abiotiques (dispositifs médicaux tels que les sondes, les prothèses et les implants). Le biofilm est un facteur de virulence, qui offre un environnement interne stable, au sein duquel les bactéries sont protégées contre les défenses du système immunitaire de l'hôte, favorisant l'établissement et la persistance de l'infection, particulièrement sur les implants chirurgicaux (Archer *et al.*, 2011 ; Parastan *et al.*, 2020).

De nombreuses souches de *S. aureus* sont capables de former des biofilms qui leur permettent d'adhérer aux tissus tissulaires de l'hôte et aux dispositifs médicaux et de se protéger contre les attaques par les cellules phagocytaires, favorisant ainsi la persistance de leur infection (Archer *et al.*, 2011 ; Parastan *et al.*, 2020).

### I.5.2.4 Régulation de la virulence chez *S. aureus*

L'expression de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus* est régulée par un système de *quorum sensing*, appelé régulateur des gènes accessoires *agr* (*accessory gene regulator*) (Le, et Otto, 2015 ; Jenul et Horswill, 2019). Les gènes codant ce régulateur global forment un opéron constitué de quatre gènes *agrA*, *agrB*, *agrC* et *agrD* (Figure 8). Le gène *agrD* code pour un auto-inducteur peptidique (AIP, *autoinducer peptide*). Le gène *agrB* code pour une protéine membranaire responsable de la modification de l'AIP et son transport au milieu extracellulaire. Le gène *agrC* code pour une histidine kinase membranaire réceptrice de l'AIP et le gène *agrA* code pour le régulateur de réponse, qui active la transcription des gènes sous le control du système *agr* (Le, et Otto, 2015 ; Jenul et Horswill, 2019).



**Figure 8.** Schéma du système de régulation de gènes accessoires (*agr*) de *S. aureus* (Salam et Quave, 2018).

### I.6 Le génome de *S. aureus*

Le génome de *S. aureus* est d'une taille d'environ 2,8 Mega bites (Mb), avec un contenu en GC d'environ 33% et contient environ 2800 gènes.

Comme tous les autres génomes bactériens, le génome de *S. aureus* peut être également divisé en deux parties : une partie hautement conservée chez toutes les souches d'une même espèce, appelée le génome cœur (*Core genome* en Anglais) et une partie variable entre les souches, appelée le génome accessoire, qui contribue à la diversité génétique de l'espèce bactérienne. Le génome cœur comprend les gènes essentiels (gènes de ménage), qui codent pour les fonctions essentielles, comme le métabolisme central, la réplication, la transcription, etc...

Par contre, le génome accessoire est constitué de gènes qui codent pour des fonctions non-essentiels, comme le métabolisme secondaire, la virulence et la résistance aux antibiotiques. Les gènes du génome accessoire sont généralement localisés sur des éléments génétiques mobiles (EGM) tels que les bactériophages, les plasmides, les transposons, les îlots de pathogénicité et les cassettes chromosomiques, qui peuvent être transférés horizontalement entre les cellules via conjugaison, transduction ou transformation (Jackson *et al.*, 2011).

Le génome cœur de *S. aureus* constitue environ 75% du génome total de *S. aureus*, tandis que le génome accessoire occupe les 25% restant du génome (Lindsay et Holden, 2004 ; Lindsay, 2014).

## I.7. Épidémiologie de *S. aureus*

### I.7.1 Réservoirs de *S. aureus*

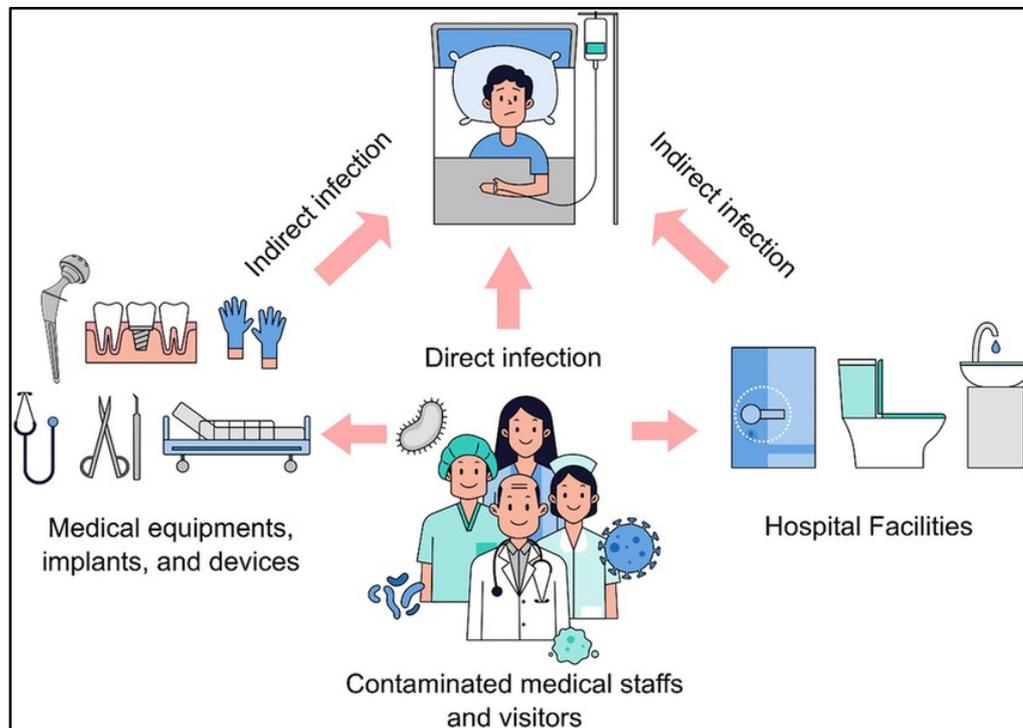
Le principal réservoir de *S. aureus* est la peau et les muqueuses de l'homme et plusieurs espèces animales. Bien que divers sites corporels puissent être colonisés par *S. aureus*, la cavité nasale, est le principal site de portage de *S. aureus* chez l'homme. *S. aureus* colonise principalement la partie antérieure de la cavité nasale ; néanmoins, les narines postérieures pourraient aussi être colonisées (Weidenmaier *et al.*, 2012). Trois types de portage nasal de *S. aureus* peuvent être distingués dans la population adulte en bonne santé : ~20 % des individus sont des porteurs persistants, ~30 sont des porteurs transitoires et ~50 % sont des non-porteurs (Wertheim *et al.*, 2005 ; Sakr *et al.*, 2018 ; Olsen *et al.*, 2013). Cette bactérie est aussi omniprésente dans l'environnement tels que les surfaces, les sols, les eaux et les aliments (Smith *et al.*, 2010).

### I.7.2 Modes de transmission de *S. aureus*

La transmission de *S. aureus* s'effectue essentiellement soit par la voie directe, par contact entre sujets (humains ou animaux) colonisés ou infectés, principalement par l'intermédiaire des mains contaminées ; ou par la voie indirecte, à partir de l'environnement, par contact avec des objets et surfaces contaminés (Denis, 2017). La transmission peut également se produire via des gouttelettes dans l'air, suite à une dispersion par le nez ou la bouche d'un porteur (Gehanno *et al.*, 2009 ; Denis, 2017). Le portage nasal de *S. aureus*, chez l'homme et les animaux, contribue énormément à la transmission de *S. aureus* vers d'autres surfaces corporelles au sein du même hôte, vers d'autres hôtes ou vers des surfaces abiotiques. Le portage nasal de *S. aureus* est un important facteur de risque d'infections par ce pathogène. Il a été estimé que les porteurs nasaux de *S. aureus* sont jusqu'à dix fois plus susceptibles de développer une infection à *S. aureus* que les non-porteurs (Wertheim *et al.*, 2005 ; Sivaraman *et al.*, 2009).

En milieux hospitaliers, les patients risquent de contracter *S. aureus* à partir d'autres patients, des visiteurs ou du personnel de soins, ou par contact avec des objets et surfaces contaminés (Figure 9). Des études ont rapporté que le personnel de soins ayant des contacts rapprochés et prolongés avec les patients présente des taux de portage nasal de *S. aureus* plus élevés que

ceux de la population générale (Lena *et al.*, 2021 ; Shih *et al.*, 2021). Le personnel de soins peut transmettre *S. aureus* directement ou indirectement aux patients, par l'intermédiaire des mains contaminées ou par dispersion aérienne (toux) ou par dispersion de cellules cutanées (Gehanno *et al.*, 2009 ; Denis, 2017).



**Figure 9.** Voies de transmission de *S. aureus* en milieux hospitaliers (Puspasari *et al.*, 2022).

### I.7.3 Facteurs de risques d'infection à *S. aureus*

Il existe un grand nombre de facteurs de risques qui favorisent le développement des infections à *S. aureus*. Parmi ces facteurs on peut citer entre autre le portage nasal, l'âge avancé, l'immunodépression, la présence de maladies chroniques sous-jacentes, l'hospitalisation prolongée, la présence de plaies chirurgicales, la présence de dispositifs médicaux tels que les cathéters et les sondes urinaires ; certains groupes de professions comme les travailleurs de la santé, les éleveurs, les vétérinaires et les personnes vivant dans des lieux collectifs à forte densité humaines (le personnel militaire et les prisonniers) ou ayant une mauvaise pratique d'hygiène (Wertheim *et al.*, 2005 ; Tong *et al.*, 2015).

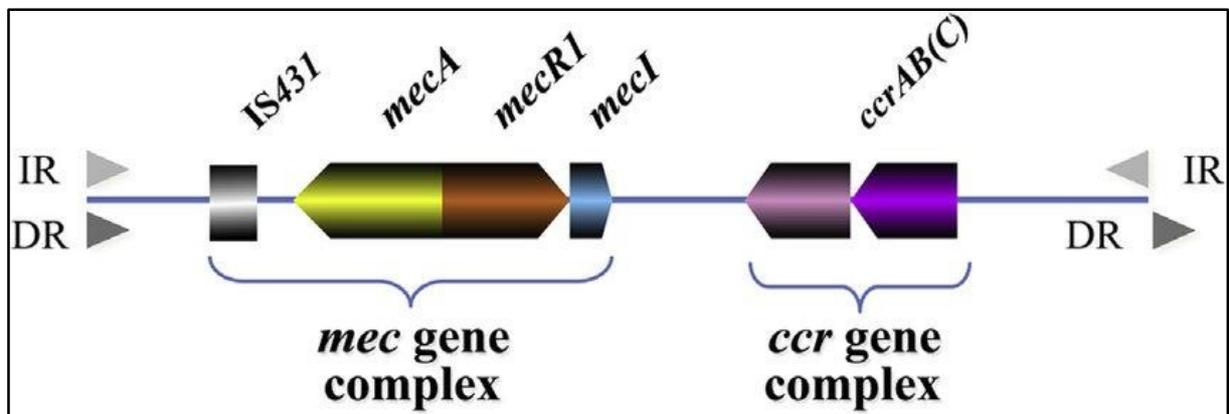
### I.7.4 Émergence de *S. aureus* résistant à la méthicilline

L'épidémiologie de *S. aureus* a connu un changement important en 1961, suite à l'émergence d'une nouvelle souche de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) en Angleterre, peu de temps après l'introduction de l'antibiotique méthicilline (une pénicilline semi-synthétique) dans la pratique clinique. La résistance des SARM à la méthicilline est due à l'acquisition d'un

gène *mecA*, qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline supplémentaire appelée PBP2a. La PBP2a présente une faible affinité pour la plupart des pénicillines semi-synthétiques, et confère une résistance à la plupart des  $\beta$ -lactamines antibiotiques, y compris la méthicilline, l'oxacilline et les céphalosporines.

Le gène *mecA* est porté par un élément génétique mobile localisé dans le chromosome, appelé cassette chromosomique staphylococcique (SCC*mec*) (Hiramatsu *et al.*, 2001 ; Mediavilla *et al.*, 2012).

Les principaux composants de l'élément SCC*mec* sont les complexes de gènes *mec* et *ccr*, qui contiennent des gènes responsables de la résistance à la méthicilline et de la mobilité de l'élément SCC*mec*, respectivement (Figure 10).



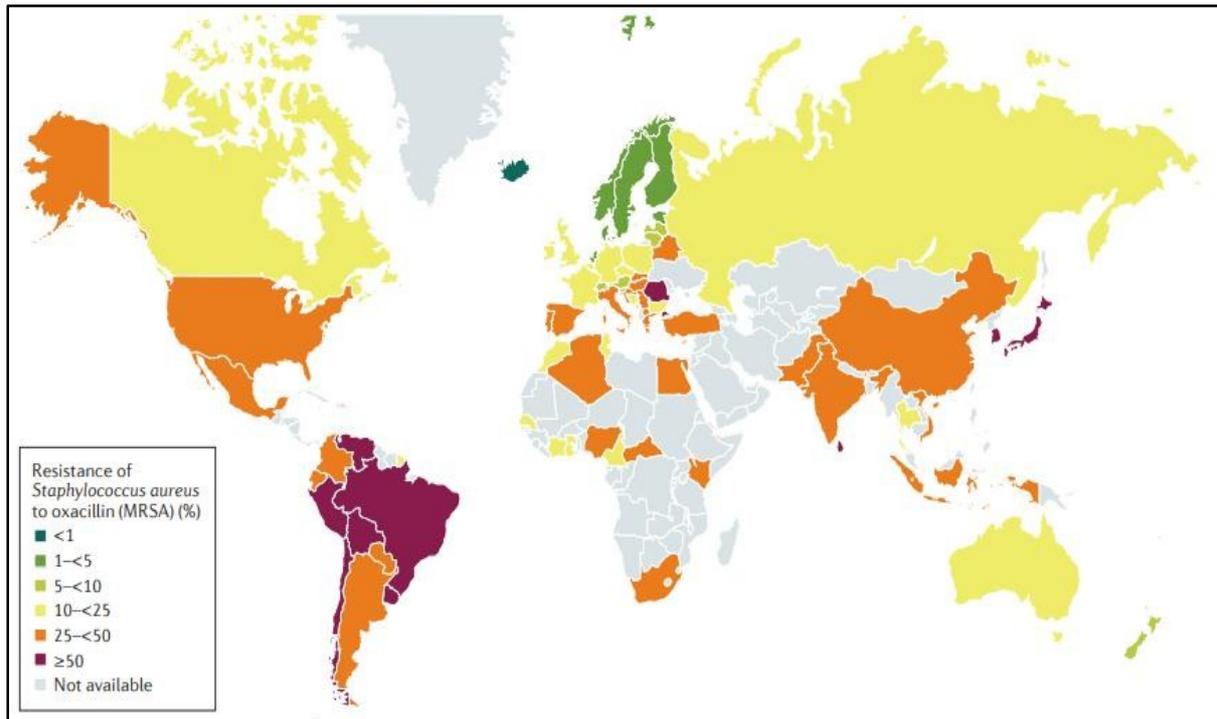
**Figure 10.** La structure de l'élément SCC*mec*. SCC*mec* est composé de deux principaux complexes génétiques : 1) le complexe gène *mec*, qui comprend le gène *mecA*, codant pour la résistance à la méthicilline, et ses gènes régulateurs (*mecI* et *mecR1*) ; et 2) le complexe gène *ccr* qui comporte les gènes (*ccrA*, *ccrB* ou *ccrC*) qui codent pour le mouvement du SCC*mec* en entier (intégration et excision précise du chromosome). IR, répétition inversée ; DR, répétition directe (Hiramatsu *et al.*, 2014).

#### I.7.4.1 Les différents groupes de SARM

##### a. SARM d'origine hospitalière

Au cours de la décennie qui a suivi son apparition, le SARM est devenu prédominant en milieux hospitaliers, causant plusieurs épidémies hospitalières dans plusieurs régions du monde ; et c'est pour cette raison qu'il a été nommé SARM associé aux hôpitaux, ou HA-SARM (*Healthcare-Associated MRSA*) (Lee *et al.*, 2018). La prévalence du HA-SARM variait considérablement d'un pays à un autre, allant de <5 % en Scandinavie à > 50 % en Amérique et en Asie (Figure 11) ; ainsi qu'au sein d'un même pays, en raison de plusieurs facteurs, y compris les différences dans les pratiques locales de contrôle des infections et les caractéristiques spécifiques des clones de HA-SARM en circulation (Lee *et al.*, 2018).

De plus, certains clones de HA-SARM ont acquis des résistances à plusieurs autres classes d'antibiotiques, compliquant d'avantage les options de traitement pour ce pathogène. Par conséquent, les infections à HA-SARM sont devenues un problème de santé publique majeur en raison des taux de morbidité et de mortalité élevés et des coûts associés à ces infections chaque année. En 2017, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a publié la liste prioritaire mondiale des bactéries résistantes aux antibiotiques dans lesquelles le HA-SARM occupait la haute priorité (Tacconelli *et al.*, 2018).



**Figure 11.** Prévalence mondiale des SARM (Lee *et al.* 2018).

### b. SARM d'origine communautaire

Suite à l'émergence et la dissémination des HA-SARM, l'épidémiologie de *S. aureus* a connu encore une fois des changements spectaculaires, en particulier dans les années 1990, avec une augmentation du nombre d'infections par de nouveaux clones de SARM chez des individus sains et qui n'ont pas d'antécédents récents d'hospitalisation. Puisque ces SARM sont acquis dans la communauté et ne sont pas liées au milieu hospitalier, ils ont été dénommés SARM d'origine communautaire ou CA-SARM (*Community-Associated MRSA*). Les cas de CA-SARM sont maintenant signalés dans le monde entier et leur nombre est en augmentation (Kluytmans-Vanden Bergh et Kluytmans, 2006 ; Lakhundi et Zhang, 2018).

Il a été démontré que les lignées CA-SARM sont des HA-SARM du point de vue épidémiologique, génotypique et phénotypique. Les souches de CA-SARM portent différent

types de SCC<sub>mec</sub> (de type IV, V et VII) et produisent la toxine PVL (Gillet *et al.*, 2002), et sont considérés comme plus virulents que les souches de HA-SARM. Les CA-SARM sont l'une des principales causes du SCT et de cas de septicémie (Vandenesch *et al.*, 2003). De plus, les CA-SARM ont la capacité de se propager plus facilement que les HA-SARM (Skov *et al.*, 2012).

Cependant, il est important de noter que la classification traditionnelle des SARM en HA-SARM et CA-SARM est en train de devenir non pertinente, car les clones considérés comme CA-SARM sont devenus liés aux milieux hospitaliers et vice versa (Chavez et Decker, 2008; Otter et French, 2011).

### c. SARM d'origine animale

En plus de HA-SARM et CA-SARM, un troisième groupe de SARM a été isolé pour la première fois dans le lait de vaches laitières atteintes de mammite en Belgique au début des années 1970 (Grema *et al.*, 2015). Au cours des années qui suivent, un nombre croissant d'études ont démontré que ce groupe de SARM est capable de coloniser ou infecter plusieurs espèces animales, comme les chiens, les chats, les chevaux, les ovins et les porcs (Leonard et Markey, 2008 ; Cuny *et al.*, 2010 ; Fetsch *et al.*, 2021). Ces clones de SARM, qui sont différents des SARM humains, ont été communément appelés SARM associés aux animaux ou LA-SARM (*livestock-associated MRSA*) (Cuny *et al.*, 2010 ; Peton *et al.*, 2014).

Les clones de LA-SARM peuvent coloniser les animaux d'une manière asymptomatique, comme ils peuvent provoquer des infections de la peau et des tissus mous ou des infections graves chez certains animaux. Les clones de LA-SARM sont une cause majeure de mammite chez les vaches laitières, entraînant des pertes économiques importantes pour l'industrie laitière. Ils sont aussi une cause fréquente des infections des plaies chez les animaux de compagnie (chiens, chats et chevaux) (Fetsch *et al.*, 2021).

Les animaux colonisés ou infectés peuvent servir de réservoir à partir desquels les souches de LA-SARM peuvent être transmises entre les différentes espèces animales et aux humains, particulièrement ceux qui sont en contact étroit avec les animaux, comme les vétérinaires et les éleveurs. Cette transmission animal-homme souligne l'importance de *S. aureus* comme pathogène zoonotique, qui peut poser de réels problèmes en médecine vétérinaire et en agriculture (Leonard et Markey, 2008 ; Cuny *et al.*, 2010).

#### d. *S. aureus* résistant à la vancomycine

L'utilisation accrue et non contrôlée de la vancomycine dans le traitement des infections à SARM a favorisé l'émergence de SARM résistant à la vancomycine à la fin des années 1990 (Figure 12) (CDC, 2002). *S. aureus* présente deux formes de résistance à la vancomycine, *S. aureus* à résistance intermédiaire à la vancomycine (*Vancomycin-Intermediate S. aureus*, VISA) et *S. aureus* résistant à la vancomycine (*Vancomycin-Resistant S. aureus*, VRSA). L'émergence de la résistance à la vancomycine chez *S. aureus* constitue un grand problème thérapeutique, étant donné l'utilisation généralisée de cet antibiotique dans le traitement des infections à SARM (Appelbaum, 2006 ; Cong *et al.*, 2020).

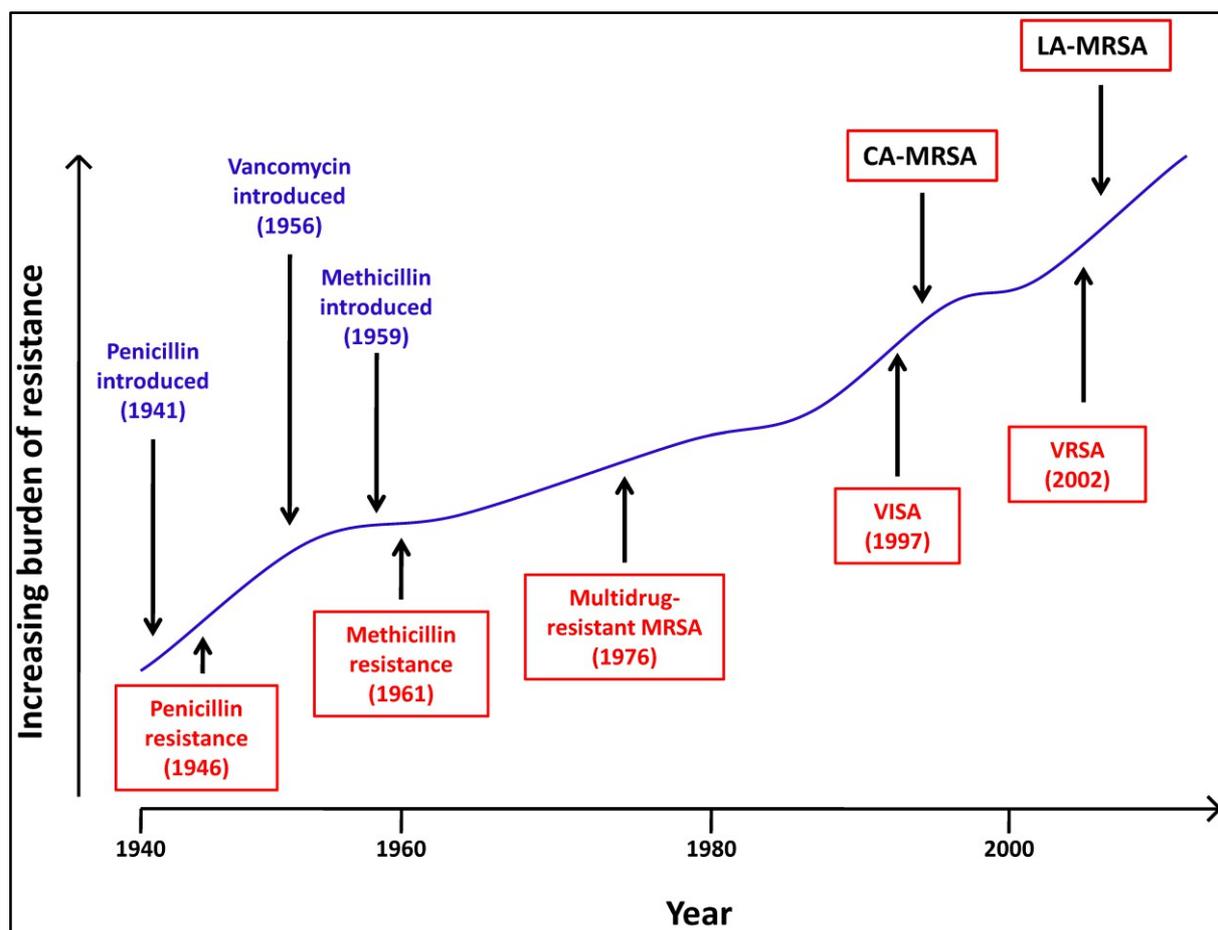


Figure 12. L'émergence de la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* (Schmidt, *et al.*, 2015).

#### I.8 Caractérisation des souches de *S. aureus* par typage moléculaire

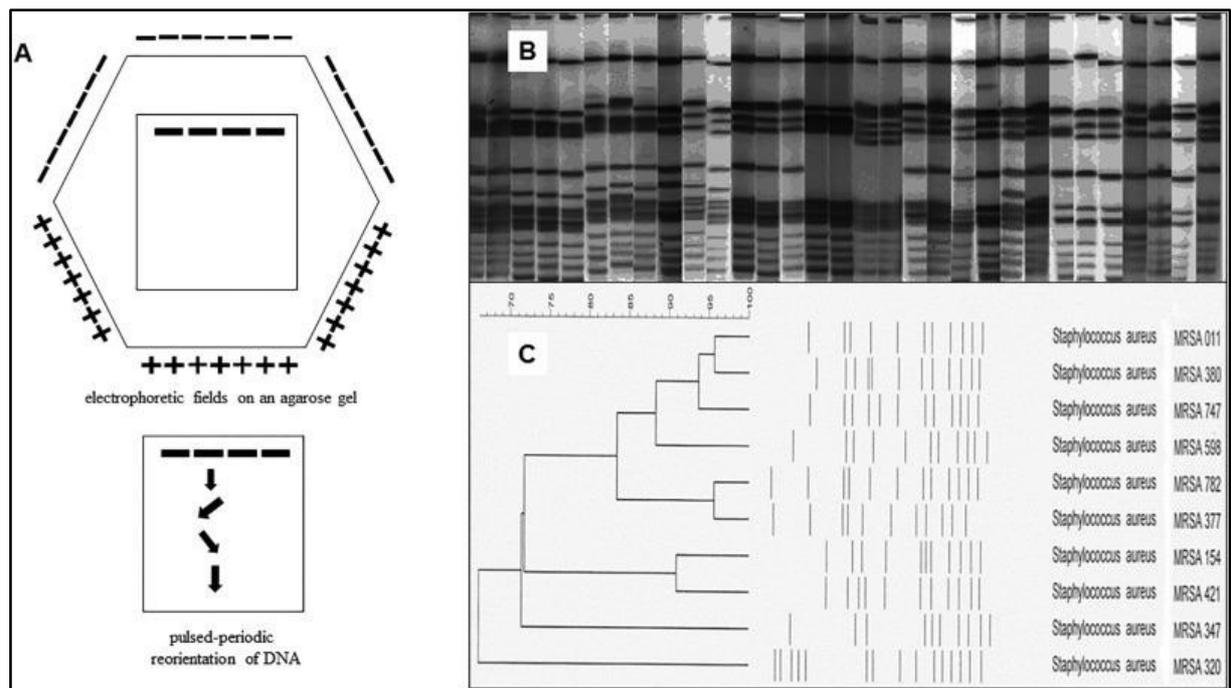
Le but du typage est de distinguer les souches au sein d'une même espèce, d'évaluer leurs caractéristiques génétiques et d'analyser leurs liens de parenté. Le typage est une tâche très importante et essentielle, tant sur le plan clinique qu'épidémiologique, pour déterminer les

souches responsables de l'infection ou de l'épidémie, d'identifier leurs réservoirs, sources et modes de transmission lors des épidémies. Plusieurs méthodes moléculaires sont disponibles pour le typage *S. aureus*, notamment *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis* (MLVA), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Multilocus Sequence Typing* (MLST), typage du gène *spa* et typage de la cassette *SCCmec* (Trindade *et al.*, 2003 ; Stefani *et al.*, 2012).

Bien que toutes ces méthodes de typage soient applicables à *S. aureus*, néanmoins elles diffèrent dans leur pouvoir discriminant, rapidité, coût d'exécution et reproductibilité. Pour cette raison, il est courant de combiner plusieurs méthodes, en fonction de l'objectif de chaque étude.

#### a. L'électrophorèse en champ pulsé

Dans la technique PFGE, l'ADN chromosomique des bactéries est immobilisé dans des bouchons d'agarose où il est digéré par une enzyme de restriction, dont les sites de coupure sur l'ADN sont rares, produisant des fragments d'ADN de grandes tailles, allant de 10 Kilo bases (Kb) à 800 Kb. Ces Fragments d'ADN sont alors séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose avec des changements périodiques de l'orientation du champ électrique à travers le gel (**Figure 13**). Les profils de bandes obtenus (le nombre de bandes et leurs tailles) sont ensuite comparés. Les isolats qui ont très peu de différence de bandes entre eux sont considérés comme étroitement liés. Tandis que les isolats qui ont beaucoup de différences de bandes entre eux sont considérés comme non liés (Tenover *et al.*, 1995 ; Herschleb *et al.*, 2007 ; Ostojić, 2008).



**Figure 13.** Schéma de typage par PFGE. **A)** Les fragments d'ADN obtenus après digestion avec une enzyme de restriction, sont séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose avec des changements périodiques de l'orientation du champ électrique. **B)** Exemple de profils de bandes d'ADN obtenus. **C)** Dendrogramme construit sur la base des différences entre les profils de bandes (Neoh *et al.*, 2019).

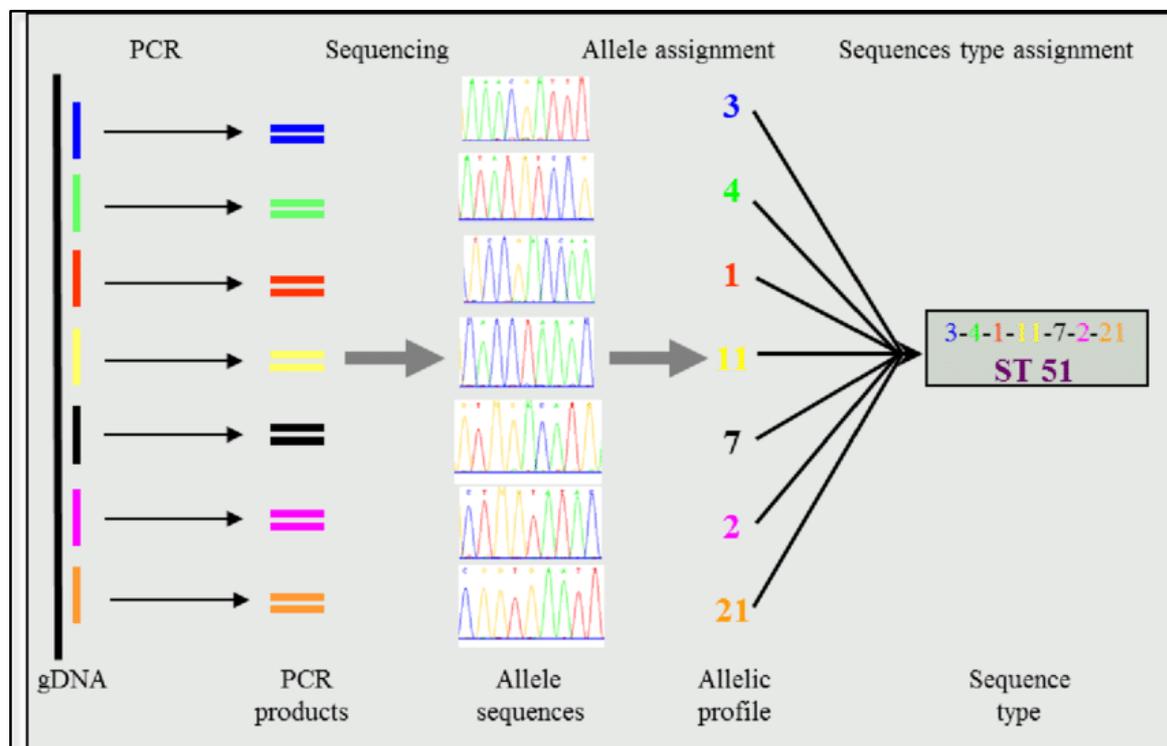
#### b. Multi-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)

La technique MLVA est basée sur l'amplification par PCR (*polymerase Chain reaction*) multiplexe de plusieurs régions dans le génome appelées répétitions en tandem variable en nombre (VNTR, *Variable-Number Tandem Repeat*). Chaque VNTR est formée de plusieurs répétitions en tandem. Les amplicons sont séparés par électrophorèse capillaire, et leurs tailles sont analysées. La taille d'une bande d'ADN est proportionnelle au nombre de répétitions en tandem dans un VNTR. L'ensemble des bandes d'ADN forme un profil MLVA. Les profils MLVA des isolats sont analysés et comparés (Nadon *et al.*, 2013 ; Neoh *et al.*, 2017).

#### c. Multilocus Sequence Typing (MLST)

La MLST est une méthode de typage hautement discriminatoire, qui est basée sur l'amplification et le séquençage des régions internes de sept gènes de ménages qui sont conservés chez *S. aureus*, *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL* (Figure 14). Les séquences sont comparées aux séquences stockées dans la base données *S. aureus* MLST (<http://saureus.mlst.net/sql/sthtml.asp>). Un numéro d'allèle (chiffre) est attribué à la séquence de chaque gène, puis les sept numéros d'allèles sont combinés pour produire un

profil allélique (une série de 7 chiffres) ; et enfin, un type de séquence (ST, *Sequence Type*) est attribué à chaque profil allélique de la souche (**Enright *et al.*, 2000 ; Saunders et Holmes, 2014**). Par exemple, dans la base de données *S. aureus* MLST, le profil allélique : 3-4-1-11-7-2-21, est attribué au ST51 (**Figure 14**).

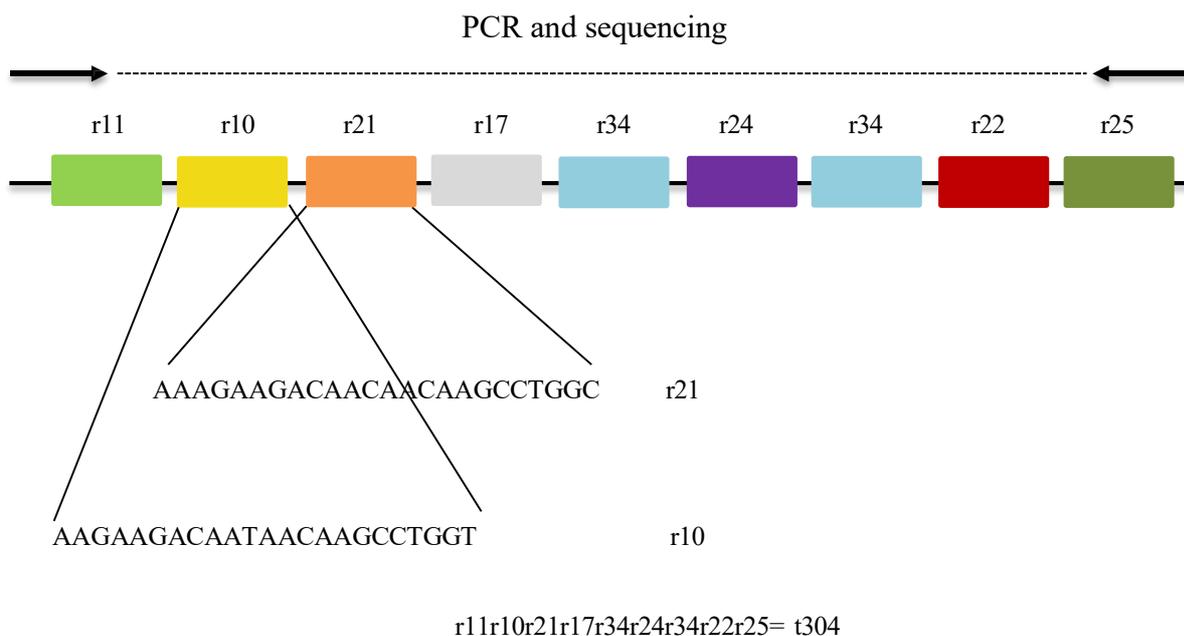


**Figure 14.** Schéma de typage par MLST. Après séquençage de sept gènes de ménage d'une souche, les séquences sont soumises à la base de données MLST. Des numéros d'allèles sont attribués aux séquences uniques et la combinaison des numéros d'allèles obtenus est assignée à un type de séquence (ST) distinct (**Ruppitsch, 2016**).

#### d. Le typage Spa

Le typage spa consiste en l'amplification par PCR et le séquençage de la région X polymorphe de la protéine staphylococcique A (Spa), qui est constituée d'un nombre variable de répétitions de 24 paires de bases (pb) flanquées de régions bien conservées (**Figure 15**).

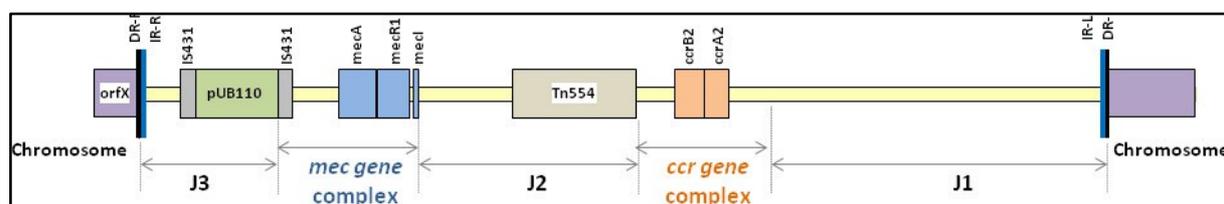
Les séquences de ces répétitions sont comparées à la liste de toutes les séquences répétées connues à l'aide du server Ridom ou Bionumerics, où un code alphanumérique est attribué à chaque répétition, par exemple, r04, r20, r17, etc ..., puis ces codes alphanumériques individuels sont combinés (selon le nombre des unités répétitives et leurs ordre dans la région X) en un seul code alphanumérique (r04r20r17r20r34), qui sera enfin assigné à un type de spa de l'isolat, par exemple, t2906 (**Strommenger *et al.*, 2008 ; Hallin *et al.*, 2009**).



**Figure 15.** Présentation schématique du typage spa des isolats de *S. aureus*. Après amplification et séquençage de la région X du gène spa, qui contient des unités de répétition (présentées par couleurs), la séquence est analysée à l'aide d'un serveur, qui donne lieu à un code alphanumérique pour les unités répétitives et enfin pour un type de spa de la souche.

#### e. Le typage SCCmec

L'élément génétique mobile SCCmec est composé de trois régions: (i) le complexe de gènes *mec*, qui comprend le gène *mec* (A ou C, codant pour la résistance à la méthicilline), ses gènes régulateurs (*mecI* et *mecR1*) et des séquences d'insertion (IS431 or IS1272) ; (ii) le complexe de gènes *ccr*, qui comprend un ou plusieurs gène(s) *ccr* (*ccrA*, *ccrB* ou *ccrC*) ; et (iii) trois régions J (J1, J2 et J3), qui constituent des composants non essentiels de l'élément SCCmec (Figure 16) ; cependant, ces régions peuvent porter des gènes supplémentaires de résistance aux antibiotiques (Hanssen et Ericson, 2006 ; Uehara, 2022).



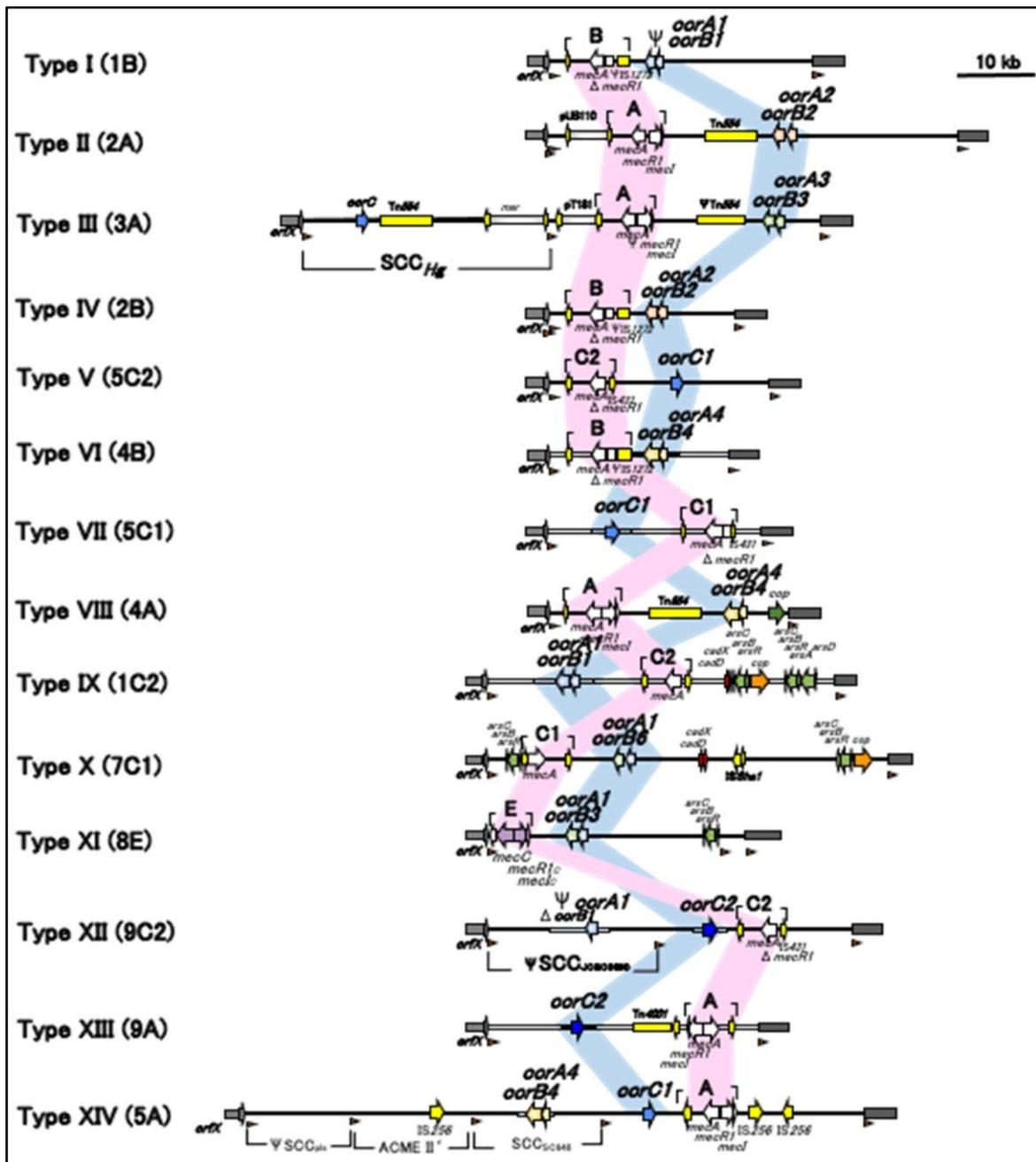
**Figure 16.** La structure essentielle des éléments SCCmec démontrant les complexes de gènes *mec* et *ccr*, encadrés par les régions J1, J2 et J3 (McClure-Warnier *et al.*, 2013).

Le typage SCCmec exploite les différences structurales dans ces trois régions. Ces régions sont amplifiées par PCR multiplexe, les amplifiats sont séparés par électrophorèse, puis le

profil des bandes d'ADN obtenu détermine un type SCCmec (Turlej *et al.*, 2011 ; Uehara, 2022). A ce jour, il existe 14 types SCCmec (SCCmecI-XIV) (Figure 17 et Tableau 1).

Le type SCCmec d'un isolat de *S. aureus* est défini par la combinaison du type du complexe *ccr* (de 1 à 8) et de la classe du complexe *mec* (de A à E) qu'il héberge. Par exemple, un SARM possédant le complexe *ccr* de type 1 et le complexe *mec* de classe B est un SARM de type SCCmecI (Figure 18). Si des éléments SCCmec possèdent les mêmes complexes *mec-ccr*, les variations dans les régions J sont utilisées pour les différencier en sous-types SCCmec.

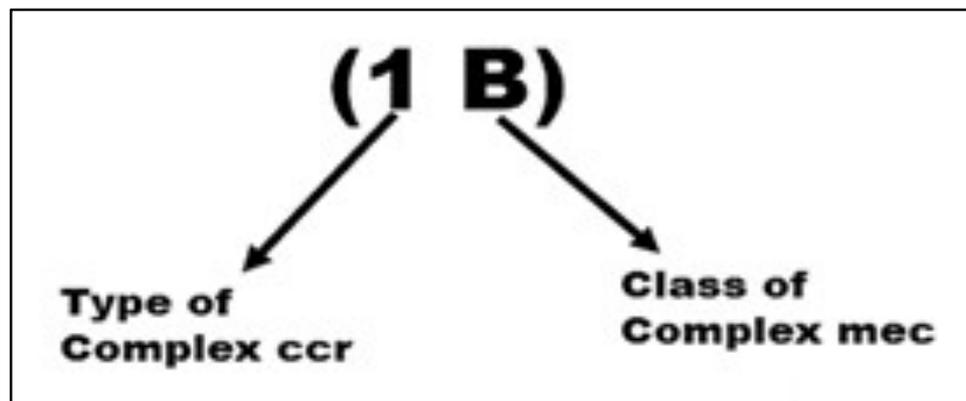
Figure 17. Comparaison structurelle des types d'éléments SCCmec actuels (Uehara, 2022).



Les complexes de gènes *mec* et *ccr* sont ombrés en rose et en bleu, respectivement.

**Tableau 1.** Types des SCC*mec* actuels (14 décembre 2021) (Uehara, 2022).

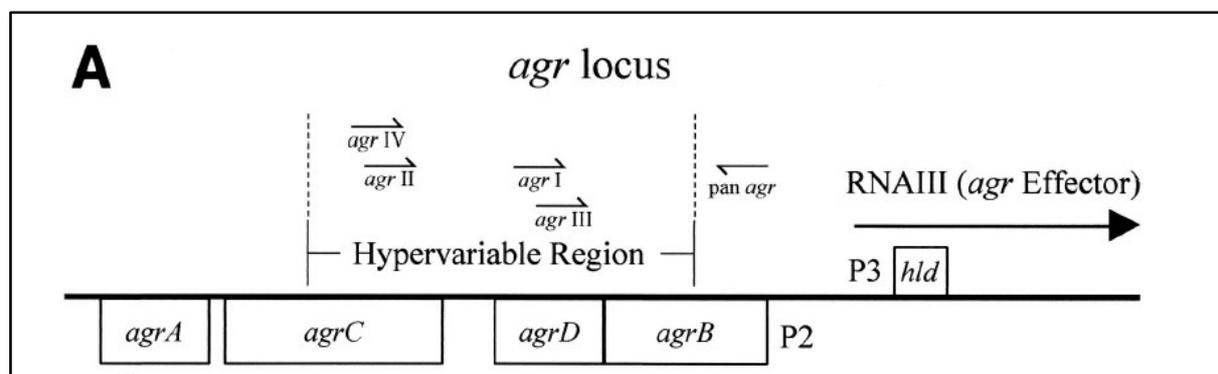
<b>SCC<i>mec</i> Type</b>	<b>Ccr Complex Type</b>	<b><i>mec</i> Complex Class</b>
I (1B)	1 (A1B1)	B
II (2A)	2 (A2B2)	A
III (3A)	3 (A3B3)	A
IV (2B)	2 (A2B2)	B
V (5C2)	5 (C1)	C2
VI (4B)	4 (A4B4)	B
VII (5C1)	5 (C1)	C1
VIII (4A)	4 (A4B4)	A
IX (1C2)	1 (A1B1)	C2
X (7C1)	7 (A1B6)	C1
XI (8E)	8 (A1B3)	E
XII (9C2)	9 (C2)	C2
XIII (9A)	9 (C2)	A
XIV (5A)	5 (C1)	A

**Figure 18.** Illustration d'un SCC*mec* de type I.

#### f. Le typage *agr*

Le typage *agr* consiste en la mise en évidence, par PCR, des polymorphismes dans les gènes de l'opéron, codant pour le système de *quorum sensing*, qui régule l'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* (Dufour *et al.*, 2002).

Les amorces utilisées dans la PCR se fixent au niveau de différents endroits d'une région hypervariable du locus *agr*, incluant les gènes *agrB*, *agrC* et *agrD*, qui varie selon les souches de *S. aureus*. La taille des fragments d'ADN produits après amplification est spécifique au type d'*agr* (**Figure 19**). Par cette méthode, le système *agr* de *S. aureus* est divisé en quatre groupes (*agr* de type I, II, III et IV) (**Shopsin et al., 2003**).



**Figure 19.** Carte schématique du locus *agr* de *S. aureus*, montrant les emplacements des différentes amorces utilisées pour l'amplification de la région hypervariable (**Shopsin et al., 2003**).

## I.9 Épidémiologie génomique de *S. aureus*

### I.9.1 Les technologies séquençage de nouvelle génération (NGS)

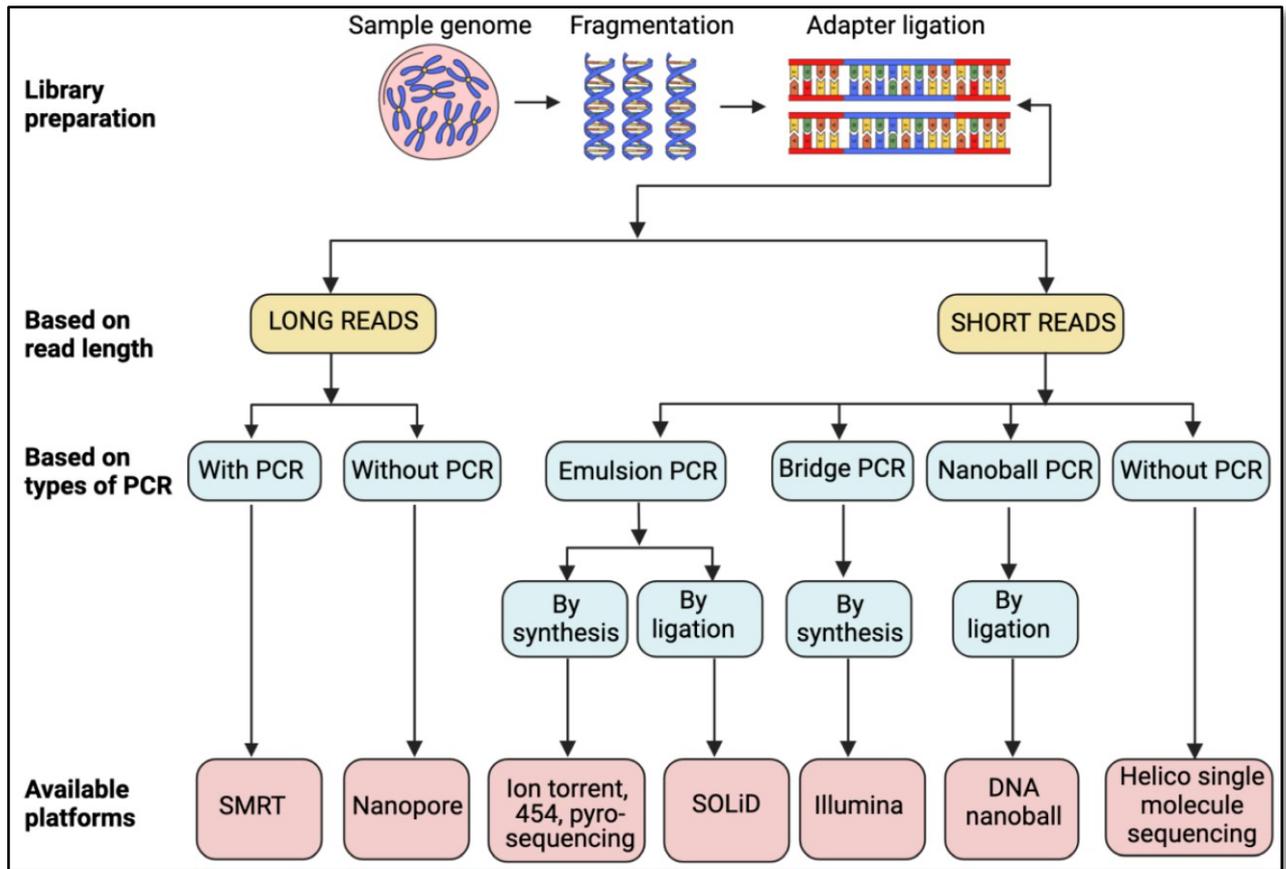
Depuis la première publication de la séquence complète du génome bactérien en 1995 par la méthode de Sanger (séquençage de première génération) (**Fleischmann et al., 1995**), les technologies de séquençage sont rapidement évoluées et beaucoup améliorées, avec l'introduction du séquençage de nouvelle génération (NGS), également connu sous le nom de séquençage à haut débit. Les NGS fait référence collectivement aux approches de séquençage de l'ADN récemment développées avec des instruments automatisés, dans lesquels des millions, voire des milliards de réactions de séquençage peuvent être effectuées en parallèle en une seule fois (**Tang et al., 2017**). Grâce aux NGS, le séquençage des génomes entiers (WGS, *Whole Genome Sequencing*) est devenu moins cher et plus rapide (**Tang et al., 2017**). Les technologies NGS utilisées actuellement pour le WGS sont soit des technologies de deuxième génération (Illumina, Roche, Ion Torrent et SOLiD), soit des technologies de troisième génération (PacBio et Oxford Nanopore). Ces technologies NGS permettent soit le séquençage massivement parallèle et à haut-débit (technologies de deuxième génération) soit le séquençage d'une seule molécule (technologies de troisième génération), ce qui a énormément amélioré le débit et réduit les coûts de séquençage (**Voelkerding et al., 2009 ; Satam et al., 2023**).

Chaque plateforme de séquençage NGS dispose de protocoles spécifiques pour la préparation des ADN et les réactions de séquençage (Voelkerding *et al.*, 2009). La plupart des technologies de séquençage de deuxième génération partagent quatre étapes communes : i) fragmentation de l'ADN génomique ; ii) ligature d'adaptateurs et d'indexes aux fragments d'ADN ; iii) amplification des fragments d'ADN et iv) séquençage (Figure 20). Par contre, avec les technologies de troisième génération, une seule longue molécule d'ADN est séquencée sans étape d'amplification par PCR (Figure 20).

Dans l'étape de la fragmentation, l'ADN génomique, qui est de haut poids moléculaire, est fragmenté d'une manière aléatoire en fragments de petites tailles par sonication, par voie chimique ou enzymatique.

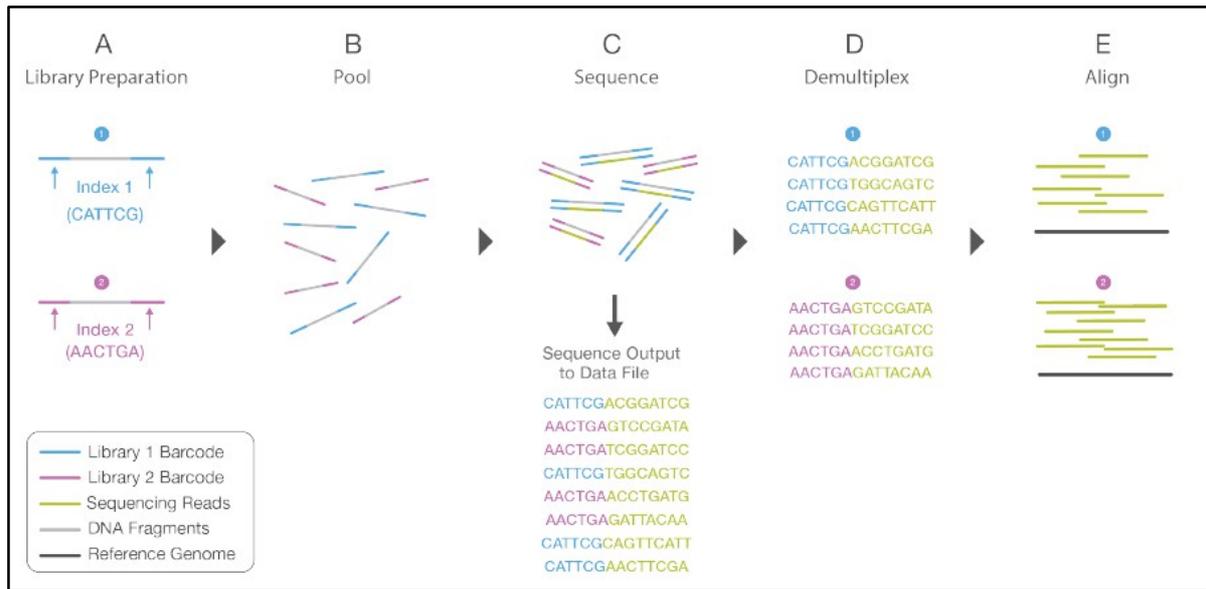
Après la fragmentation de l'ADN génomique, des courtes séquences d'ADN, appelées adaptateurs, qui contiennent un code barre unique (indexes), sont attachés aux extrémités des fragments d'ADN. Les adaptateurs sont complémentaires aux amorces qui seront utilisés plus tard dans la PCR et le séquençage ; tandis que les codes-barres (de 6 à 8 pb) sont utilisés pour étiqueter de manière unique tous les fragments d'ADN provenant d'un échantillon, permettant de regrouper les ADN de plusieurs échantillons et de les séquencer en même temps (séquençage multiplex), afin d'exploiter la capacité de l'instrument et réduire le coût de séquençage par échantillon.

Avant d'être séquencés, les fragments d'ADN préparés lors de l'étape précédente (appelés collectivement bibliothèque d'ADN ; sont dénaturés en fragments simple brins puis amplifiés par PCR, soit en pont « *bridge PCR* » sur Flow Cell (Illumina) ou en émulsion sur billes « *Emulsion PCR* » (Roche, Ion Torrent et SOLiD). La technologie Nanopore qui assure le séquençage/séquence de longues molécules d'ADN ne nécessite pas une étape d'amplification par PCR (Figure 20).



**Figure 20.** Présentation des principes et des flux de travail des différentes technologies NGS (Satam *et al.*, 2023).

A l'issue du séquençage, les indexes sont exploités pour assigner les séquences obtenues à leurs échantillons correspondants, un processus appelé le démultiplexage) (Figure 21).



**Figure 21.** Présentation schématique des processus de multiplexage et de démultiplexage des banques génomiques d'ADN. (A) Des séquences d'index uniques sont ajoutées aux extrémités des ADN provenant de deux échantillons différents lors de la préparation des banques génomiques d'ADN. (B) Les banques génomiques d'ADN sont regroupées et chargées sur la Flow Cell. (C) Les banques génomiques d'ADN sont séquencées ensemble. Toutes les séquences sont exportées vers un seul fichier de sortie. (D) Un logiciel de démultiplexage trie les lectures dans différents fichiers en fonction de leurs index (Illumina, <https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>).

Les plateformes NGS utilisent différentes approches de séquençage, qui sont : (i) le séquençage par synthèse (Illumina, Roche et Ion Torrent), où un brin complémentaire est synthétisé en présence de l'enzyme ADN polymérase, (ii) le séquençage par ligation d'oligonucléotides (SOLiD) et (iii) le séquençage d'une seule molécule (Oxford Nanopore et PacBio) (Piro, 2020).

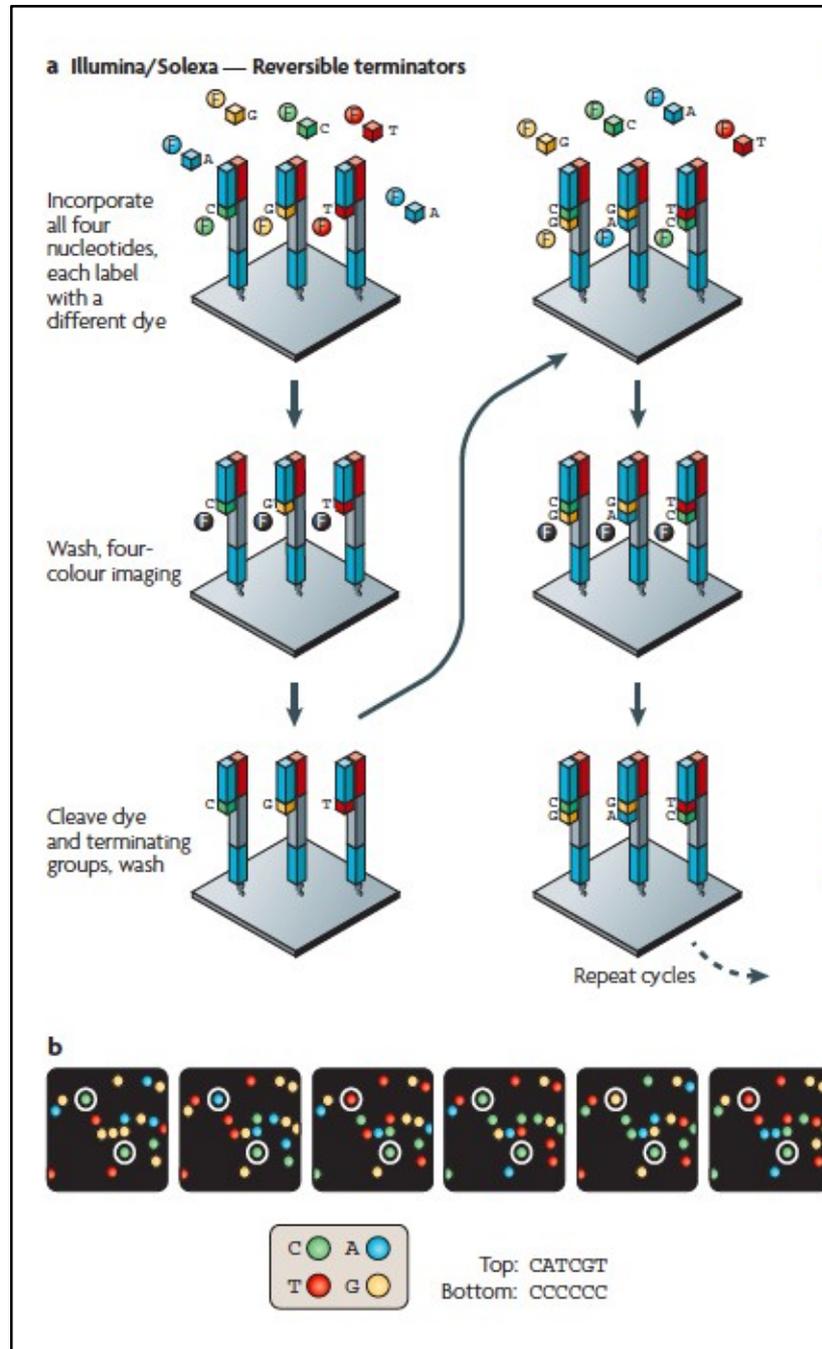
Les approches de séquençage par synthèse utilisent 3 types de nucléotides : des nucléotides non modifiés (Roche, Ion Torrent et MinION), des nucléotides fluorescents et dont le groupement 3' OH est bloqué d'une manière réversible par un groupe bloquant (Illumina) et des nucléotides fluorescents (PacBio) (Piro, 2020).

## I.9.2 Les différentes approches de séquençage NGS

### a. Illumina

Le séquençage par synthèse avec la technologie Illumina utilise 4 nucléotides (dNTP), marqués différemment par fluorescence, appelés terminateurs de chaîne réversibles et dont le groupement 3'OH est bloqué par un groupe bloquant. Ces terminateurs réversibles sont ajoutés aux fragments d'ADN monobrans fixés sur la Flow Cell et incorporés par une

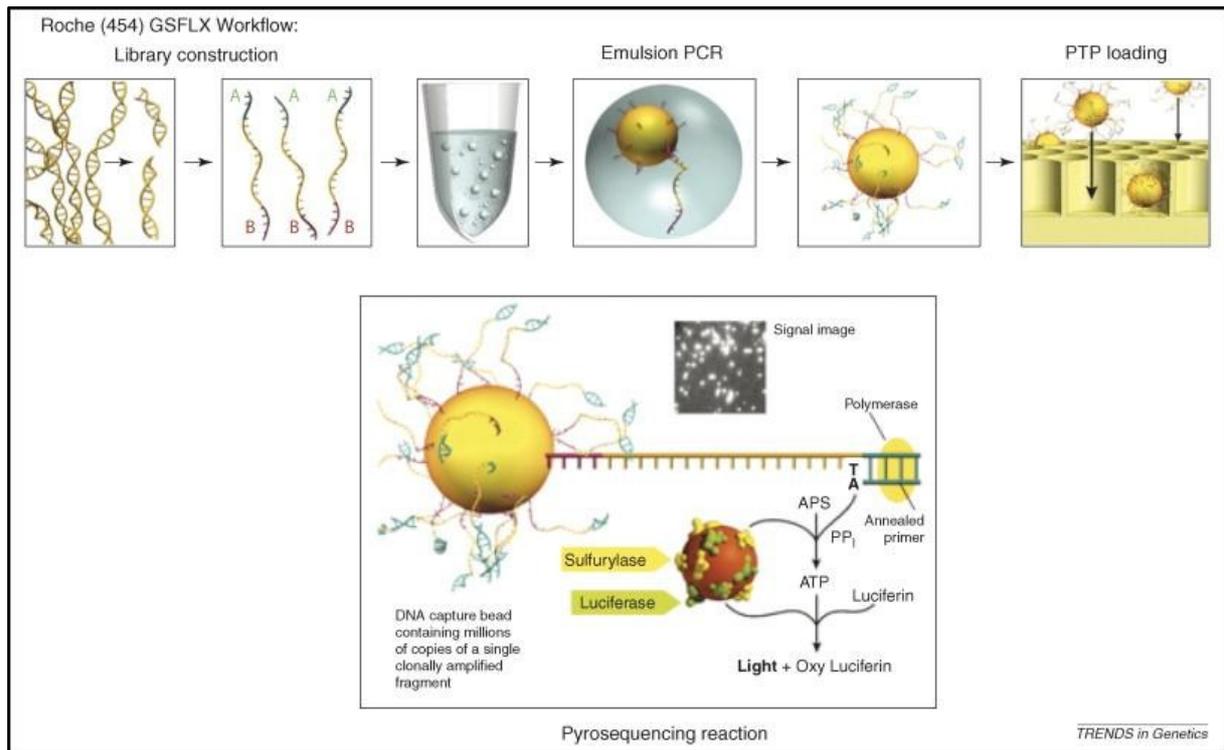
polymérase dans un nouveau brin d'ADN, un par un / une base à la fois. La fluorescence des nucléotides incorporés est enregistrée. Les molécules / colorants fluorescents et les groupes bloquants sont ensuite clivés pour régénérer le groupe 3'-OH, et le processus est répété (Metzker, 2010) (Figure 22).



**Figure 22.** Une représentation schématique du séquençage par la technologie Illumina. **a)** Les terminateurs réversibles fluorescents sont ajoutés aux clusters d'ADN amplifiés et fixés sur la Flow Cell. Après l'incorporation et l'imagerie, une étape de clivage élimine les colorants fluorescents et régénère le groupe 3'-OH. **b)** Les images montrent les données de séquençage de deux clusters d'ADN (Metzker, 2010).

### b. Roche

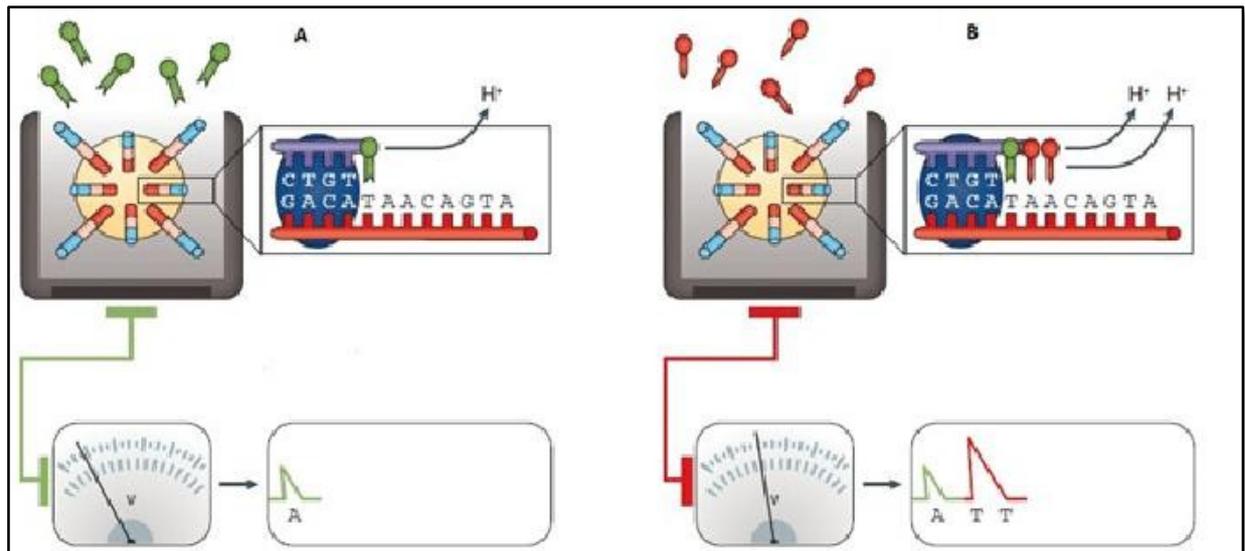
Le séquençage par la plateforme 454 (Roche), appelé aussi pyroséquençage, car il est basé sur la détection du pyrophosphate. Chacun des 4 nucléotides (non modifiés) est ajouté séquentiellement aux ADN monobrans fixés sur des billes. Si la base est incorporée dans un brin d'ADN en cours de synthèse, un pyrophosphate est libéré ; celui-ci est transformé en luminescence, par l'enzyme luciférase. Les signaux de luminescence émis sont détectés et convertis en séquence (Metzker, 2010) (Figure 23).



**Figure 23.** Une représentation schématique du pyroséquençage par la technologie 454 (Roche) (Mardis, 2008).

### c. Ion Torrent

Le séquençage par la technologie Ion Torrent (Thermo Fisher) est basé sur la détection des variations de pH. Les quatre nucléotides (non modifiés) sont ajoutés un par un aux ADN monobrans fixés sur des billes. Lorsqu'un nucléotide est incorporé dans un brin d'ADN en cours de synthèse, il entraîne la libération d'un ion H<sup>+</sup>, causant un changement de pH, qui sera détecté par un semi-conducteur (Figure 24). Les nucléotides non incorporés sont éliminés par lavage. Puis le processus est répété avec le deuxième, troisième et quatrième nucléotide, et ainsi de suite (Metzker, 2010).



**Figure 24.** Une représentation schématique du principe de séquençage avec la technologie Ion Torrent (Goodwin *et al.*, 2016).

#### d. SOLiD

Contrairement aux autres technologies NGS de deuxième génération, qui sont basées sur la détection de l'incorporation de dNTPs dans des fragments d'ADN en cours de synthèse par l'ADN de polymérase, le séquençage SOLiD (*Supported Oligo Ligation Detection*) (Applied Biosystems) est réalisé par ligation entre des amorces et des sondes octamères en utilisant une ADN ligase (Voelkerding *et al.*, 2009) (Figure 25). Chaque sonde contient un dinucléotide spécifique et 6 nucléotides dégénérés (nnzzzz). Les dinucléotides spécifiques aux sondes sont constitués d'une de 16 combinaisons de 2 bases possibles, par exemple TT, GT, et ainsi de suite). Chaque sonde est marquée par un marqueur fluorescent spécifique liés à son extrémité 5' (quatre marqueurs fluorescents différents sont utilisés).

Le processus de séquençage est mené par cinq cycles de 4 étapes chacun (Figure 25), comme suit :

(1) Une amorce universelle avec « n » nucléotides s'hybride à chaque fragment d'ADN, puis un mélange de sondes octamères contenant des dinucléotides différents (16 différentes combinaisons de dinucléotides possibles) est ajouté. La sonde contenant un dinucléotide complémentaire à l'ADN matrice va s'hybrider, puis elle sera attachée à l'amorce par ligation à l'aide de l'ADN ligase (Figure 25A).

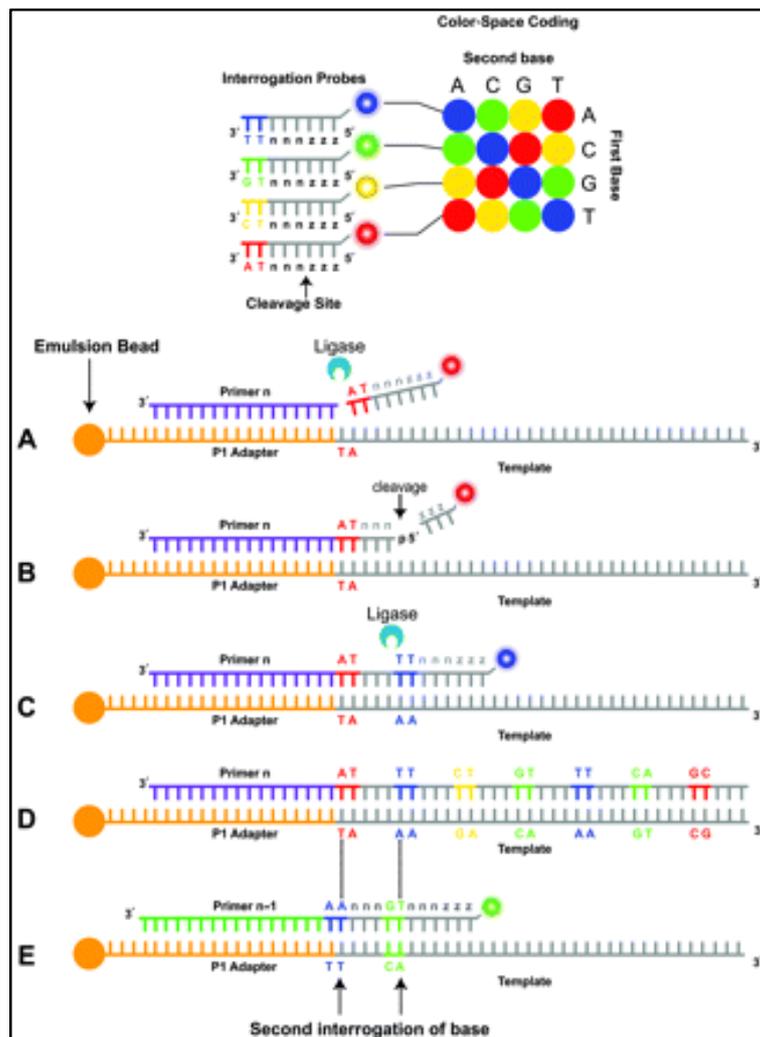
(2) La fluorescence spécifique au dinucléotide de la sonde attachée à l'amorce est détectée et enregistrée ; puis, les sondes non hybridées sont éliminées par lavage.

(3) Les trois dernières bases de la sonde (c'est-à-dire les bases 6, 7 et 8) ainsi que le colorant fluorescent sont chimiquement éliminées, de sorte que cinq bases (un pentamère) de la sonde sont laissées (**Figure 25B**).

(4) Les étapes ci-dessus sont répétées 10 fois pour étendre la première amorce, et à chaque fois les sondes sont ligaturées au groupe 5' phosphate du pentamère précédent (**Figure 25C**) ; et à la fin, les couleurs fluorescentes, correspondantes à 10 dinucléotides (1/2, 6/7, 11/12, 16/17, 21/22, 26/27, 31/ 32, 36/37, 41/42 et 46/47) sont déterminées (**Figure 25D**). A la fin, le brin d'ADN synthétisé est alors dénaturé.

Dans les cycles suivants, les mêmes étapes sont répétées, mais avec une nouvelle amorce décalée d'une base dans la séquence d'adaptateur (n-1) est ajoutée (**Figure 25E**).

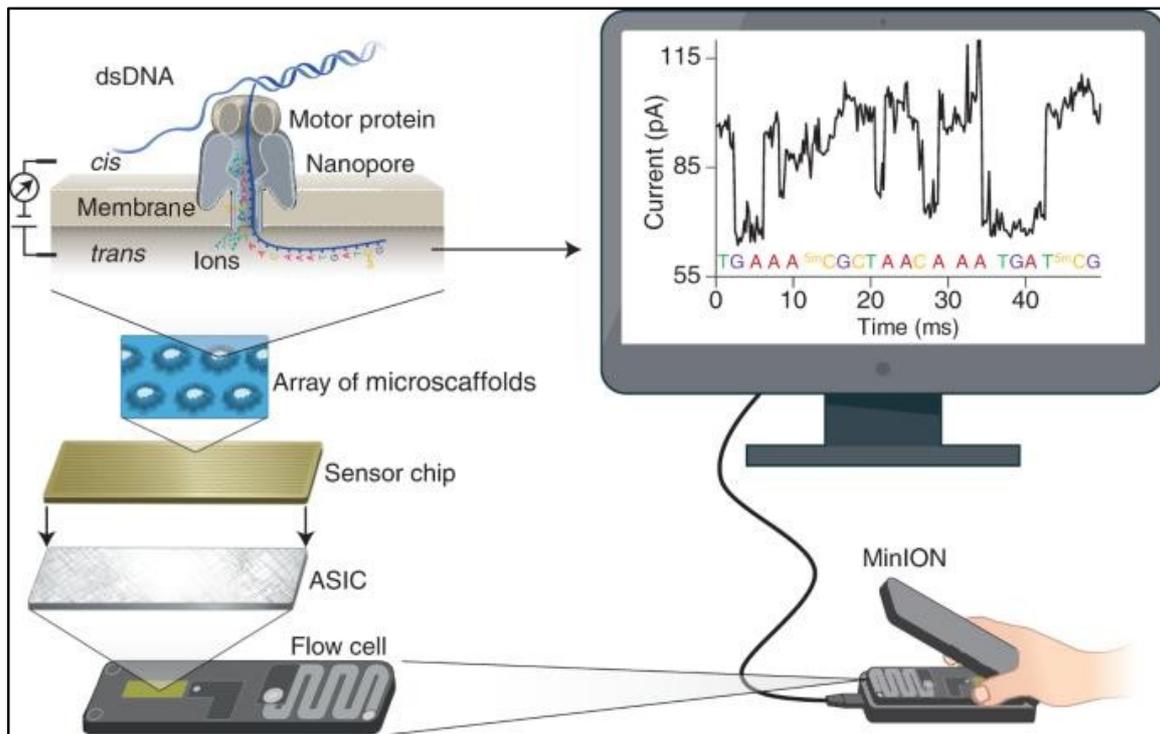
Au total cinq cycles sont effectués, dans chaque cycle une nouvelle amorce avec un décalage successif d'une base (n-2, n-3, et ainsi de suite) est utilisée.



**Figure 25.** Une représentation schématique du principe de séquençage avec la technologie SOLiD (Voelkerding *et al.*, 2009).

### e. MinION

La technologie de séquençage de troisième génération MinION, développée par Oxford Nanopore Technologies, utilise un nanopore protéique connecté à un courant électrique. Les molécules d'ADN qui traversent le nanopore provoquent des perturbations caractéristiques du courant électrique. En mesurant les variations du courant circulant à travers le pore, des nucléotides individuels peuvent être identifiés (Wang *et al.*, 2021) (Figure 26).

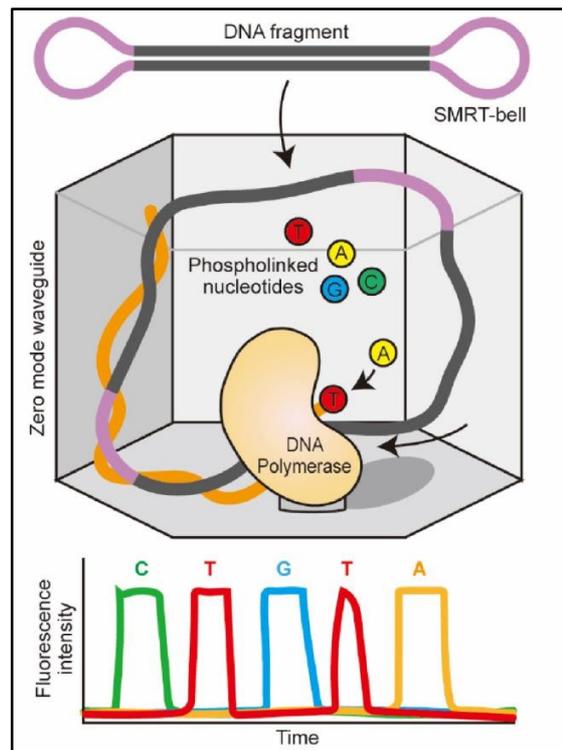


**Figure 26.** Principe du séquençage nanopore par la technologie MinION (Wang *et al.*, 2021).

### f. PacBio

Dans le séquençage en temps réel à molécule unique (SMRT) de Pacific Biosciences (PacBio), les fragments d'ADN matrices sont ligaturés à des adaptateurs en épingle à cheveux à chaque extrémité, pour produire des molécules d'ADN circulaires avec des régions d'ADN simple brin (ADNsb) à chaque extrémité et des d'ADN double brin (ADNdb) au milieu.

Le séquençage est ensuite effectué en ajoutant les quatre nucléotides marqués avec différents colorants fluorescents. Lorsqu'une base est incorporée dans le brin d'ADN matrice en cours de synthèse par l'ADN polymérase, une impulsion lumineuse est émise (Figure 27) (Lee, 2023).



**Figure 27.** Principe du séquençage nanopore par la technologie PacBio (Lee, 2023).

En plus de leurs différentes approches de séquençage, les plateformes de séquençage NGS, diffèrent aussi en termes de qualité et de quantité de données qu'elles produisent, leurs temps d'exécution et coûts ; et chacune présente des avantages et des inconvénients. Le séquençage massivement parallèle par les technologies de deuxième génération (Illumina Roche, Ion Torrent et SOLiD) produit de grandes quantités de séquences de haute qualité, mais de courtes longueurs ; tandis que le séquençage d'une seule molécule par les technologies de troisième génération (Oxford Nanopore et PacBio), fournit des séquences plus longues et en temps réel, mais avec une qualité et un débit faible. Actuellement, les séquenceurs Illumina sont les plus populaires, car ils sont capables de produire des séquences avec un rendement pouvant atteindre des centaines de giga bytes par exécution, et avec une très grande précision (avec des taux d'erreur de 0,1 %, ou une paire de bases incorrecte par 1000 bases séquencées) (Liu *et al.*, 2012).

### I.9.3 Analyses des séquences des génomes

La grande quantité de données générée par le séquençage des génomes entiers par NGS pose des défis pour son traitement, stockage, analyse et interprétation ; particulièrement en termes d'infrastructures et de ressources informatiques et d'outils de bioinformatique (Wyres *et al.*, 2014). Ces analyses font appel à plusieurs logiciels de bioinformatique, selon les objectifs des études.

Plusieurs étapes sont nécessaires pour l'analyse des séquences issues des séquenceurs NGS. Certaines sont indispensables et d'autres peuvent être facultatifs. Dans le cas des génomes microbiens, ces étapes peuvent inclure : (i) le contrôle de la qualité des données de séquençage, (ii) l'assemblage des génomes, (iii) l'annotation des génomes, (iv) le typage des souches, (v) les analyses phylogénétiques et (vi) l'analyse des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence. Il existe de nombreux outils bioinformatique disponibles pour ces analyses (**Van et al., 2013 ; Gilchrist et al., 2015**).

### 1.9.3.1 Contrôle de la qualité des données de séquençage

La première étape de presque toutes les analyses bioinformatiques est le contrôle de la qualité des séquences générées par les plateformes NGS. Des séquences de très bonne qualité sont nécessaires pour une analyse ultérieure. Les fichiers de sortie de la plupart des instruments NGS sont des lectures de séquences brutes. Ces fichiers contiennent les détails de chaque séquence lue pour l'échantillon ainsi que la qualité de chaque base dans la séquence.

Ces séquences sont soumises à un contrôle de qualité avec différents logiciels pour éliminer les séquences des amorces et des codes-barres et les bases de mauvaise qualité, afin de ne conserver que les séquences de très bonne qualité, qui seront utilisées dans les analyses qui suivent (**Balloux et al., 2018**).

### 1.9.3.2 Assemblage des séquences

Les machines de séquençage génèrent des milliers de petites séquences d'ADN, appelées lectures, qui peuvent avoir des longueurs comprises entre 40 et 1000 bases, selon la technique utilisée. Chaque lecture représente la séquence d'une petite fraction du génome. Pour être utiles, les lectures doivent être assemblées (**Nagarajan et Pop, 2013**).

L'assemblage est un processus qui consiste à assembler les lectures de séquences courtes, générées par le séquenceur, en séquences plus longues, appelées contigs (une séquence de séquence continue créée en alignant des lectures de séquençage qui se chevauchent), afin de reconstituer la séquence du génome entier ou une grande partie du génome (**Pop et al., 2004**).

Il existe deux types différents d'assemblage du génome : l'assemblage *de novo* et l'assemblage basé sur un génome de référence. L'assemblage *de novo* fait référence à l'assemblage d'un nouveau génome à partir de zéro, sans l'aide de données génomiques de référence. Par contre, l'assemblage basée sur un génome de référence, comme son nom l'indique, s'appuie sur un génome de référence, qui a été préalablement séquencé et complètement assemblé et annoté, pour aligner les lectures de séquences. Le génome de

référence doit être celui de la même espèce du génome à analyser, ou dans le cas échéant, d'une espèce proche (**Pop et al., 2004**).

### 1.9.3.3 Annotation des génomes

L'annotation des génomes vise à identifier les gènes codant pour les protéines, appelés séquences codantes (CDS), les gènes codants pour les ARN non codants (ARNr, ARNt, petits ARN) ainsi que tout autres éléments génétiques qui sont contenus dans le génome et prédire leurs fonctions (**Stein, 2001**).

Les programmes fréquemment utilisés pour l'annotation sont Prokka (un outil de ligne de commande) et RAST (un outil basé sur le Web) (**Lynch et al., 2016**).

### 1.9.3.4 Génomique comparative

Une fois le génome obtenu, il serait ensuite intéressant de réaliser une génomique comparative pour détecter les liens de parenté entre les souches. La comparaison entre les génomes est utilisée pour identifier les régions de similarité et de différences (régions uniques).

Souvent, les génomes bactériens sont classés en deux catégories : le génome central (*core genome*), qui comprend les gènes présents chez toutes les souches, et le génome accessoire, qui contient les gènes présents chez une ou plusieurs souches, mais pas toutes. Le pangénome est constitué de l'ensemble des gènes présents dans l'ensemble des souches analysées (contenu génétique complet d'une espèce).

Des exemples d'outils bioinformatique permettant de comparer et de visualiser des génomes sont Mauve et ACT (**Edwards et Holt, 2013**).

## 1.9.4 Application du WGS en santé publique

La réduction du coût des NGS permet désormais de séquencer rapidement des milliers d'échantillons de génomes au sein d'une seule étude, ouvrant la voie pour leur utilisation de routine dans les laboratoires de santé publique. Les NGS sont applicables à tout le spectre d'agents pathogènes importants en santé publique (**Deurenberg et al., 2017 ; Motro et Moran-Gilad, 2017**). Ainsi, les approches de NGS sont en train de remplacer la plupart des méthodes actuelles d'identification et de caractérisation d'agents pathogènes. Dans un contexte de santé publique par exemple, le WGS s'est avéré être un outil précieux pour les enquêtes épidémiologiques, en permettant l'identification des souches épidémiques, leurs typages, la détermination de leurs virulences et résistances aux antimicrobiens, leurs liens de parenté et leurs voies de transmission (**Quainoo et al., 2017**).

### a. Le typage par WGS

Les méthodes de typage conventionnelles décrites ci-dessus se sont révélées utiles pour les études épidémiologiques au cours des dernières décennies ; cependant, elles offrent une résolution et un pouvoir discriminatoire limités. Récemment, le domaine de l'épidémiologie moléculaire a vraiment progressé avec l'avènement des NGS. Les NGS ainsi que les outils de la bioinformatique associés ont donné naissance à une nouvelle branche de l'épidémiologie, qui est l'épidémiologie génomique, qui s'appuie sur les outils de la génomique et de l'épidémiologie afin de mieux comprendre, surveiller et gérer les éclosions de maladies infectieuses (**Struelens et Brisse, 2013**).

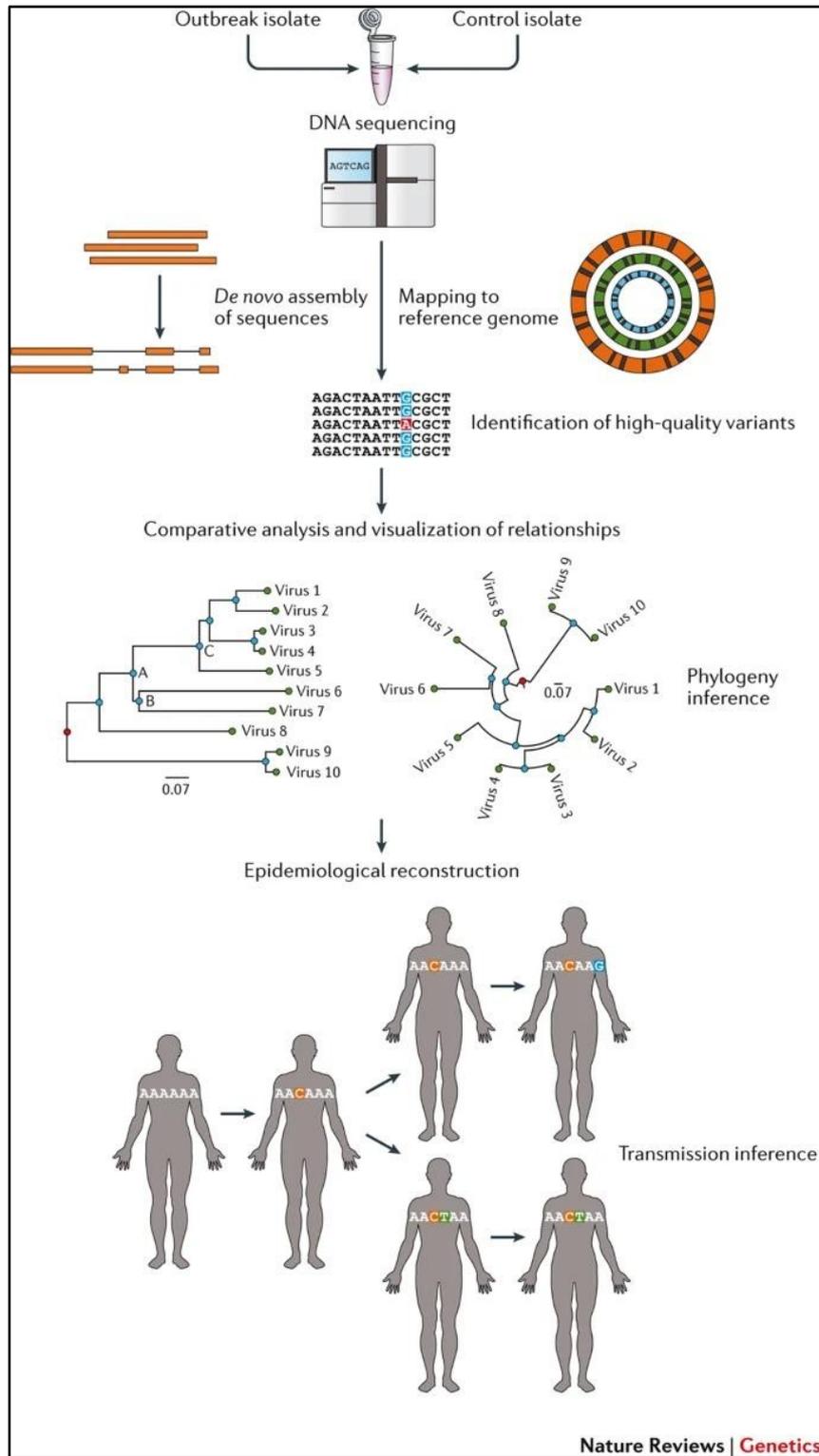
Les approches de l'épidémiologie génomique ont conduit à des avancées considérables dans le domaine de l'épidémiologie des maladies infectieuses. Contrairement aux méthodes de typage conventionnelles, qui ne ciblent que des variations au niveau de certaines régions du génome, le séquençage du génome permet la discrimination des isolats d'agents pathogènes au niveau du polymorphisme d'un seul nucléotide (*Single Nucleotide Polymorphisme*, SNP), fournissant un outil de typage au niveau du génome avec une résolution et un pouvoir discriminant beaucoup plus élevés que ceux des méthodes de génotypage traditionnels (**Figure 28**) (**Grad et Lipsitch, 2014**). En plus d'être applicables à tout le spectre d'agents pathogènes importants en santé publique, les approches de l'épidémiologie génomique offrent un avantage considérable par rapport aux autres méthodes de typage moléculaire, en fournissant un inventaire complet de tous les gènes présents dans le génome, y inclut ceux qui codent pour les résistances aux antibiotiques et les facteurs de virulence, ce qui peut avoir un impact majeur sur le traitement et le diagnostic des infections (**Grad et Lipsitch, 2014**).

Au cours des dernières années, l'épidémiologie génomique est devenue un outil précieux pour les enquêtes épidémiologiques sur les maladies transmissibles, et a démontré son utilité dans différents contextes à l'échelle locale, nationale et internationale, pour définir les épidémies, identifier les réservoirs des agents pathogènes, retracer les sources d'infections et d'élucider les voies de transmission (**Tang et Gardy, 2014 ; Tang et al., 2017**). L'exemple le plus remarquable est celui de la pandémie du COVID-19, où l'épidémiologie génomique s'est révélée une approche très utile pour la surveillance de l'évolution, la transmission et la virulence du virus SARS-CoV-2, ainsi que pour l'évaluation de l'efficacité des mesures de prévention et de contrôle des infections (**Li et al., 2021**).

De plus, le séquençage du génome du virus SARS-CoV-2, et le partage international de cette séquence, a directement aboutit au développement rapide de tests de diagnostics et de vaccins (**Li *et al.*, 2021**). Dans un autre exemple, l'analyse des séquences des génomes entiers des SARM isolés dans une unité de soins intensifs néonataux au niveau d'un hôpital à Cambridge au Royaume-Uni, a indiqué qu'un professionnel de la santé infecté de manière persistante a probablement joué un rôle clé dans la transmission du pathogène aux nourrissons admis dans de cette unité. Cette analyse a conduit à l'implémentation de mesures de contrôle afin d'éradiquer l'agent pathogène (**Harris *et al.*, 2013**).

Dans un troisième exemple, le séquençage du génome entier, en combinaison avec des informations épidémiologiques, ont été utilisés lors d'une épidémie d'infections à SARM prolongée sur une période de 4 ans dans un service de chirurgie d'un hôpital au Danemark, impliquant 23 patients. Cette étude a permis d'identifier que deux travailleurs de la santé colonisés par la même souche de SARM que chez les patients étaient la source probable de l'infection, indiquant qu'ils ont probablement contribué au maintien de l'épidémie dans l'hôpital durant 4 ans (**Rubin *et al.*, 2018**).

Les exemples présentés ci-dessus témoignent que l'épidémiologie génomique est désormais devenue l'approche préférée pour les études épidémiologiques sur les maladies transmissibles, et révèlent également l'énorme impact des technologies NGS sur la détection, la prévention et le traitement des infections dans le futur. Cependant, bien qu'elles soient en train d'être largement utilisée dans les pays développés, ses applications dans les pays en voie de développement sont rares, en raison du manque d'infrastructures et de compétences nécessaires.



**Figure 28.** Schématique illustration de l'approche de l'épidémiologie génomique pour l'identification des événements de transmission. Cette approche comporte généralement quatre étapes. Dans un premier temps, les génomes des isolats épidémiques sont séquencés. Ensuite, les différences génomiques entre les séquences sont identifiées. Dans la troisième étape, ces différences génomiques sont utilisées pour déduire les relations phylogénétiques entre les isolats. Enfin, s'il existe des liens phylogénétiques entre les isolats, celles-ci sont examinées dans le contexte d'informations épidémiologiques connues, telles que le contact social entre les cas, un lieu commun ou une autre exposition (Gardy et Loman, 2018).

### I.9.5 Principaux complexes clonaux de SARM et répartition géographique

Un complexe clonal (CC) est un groupe de clones de SARM qui sont étroitement liés et présentant des STs qui ne diffèrent qu'au niveau de trois des sept gènes analysés par MLST (**Planet *et al.*, 2017 ; Jolley *et al.*, 2018**).

Au fil du temps, les membres d'un même CC peuvent se différencier en nouveaux clones par des mutations ponctuelles, des recombinaisons et l'acquisition ou la suppression d'éléments génétiques mobiles. Ces variations génétiques conduisent à l'émergence et la dissémination de certains clones de SARM qui ont acquis des caractères leur conférant des avantages compétitifs et favorisant leur succès dans une zone géographique ou un contexte particulier (milieu hospitaliers ou communautaires ou chez les animaux). C'est pour cela que l'épidémiologie des SARM est en constant changement ; certains CCs sont répandus à l'échelle mondiale tandis que d'autres sont limités à une ou plusieurs zone(s) géographique(s) donnée(s). De plus, un CC prédominant dans une certaine zone géographique, après avoir atteint un sommet de domination, a tendance à décliner ou disparaître, puis remplacer par un nouveau CC (**Dai *et al.*, 2019**).

Les CCs de SARM les plus fréquemment signalés à l'échelle mondiale sont CC1, CC5, CC8, CC15, CC22, CC30, CC45, CC97, CC93 et CC121. Cependant, d'autres CCs ont été également signalés, mais ont montré une répartition géographique relativement restreinte (**Tableau 2**) (**Jolley *et al.*, 2018 ; Monecke *et al.*, 2011 ; Chatterjee et Otto, 2013 ; Turner *et al.*, 2019**).

Les CCs CC5 (ST5-I, -II, -IV, -VI), CC8 (ST247-I, ST239-III, ST8-IV), CC22 (ST22-IV), CC30 (ST36-II) and CC45 (ST45-II, -IV) sont connus comme des SARM hautement épidémiques (ESARM), qui ont été associés aux environnements hospitaliers (HA-SARM) (**Chua *et al.*, 2014**) ; tandis que, les CCs CC8 (USA300, America), CC80 (ST80-IV, Europe) et CC30 (ST30 Australie), ont été liés aux milieux communautaires (CA-SARM) (**Vindel *et al.*, 2014**). Par contre, les clones appartenant aux CC1, CC9, CC97, CC121, CC130, CC133 ou CC398 ont été associés aux animaux (LA-MRSA) (**Spoor *et al.*, 2013**).

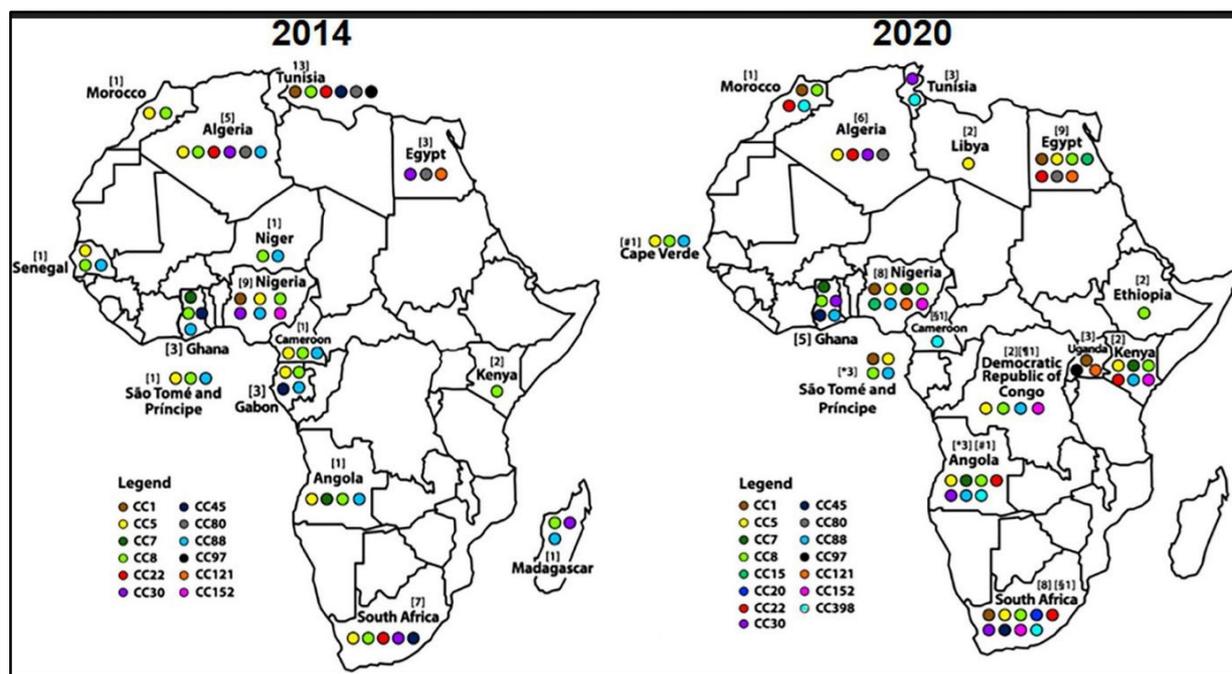
**Tableau 2.** Clones pandémiques de SARM et leur répartition mondiale (Silva *et al.*, 2022).

Clonal Complex (CC)	Sequence Type (ST)	Spa-Type	SCCmec Type	Clone	Geographic Distribution
CC1	ST6	t304 and variants	IVa	Middle East	The Middle East and Europe
CC5	ST5	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	II	New York/Japan, USA100	United States, Japan, Europe, Australia and South Korea
		t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	IV	Pediatric/USA800	South America and Europe
CC8	ST239	t030, t037, t234, t387, t388	III	Brazilian/Hungarian	Europe, South America, Asia and Africa
	ST247	t008, t051, t052, t054, t200	I	Iberian/EMRSA-5	Europe and the United States
	ST250	t008, t009, t194	I	Archaic	Worldwide
CC22	ST22	t005, t022, t032, t223, t309, t310, t417, t420	IV	EMRSA-15	Europe, Australia and Canada
CC30	ST36	t018, t253, t418, t419	II	EMRSA-16, USA200	Europe, North America, and Australia
	ST30	t012, t019, t1143, t300	IV	USA1100/South West Pacific	America, Australia and the Western Pacific
CC45	ST45	t004, t015, t026, t031, t038, t050, t065, t204, t230, t390	IV	Berlin, USA600	Europe and the United States
ST80	ST80	t044, t203, t131, t1028, t1200	IV	European	Europe, North Africa and the Middle East
	ST93	t3949 t202 t15361 t4699 t17089 t16949 t17272	IV	Queensland	Australia

Abbreviations. ST: sequence type; CC: clonal complex; SCCmec: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*.

### I.9.6 Principaux clones de SARM en Algérie

La structure de la population des SARM en circulation en Algérie n'est pas claire en raison du manque de données. Le peu d'études publiées n'ont typé qu'un nombre faible d'isolats. Le CC de SARM le plus fréquemment rencontré en Algérie est le CC80 (ST80-IV [2B]), dit clone « Européen ». Ce CC est endémique dans les hôpitaux Algériens, constituant entre 77%-100% de l'ensemble des isolats cliniques (Antri *et al.*, 2011 ; Agabou *et al.*, 2017). Cependant, plusieurs autres CCs de SARM ont été également identifiés, tels que le CC5 (ST5-IV, ST5-VII), CC6 (ST6-IV), CC8 (ST239-III), CC22 (ST22-IV) et CC30 (ST535-IV), CC88 (Figure 29) (Ramdani-bougoussa *et al.*, 2006 ; Bekkhoucha *et al.*, 2009 ; Antri *et al.*, 2011 ; Djoudi *et al.*, 2013 ; Djoudi *et al.*, 2015 ; Djoudi *et al.*, 2016 ; Alioua *et al.*, 2014 ; Achek *et al.*, 2021).



**Figure 29.** Distribution des principaux clones de SARM en Afrique en 2014 et 2020 (Lawal *et al.*, 2022).

### I.10 Méthodes d'isolement et d'identification de *S. aureus*

L'identification rapide et directe de *S. aureus* est cruciale pour la bonne prise en charge des patients atteints d'infections par ce pathogène et le contrôle de ses maladies.

Plusieurs techniques de laboratoire sont disponibles pour l'isolement et l'identification de *S. aureus* à partir des prélèvements biologiques (pus, crachats, hémocultures, prélèvements respiratoires, liquides de ponction, les prélèvements nasaux, périnéaux et de la gorge). Ces méthodes peuvent être divisées en quatre catégories : (i) les tests microbiologiques conventionnelles, basés sur la culture de la bactérie sur des milieux de culture sélectifs et différentiels, suivit par des tests d'identification macroscopiques (coloration et aspects des colonies), microscopiques (Coloration de Gram) et biochimiques (pour identifier des caractéristiques métaboliques spécifiques de *S. aureus*); (ii) les méthodes moléculaires, basées sur l'amplification par PCR de gènes spécifiques à *S. aureus* ; (iii) la méthode MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) et (iv) les tests l'agglutination sur lame (Brown *et al.*, 2005 ; Carroll, 2008 ; Reddy *et al.*, 2017 ; Sanchini, 2022).

Avec les méthodes microbiologiques conventionnelles, *S. aureus* est généralement cultivée sur des milieux de culture sélectifs, qui contiennent des agents inhibiteurs de la croissance d'autres organismes, et des substrats chromogéniques, qui sont hydrolysés par une enzyme

spécifique de *S. aureus*, pour former des colonies de couleur distincte. Par exemple, le milieu Chapman (Mannitol Salt agar), contient une concentration élevée de sel (environ 7,5 à 10 % de NaCl), qui est un inhibiteur pour la plupart des bactéries, et le mannitol, pour la mise en évidence du caractère fermentative du mannitol de *S. aureus*. Sur ce milieu les colonies de *S. aureus* apparaissent jaunâtres (**Missiakas et Schneewind, 2013**). Récemment, des géloses chromogéniques, telles que Brilliance MRSA agar (Oxoid), ChromID (bioMérieux), MRSASelect (Bio-Rad), CHROMagar (CHROMagar Microbiology), et BBL-CHROMagar (BD Diagnostics), ont été développées pour cibler *S. aureus* avec une spécificité et une sensibilité élevée (**Perry et Freydière, 2007**).

Pour plus de confirmation, les tests microbiologiques peuvent être complétés par des tests biochimiques tels que le test de catalase, de coagulase et de nucléase. Parmi ces tests, le test de la production de la coagulase est le plus préféré, car il permet de différencier *S. aureus* qui est coagulase positive (SCoP) des autres espèces staphylocoques à coagulase négative (SCoN). Deux différents tests de coagulase peuvent être effectués : le test de coagulase libre et le test de coagulase liée (facteur d'agglutination) (**Berke et Tilton, 1986**). Le test de détection de l'activité désoxyribonucléase (DNase) est également utile dans l'identification de *S. aureus* (**Ratner et Stratton, 1985**).

Bien que les méthodes phénotypiques (bactériologiques et biochimiques) décrites ci-dessus sont largement utilisées, elles sont laborieuses et ont montré des limitations en terme de reproductibilité inter-laboratoires, sensibilité et spécificité, ce qui rend l'identification précise de *S. aureus* au niveau de l'espèce difficile. Pour cette raison, d'autres méthodes automatisées, plus rapides et fiables sont utilisées, comme la PCR et, plus récemment, la Spectrométrie de masse. L'identification de *S. aureus* par la PCR, est basée sur l'amplification de gènes conservés chez toutes les souches de *S. aureus*, comme le gène *nuc*, codant pour la nucléase (**Brakstad et al., 1992 ; Yang et Rothman, 2004 ; Reddy et al., 2017**).

L'introduction récente du MALDI-TOF MS dans le domaine de la microbiologie a transformé la détection et la caractérisation des agents pathogènes. En effet, la MALDI-TOF MS est devenue l'une des techniques les plus prometteuses pour l'identification rapide et précise d'agents pathogènes, y inclut *S. aureus*. Avec le MALDI-TOF MS, une colonie microbienne est soumise à un faisceau laser pour ioniser les protéines. Les ions produits sont ensuite séparés les uns des autres en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Le spectre généré est comparé aux spectres des isolats microbiens connus contenus dans une base

de données ; ainsi l'organisme inconnu est identifié au niveau de la famille, du genre ou de l'espèce (**Kim *et al.*, 2019 ; Bernardo *et al.*, 2002 ; Wolters *et al.*, 2011**).

Plusieurs fabricants ont développé des kits pour l'identification rapide de *S. aureus*. Par exemple, les kits Slidex Staph Plus (bioMérieux) et Staphaurex (Murex Diagnostics Ltd), basés sur l'agglutination sur lame, ont été conçus pour la détection simultanée de la protéine A, du facteur d'agglutination et d'un groupe d'antigènes à la surface des cellules de *S. aureus*, tandis que le kit Pastorex Staph-Plus (Sanofi Diagnostics Pasteur) détecte la protéine A, le facteur d'agglutination et des polysaccharides capsulaires de *S. aureus* (**Van Griethuysen *et al.*, 2001**). Par rapport aux techniques de laboratoire basées sur la culture bactérienne, la PCR ou le MALDI-TOF MS, qui nécessitent un personnel spécialisé, des équipements coûteux et prennent beaucoup de temps, les kits d'agglutination sur lame, en plus d'être efficaces dans la détection rapide de *S. aureus*, sont peu coûteux, portables, simples, rapides et ne nécessitent pas un personnel spécialisé.

#### **I.10.1 Méthodes d'identification des SARM**

Une fois les isolats sont identifiés comme étant *S. aureus*, ils peuvent être classés en SARM ou en *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM), selon leur résistance à la méthicilline par des méthodes phénotypiques, moléculaires ou immuno-enzymatiques (**Baron et Tenover, 2012 ; De Souza, 2018**).

La méthode phénotypique standard pour l'identification des SARM est la méthode de diffusion de disque, qui consiste à appliquer un disque de céfoxitine (30µg) sur gélose Mueller-Hinton ensemencée avec *S. aureus*, puis le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré. Le diamètre obtenu permet de catégoriser la bactérie en sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique, selon les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou du Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM) (**Skov *et al.*, 2006**).

En plus de la méthode de diffusion de disque, il existe d'autres tests phénotypiques comme la méthode de dilution en milieu liquide, la méthode de diffusion en gradient d'antibiotique (bandelette E-test) et le système semi-automatisé VITEK 2 (Biomérieux). Ces trois méthodes permettent de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) exacte de l'antibiotique (**Soheir *et al.*, 2006**).

Les SARM peuvent être également identifiés par PCR pour détecter la présence du gène *mecA*, codant la résistance à la méthicilline (**Hirvonen, 2014 ; Liu *et al.*, 2016**) ; ou de son

produit, la protéine de liaison à la pénicilline (PBP2a), par des anticorps anti-PBP2a présents sur des kits d'agglutination sur lame (Van Leeuwen *et al.*, 1999). La MALDI-TOF MS est également de plus en plus utilisée pour identifier rapidement les SARM (Kim *et al.*, 2019 ; Yu *et al.*, 2022).

### I.11 Traitement des infections staphylococciques

Le traitement des infections à *S. aureus* dépend largement du type et la gravité de l'infection. De plus, le choix de l'antibiotique, la voie d'administration et la durée de l'antibiothérapie sont déterminés par la souche infectante et son profil d'antibiorésistance.

En général, les antibiotiques bêta-lactamines restent le médicament de choix si les isolats sont des SASM.

La plupart des *S. aureus* isolés dans les hôpitaux (HA-SARM) et dans la communauté (CA-SARM) sont résistantes à plusieurs antibiotiques, ce qui complique le traitement de leurs infections. Le traitement des infections de ces deux types de SARM n'est possible qu'avec des antibiotiques de dernière ligne, la vancomycine, la teicoplanine, la daptomycine ou le linézolide (Chambers, 2005 ; Tong *et al.*, 2015).

Étant donné que de nombreuses souches de SARM sont multi-résistantes, de nouvelles options de traitement, les chercheurs ont intensifié leur intérêt pour le développement de thérapies alternatives, comme des vaccins (Spellberg et Daum, 2012 ; LeClaire *et al.*, 2002). Cependant, l'efficacité et la sécurité de plusieurs vaccins testés contre *S. aureus* n'ont pas encore été démontrées ; ainsi, il n'existe actuellement aucun vaccin disponible contre *S. aureus*. En raison de non disponibilité de stratégies vaccinales contre *S. aureus*, de nombreux efforts ont mis l'accent sur le développement des approches d'immunothérapie passive, qui visent à neutraliser les déterminants de la virulence, notamment les toxines et les composants de surface (Reddy *et al.*, 2017).

### I.12 Prévention et contrôle des infections staphylococciques

Devant les limites de l'antibiothérapie dans le traitement des infections à *S. aureus*, les mesures de prévention demeurent le meilleur moyen pour contrôler ce pathogène. Ainsi, plusieurs mesures de prévention sont recommandées, particulièrement en milieux hospitaliers, afin de réduire la transmission des SARM entre patients et personnel de santé, notamment (i) des bonnes pratiques d'hygiène des mains ; (ii) des précautions de contact direct entre personnel soignant et patients colonisés ou infectés par le SARM (par le port de gants, vêtements et équipements de protection) ; (iii) l'isolement des patients infectés ; (iv) le nettoyage et la

décontamination de l'environnement hospitalier, principalement les zones de contact manuel, comme les salles de soins, les toilettes et les vestiaires ; et (v) le dépistage des SARM chez les patients admis aux hôpitaux et le personnel soignant (**Boyce *et al.*, 2004 ; Coia *et al.*, 2006**).

Les interventions de contrôle des SARM dans la communauté doivent se focaliser principalement sur l'identification des porteurs sains par dépistage des SARM, afin d'empêcher un porteur de développer une infection et, d'autre part, réduire la transmission dans les endroits encombrés, particulièrement les crèches, les écoles, les cités universitaires, les centres sportifs, les casernes et les prisons, etc .... (**Skov *et al.*, 2012**).

Les LA-SARM représentent également un risque pour les humains, car comme ils peuvent se transmettre des animaux colonisés ou infectés à d'autres animaux, ils peuvent aussi se transmettre aux humains, particulièrement les personnes en contact étroit avec les animaux comme les vétérinaires et les éleveurs (**Wang *et al.*, 2023**). De plus, les LA-SARM sont responsables de pertes économiques importantes pour les agriculteurs, dues aux pertes de production causées par leurs infections. Pour faire face aux problèmes que peuvent poser les LA-SARM, plusieurs mesures préventives sont recommandées afin de briser avec succès la boucle de transmission Animal- (Environnement)-Homme-Animal. Ces mesures peuvent être appliquées à plusieurs niveaux et visent principalement à empêcher l'introduction des SARM dans les fermes, à réduire le nombre d'animaux colonisés ou infectés et à éradiquer les SARM des fermes contaminées (**Van Nes et Wulf, 2012 ; Crespo-Piazuelo et Lawlor, 2021**).

Parmi les mesures préventives mises en œuvre dans les fermes d'élevage on peut citer : (i) le respect des protocoles de contrôles sanitaires lors de l'import des animaux et leur introduction dans les élevages ; (ii) le nettoyage et la désinfection réguliers des fermes pour éliminer les SARM de l'environnement ; (iii) le lavage des main avant d'entrer et en sortant de la ferme, ainsi que le port de gants et vêtements protectives lors du contact avec les animaux ; (iv) le dépistage annuel des animaux, le personnel agricole et les vétérinaires ; et (v) lorsqu'un élevage s'avère positif au SARM, les animaux infectés doivent être isolés, le commerce des animaux doit être limité ou arrêté et l'élevages doit être dépeuplé, puis lavé et désinfectés rigoureusement (**Van Nes et Wulf, 2012 ; Crespo-Piazuelo et Lawlor, 2021**).

*Matériels et*

---

*Méthodes*

### II.1 Lieu, période et population d'étude

Cette étude, réalisée entre Novembre 2018 et le Juillet 2019, avait comme objectif la caractérisation génotypique et épidémiologique des isolats de *S. aureus* et de SARM isolés à partir de patients admis à deux hôpitaux de la Wilaya de Chlef, l'hôpital des Sœurs Bedj et l'hôpital de Merouani Abed.

Pour chaque participant, un questionnaire a été rempli lors des prélèvements, pour recueillir les données sociodémographiques et médicales comme l'âge, sexe, type de pathologie, prise d'antibiotiques, atteintes de maladies chroniques (**Annexe 1**). Chaque participant a été identifié par un code anonyme.

### II.2 Milieux de culture et solutions

Les compositions des milieux de culture et des solutions utilisées dans ce travail sont présentées dans l'**Annexe 2**. Les milieux de culture et solutions ont été stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

### II.3 Prélèvements et enrichissement

Les prélèvements de pus ont été collectés par écouvillons stériles imbibés de bouillon nutritif. Ces prélèvements ont ensuite subi une étape d'enrichissement, qui consiste à mélanger un millilitre (ml) de l'échantillon avec 3 ml du bouillon Cœur Cervele. Les prélèvements du liquide céphalo-rachidien (LCR) et du sang ont été collectés par des seringues stériles puis inoculés directement dans des flacons d'hémoculture. Tous les échantillons ont été ensuite incubés à 37°C pendant 24h (**Sulaiman et al., 2018**).

### II.4 Isolement et identification de *S. aureus*

L'isolement de *S. aureus* a été effectué par ensemencement en stries d'une goutte de la culture d'enrichissement (pour les prélèvements de pus) ou de la pré-culture (pour les prélèvements de sang et du LCR) sur gélose Chapman. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h à 48h (**Sulaiman et al., 2018**).

Les isolats présentant des caractéristiques morphologiques de *S. aureus*, telles que la couleur jaunâtre due à la fermentation du mannitol, ont été purifiés sur le même milieu de culture, puis repiqués sur gélose nutritive. Après incubation à 37°C pendant 24 à 48 h, les isolats purifiés ont été soumis à une série de tests d'identification : microscopique (la coloration de Gram), biochimique (les tests de la catalase et la coagulase), moléculaire (la PCR), le séquençage du génome complet par NGS et des analyses bioinformatiques.

### II.4.1 Identification microscopique par coloration de Gram

La coloration de Gram a permis de déterminer le type de paroi cellulaire, la morphologie des cellules et le mode de leur regroupement.

### II.4.2 Identification biochimique

#### II.4.2.1 Recherche de catalase

Ce test permet de déterminer si la bactérie possède une capacité à dégrader le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Pour cela, des colonies bactériennes pures ont été mélangées sur la surface d'une lame propre avec une goutte d' $H_2O_2$ . L'apparition immédiate des bulles d'air indique un résultat positif (**Foster, 1999**).

#### II.4.2.2 Tests de coagulase

La présence de l'enzyme coagulase est un important critère pour la distinction entre les staphylocoques à coagulase positive (SCoP) des autres staphylocoques à coagulase négative (SCoN). Il existe deux types de test de coagulase, le test en tube pour la détection de la coagulase libre et le test sur lame pour la détection de la coagulase liée. Avec le test de coagulase libre, une à deux colonies suspectes de *S. aureus* ont été transférées dans un tube Eppendorf stérile contenant 0,5 ml de plasma humain. Le tube a été ensuite incubé à 37°C et observé après 4h. La coagulation du plasma, qui reste en place même après retournement du tube, indique un résultat positif (**Katz, 2010**).

Le test de coagulase liée consiste à déposer sur une lame de verre une goutte de plasma humain et y ajouter une colonie bactérienne. La présence de la coagulase liée est détectée par l'apparition d'agglutination (**Katz, 2010**).

### II.4.3 Identification de *S. aureus* par PCR

#### II.4.3.1 Extraction d'ADN chromosomique

L'ADN des isolats de *S. aureus* a été isolé par la méthode du choc thermique (**Sambrook et al., 2002**). Deux à trois colonies de *S. aureus* ont été resuspendues dans 500  $\mu$ l de l'eau distillée stérile, incubées à 94°C pendant 15 min, puis mises sur glace pendant 15 min. Les débris cellulaires ont été précipités par centrifugation à 13000 tours/min pendant 5 min, alors que le surnageant contenant l'ADN génomique a été retenu et conservé à - 20°C (**Bogestam et al., 2018**).

### II.4.3.2 Réactions de PCR et programme d'amplification

Les isolats de staphylocoques ont été confirmés comme étant *S. aureus* par PCR à l'aide d'une paire d'amorce ciblant le gène *nuc* (**Tableau 3**), qui code l'enzyme nucléase, qui est présente chez la majorité des souches de *S. aureus* (**Zhang et al., 2004**). Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume total de 25µl, contenant 5µl d'ADN chromosomique, 3 µl de chaque amorce (10µM), 0,5 µl de dNTP mixtes, 2,5µl de tampon (10×), 0,25µl de Taq polymérase et 10,75µl de H<sub>2</sub>O ultra-pure en suivant le programme d'amplification PCR montré dans le **Tableau 4** (**Zhang et al., 2004**).

**Tableau 3.** Liste des amorces utilisées pour détection du gène *nuc* par PCR

Amorce	Séquence	Souche cible	Taille d'amplicon
Nuc 1	5' GCGATTGATGGTGATACGGTT 3'	<i>S. aureus</i>	279 Pb
Nuc 2	5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3'		

**Tableau 4.** Programme d'amplification par PCR

Nombre de cycle	Étape	Température (C°)	Durée
1 Cycle	Dénaturation initiale	94	10 min
35 Cycles	Dénaturation	94	1 min
	Hybridation	57	30 sec
	Élongation	72	1 min
1 Cycle	Extension finale	72	7 min

### II.4.3.3 Migration sur gel d'agarose

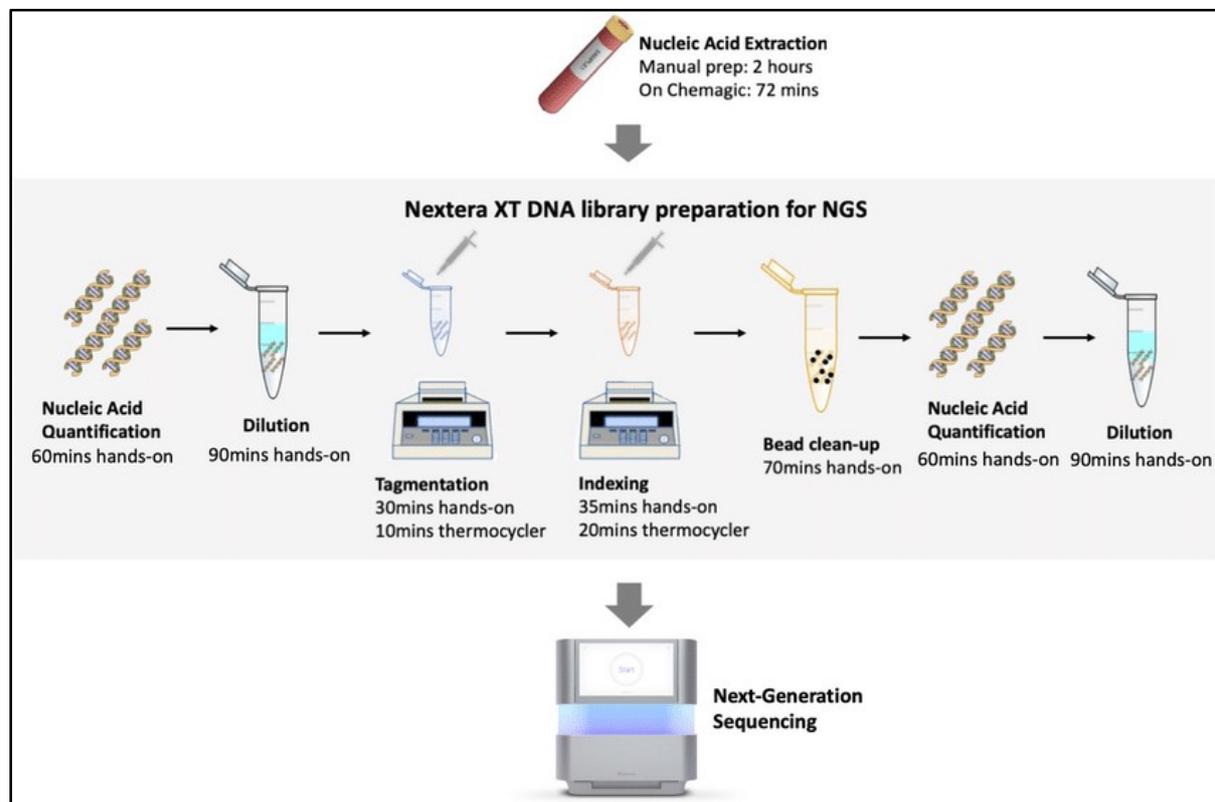
Un volume du produit de la PCR a été mélangé avec le tampon de charge (5X) avant d'être migré sur un gel d'agarose à 1,5% additionné de bromure d'éthidium (BET), à un voltage de 100 Volt pendant 45 min. Les amplicons ont été visualisé sous un transilluminateur UV.

## II.5 Séquençage des génomes complets des isolats de *S. aureus*

Une collection de 29 isolats de *S. aureus* a été sélectionnée pour séquençage de génome entier. Le séquençage des génomes a été réalisé à la plateforme génomique de l'Université de St Andrews en utilisant la technologie Illumina Miseq.

Le flux de travail de séquençage Illumina peut-être diviser en quatre étapes principales : 1) extraction d'ADN génomique ; 2) préparation des bibliothèques d'ADN (fragmentation de l'ADN génomique et ligation d'adaptateurs et d'indexes) ; 3) formation de clusters d'ADN et 4) séquençage (**Figure 30**).

Ces étapes garantissent que les ADN sont présents en quantités suffisantes, de bonne qualité et sans contaminants, et que chaque fragment d'ADN a la taille compatible avec la plateforme de séquençage et correctement étiqueté afin d'être identifié après séquençage.



**Figure 30.** Flux de travail pour la préparation de la bibliothèque d'ADN par le kit Nextera® XT (Illumina) (Tegally *et al.*, 2020).

### II.5.1 Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide du kit « MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit » (Lucigen, Middleton, WI, USA) selon les instructions du fabricant, comme suit :

1. Mettre en culture une colonie pure d'un isolat de *S. aureus* dans un bouillon de soja tryptique (TSB) sous agitation pendant une nuit à 37°C.
2. Centrifuger 1 mL de la culture bactérienne puis éliminer le surnageant.
3. Resuspendre le culot avec 150 µL de tampon TE et mélanger vigoureusement au vortex.
4. Ajouter 1 µL de la solution Ready-Lyse Lysozyme à la suspension bactérienne puis incubé pendant 30 minutes à 37°C.
5. Ajouter 150 µL de la solution de lyse contenant la protéinase K (50 µg/µL) et bien mélanger.

6. Incuber à 65-70 °C pendant 15 min, en vortexant brièvement toutes les 5 minutes.
7. Refroidir le mélange à 37 °C avant de le placer sur la glace pendant 3 à 5 minutes, puis procéder à la précipitation de l'ADN.

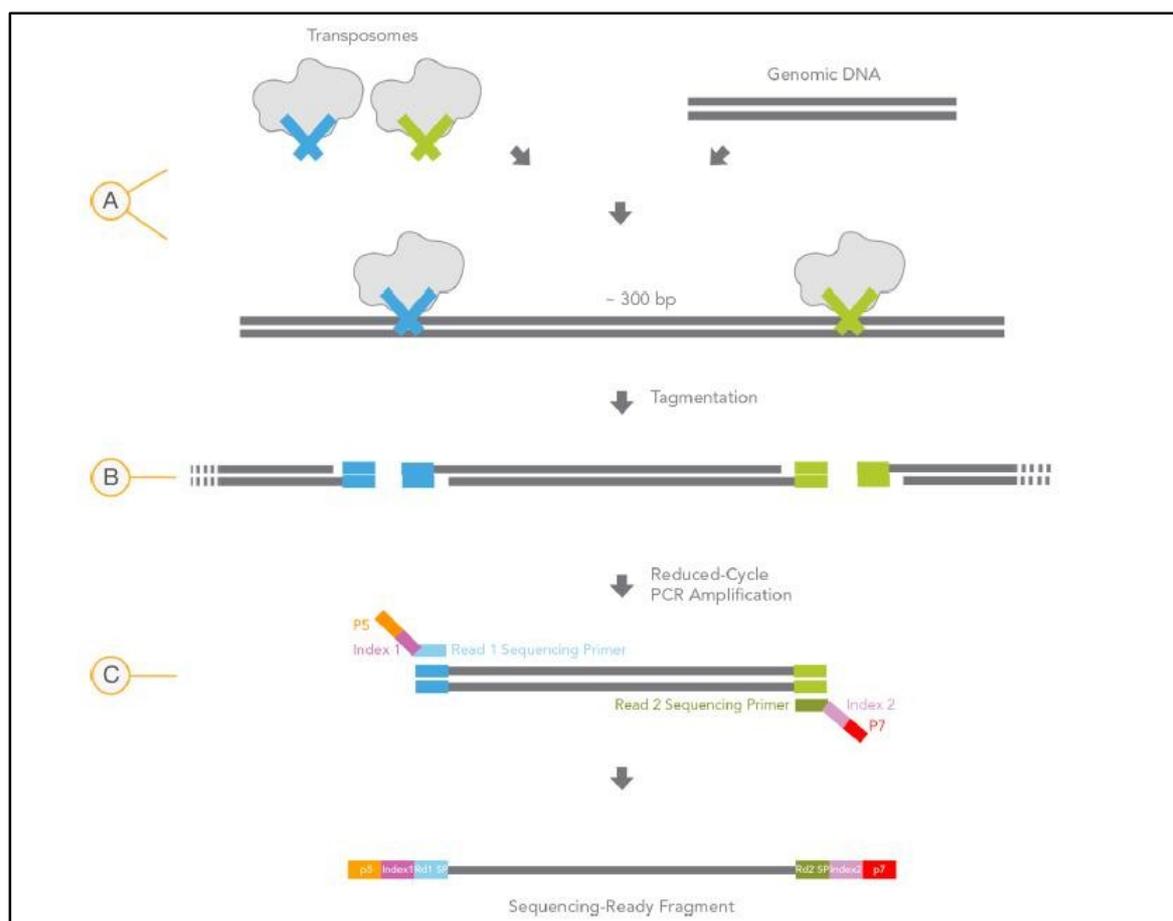
### **Précipitation de l'ADN**

1. Ajouter 175 µL de réactif de précipitation de protéines MPC à 300 µL d'échantillon lysé et mélanger vigoureusement au vortex pendant 10 secondes.
2. Précipiter les débris par centrifugation à 4 °C pendant 10 min à  $>10\,000 \times g$
3. Transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf et jeter le culot.
4. Ajouter 1 µL de RNase A (5 µg/µL) à chaque échantillon et mélanger soigneusement.
5. Incuber à 37 °C pendant 30 minutes.
6. Ajouter 500 µL d'isopropanol au surnageant récupéré et bien mélanger en retournant le tube plusieurs fois.
7. Précipiter l'ADN par centrifugation à 4 °C pendant 10 min à  $>10\,000 \times g$
8. Éliminer l'isopropanol à l'aide d'un embout de pipette sans déloger le culot d'ADN.
9. Rincer le culot contenant l'ADN génomique avec de l'éthanol à 70 %.
10. Resuspendre l'ADN dans 35 µL de tampon TE.

La concentration et la qualité de l'ADN ont été évaluées avec un fluoromètre Qubit® 3.0 (Invitrogen, Life Technologies, Singapore). Chaque échantillon d'ADN a été dilué à 0,2 ng/µL avec de l'eau ultra pure.

### **II.5.2 Préparation de la bibliothèque d'ADN**

Dans notre étude, la préparation de la bibliothèque d'ADN a été réalisée par tagmentation en utilisant le kit Nextera® XT (Illumina), qui permet la fragmentation de l'ADN génomique, la ligature des adaptateurs et le marquage par des indexes, le nettoyage et la normalisation de la bibliothèque simultanément en une seule réaction enzymatique, par l'intermédiaire d'une tagmentase, appelée aussi transposome (**Figure 31**). Le protocole détaillé est donné dans l'**Annexe 3**.



**Figure 31.** Le processus de tagmentation par le kit Nextera® XT (Illumina).

**A)** Un transposome Nextera XT avec adaptateurs est combiné avec une matrice d'ADN. **B)** Tagmentation pour fragmenter et ajouter des adaptateurs. **C)** PCR à cycles limités pour ajouter des séquences d'amorces et des indexes de séquençage (Illumina 2012, Guide de référence du kit de préparation de la bibliothèque d'ADN Nextera®XT).

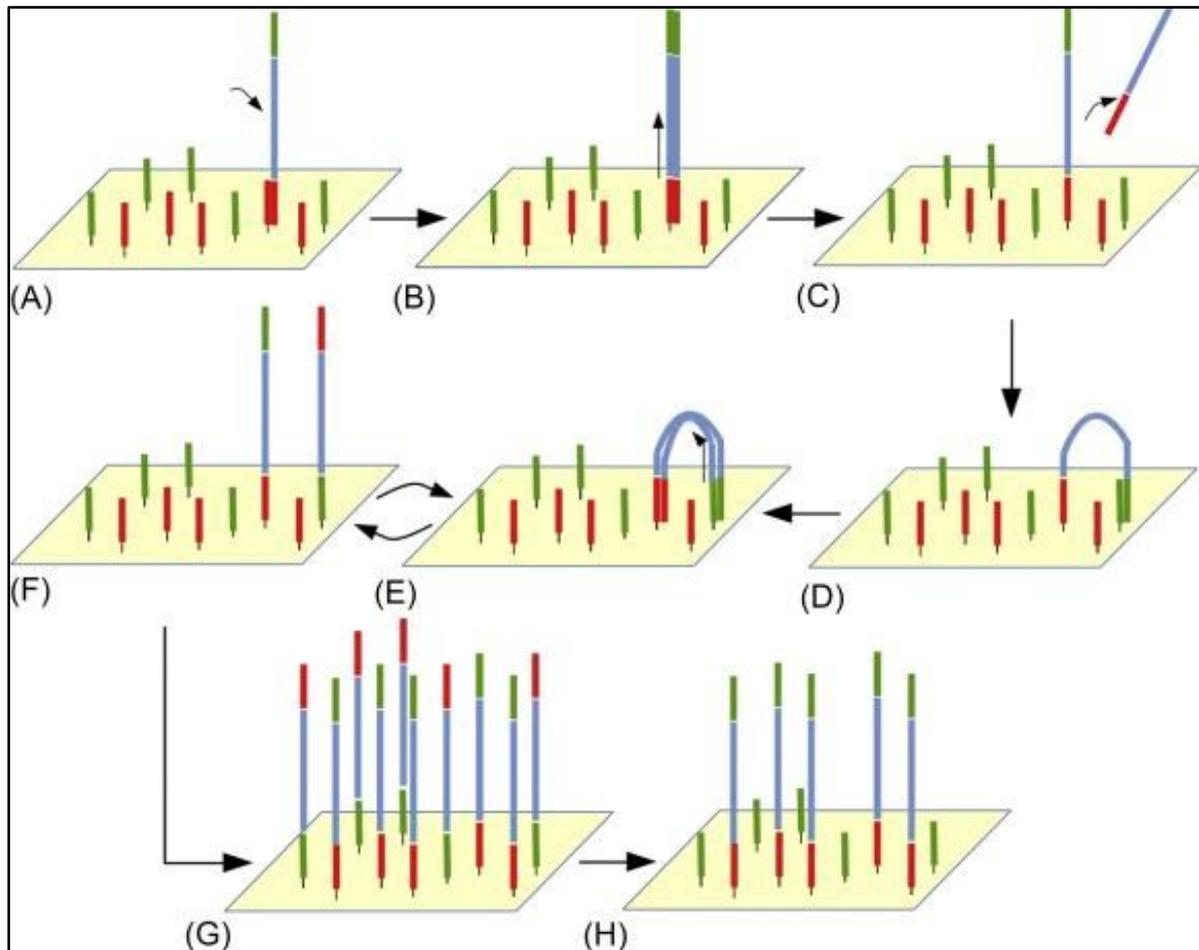
Dans l'étape de nettoyage et normalisation, la bibliothèque d'ADN est purifiée pour éliminer les fragments d'ADN très courts et diluée à la concentration recommandée par la plate-forme de séquençage.

L'ensemble des fragments d'ADN provenant d'un seul échantillon et liés à leurs extrémités à des adaptateurs et des indexes uniques constituent une bibliothèque d'ADN (**Figure 32**). La bibliothèque d'ADN ainsi préparée est insérée dans le séquenceur MiSeq (Illumina).

### II.5.3 Formation de clusters d'ADN

Les ADN dans la bibliothèque préparée lors de l'étape précédente sont dénaturés en fragments simple brins, puis fixés sur la surface d'une plaque (Flow Cell) recouverte d'amorces complémentaires aux séquences adaptateurs. Cette fixation se produit par hybridation entre les séquences adaptateurs, liés aux extrémités des fragments d'ADN, et les amorces qui sont fixés sur la plaque (**Figure 32 A**).

Chaque fragment d'ADN est amplifié par plusieurs cycles de PCR en pont « *bridge PCR* » (**Figure 32 B -H**) pour générer un amas d'ADN (*cluster*), d'environ 1000 copies de fragments d'ADN identiques, provenant d'un seul fragment d'ADN, sur la surface de la Flow Cell, prêts à être séquencés (**Mardis, 2008**).



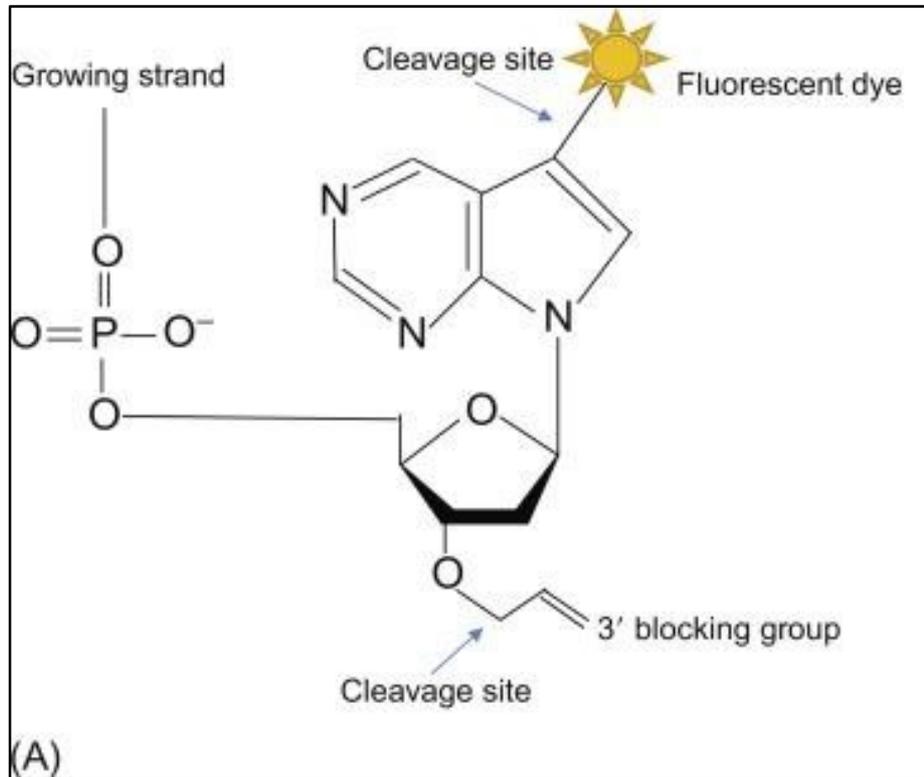
**Figure 32.** Formation de clusters sur Flow Cell pour le séquençage Illumina.

**A)** Les fragments d'ADN sont hybridés aux amorces sur la Flow Cell. **B)** Des brins complémentaires fixés de manière covalente sont synthétisés à partir des amorces. **C)** Les fragments d'ADN originaux sont éliminés. **D)** Durant l'amplification par PCR en pont, les fragments d'ADN se plient en hybridant leur deuxième adaptateur avec une autre amorce sur la Flow Cell. **E)** des brins complémentaires sont synthétisés à partir de la deuxième amorce. Enfin, **F)** les deux brins sont séparés par dénaturation. **G)** Ces étapes sont répétées plusieurs fois jusqu'à la formation d'un amas de fragments d'ADN. **H)** l'un des deux orientations (brins complémentaires) est finalement clivé (**Piro, 2020**).

#### II.5.4 Réactions de séquençage

Les ADN matrices préparées lors des étapes précédentes ont été séquencées avec le séquenceur Illumina MiSeq (Illumina) configuré pour générer des lectures de séquences en mode paillé (*paired-end*) de 2 x 300 pb (l'ADN est séquencé par les deux extrémités).

Le séquençage Illumina est une technique de séquençage par synthèse, basée sur l'utilisation de 4 nucléotides (dNTPs) terminateurs réversibles, dont les extrémités 3' OH sont bloqués d'une manière réversible par un groupement de blocage et chacun est marqué avec un colorant fluorescent différent (**Figure 33**).



**Figure 33.** Structure d'un dNTP terminateur réversible. s. Les terminateurs réversibles sont des dNTP marqués par des colorants fluorescences différents et contiennent un groupement de blocage dans la position 3' OH, pour empêcher l'ajout de plus d'un nucléotide par cycle de séquençage. Ce groupement de blocage peut être éliminé une fois le dNTP est incorporé afin de permettre l'incorporation du dNTP suivant (**Shen, 2023**).

Avant le séquençage, des amorces complémentaires aux adaptateurs attachés aux extrémités des fragments d'ADN sont ajoutés (**Figure 34 A**).

Le séquençage consiste en une succession de plusieurs cycles, et chaque cycle comprend 3 étapes :

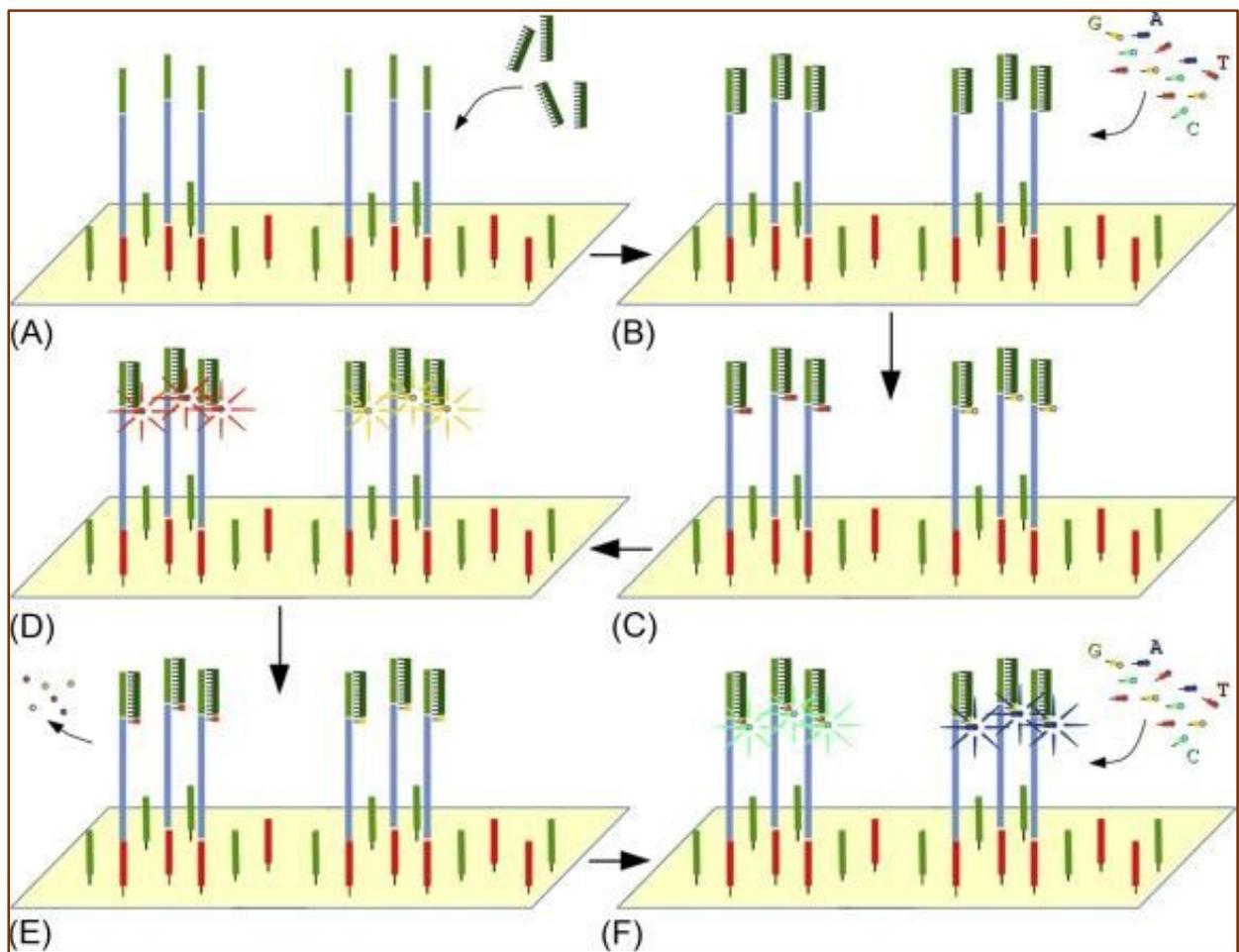
Étape 1 : Les 4 nucléotides terminateurs réversibles sont ajoutés sur la flow-cell (**Figure 34 B**). Durant cette étape, un seul dNTP est incorporé dans un brin d'ADN en cours de synthèse (complémentaire à la matrice) (**Figure 34 C**).

Étape 2 : les dNTPs incorporés sont excités par un laser et une fluorescence, caractéristique au dNTP incorporé, est émise. Cette fluorescence est détectée par une caméra et enregistrée (**Figure 34 D**).

Étape 3 : Une fois la fluorescence détectée, le groupement bloquant et le chromophore des dNTPs sont clivés et éliminés pour permettre l'incorporation du dNTP suivant dans le cycle suivant (**Figure 34 E**).

Chaque cycle est répété plusieurs fois (**Figure 34 F**). A la fin du séquençage, l'ensemble des images enregistrées par la caméra sont converties en séquences d'ADN, appelés lectures (*reads*).

Il est également possible de séquencer les deux extrémités du fragment d'ADN pour générer des lectures de séquence à extrémités pairées (*paired-end reads*).



**Figure 34.** Principe du séquençage Illumina. A) Deux groupes de fragments sont montrés. A) Tout d'abord, les amorces de séquençage sont hybridées aux adaptateurs des fragments d'ADN. Dans chaque cycle de séquençage. B) Les quatre dNTPs terminateurs réversibles marqués sont ajoutés. C) Un seul dNTP sera incorporé par l'ADN polymérase dans l'ADN complémentaire en cours de synthèse. D) Les signaux fluorescents des dNTP incorporés sont enregistrés (par prise d'image). E) les groupements bloquants et les chromophores des dNTPs incorporés sont supprimés. F) Les mêmes étapes sont répétées dans le cycle suivant pour permettre l'incorporation du deuxième dNTP. Une autre base au cycle suivant. Chaque cycle est répété plusieurs fois jusqu'à la fin du séquençage (**Piro, 2020**).

### II.5.5 Démultiplexage

Grâce à leurs codes-barres, les lectures de séquences produites par le séquenceur MiSeq sont, en premier lieu, assignées aux échantillons d'où elles proviennent (Démultiplexage), puis les séquences de chaque échantillon sont regroupées dans un fichier au format FASTQ (**Figure 35**). Le fichier FASTQ contient les détails de chaque séquence lue pour l'échantillon ainsi que la qualité de chaque base dans les séquences. Un exemple d'un fichier FASTQ est présenté dans l'**Annexe 4**.

Les lectures de séquences brutes générées dans cette étude ont été déposées dans la base de données *Sequence Read Archive (SRA)* du NCBI sous le numéro d'accès BioProject PRJNA930663.

### II.5.6 Analyses des séquences

#### II.5.6.1 Contrôle de la qualité des séquences

La première étape de l'analyse des séquences consiste à analyser leur qualité. Cette tâche a été réalisée avec le logiciel FastQC qui génère un rapport qui fournit une évaluation globale de la qualité des séquences, mettant en évidence tout problème pouvant survenir lors de la préparation de la bibliothèque, du processus de séquençage ou sur les échantillons eux-mêmes. Les problèmes d'échantillons peuvent être dus à des adaptateurs et des amorces PCR dupliqués, des lectures de mauvaise qualité ou à la présence de contaminants.

Le logiciel Trimmomatic a été utilisé pour éliminer les séquences d'amorces, des codes-barres et les bases de mauvaise qualité, afin de ne conserver que les séquences de très bonne qualité, qui seront être utilisées dans toutes les analyses qui suivent.

#### II.5.6.2 Assemblage des séquences

Les séquences de très bonne qualité obtenues ont été assemblées *de novo* avec le logiciel d'assemblage des génomes de procaryotes Unicycler version 0.4.7 (**Wick et al., 2017**), en utilisant les options du mode normal de l'assembleur.

Les assemblages ont été évalués à l'aide du logiciel QCAST (QUalityASsessmentTool) version 4.6 (**Gurevich et al., 2013**), qui compare les génomes assemblés avec un génome de référence (on a utilisé celui de la souche MSSA476 de *S. aureus*, dont le numéro d'accès dans la base de données GenBank est BX571858). QCAST fournit la longueur totale de l'assemblage (pb), le nombre total de contigs et de bases, contenu en GC, la taille du contig le plus long, profondeur de couverture, le nombre et la longueur des contigs mal assemblés, les valeurs L50 (défini comme le nombre des plus petites séquences dont la somme des

longueurs représente 50 % de l'assemblage.) et N50 (La longueur de tous les contigs qui couvre au moins la moitié de l'assemblage). L50 et N50 sont des marqueurs importants de la qualité de l'assemblage.

Les séquences de génomes des isolats de *S. aureus* obtenus après l'assemblage ont été exploités pour annoter les génomes, géotyper les isolats par *in silico* MLST, SCCmec et Spa ; établir les relations phylogénétiques entre les isolats par analyse des SNPs et enfin identifier les gènes de résistances et de virulence qu'ils portent. Ces analyses et les outils de la bioinformatique associés sont décrites dans les sections suivantes.

### II.5.6.3 Annotation des génomes

Une fois qu'un génome est séquencé, il doit être annoté pour lui donner un sens biologique. L'annotation du génome est un processus qui consiste à identifier la position de tous les gènes qui codent pour les protéines et les ARN non-codants (ARNr, ARNt et petits ARN) ainsi que d'autres éléments génétiques qui sont contenus dans le génome et à prédire leurs fonctions. Les génomes séquencés et assemblés dans cette étude ont été annotés avec le logiciel Prokka (*Rapid Prokaryotic Genome Annotation*) version 1.10 (Seemann, 2014). Prokka utilise un processus en deux étapes pour l'annotation des régions codantes pour les protéines : premièrement, les régions codantes pour les protéines sur le génome sont identifiées à l'aide de Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010) ; deuxièmement, les fonctions des protéines codées sont prédites par similarité avec les protéines stockées dans les bases de données ou de domaines protéiques. Prokka génère des fichiers de sortie aux formats GenBank, EMBL et gff.

### II.5.6.4 MLST

Le typage MLST est une méthode largement utilisée dans l'épidémiologie moléculaire pour caractériser les isolats d'espèces bactériennes (Pérez-Losada *et al.*, 2013). MLST analyse les variations dans les séquences de sept gènes de ménage (loci), conservés dans toutes les souches de l'espèce (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL*). Chaque séquence d'un locus se voit attribuer un numéro (*arcC*-1, *arcC*-2... et ainsi de suite). La combinaison des numéros assignés à tous les sept loci forme un profil allélique (par exemple, 2-3-4-3-8-4-6). Chaque profil allélique, se voit attribuer un ST (par exemple, ST-11).

Dans la MLST conventionnelle, environ 450 à 500 pb de chaque gène (locus) sont amplifiées par PCR, puis séquencées séparément par la méthode de Sanger et puis comparées à la base de données MLST. Avec l'arrivée des NGS pour le séquençage rapide des génomes, il est

désormais possible d'obtenir facilement les ST simplement en saisissant directement les séquences des sept loci à partir du génome (*in silico* MLST).

Le typage par *in silico* MLST de nos isolats a été réalisé avec le programme SRST2 (*Short Read Sequence Typing for bacterial pathogens*) v0.2.0 (Inouye *et al.*, 2014), en utilisant bowtie2 (Langmead et Salzberg, 2012) pour saisir les sept loci directement à partir des lectures de séquences Illumina et les comparer aux séquences stockées dans la base de données PubMLST de *S. aureus* (<https://pubmlst.org/saureus/>, accédée en 15 Novembre 2022).

#### II.5.6.5 Typage SCCmec et Spa

Les types de SCCmec ont été identifiés dans les génomes à l'aide de SCCmecFinder v.1.2 (Kaya *et al.*, 2018). Les types de Spa ont été déterminés par spaTyper v.1.0 (Bartels *et al.*, 2014) en utilisant les paramètres par défaut.

#### II.5.6.6 Analyses des SNPs

L'analyse des SNPs permet de déterminer les relations phylogénétiques entre les isolats bactériens avec une résolution beaucoup plus fine que par le génotypage par MLST.

Pour cela, le logiciel Roary version 3.11.2 (Page *et al.*, 2015) a été utilisé pour déterminer le core génome (la collection de tous les gènes partagés par les isolats séquencés). Les génomes assemblés de nos isolats ont été alignés sur un génome de référence de la souche MSSA476 de *S. aureus* (un isolat SASM appartenant à ST1, avec le numéro d'accès BX571858 dans la base de données GenBank). Ce génome de référence a été choisi car il est entièrement et soigneusement annoté. Roary extrait toutes les séquences codantes, les convertit en protéines et les compare entre elles en utilisant BLASTP (Camacho et Madden, 2013), puis il produit un fichier « gene\_presence\_absence.csv » contenant la liste des gènes partagés par tous les isolats (le core génome), ou par seulement certains isolats (le génome accessoire). Le génome accessoire contient principalement des éléments génétiques mobiles (EGM) tels que les prophages, les transposons, les SCCmec et les îlots génomiques, qui sont connus comme une source majeure de variation entre les génomes de *S. aureus*. L'ensemble du core génome et du génome accessoire constitue le pangénome. Roary génère également un alignement des nucléotides concaténés du core génome sous forme d'un fichier d'alignement multi-FASTA (Le génome accessoire a été masqué des alignements de SNP). Ce fichier d'alignement multi-FASTA est utilisé par le logiciel SNP-sites (Page *et al.*, 2016) pour extraire tous les SNP par inhabituelles de SNP) dans l'alignement ont été détectées dans l'alignement à l'aide de Gubbins (Croucher *et al.*, 2015) et supprimées. Enfin l'alignement du core génome sans les recombinaisons a été utilisé comme entrée du logiciel RAxML (Stamatakis, 2014) pour la construction d'un arbre phylogénétique.

### II.5.6.7 Analyses des gènes de virulence

Les gènes de virulence ont été identifiés à l'aide de VFAnalyzer (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>), un pipeline automatique pour un criblage systématique des facteurs de virulence potentiels, présents dans la base de données « *Virulence Factor Database (VFDB)* » (Liu *et al.*, 2022).

### II.5.6.8 Analyse génotypique de la résistance aux antimicrobiens

La présence des déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques a été déterminée en criblant les génomes assemblés contre la base de données CARD « *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* ; <https://card.mcmaster.ca> » (Alcock *et al.*, 2020).

## II.6 Tests de sensibilité aux antibiotiques

Les tests de sensibilité aux antibiotiques de nos isolats ont été effectués par la méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller Hinton et par le système Vitek® 2. Les disques d'antibiotiques utilisés dans la méthode de diffusion de disque sont : amikacine (AMK ; 30 µg), céfoxitine (FOX ; 30 µg), ciprofloxacine (CIP ; 5 µg), chloramphénicol (CHL ; 30 µg), acide fusidique (FUS ; 10 µg), gentamycine (GEN ; 10 µg), kanamycine (KAN ; 30 µg), ofloxacine (OFX ; 5µg) and rifamycine (RIF ; 5 µg). La méthode de diffusion de disque a été réalisée par ensemencement à l'aide d'un écouvillon d'une culture bactérienne à 0.5 McFarland sur des boîtes de gélose Mueller Hinton, puis les disques d'antibiotiques ont été déposés sur la surface de la gélose. Les boîtes ont été incubées pendant 24 h à 37°C, les lectures ont été faites en mesurant les diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm). Selon les diamètres, les isolats ont été classés en Sensibles (S), Intermédiaires (I) ou Résistantes (R) selon les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI M100, 2022)* et le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (CA-SFM, 2022) (Annexe 5).

Le système automatisé Vitek® 2 (BioMérieux) a été utilisé pour déterminer les CMI des antibiotiques suivants : érythromycine (ERY), la clindamycine (CLI), la lévofloxacine (LVX), la linézolide (LZD), la moxifloxacine (MXF), le nitrofurantoïne (NIT), la quinupristine/dalfopristine (QD), le tigécycline (TGC), la teicoplanine (TEC), la tétracycline (TET), le triméthoprim+ sulfaméthoxazole (SXT) et la vancomycine (VAN). Les isolats ont été repiqués sur gélose nutritive et incubés pendant 24h à 37°C. Des suspensions bactériennes équivalentes à 0,5 McFarland ont été préparées pour les 17 isolats bactériens dans des cartes. Les résultats ont été interprétés selon les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI M100, 2022)* et le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (CA-SFM, 2022).

# *Résultats*

---

### III.1 Caractéristiques des patients et des prélèvements

Entre Novembre 2018 et Juillet 2019, 17 échantillons de patients, au niveau de deux hôpitaux de la Wilaya de Chlef : l'hôpital des Sœurs Bedj et l'hôpital de Merouani Abed, ont été collectés. Les caractéristiques des échantillons et les données démographiques et cliniques des patients inclus dans cette étude sont présentées dans le **Tableau 5**. Quinze (88%) patients étaient admis à l'hôpital Merouani Abed et 2 (6%) à l'hôpital Sœurs Bedj. Douze (70.6%) sont adultes et 5 enfants (29.4%) ; 8 (47%) hommes et 9 (53%) femmes. Quinze prélèvements étaient des pus (88%, n=15), 1 (6%) du LCR et 1 du sang (6%).

**Tableau 5.** Caractéristiques des patients et des prélèvements.

Patient	Age	Sexe	Date d'admission	Date de collection	Hôpital	Service	Prélèvement
1RN	A	F	20.12.2018	24.12.2018	MA	Trauma	Pus
2RN	E	F	15.01.2019	20.01.2019	MA	Pédiatrique	Pus
4RN	E	H	30.12.2018	31.12.2018	MA	Pédiatrique	Pus
7RN	A	F	17.01.2019	20.01.2019	MA	Urgence	Pus
9RN	E	H	26.02.2019	27.02.2019	MA	Pédiatrique	Sang
10RN	A	H	21.04.2019	22.04.2019	MA	MI	Pus
13RN	A	F	18.04.2019	21.04.2019	MA	MI	LCR
14RN	E	H	22.01.2019	23.01.2019	MA	Pédiatrique	Pus
15RN	A	F	28.11.2018	29.11.2018	MA	Urgence	Pus
16RN	A	H	21.01.2019	22.01.2019	MA	Trauma	Pus
17RN	E	F	11.02.2019	24.02.2019	MA	Pédiatrique	Pus
18RN	A	F	14.02.2019	25.02.2019	MA	Urgence	Pus
19RN	A	H	13.03.2019	14.03.2019	SB	ORL	Pus
20RN	A	H	09.05.2019	13.05.2019	MA	MI	Pus
21RN	A	F	09.05.2019	13.05.2019	MA	MI	Pus
25RN	A	F	21.03.2019	24.03.2019	SB	MI	Pus
29RN	A	H	23.04.2019	29.04.2019	MA	MI	Pus

A: Adulte; E: Enfant; F: Femme; H: Homme; MA: Merouani Abed; SB: Sœurs Bedj; MI: Médecine interne ; ORL: Oto-Rhino-Laryngologie; LCR: Liquide céphalo-rachidien, Trauma : Traumatologie.

### III.2 Isolement et identification de *S. aureus*

Les *S. aureus* dans les 17 échantillons ont été isolés et identifiés par plusieurs tests microbiologiques, biochimiques et moléculaires.

#### III.2.1 Identification macroscopique et microscopique de *S. aureus*

Tous les isolats ont montré les caractéristiques de *S. aureus* après culture sur le milieu Chapman, avec des colonies jaunâtres, dû à la fermentation du mannitol (Kateete *et al.*, 2019) (Figure 35) ; et après coloration de Gram, comme étant des coques à Gram positif, disposées en amas (Figure 36).



Figure 35. Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu Chapman.

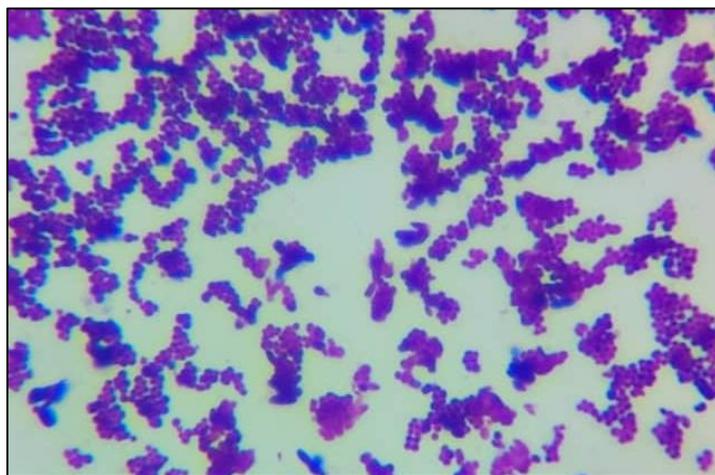


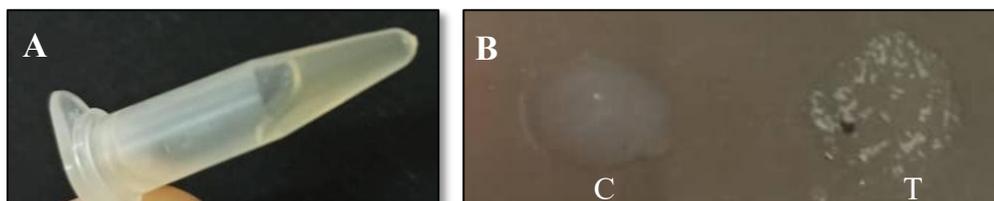
Figure 36. Aspect microscopique d'un isolat de *S. aureus* après coloration de Gram (G x100).

### III.2.2 Identification biochimique de *S. aureus*

Les tests de catalase et de coagulase (libre et liée) ont révélé que les 17 isolats étaient catalase et coagulase positifs (**Figure 37** et **38**).



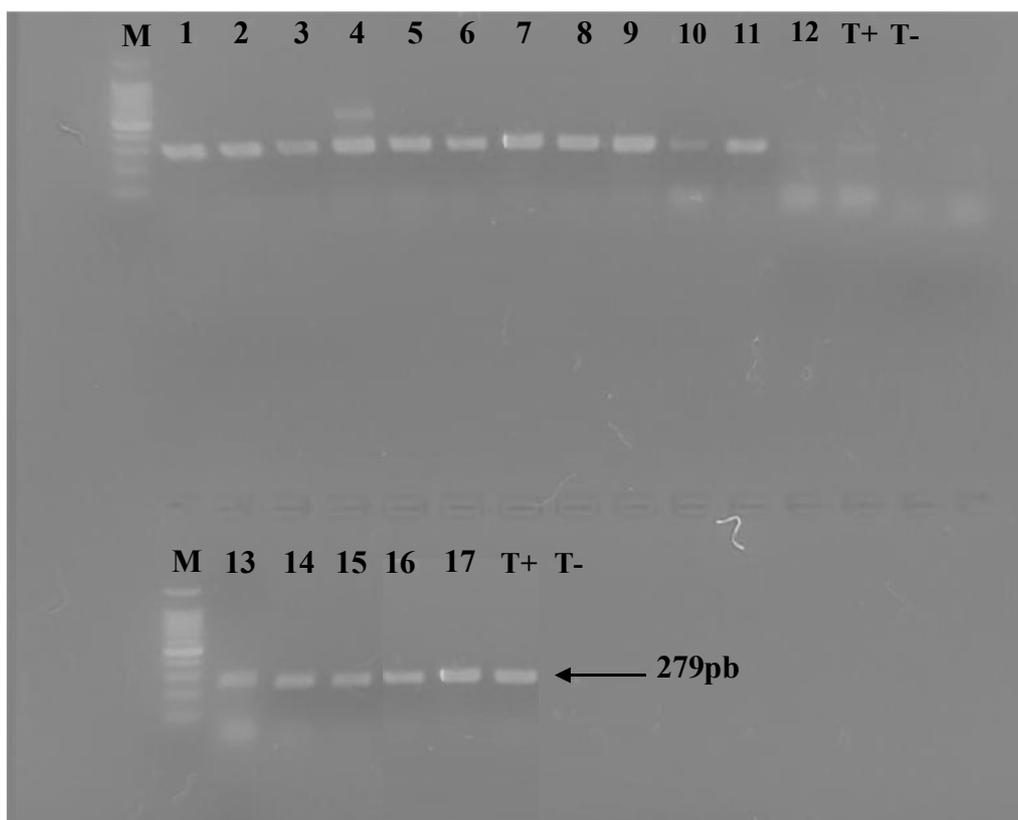
**Figure 37.** Résultat positif du test de catalase pour l'isolat RN7 (**T**) ; (**C**) Contrôle négatif.



**Figure 38.** Résultats positifs du test de coagulase, libre (**A**) et liée (**B**), pour l'isolat RN7 (**T**). (**C**) Contrôle négatif.

### III.2.3 Identification moléculaire de *S. aureus*

Les résultats de la PCR ont montré que les 17 isolats ont produit une bande d'une taille de 279 pb, correspondant à la taille attendue des amplifiats par les amorces NucF et NucR, ce qui confirme que ces isolats sont des *S. aureus* (**Figure 39**).



**Figure 39.** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR avec les amorces NucF et NucR. Puits de 2 à 11 et de 17 à 21 les isolats de *S. aureus* RN1, RN2, RN4, RN7, RN9, RN10, RN13, RN14, RN15, RN16, RN17, RN18, RN19, RN20, RN21, RN25, RN29 respectivement. **M** : Marqueur de taille ; **T+** : Témoin positif (*S. aureus* ATCC 6538) ; **T-** : Témoin négatif.

#### III.2.4 Identification des SARM

Parmi les 17 isolats de *S. aureus*, 7 (41,2 %) ont été identifiés comme étant des SARM en raison de leur résistance à la céfoxitine, et 10 (85,8 %) étaient des SASM.

#### III.2.5 Caractéristiques des isolats des SARM et SASM

La majorité des isolats de *S. aureus* (58,8 %, n = 10) provenaient de patients hospitalisés pendant plus de 48 h et ont donc considérés comme hospitaliers (**Tableau 6**), selon la définition du CDC (**Garner et al., 1988**).

**Tableau 6.** Caractéristiques des isolats des SARM et SASM.

Isolat	SASM / SARM	AC/AH
1RN	MRSA	AH
2RN	MRSA	AH
4RN	MRSA	AC
7RN	MRSA	AH
9RN	MSSA	AC
10RN	MSSA	AC
13RN	MSSA	AH
14RN	MRSA	AC
15RN	MRSA	AC
16RN	MRSA	AC
17RN	MSSA	AH
18RN	MSSA	AH
19RN	MSSA	AC
20RN	MSSA	AH
21RN	MSSA	AH
25RN	MSSA	AH
29RN	MSSA	AH

SASM : *S. aureus* sensible à la méthicilline ; SARM : *S. aureus* résistante à la méthicilline ; AH: associé aux hôpitaux; AC: associé à la communauté.

### III.3 Analyses bioinformatiques des séquences des génomes des isolats de *S. aureus*

Les données brutes de séquençage produites dans cette étude et les méta-données associées ont été déposées dans la base de données SRA (*Short Read Archive*) du NCBI sous le numéro d'accès BioProject PRJNA930663 (**Annexe 6**).

#### III.3.1 Assemblage des séquences

Pour garantir que les génomes utilisés pour les analyses en aval étaient de bonne qualité, les qualités des assemblages ont été évaluées par le logiciel QUAST (**Gurevich *et al.*, 2013**). QUAST produit différents indicateurs de la qualité de l'assemblage tels que le nombre de contigs et les valeurs N50 et L50. La valeur N50 indique qu'au moins la moitié des nucléotides dans l'assemblage appartiennent à des contigs de longueur N50 ou plus.

La valeur L50 correspond au nombre de contigs dont la taille totale est égale ou supérieure à la valeur N50 et qui comprennent la moitié des bases de l'assemblage. Plus la valeur de N50 est élevée et plus la valeur de L50 est faible est une indication que l'assemblage est de bonne qualité.

Les caractéristiques des assemblages sont présentées dans le **Tableau 7**. Sur la base des mesures de qualité du génome, tous les génomes, sauf un (29RN), sont de bonne qualité. Le génome de l'isolat 29RN avait la plus faible valeur N50 (3,774) et la valeur L50 la plus élevée (201) par rapport aux autres génomes, indiquant que ce génome contient trop de contigs de petites tailles. Le nombre de contigs variait entre 123 (10RN) et 460 (13RN), avec une moyenne de 266. Les valeurs N50 pour les génomes variaient de 20,469 (13RN) à 96,050 (10RN), avec une moyenne de 41,373 ; tandis que les valeurs L50 variaient de 8 (10RN) à 37 (13RN), avec une moyenne de 23.

**Tableau 7.** Métriques de la qualité des génomes des isolats de *S. aureus* séquencés dans cette étude.

Isolat	Nombre de contigs	Contig L50	Contig N50
1RN	270	19	46,124
2RN	311	23	40,997
4RN	295	20	45,356
7RN	172	17	44,753
9RN	199	22	37,957
10RN	123	8	96,050
13RN	460	37	20,469
14RN	325	34	27,198
15RN	289	25	34,232
16RN	236	19	47,209
17RN	383	33	27,639
18RN	294	28	31,534
19RN	245	21	44,441
20RN	217	20	44,717
21RN	267	24	34,329
25RN	276	20	38,966
29RN	1,299	201	3,774

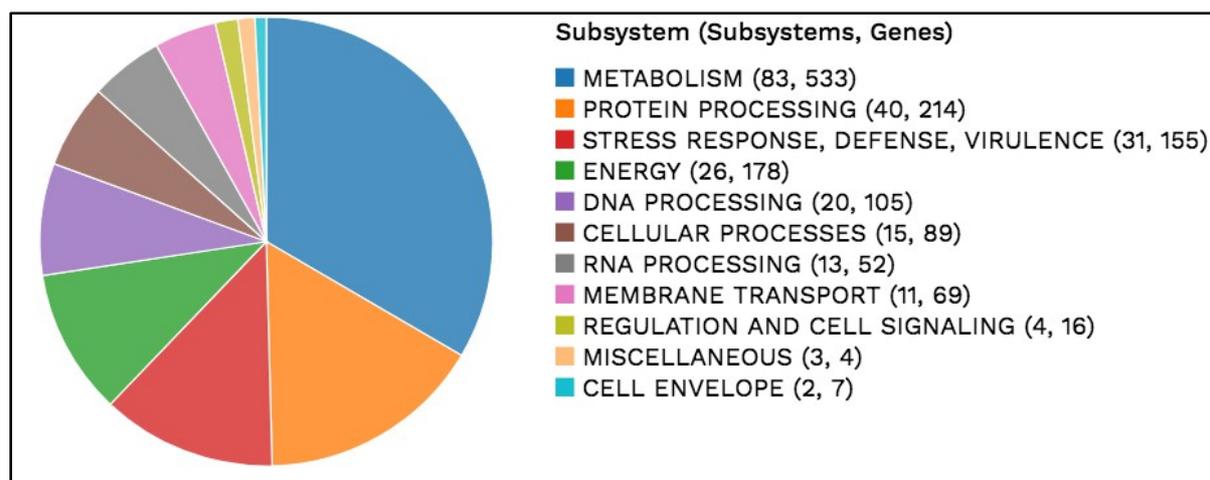
### II.3.2 Annotation des génomes

Après l'assemblage, l'annotation automatique des génomes a été réalisée sur le serveur PATRIC (Davis *et al.*, 2020 ; [www.patric.org](http://www.patric.org)). Le **Tableau 8** montre la taille des génomes (pb), le nombre de CDS et contenus en GC (%). La taille moyenne des génomes est de 2,750,713 pb et la teneur en G+C pur tous les isolats était comprise entre 32.69% et 32,85 %, avec une moyenne de 32.76%. Les génomes contiennent en moyenne 2703 CDS qui codent pour 2168 protéines dont les fonctions ont été prédites et pour 536 protéines hypothétiques.

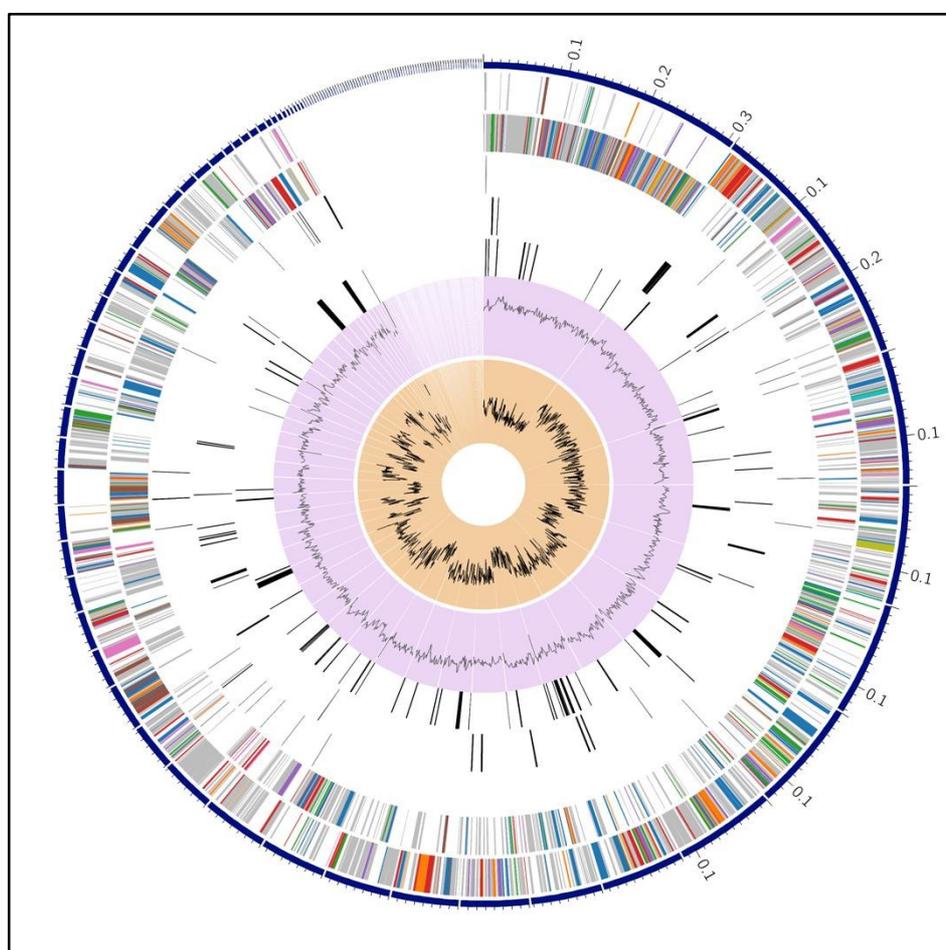
**Tableau 8.** Caractéristiques des génomes des isolats de *S. aureus*.

Isolat	Taille du génome (pb)	Pourcentage en GC (%)	Nombre de gènes	Protéines avec fonctions	Protéines hypothétiques
1RN	2,794,513	32.74	2,734	2,203	531
2RN	2,764,397	32.79	2,707	2,182	525
4RN	2,815,677	32.79	2,836	2,305	531
7RN	2,802,309	32.74	2,725	2,193	532
9RN	2,733,637	32.71	2,625	2,109	516
10RN	2,731,972	32.70	2,609	2,106	503
13RN	2,675,795	32.74	2,703	2,145	558
14RN	2,700,513	32.85	2,649	2,131	518
15RN	2,754,192	32.83	2,694	2,175	519
16RN	2,770,058	32.77	2,705	2,184	521
17RN	2,702,394	32.78	2,684	2,119	565
18RN	2,756,196	32.77	2,726	2,146	580
19RN	2,749,521	32.78	2,725	2,163	562
20RN	2,735,815	32.69	2,652	2,126	526
21RN	2,758,119	32.79	2,737	2,200	537
25RN	2,766,302	32.75	2,748	2,198	550
29RN	2,576,927	33.11	3,084	2,533	551

L'annotation fonctionnelle a révélé que les CDS dont des fonctions ont été prédites sont classés en 11 catégories fonctionnelles différentes, dont la majorité appartiennent aux catégories métabolisme (533, 83%), transformation des protéines (214, 40%), réponses aux stress, défense contre le système immunitaire et la virulence (155, 31%), comme montré dans les **figures 40** et **41**.



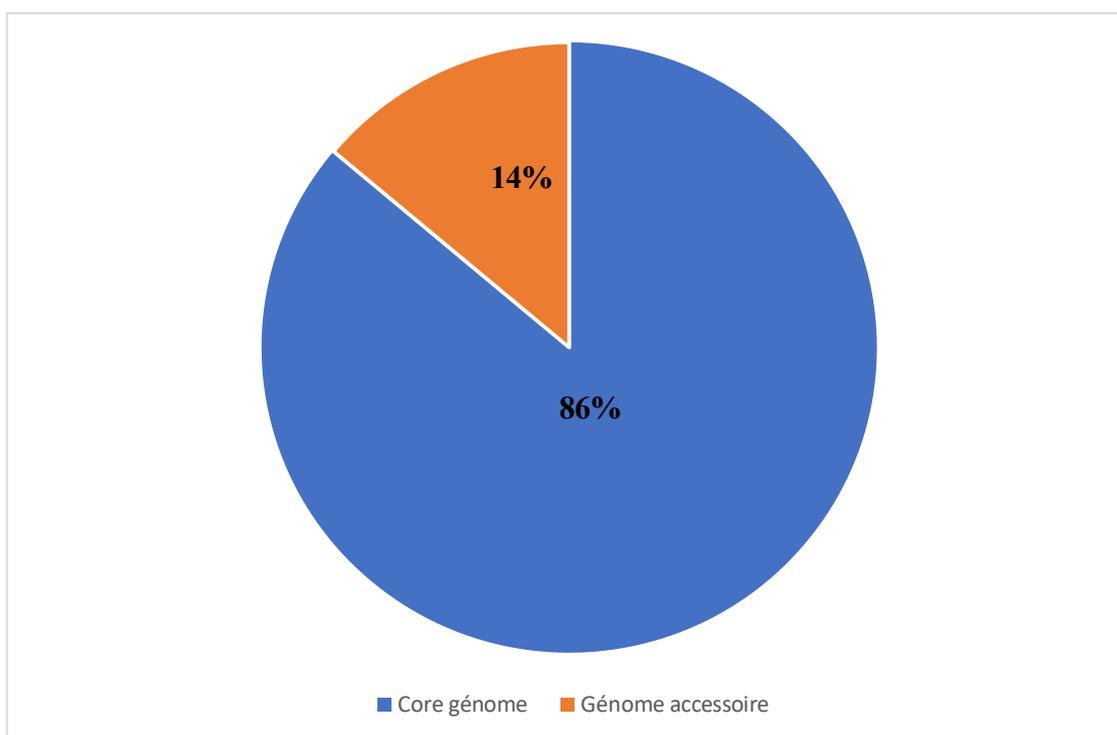
**Figure 40.** Classification fonctionnelle des protéines codées par le génome de l'isolat de *S. aureus* 10RN.



**Figure 41.** Représentation circulaire de l'annotation et des caractéristiques générales du génome de l'isolat 10RN. Les anneaux de l'extérieur à l'intérieur représentent : les contigs, les CDS sur le brin précoce, les CDS sur le brin tardif, les gènes d'ARN non-codants, les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de virulence, la teneur en G+C et le biais de GC. Les couleurs du CDS sur le brin précoce et tardif indiquent le sous-système auquel appartiennent ces gènes.

### II.3.3 Analyse du pangénome

Les génomes assemblés et annotés ont été analysés par le logiciel Roary (**Page et al., 2015**), pour identifier le pan-génome, le core génome, et le génome accessoire de 16 isolats de *S. aureus*. Les résultats de cette analyse sont montrés dans la **Figure 42**. Le pangénome comprend 3672 gènes, et est constitué d'un core génome de 3162 gènes (86%) et d'un génome accessoire de 510 gènes (14%).



**Figure 42.** Diagramme du pangénome, illustrant le core génome (bleu) et le génome accessoire (orange), de 16 isolats de *S. aureus*.

### III.4 Typage des isolats de *S. aureus*

#### III.4.1 Typage MLST

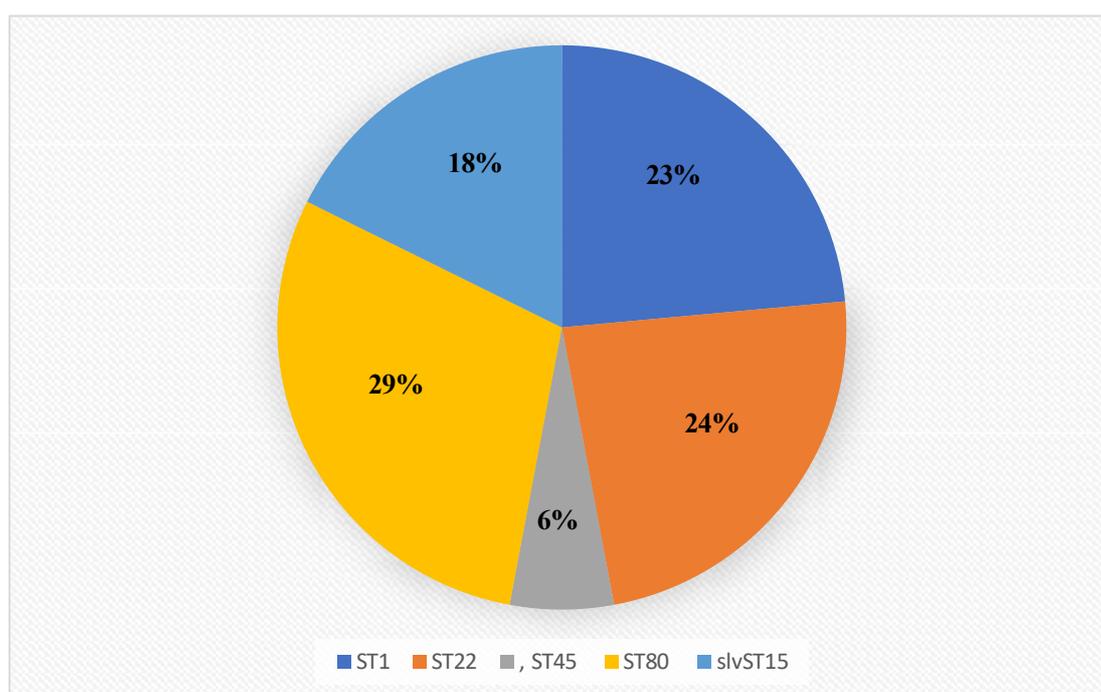
L'analyse par *in silico* MLST des 17 isolats de *S. aureus* a révélé quatre types de séquences (ST) différents : ST1, ST22, ST45 et ST80 et slvST15 (un nouveau ST qui diffère du ST15 au niveau d'un seul locus) (**Table 9**). Le ST dominant était le ST80 (n=5, 29.4%), suivi par les ST1 et ST22 (23.5%, n= 4 chacun), le slvST15 (17.6%, n =3), et le ST45 (5.8%, n=1) (**Figure 43**).

Le typage MLST a permis de classer les isolats dans cinq CC connus, CC1 (ST1), CC22 (ST22), CC45 (ST45), CC15 (slvST15) et CC80 (ST80).

**Tableau 9.** Résultats de l'analyse par *in silico* MLST.

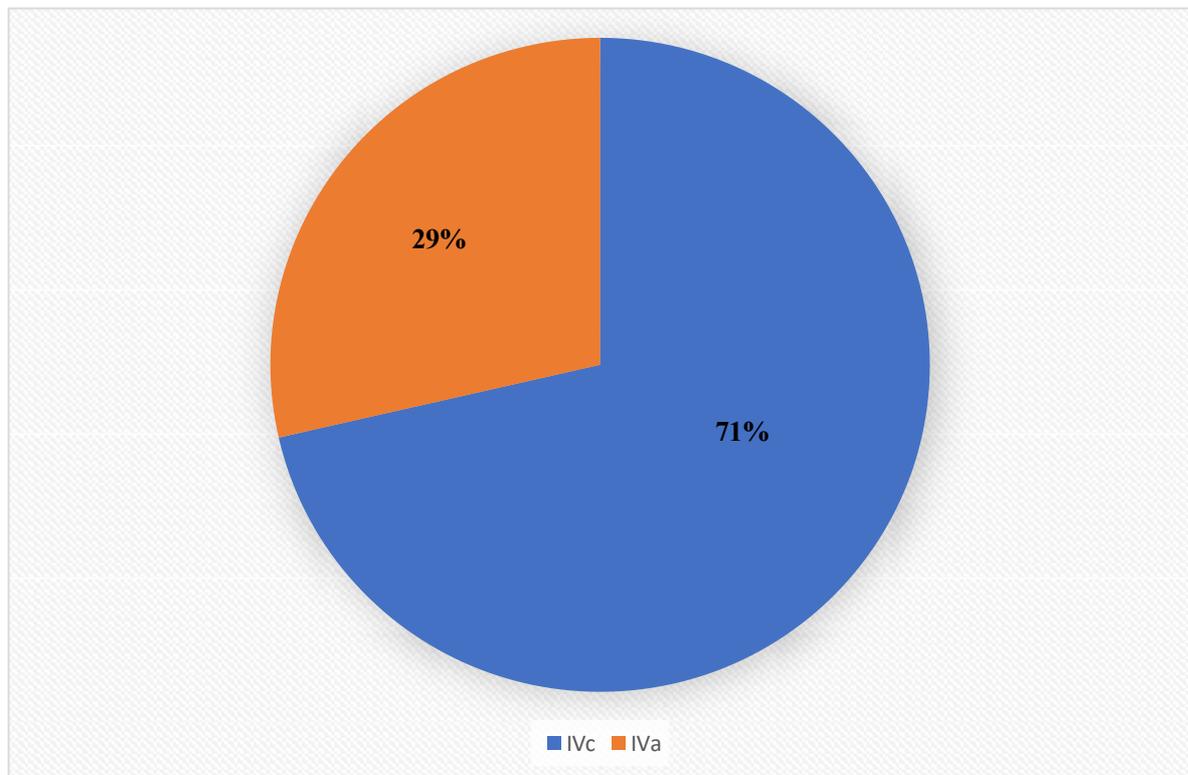
Isolate	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>	Profile allélique	ST
1RN	1	3	1	14	11	51	10	1-3-1-14-11-51-10	80
2RN	1	3	1	14	11	51	10	1-3-1-14-11-51-10	80
4RN	1	3	1	14	11	51	10	01-3-1-14-11-51-10	80
7RN	1	1	1	1	1	1	1	1-1-1-1-1-1-1	1
9RN	1	1	1	1	1	1	1	1-1-1-1-1-1-1	1
10RN	1	1	1	1	1	1	1	1-1-1-1-1-1-1	1
13RN	13	13	1	1	12*	11	13	13-13-1-1-12*-11-13	slvST15*
14RN	7	6	1	5	8	8	6	7-6-1-5-8-8-6	22
15RN	1	3	1	14	11	51	10	1-3-1-14-11-51-10	80
16RN	1	3	1	14	11	51	10	1-3-1-14-11-51-10	80
17RN	13	13	1	1	12*	11	13	13-13-1-1-12*-11-13	slvST15*
18RN	13	13	1	1	12*	11	13	13-13-1-1-12*-11-13	slvST15*
19RN	10	14	8	6	10	3	2	10-14-8-6-10-3-2	45
20RN	1	1	1	1	1	1	1	1-1-1-1-1-1-1	1
21RN	7	6	1	5	8	8	6	7-6-1-5-8-8-6	22
25RN	7	6	1	5	8	8	6	07-6-1-5-8-8-6	22
29RN	7	6	1	5	8	8	6	7-6-1-5-8-8-6	22

\*slvST15 (*Single locus variant of ST15*) : un nouveau ST qui diffère du St15 par 1 SNP au niveau du locus *pta*.

**Figure 43.** Prévalence des STs des isolats.

### III.4.2 Typage SCCmec

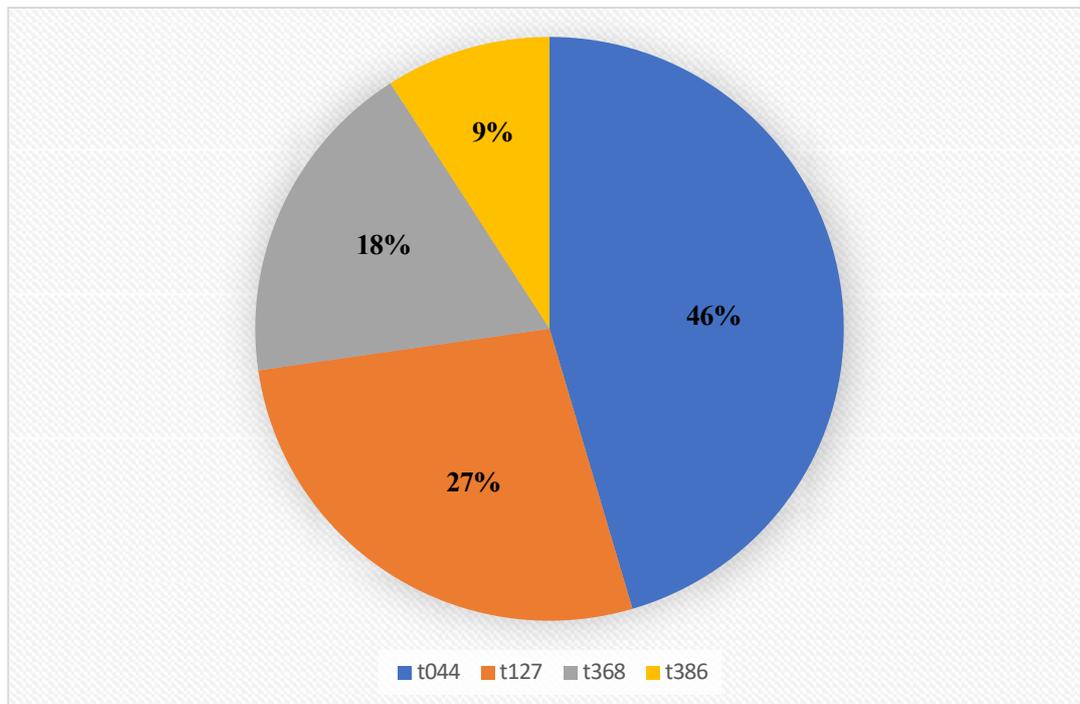
Deux types de SCCmec ont été identifiés parmi les isolats de SARM, le type IVc (71.4%, n=5) et IVa (28.6%, n=2) (**Figure 44**).



**Figure 44.** Prévalence des types SCCmec des isolats.

### III.4.3 Typage Spa

Au total, quatre types de *spa*, t044 (n=5, 29.4 %), t127 (n=3, 17.6 %), t368 (n=2, 11.7 %) et t386 (n=1, 5.9 %) ont été détectés parmi 11 isolats de *S. aureus* ; le type de *spa* des six isolats restants de *S. aureus* n'a pas pu être déterminé (**Figure 45**).



**Figure 45.** Prévalence des types Spa des isolats.

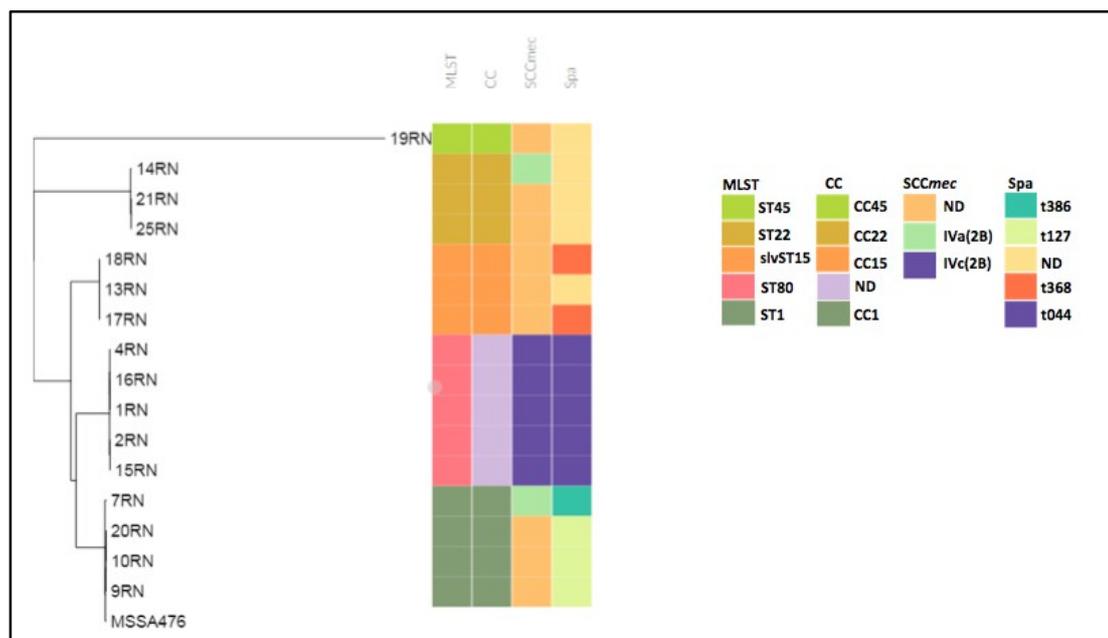
### III.4.4 Analyse phylogénomique

L'analyse phylogénomique basée sur les différences de SNP dans le core génome des isolats a révélé que le nombre de différences de SNP entre les 17 isolats de *S. aureus* allait de 0 à 60,210 (Figure 46).

	1RN	2RN	4RN	7RN	9RN	10 RN	13 RN	14 RN	15 RN	16 RN	17 RN	18 RN	19 RN	20 RN	21 RN	25 RN	29 RN	MSSA 476
1RN																		
2RN	178																	
4RN	102	159																
7RN	1796 1	1790 9	1812 6															
9RN	1791 6	1784 4	1806 6	523														
10RN	1804 9	1794 2	1819 2	557	122													
13RN	1662 8	1660 3	1668 1	1692 5	1695 1	1703 9												
14RN	3704 1	3671 9	3711 7	3706 9	3699 5	3733 7	3467 3											
15RN	193	6	152	1779 1	1771 9	1782 6	1651 8	3658 0										
16RN	6	177	101	1815 1	1806 5	1819 4	1671 9	3712 1	170									
17RN	1758 8	1755 1	1769 6	3706 9	1779 1	1789 9	7	3691 6	1743 6	1771 3								
18RN	1742 9	1737 2	1751 8	1758 9	1760 8	1771 8	11	3685 2	1728 6	1752 4	7							
19RN	5856 6	5825 1	5900 5	6013 7	5968 5	6021 0	5497 8	5324 0	5809 6	5890 7	5812 8	5829 9						
20RN	1805 5	1796 0	1821 0	553	121	0	1704 2	3734 6	1782 4	1820 9	1791 6	1773 7	6017 9					
21RN	3737 8	3707 9	3756 4	3766 4	3733 4	3777 8	3494 4	295	3682 7	3753 9	3727 9	3722 7	5359 9	3778 0				
25RN	3752 9	3718 5	3776 2	3796 8	3764 6	3810 4	3494 0	302	3695 3	3771 7	3739 7	3741 9	5396 3	3811 0	2			
29RN	2845 2	2834 6	2847 4	2967 8	2966 2	2973 3	2747 6	198	2823 9	2848 2	2853 3	2855 2	3786 6	2974 0	2	0		
MSSA 476	1812 6	1802 2	1827 5	502	294	329	1706 1	3745 5	1789 2	1828 6	1792 0	1776 7	6041 6	325	3797 2	3829 4	2984 1	

**Figure 46.** Les différences de SNP entre les 17 isolats de *S. aureus*. Les différences de SNP marquées en vert indiquent des isolats apparentés.

La reconstruction phylogénétique à partir des données SNP des génomes entiers est donnée dans la Figure 47, qui montre les 16 isolats de *S. aureus* ainsi que leur ST, CC, SCC<sub>mec</sub> et Spa. Nous pouvons observer que les isolats sont séparés en cinq groupes distincts correspondant à leurs STs respectifs.



**Figure 47.** Arbre phylogénétique des 17 isolats de *S. aureus* et du génome de référence de la souche *S. aureus* MSSA476 visualisé à l'aide de Phandango. L'arbre phylogénétique à gauche est lié aux : STs, CCs, SCCmec et *Spa* (représentés par différentes couleurs comme indiqué dans la légende à droite).

### III.5 Détection des gènes de virulence

Les génomes des isolats de *S. aureus* ont été criblés pour la présence des gènes de virulence à l'aide de la base de données des facteurs de virulence VFDB. Les gènes de virulence détectés sont présentés dans le **Tableau 10**. Ces facteurs de virulence appartenaient à cinq classes, à savoir : (i) l'adhérence, (ii) l'évasion immunitaire, (iii) les enzymes extracellulaires, (iv) les toxines et (v) la formation de biofilm. Au total, 95 gènes de virulence ont été identifiés, avec des proportions différentes, dans les 16 génomes. Les gènes de 10 facteurs de virulence étaient présents dans 100% des génomes analysés, *cap8* (opéron de la capsule polysaccharidique), *ebp* (protéine de liaison à l'élastine), *geh* et *lip* (lipases), *hlgABC* (gamma hémolysine), *hly/hla* (alpha-hémolysine), *icaABCD* (opéron de formation biofilm), *nuc* (thermonucléase), *coa* (staphylocoagulase), *set16* (exotoxine) et *sspB* (cystéine protéase).

Les gènes codant pour les deux composants de la toxine PVL (*lukF-PV* et *lukS-PV*) ont été détectés dans cinq des sept isolats (71%) de SARM (1RN, 2RN, 4RN, 15RN et 16RN), qui appartiennent tous au ST80.

Le gène codant pour la toxine du syndrome de choc toxique TSST-1 a été détecté dans trois isolats de SASM appartenant au ST22 (21RN, 25RN et 29RN).



Immune evasion	AdsA	<a href="#">adsA</a>	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	A	P	15
	CHIPS	<a href="#">chp</a>	A	A	A	A	A	A	P	P	A	A	P	P	P	A	P	P	P	8
	Capsule	Undetermined	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	16
Secretion system	SCIN	<a href="#">scn</a>	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	14
	Sbi	<a href="#">sbi</a>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	16
	Type VII secretion system	<a href="#">ssaA</a>	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	16
		<a href="#">ssaB</a>	A	A	A	A	P	P	A	A	P	P	A	P	P	A	A	A	A	7
		<a href="#">ssaD</a>	P	P	P	P	P	P	A	A	P	P	A	A	P	P	A	A	A	7
		<a href="#">ssaE</a>	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	P	P	A	A	A	11
		<a href="#">ssaG</a>	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P	15
		<a href="#">ssaA</a>	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	14
		<a href="#">sssB</a>	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	16
		<a href="#">sscC</a>	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	16
		<a href="#">ssxA</a>	P	P	A	P	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	14
		<a href="#">ssxB</a>	P	P	A	P	P	P	A	A	P	P	A	A	P	P	A	A	A	9
		<a href="#">ssxC</a>	P	P	A	P	P	P	A	A	P	P	A	A	P	P	A	A	A	9
<a href="#">ssxD</a>	P	P	A	P	P	P	A	P	P	P	A	A	P	P	A	A	A	10		
Toxin	Alpha hemolysin	<a href="#">hly/hla</a>	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	16
	Beta hemolysin	<a href="#">hlyb</a>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1
	Delta hemolysin	<a href="#">hlyd</a>	P	P	A	P	P	P	P	A	P	P	A	A	P	P	P	P	A	12
	Enterotoxin A	<a href="#">sea</a>	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	3
	Enterotoxin B	<a href="#">seb</a>	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	3
	Enterotoxin C	<a href="#">sec</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
	Enterotoxin D	<a href="#">sed</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	1
	Enterotoxin E	<a href="#">see</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
	Enterotoxin G	<a href="#">seg</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	P	P	A	3
	Enterotoxin H	<a href="#">seh</a>	A	A	A	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	4
	Enterotoxin I	<a href="#">sei</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	1
	Enterotoxin J	<a href="#">sej</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
	Enterotoxin Yent1	<a href="#">vent1</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	A	2
	Enterotoxin Yent2	<a href="#">vent2</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	1
	Enterotoxin-like K	<a href="#">selk</a>	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A	P	P	A	A	A	4
	Enterotoxin-like L	<a href="#">sell</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
	Enterotoxin-like M	<a href="#">selm</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	P	P	A	3
	Enterotoxin-like N	<a href="#">seln</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	P	P	A	3
	Enterotoxin-like O	<a href="#">selo</a>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	P	A	P	P	A	4
	Enterotoxin-like P	<a href="#">selp</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
	Enterotoxin-like Q	<a href="#">selq</a>	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	3
	Enterotoxin-like R	<a href="#">selr</a>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1
	Enterotoxin-like U	<a href="#">selu</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
	Exfoliative toxin type A	<a href="#">eta</a>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1
	Exfoliative toxin type B	<a href="#">etb</a>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1
	Exfoliative toxin type C	<a href="#">etc</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
	Exfoliative toxin type D	<a href="#">etd</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
	Exotoxin	<a href="#">set10</a>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	P	P	P	4
		<a href="#">set11</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
		<a href="#">set12</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
		<a href="#">set13</a>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	P	P	4
		<a href="#">set14</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
		<a href="#">set15</a>	P	P	P	A	A	A	A	P	P	A	A	A	P	A	P	P	P	10
		<a href="#">set16</a>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	17
		<a href="#">set17</a>	A	P	A	P	P	P	A	A	P	A	A	A	A	P	A	A	A	6
		<a href="#">set18</a>	P	P	A	P	P	P	A	A	P	P	A	A	A	P	A	A	A	9
		<a href="#">set19</a>	P	P	P	P	A	A	P	A	P	P	P	P	P	A	A	A	A	9
		<a href="#">set1</a>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	P	A	P	P	5
		<a href="#">set20</a>	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1
		<a href="#">set21</a>	A	A	A	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	4
		<a href="#">set22</a>	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	A	P	A	P	A	A	A	12
		<a href="#">set23</a>	P	P	P	P	P	P	A	A	P	P	A	A	A	P	A	A	A	9
		<a href="#">set24</a>	P	P	P	P	P	P	A	A	P	P	P	P	A	P	A	A	A	11
		<a href="#">set25</a>	A	A	A	P	P	P	P	A	A	A	P	P	A	P	A	A	A	7
		<a href="#">set26</a>	A	A	A	P	P	P	P	A	A	A	P	P	A	P	A	A	A	7
		<a href="#">set2</a>	A	A	A	A	A	P	A	P	A	A	A	A	A	A	P	P	P	5
		<a href="#">set30</a>	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1
<a href="#">set31</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1	
<a href="#">set32</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1	
<a href="#">set33</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1	
<a href="#">set34</a>		P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	A	A	A	12	
<a href="#">set35</a>		A	A	A	A	A	P	P	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	4	
<a href="#">set36</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1	
<a href="#">set37</a>		A	A	A	A	A	P	P	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	4	
<a href="#">set38</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1	
<a href="#">set39</a>		P	P	P	A	A	P	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A	6	
<a href="#">set3</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	2	
<a href="#">set40</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1	
<a href="#">set4</a>		A	A	A	A	A	P	A	P	A	A	A	A	A	P	A	P	P	6	
<a href="#">set5</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	2	
<a href="#">set6</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1	
<a href="#">set7</a>		P	A	P	A	A	P	P	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	12	
<a href="#">set8</a>		A	A	A	A	A	P	P	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	4	
<a href="#">set9</a>		A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1	
Gamma hemolysin		<a href="#">hleA</a>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	17
		<a href="#">hleB</a>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	16
		<a href="#">hleC</a>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	16
	Leukocidin M	<a href="#">lukF-like</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
		<a href="#">lukM</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
Leukocidin D	<a href="#">lukD</a>	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	A	A	12		
Leukocidin E	<a href="#">lukE</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0	
Panton-Valentine leukocidin	<a href="#">lukF-PV</a>	P	P	P	A	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A	5	
Toxic shock syndrome toxin	<a href="#">tsst</a>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	3	

Corps de texte

### III.6 Détection des déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques

Les gènes de résistance aux antibiotiques détectés dans les génomes des 17 isolats de *S. aureus* sont présentés dans le **Tableau 11**. Au total, 15 gènes ont été identifiés :  $\beta$ -lactamines (*mecA*), l'érythromycine/MLS<sub>B</sub> (*ermC*), la tétracycline (*tet(K)* et *tet(45)*), la fosfomycine (*fosB*, *glpT* et *murA*), l'acide fusidique (*fusB* et *fusC*), les aminoglycosides (*aad(6)* et *aph(3')- IIIa*), les fluoroquinolones (*df<sub>r</sub>C* et *parC*) et la streptothrine (*sat-4*).

Tous les isolats, sauf un (29RN), portaient au moins un des gènes de résistance à la tétracycline *tet(K)* ou *tet(45)*, qui codent pour les pompes d'efflux de la tétracycline.

Le gène *ermC* codant pour l'ARNr 23S adénine-N-6 méthyltransférase qui confère une résistance à la classe d'antibiotiques MLS<sub>B</sub> était présent dans seulement 8 isolats (47 %, 8/17). Les gènes *fusB* ou *fusC* codant pour les protéines bloquant la liaison de l'acide fusidique à EF-G responsables de la résistance à l'acide fusidique ont été identifiés dans 4 isolats (23,5%), tandis qu'un autre isolat 15RN (ST80) présente une mutation H457Q dans *fusA*.

Le gène de résistance à la fosfomycine *fosB*, codant pour une enzyme modificatrice de la fosfomycine, a été détecté dans 3 isolats (17,6%), tandis qu'un quatrième isolat 19RN (ST45) présente les mutations A100V dans le gène *glpT*, et E291D et T396N dans le gène *murA*. Tous les isolats portaient le gène *df<sub>r</sub>C* codant pour la résistance aux fluoroquinolones, parmi eux trois isolats (17,6%) portaient également une mutation S80F dans le gène *parC*.

Les 7 isolats de SARM portaient le gène *mecA* responsable de la résistance à la méthicilline (**Tableau 11**). Le gène *tet38* était omniprésent dans tous les isolats de cette étude. Cinq de nos isolats (29.4%) étaient positifs pour le gène *bla<sub>Z</sub>*, qui encode une  $\beta$ -lactamase de type C.

**Tableau 11.** Déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques identifiés dans les génomes des isolats de *S. aureus*.

Isolat	Gènes de résistance
1RN	<i>mecA, blaZ, ermC, dfrC, fusB, tetK, tet38, aad(6), aph(3')-IIIa, norA</i>
2RN	<i>mecA, dfrC, aad(6), aph(3')-IIIa, tet38, norA</i>
4RN	<i>mecA, ermC, dfrC, aad(6), aph(3')-IIIa, tet38, norA</i>
7RN	<i>mecA, blaZ, ermC, dfrC, aad(6), aph(3')-IIIa, tet38, tet(45), tetK, norA</i>
9RN	<i>ermC, dfrC, fusC, tet38, norA</i>
10RN	<i>dfrC, tet38, fusC, norA</i>
13RN	<i>ermC, dfrC, tet38, tetK, fosB, norA, parC<sup>a</sup></i>
14RN	<i>mecA, blaZ, dfrC, tet38, norA,</i>
15RN	<i>mecA, dfrC, tet38, aad(6), aph(3')-IIIa, fusA, norA, fusA<sup>b</sup></i>
16RN	<i>mecA, ermC, dfrC, aad(6), aph(3')-IIIa, tet38, norA</i>
17RN	<i>blaZ, ermC, dfrC, tetK, tet38, fosB, norA, parC<sup>a</sup></i>
18RN	<i>blaZ, ermC, dfrC, tetK, tet38, fosB, norA, parC<sup>a</sup></i>
19RN	<i>blaZ, dfrC, tet38, norA, glpT<sup>c</sup>, murA<sup>d</sup></i>
20RN	<i>dfrC, tet38, fusC, norA</i>
21RN	<i>blaZ, dfrC, tet38, norA</i>
25RN	<i>blaZ, dfrC, tet38, norA</i>
29RN	<i>blaZ, dfrC, tet38, norA</i>

<sup>a</sup> contient une mutation S80F dans le gène *parC* conférant une résistance aux fluoroquinolones.

<sup>b</sup> contient une mutation H457Q dans le gène *fusA* conférant une résistance à l'acide fusidique.

<sup>c</sup> contient une mutation A100V dans le gène *glpT* conférant une résistance à la fosfomycine.

<sup>d</sup> contient les mutations E291D et T396N dans le gène *murA* conférant une résistance à la fosfomycine.

### III.6.1 Profils de résistance aux antibiotiques des isolats *S. aureus*

Les 17 isolats de *S. aureus* ont été soumis aux tests de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de Kirby Bauer sur la gélose Mueller Hinton et par le Vitek® 2 contre un panel de 21 antibiotiques. Les résultats ont été interprétés selon les recommandations préconisées par le CLSI M100, 2022 et la CA-SFM, 2022, et sont montrés dans le **Tableau 12**. Tous les isolats étaient sensibles à la vancomycine, à la quinupristine-dalfopristine, au triméthoprim/sulfaméthoxazole, au linézolide, à la teicoplanine, à la tigécycline et à la nitrofurantoïne.

Le taux de résistance le plus élevé a été observé contre l'ampicillin/sulbactam (100%, n=17), suivi par l'érythromycine, la clindamycine, l'amikacine et la kanamycine (53%, n=9 chacun), l'acide fusidique (47%, n=8), la céfoxitine (41.2%, n=7), l'ofloxacine et la tétracycline (35%, n=6 chacun), la ciprofloxacine (23.5%, n=4), la gentamycine (17.6%, n=3), la rifamycine (11.7%, n=2) et le chloramphénicol (5.9%, n=1).

La multirésistance (résistance à trois antibiotiques appartenant à 3 classes différentes ou plus) a été détectée dans plus de la moitié des isolats de *S. aureus* (64.7%, n=11). Le taux de multirésistance chez les isolats de SARM (71.42%, 5/7) était plus élevé que chez les isolats de SASM (60%, 6/10) (**Tableau 12**).

Trois isolats ont présenté une co-résistance à deux classes d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines et aminoglycosides ou  $\beta$ -lactamines et Fusidane), tandis que trois isolats étaient résistants uniquement aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines.

Tableau 12. Profils phénotypiques de résistance aux antibiotiques des isolats de *S. aureus*.

Isolat	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) (µg/mL)															Diamètres de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion de disque (mm)																	
	Fluoroquinolones		Mérovidé		Lincosamide		Streptogramine		Oxolidinone		Glycopeptides		Tétracycline		Glycylcyclines		Nitrofurane		Sulfonamide		Phénicoles		Aminoglycosides		β-lactame		Fluoroquinolones		Fusidate		Ansamycines		
	Lévofloxacine LVX	Moxifloxacine MXF	Érythromycine ERY	Clindamycine CLI	Quinupristine/ Dalfoプリistine QD	Linezolid LZD	Técoplanine TEC	Vancomycine VAN	Tétracycline TET	Tigécycline TGC	Nitrofurantoiné NIT	Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole SXT	Chloramphicol CHL	Gentamicine GEN	Ambicacine AMB	Kanamycine KAN	Céfotaxime FOX	Ciprofloxacine CIP	Ofloxacine OFX	Acide Fusidique FUS	Rifampicine RIF												
1RN	<=0.12 S	<=0.25 S	>=8 R	<=0.25 R	<=0.25 S	2 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	>=16 R	<= 0.12 S	<=16 S	20 S	20 S	12 R	2 R	6 R	18 I	14 R	14 R	14 R	20 S												
2RN	<=0.12 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	1 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	<= 1 S	<= 0.12 S	<=16 S	18 S	18 S	12 R	2 R	6 R	14 R	14 R	14 R	22 R	20 S												
4RN	<=0.12 S	<=0.25 S	>=8 R	<=0.25 R	<=0.25 S	2 S	<= 0.5 S	1 S	<= 1 S	<= 0.12 S	<=16 S	18 S	12 R	12 R	2 R	8 R	16 I	12 R	12 R	24 S	12 R												
7RN	<=0.12 S	<=0.25 S	>=8 R	<=0.25 R	<=0.25 S	2 S	<= 0.5 S	1 S	>=16 R	<= 0.12 S	<=16 S	22 S	22 S	20 S	2 R	2 R	22 S	22 S	22 S	24 S	20 S												
9RN	<=0.12 S	<=0.25 S	>=8 R	<=0.25 R	<=0.25 S	1 S	<= 0.5 S	1 S	<= 1 S	<= 0.12 S	<=16 S	24 S	22 S	26 S	26 S	26 S	22 S	24 S	24 S	18 R	20 S												
13RN	<=0.5 S	<=0.25 S	>=8 R	<=0.25 R	<=0.25 S	1 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	>=16 R	<= 0.12 S	<=16 S	24 S	10 R	10 R	12 R	24 S	10 R	18 S	20 S	26 S	18 I												
14RN	<=0.12 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	2 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	<= 1 S	<= 0.12 S	<=16 S	22 S	20 S	16 I	16 I	8 R	22 S	20 S	26 S	26 S	24 S												
15RN	<=0.12 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	1 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	<= 1 S	<= 0.12 S	<=16 S	20 S	20 S	10 R	2 R	4 R	26 S	20 S	24 S	24 S	24 S												
16RN	<=0.12 S	<=0.25 S	>=8 R	<=0.25 R	<=0.25 S	2 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	>=16 R	<= 0.12 S	<=16 S	24 S	12 R	14 R	16 I	8 R	16 I	14 R	20 R	20 R	22 S												
17RN	<=0.5 S	<=0.25 S	>=8 R	<=0.25 R	<=0.25 S	1 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	>=16 R	<= 0.12 S	<=16 S	18 S	20 S	12 R	12 R	22 S	10 R	10 R	26 S	30 S	30 S												
18RN	<=0.5 S	<=0.25 S	>=8 R	<=0.25 R	<=0.25 S	1 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	>=16 R	<= 0.12 S	<=16 S	12 R	26 S	10 R	12 R	24 S	20 I	22 S	20 R	20 S	20 S												
19RN	<=0.5 S	<=0.25 S	2 R	<=0.25 R	<=0.25 S	4 S	2 S	1 S	<= 1 S	<= 0.25 S	64 I	20 S	16 S	18 S	20 S	22 S	20 I	14 R	24 S	10 R	10 R												
20RN	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	2 S	<= 0.5 S	1 S	<= 1 S	<= 0.12 S	<=16 S	20 S	18 S	6 R	12 R	22 S	14 R	4 R	24 S	24 S	24 S												
21RN	<=0.5 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	2 S	1 S	1 S	<= 1 S	<= 0.12 S	<=16 S	24 S	22 S	20 S	22 S	26 S	22 S	22 S	26 S	26 S	20 S												
25RN	<= 1.2 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	<=0.25 S	1 S	<= 0.5 S	<=0.5 S	<= 1 S	<= 0.12 S	<=16 S	24 S	22 S	20 S	20 S	22 S	26 S	26 S	18 R	20 S	20 S												
29RN	2 J	<=0.5 S	<=0.5 S	<=0.25 S	<=0.5 S	4 S	2 S	2 S	<= 1 S	<= 0.25 S	32 S	20 S	24 S	26 S	26 S	20 S	22 S	22 S	20 R	20 S	20 S												
Taux de résistance (%)	0(0%)	0(0%)	9(53%)	9(53%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	6(35%)	0(0%)	0(0%)	1(6.5%)	3(17.6)	9(53%)	9(53%)	8(47%)	4(23.5%)	6(35%)	8(47%)	8(47%)	2(11.7%)												

CMI:

Ciprofloxacine; ERY : Erythromycine; FOX: Céfotaxime; FUS: Acide Fusidique; GEN: Gentamicine; KAN: Kanamycine; LVX: Lévofoxacine; MXF: Moxifloxacine; NIT: Nitrofurantoiné; OFX: Ofloxacine; QD: Quinupristine/Dalfoプリistine; RIF: Rifampicine; SXT: Triméthoprime-sulfaméthoxazole; TEC: Tétracycline; TET: Tétracycline; VAN : Vancomycine.

### III.6.2 Corrélation entre les profils phénotypiques et génotypiques de résistance aux antibiotiques

La corrélation observée entre les profils phénotypiques et génotypiques de résistance aux antibiotiques est très variée, en étant élevée pour FOX/*mecA* (100%), ERY/CLI/ *ermC* (94%), TET/*tet(K)* (94%), MOX/*parC* (82 %) et LVX/*parC* (76 %) ; modérée pour AMK/GEN/KAN/*aph(30)-IIIa/aad(6)* (64-70 %) ; et faible pour FUS/ *fusB/ fusC* et OFX/ *parC* (58%), CIP/ *parC* (52%), QD/ *ermC* et FUS/ *fusA* (47 %).

## *Discussion*

---

Dans cette étude, WGS a été utilisé pour déterminer la phylogénie et les caractéristiques moléculaires de 10 SASM et 7 SARM isolés à partir d'échantillons cliniques.

Le taux de SARM parmi les isolats de *S. aureus* dans notre étude (41.1%, 7/17) est comparable à ceux rapportés dans les pays d'Afrique du Nord, entre 35% et 47% en Algérie (**Amazian et al., 2006 ; Borg et al., 2007 ; Antri et al., 2009**), entre 41% et 46% en Tunisie (**Mesrati et al., 2010 ; Thabet et al., 2008**), 31% en Libye (**Buzaid et al., 2011**) et 52% en Égypte (**Borg et al., 2007**). A signaler qu'une étude dans la région de Tlemcen en Algérie a enregistré un taux de SARM beaucoup plus élevé (75%) (**Rebiahi et al., 2011**). Ces variations des taux de SARM entre les différentes études peuvent être attribuées à des différences dans certains paramètres entre les différentes études, tels que les zones géographiques, les systèmes de santé mis en place, les caractéristiques des patients inclus, les types de prélèvements et d'infections et les méthodes d'isolement et d'identification de la bactérie. Ce manque de conformité entre les études rend la comparaison des résultats difficiles. En effet, des variations dans les taux de SARM ont été également observées en Europe et en Asie. La prévalence des SARM en Europe variait entre 2% aux Pays-Bas et 58% en Italie (**Fluit et al., 2001 ; Dulon et al., 2011**) ; et de 22.6% (Inde) à 86.5% (Sri Lanka) en Asie (28), avec une moyenne de 25% sur les deux continents (**Fluit et al., 2001 ; Song et al., 2011**).

Les résultats ont révélé que notre collection d'isolats de *S. aureus* est hétérogène, composée de cinq STs, ST1, ST22, ST45 et ST80 et slvST15. Le clone de SARM ST80 qui était prédominant dans cette étude a également été signalé comme dominant dans de nombreuses régions du monde comme cause d'infections en milieux hospitaliers et communautaires (**Goering et al., 2009**). Ce clone a également été précédemment identifié comme dominant dans différentes niches écologiques en Algérie (**Mairi et al., 2019 ; Achek et al., 2021**).

Le deuxième clone le plus abondant, ST1, a été identifié dans les années 1990 comme le premier clone CA-MRSA (**Herold et al., 1998**), puis a émergé dans divers établissements de soins (**Otter et French, 2011 ; Caboclo et al., 2013 ; Zhang et al., 2015**). De plus, ce clone a également été isolé à partir des animaux de compagnie, du bétail et des produits d'élevage dans plusieurs pays (**Kaiser-Thom et al., 2022 ; Parisi et al., 2016 ; Carfora et al., 2016**). Il est intéressant de noter que le clone ST1, qui était principalement identifié comme SARM dans de nombreuses études (**Earls et al., 2017**), était à la fois SARM et SASM dans cette étude.

L'autre deuxième clone dominant dans notre étude, ST22, était représenté par trois SASM et un SARM (SCC*mec* type IVa). Le ST22 SARM est connu sous le nom du clone épidémique

EMRSA-15 dont les origines remontent à 1991 au Royaume-Uni, et qui s'est disséminé à l'échelle mondiale (**Holden et al., 2013**). Il a été signalé comme étant le plus fréquemment responsable d'infections nosocomiales en Europe et est de plus en plus répandus en Asie, en Australie et en Amérique du Nord (**Holden et al., 2013 ; Hsu et al., 2015 ; Kinnevey et al., 2016 ; Pokhrel et al., 2016**), et il a également été sporadiquement isolé en Algérie, en Tunisie et en Afrique du Sud (**Schaumburg et al., 2014**).

Le clone le moins fréquent dans cette étude, ST45, est un clone qui a été couramment signalé en Amérique du Nord, en Australie et en Europe comme SARM et SARM dans les milieux de soins et communautaires, mais moins fréquemment en Amérique du Sud, en Asie et en Afrique (**Effelsberg et al., 2020**).

Il est intéressant que 3 isolats de SASM dans cette étude appartiennent à un nouveau ST (non enregistré dans la base de données MLST). Ce nouveau ST ne diffère du ST15 que par un seul nucléotide au niveau du gène *pta* ; par conséquent, il a été désigné slvST15 (*single locus variant of ST15*). Le clone slvST15 semble relativement fréquent dans notre étude, représentant 17.6% (n=3) de tous les isolats de *S. aureus* et 30% des SASM. L'épidémiologie de ce clone n'est pas connue actuellement et mérite d'être surveillé.

Il est également important de noter que le clone ST15, le plus proche clone de slvST15, semble être largement diffusé dans le continent Africain (**Abdulgader et al., 2015**). Les souches du ST15 ont été notamment signalées à la fois comme SASM et SARM en Afrique du Sud (**Goolam Mahomed et al., 2018 ; Oosthuysen et al., 2014**), Gabon (**Ngoa et al., 2012 ; Schaumburg et al., 2011 ; Schaumburg et al., 2014**), Gambie (**Ebruke et al., 2016**), Ghana (**Donkor et al., 2018**), Mali (**Ruimy et al., 2008**), Mozambique (**Garrine et al., 2023**) et São Tomé et Príncipe (**Conceição et al., 2014**).

L'identification de clones de *S. aureus* en Algérie qui sont dominants en Europe et en Afrique suggère que la localisation géographique de l'Algérie joue un rôle important dans l'échange et la dissémination des clones de *S. aureus* entre ces deux continents.

Dans notre étude nous avons utilisé une approche phylogénomique basée sur les SNP des génomes entiers pour déterminer si les isolats clones de *S. aureus* sont génétiquement liés, et pour identifier les potentielles épidémies clonales en milieux hospitaliers ainsi que les événements de transmission. Pour cela, nous avons utilisé la définition de **Coll et al. (2020)**, qui stipule que les isolats de *S. aureus* qui présentent une différence de SNP dans leurs génomes de  $\leq 15$  et qui sont isolés dans un même hôpital durant une période de 6 mois sont

considérés comme génétiquement identiques et sont probablement transmis au sein de l'hôpital. Autrement, les isolats sont considérés comme génétiquement différents et leurs transmissions au sein de l'hôpital est exclue.

Cette analyse a révélé que deux isolats appartenant au CC1 (10RN et 20RN) qui ont été isolés à partir de deux patients admis à 19 jours d'intervalle dans le même hôpital (Merouani Abed) et dans le même service (médecine interne) étaient identiques (0 différence SNP), ce qui suggère une transmission intra-service de ces clones.

D'autre part, un cluster de 4 isolats appartenant au ST80, qui différaient les uns des autres par 6 SNPs seulement, ont été isolés du même hôpital (Merouani Abed), dont deux (1RN et 16RN) provenaient de deux patients différents qui ont été admis dans un même service (Traumatologie), mais à 30 jours d'intervalle ; tandis que les deux autres (2RN et 15RN) provenaient de deux patients admis dans différents services (Pédiatrie et Urgences), mais à 45 jours d'intervalle. L'isolement de ces 4 clones au cours d'une période d'environ 3 mois et de 3 services différents suggère que l'hôpital Merouani Abed était contaminé d'une manière persistante par des clones de SARM du ST80 et qu'une transmission intra-hôpital de ces clones s'est produite.

De même, les trois isolats du CC15 13RN, 17RN et 18RN étaient également étroitement liés, avec des différences de 7 SNPs entre 13RN et 17RN et 17RN et 18RN ; et de 11 SNPs entre 13RN et 18RN. Ces trois isolats ont été isolés chez différents patients admis dans différents services du même hôpital (Merouani Abed), ce qui suggère une transmission entre services au sein de cet hôpital. En effet, de nombreuses voies de transmissions intra-hospitalières de *S. aureus* ont été identifiés, tels que le transfert de patients d'un service vers un autre, entre patients partageant la même chambre, entre professionnels de santé et patients, entre visiteurs et patients et entre l'environnement hospitalier et les patients (Solberg, 2000 ; Price *et al.*, 2017 ; Kinnevey *et al.*, 2022).

En revanche, un cluster de trois clones de SASM (21RN, 25RN et 29RN) appartenant au ST22 ont été isolés à 51 jours d'intervalle de trois patients différents admis dans deux hôpitaux différents (Merouani Abed et Sœurs Bedj) sont identiques (0 SNP entre 25RN et 29RN ; 2 SNPs entre 25RN et 21RN et entre 29RN et 21RN), suggérant une transmission inter-hospitalière de ces clones. En effet, la transmission de clones identiques de *S. aureus* entre différents hôpitaux a déjà été rapporté par plusieurs études précédentes (Chang *et al.*, 2016 ; Donker *et al.*, 2010 ; Donker *et al.*, 2017 ; Ke *et al.*, 2012). La principale voie de transmission de *S. aureus* entre les établissements de santé est le mouvement de patients.

Ce mouvement de patients est déterminé à la fois par le patient lui-même ou par l'établissement de santé dans lequel le patient est admis. Le patient peut choisir d'être admis dans un hôpital particulier pour des raisons personnelles (proximité ou meilleure prise en charge). D'autre part, et dans certains cas, un établissement de santé peut transférer un patient vers un autre clone pour des procédures de diagnostic ou pour des soins médicaux supplémentaires. Par conséquent, les établissements de santé peuvent recevoir des patients ayant acquis *S. aureus* lors d'une précédente admission dans un autre hôpital, sans le savoir (**Donker et al., 2010 ; Barnes et al., 2011 ; Ke et al., 2012 ; Chang et al., 2016 ; Donker et al., 2017**).

Il est donc possible que n'importe des modes de mouvement de patients cités ci-dessus ait contribué à la dissémination des clones de *S. aureus* 21RN, 25RN et 29RN entre les deux hôpitaux, Merouani Abed et Sœurs Bedj.

Quel que soit le mode exact de transmission intra- ou inter-hospitalière cités ci-dessus, ils doivent être considérés comme des lacunes dans les mesures de contrôle et de prévention des infections. Il est donc important que les autorités de santé publique reconnaissent l'impact de ces modes de transmission sur la propagation et la prévalence de *S. aureus* dans les hôpitaux et prennent les mesures nécessaires pour les prévenir.

L'étude des déterminants génétiques de la virulence a permis d'identifier plusieurs gènes connus d'être associés à la virulence des *S. aureus*. Les gènes rencontrés chez tous les isolats dans cette étude sont les gènes de la staphylocoagulase, la thermonucléase, la cystéine protéase, la protéine de liaison à l'élastine, les lipases, les hémolysines alpha et gamma, la capsule polysaccharidique et de la formation de biofilm,

Par contre, certains gènes sont associés à des ST spécifiques, comme les gènes *lukF/S* de la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) qui sont portés uniquement par les SARM du ST80 ; les gènes du facteur d'agglutination A (*clfA*), des entérotoxines A, B et H (*sea*, *seb* et *seh*) et d'une exotoxine (*set21*) qui sont associés aux isolats SASM du ST1 ; et le gène de la toxine du syndrome de choc toxique (*tst*) n'a été détecté que chez les SASM du ST22.

Ces résultats sont cohérents avec les résultats d'autres études qui ont indiqué que certains gènes de virulence sont trouvés chez pratiquement toutes les souches de *S. aureus*, tandis que d'autres sont liés à des STs spécifiques (**Diep et al., 2006 ; Wang et al., 2016 ; Li et al., 2019**).

Bien que la PVL soit généralement considérée comme associée principalement aux CA- SARM (**Boyle-Vavra et al., 2007 ; Kale et Dhawan, 2016**), dans notre étude elle était

présente à la fois chez les isolats de CA-SARM et HA-SARM ; ce qui est conforme avec une étude réalisée a Ouganda (**Kateete et al., 2019**).

La prévalence mondiale du PVL parmi les souches de SARM variait remarquablement selon les régions géographiques et les populations (entre 0.3% et 100% en Afrique et entre 29% et 67 en Europe et aux USA%) (**Abdulgader et al., 2015**), sa prévalence parmi nos isolats de SARM (29.4%) s'inscrit dans ces intervalles (**Vandenesch et al., 2003**).

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont révélé que tous les isolats de *S. aureus* présentaient une sensibilité à la vancomycine (le principal antibiotique anti-SARM), quinupristine-dalfopristine, la linezolide, la moxifloxacine, la nitrofurantoïne, la triméthoprim-sulfaméthoxazole, la teicoplanine et la tigécycline. Un profil de sensibilité aux antibiotiques comparable a également été rapporté dans une étude au Kenya (**Omuse et al., 2014**).

Il est en toutefois rassurant de constater que la vancomycine et l'association quinupristine-dalfopristine (une alternative précieuse à la vancomycine pour le traitement des infections à SARM) demeurent efficaces contre *S. aureus*. Cette absence de résistance à la vancomycine était probablement due au fait que l'utilisation de cet antibiotique n'est pas répandue en raison de son coût élevé et de sa disponibilité limitée.

Néanmoins, la résistance à la vancomycine, a été précédemment signalée, bien qu'avec des taux très faibles, en Algérie (1.8%) (**Rebiahi et al., 2011**) ainsi que dans plusieurs régions du mondes, 1% en Europe, 3.6% en Amérique, 1.3% en Asie et 2.5% en Afrique (**Shariati et al., 2020**).

De même, la sensibilité de tous nos isolats au triméthoprim-sulfaméthoxazole, qui est largement utilisé pour traiter diverses d'infections causées par *S. aureus*, était intéressante, car un taux élevé de résistance à cet association d'antibiotiques a été rapportée parmi les isolats de SARM en Amérique latine (jusqu'à 100%) (**De Sousa et al., 1998; Silveira et al., 2015**), en Asie (jusqu'à 89 %) (**Aires de Sousa et al., 2003; An et al., 2024**) et en Afrique (jusqu'à 72%) (**Nurjadi et al., 2014; Coelho et al., 2017**).

Nos isolats de *S. aureus* ont montré des taux variables de résistance contre les autres antibiotiques testés, allant de 6% (chloramphénicol), à 53% (amikacine, clindamycine, l'érythromycine et la kanamycine). Plusieurs autres études ont également rapportés différents profils de résistance des souches de *S. aureus* à une variété d'antibiotiques (**Grubb et al., 2004; Dawood et al., 2020**).

---

Le taux de MDR dans la présente étude était relativement élevé par l'ensemble des isolats de *S. aureus* (64%) et les SARM (71.4%), ce qui est conforme aux études précédentes en Algérie (**Rebiahi et al., 2011 ; Alioua et al., 2014**) et ailleurs (**Bitrus et al., 2018 ; Guo et al., 2020**).

Certaines limites doivent être prises en compte dans cette étude. Il s'agit d'une étude sur un nombre limité d'isolats au niveau de deux hôpitaux seulement, et donc, les résultats pourraient ne pas être suffisamment représentatifs de l'ensemble de la région ou le pays.

***Conclusion***

---

***générale***

## Conclusion générale

---

À notre connaissance, cette étude est la première en Algérie à caractériser plusieurs isolats cliniques de *S. aureus* par séquençage de leurs génomes entiers.

Cette étude a fourni des informations importantes sur la diversité génétique, la résistance aux antibiotiques et les profils de virulence des souches de *S. aureus* circulant en milieux hospitaliers dans la région de Chlef Algérie.

Les approches de typage *in silico* par MLST, SCCmec et Spa ont permis de mettre en évidence que certains isolats de *S. aureus* dans les deux hôpitaux de la région de Chlef correspondaient aux souches actuellement en circulation en Algérie ou à l'échelle internationale, et plus particulièrement en Afrique ; ce qui suggère des échanges de souches entre l'Algérie et d'autres pays. Cependant, des différences ont été également observées, notamment l'identification d'un nouveau ST (slvST15), non répertorié dans la base de données PubMLST.

De potentiels événements de transmission intra- et inter-hospitalière des clones de *S. aureus* ont été démontrés par l'analyse de SNP dans les génomes, soulignant la nécessité de la mise en place de stratégies efficaces de contrôle et de prévention dans le système de santé Algérien.

L'analyse des gènes de virulence des isolats a mis en évidence une certaine association entre STs et profils de virulence. D'autre part, l'analyse des déterminants génétiques d'antibiorésistance a démontré que les profils de résistance aux antibiotiques des isolats de *S. aureus* étaient très variables, ce qui peut avoir des implications sur le plan thérapeutique.

Malgré la petite taille de l'échantillon analysé, ce travail souligne l'utilité du séquençage des génomes entiers dans les enquêtes épidémiologiques, au niveau local, régional, national et international ; en offrant un niveau de pouvoir discriminatoire plus élevé que les autres techniques de typage. Le séquençage du génome permet de détecter avec précision tous les changements qui peuvent se produire au niveau du génome, même s'il s'agit d'une seule base nucléotidique, comme il permet d'établir un inventaire complet de tous les gènes portés dans le génome, notamment les gènes de résistance (resistome) et de virulence (virulome), ce qui permet de prédire les profils phénotypiques d'antibiorésistance et de virulence du pathogène.

Cette approche fournit une base pour des futures études incluant des échantillons de plus grande taille et de divers endroits géographiques afin de tirer des conclusions plus significatives.

*Références*

---

*bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

- Abdulgader, S. M., Shittu, A. O., Nicol, M. P., & Kaba, M. (2015). Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review. *Frontiers in microbiology*, 6, 348.
- Achek, R., El-Adawy, H., Hotzel, H., Hendam, A., Tomaso, H., Ehricht, R., ... & Monecke, S. (2021). Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Human and Food Samples in Northern Algeria. *Pathogens*, 10(10), 1276.
- Agabou, Amir, Zouleikha Ouchenane, Christelle Ngba Essebe, Salim Khemissi, Mohamed Tedj Eddine Chehboub, Ilyes Bey Chehboub, Albert Sotto, Catherine Dunyach-Remy, and Jean-Philippe Lavigne. "Emergence of nasal carriage of ST80 and ST152 PVL+ *Staphylococcus aureus* isolates from livestock in Algeria." *Toxins* 9, no. 10 (2017): 303.
- Aires de Sousa, M., Crisostomo, M. I., Santos Sanches, I., Wu, J. S., Fuzhong, J., Tomasz, A., & De Lencastre, H. (2003). Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 159-163.
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., ... & McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 48(D1), D517-D525.
- Alioua, M. A., Labid, A., Amoura, K., Bertine, M., Gacemi-Kirane, D., & Dekhil, M. (2014). Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. *Médecine et maladies infectieuses*, 44(4), 180-183.
- Amazian, K., Fendri, C., Missoum, M. F. K., Bouzouaia, N., Rahal, K., Savey, A., ... & Fabry, J. (2006). Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25, 340-343.
- An, N. V., Hai, L. H. L., Luong, V. H., Vinh, N. T. H., Hoa, P. Q., Hung, L. V., ... & Hoang, L. H. (2024). Antimicrobial Resistance Patterns of *Staphylococcus aureus* Isolated at a General Hospital in Vietnam Between 2014 and 2021. *Infection and Drug Resistance*, 259-273.
- Antri, K., Rouzic, N., Boubekri, I., Dauwalder, O., Beloufa, A., Ziane, H., ... & Ramdani-Bouguessa, N. (2009). High prevalence of community- and hospital-acquired infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin gene in Algiers. *Pathologie-biologie*, 58(2), e15-20.
- Antri, K., Rouzic, N., Dauwalder, O., Boubekri, I., Bes, M., Lina, G., ... & Etienne, J. (2011). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. *Clinical microbiology and infection*, 17(4), 526-532.
- Appelbaum, P. C. (2006). The emergence of vancomycin- intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 16-23.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445-459.

## Références bibliographiques

---

- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751–1773.
- Balloux, F., Brynildsrud, O. B., Van Dorp, L., Shaw, L. P., Chen, H., Harris, K. A., ... & Eldholm, V. (2018). From theory to practice: translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic. *Trends in microbiology*, 26(12), 1035-1048.
- Barnes, S. L., Harris, A. D., Golden, B. L., Wasil, E. A., & Furuno, J. P. (2011). Contribution of interfacility patient movement to overall methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence levels. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 32(11), 1073-1078.
- Baron, E. J., & Tenover, F. C. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* diagnostics: state of the art. *Expert opinion on medical diagnostics*, 6(6), 585-592.
- Bartels, M. D., Petersen, A., Worning, P., Nielsen, J. B., Lerner-Svensson, H., Johansen, H. K., ... & Westh, H. (2014). Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 52(12), 4305-4308.
- Becker, K., Skov, R. L., & von Eiff, C. (2015). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase- positive cocci. *Manual of clinical microbiology*, 354-382.
- Bekkhoucha, S. N., Cady, A., Gautier, P., Itim, F., & Donnio, P. Y. (2009). A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean Sea: molecular characteristics of isolates from Western Algeria. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 28, 553-555.
- Berends, E. T., Horswill, A. R., Haste, N. M., Monestier, M., Nizet, V., & von Köckritz-Blickwede, M. (2010). Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of innate immunity*, 2(6), 576-586.
- Berke, A. & Tilton, R. C. (1986). Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5), 916-919.
- Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Flier, S., ... & Krönke, M. (2002). Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry. *Proteomics*, 2(6), 747-753.
- Bhatia A., et Zahoor S. (2007). *Staphylococcus aureus* enterotoxins : a review. *J Clin Diagn Res*, 1(3), 188-97.
- Bitrus, A. A., Peter, O. M., Abbas, M. A., & Goni, M. D. (2018). *Staphylococcus aureus*: A review of antimicrobial resistance mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 4(2), 43-54.

## Références bibliographiques

---

- Blickwede, M., 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of innate immunity*, 2(6), 576-586.
- Borg, M. A., de Kraker, M., Scicluna, E., van de Sande-Bruinsma, N., Tiemersma, E., Monen, J., & Grundmann, H. (2007). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), 1310-1315.
- Bogestam, K., Vondracek, M., Karlsson, M., Fang, H., & Giske, C. G. (2018). Introduction of a hydrolysis probe PCR assay for high-throughput screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the ability to include or exclude detection of *Staphylococcus argenteus*. *Plos one*, 13(2), e0192782.
- Boyce JM, Havill NL, Kohan C, Dumigan DG, Ligi CE. Do infection control measures work for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004 ;25 :395-401
- Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin. *Laboratory investigation*, 87(1), 3-9.
- Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of clinical microbiology*, 30(7), 1654-1660.
- Brown, D. F., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J., & Wren, M. W. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 56(6), 1000-1018.
- Buhren B.A., Schrupf H., Hoff N.P., Bölke E., Hilton S. et Gerber P.A., 2016. Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *European journal of medical research*, 21, 1-7.
- Buzaid, N., Elzouki, A. N., Taher, I., & Ghenghesh, K. S. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a tertiary surgical and trauma hospital in Benghazi, Libya. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(10), 723-726.
- CA-SFM, 2022. La Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie : [https://www.sfm-microbiologie.org/wpcontent/uploads/2023/06/CASFM2023\\_V1.0.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wpcontent/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf).
- Caboclo, R. M. F., Cavalcante, F. S., Iorio, N. L. P., Schuenck, R. P., Olendzki, A. N., Felix, M. J., ... & dos Santos, K. R. N. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. *American journal of infection control*, 41(3), e21-e26.
- Camacho, C., & Madden, T. (2013). BLAST+ release notes. *BLAST® Help [Internet]*.

## Références bibliographiques

---

- Carfora, V., Giacinti, G., Sagrafoli, D., Marri, N., Giangolini, G., Alba, P., ... & Battisti, A. (2016). Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4251-4258.
- Carroll, K. C. (2008). Rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current status. *Molecular diagnosis & therapy*, 12, 15-24.
- CDC Centers for Disease Control and Prevention (CDC. (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 51(26), 565-567.
- Chambers HF. Community-associated MRSA--resistance and virulence converge. *N Engl J Med*. 2005 Apr 07;352(14):1485-7.
- Chang, H. H., Dordel, J., Donker, T., Worby, C. J., Feil, E. J., Hanage, W. P., ... & Lipsitch, M. (2016). Identifying the effect of patient sharing on between-hospital genetic differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Genome medicine*, 8, 1-10.
- Chatterjee SS, Otto M (2013). Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clin. Epidemiol* 4: 205–217.
- Chavez, T. T., & Decker, C. F. (2008). Health care-associated MRSA versus community-associated MRSA. *Disease-a-month*, 54(12), 763-768.
- Chen H, Zhang J, He Y, Lv Z, Liang Z, Chen J, Li P, Liu J, Yang H, Tao A, Liu X. Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases. *Toxins*. 2022 ; 14(7):464. <https://doi.org/10.3390/toxins14070464>.
- Cheung, G. Y., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569.
- Chua KY, Howden BP, Jiang JH, Stinear T, Peleg AY. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2014 ;21 :554–62.
- *CLSI M100*; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32th ed.; CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institutes: Malvern, PA, USA, 2022.
- Coelho, C., de Lencastre, H., & Aires-de-Sousa, M. (2017). Frequent occurrence of trimethoprim-sulfamethoxazole hetero-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in different African countries. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(7), 1243-1252.
- Coia, J. E., Duckworth, G. J., Edwards, D. I., Farrington, M., Fry, C., Humphreys, H., ... & Joint Working Party of the British Society of Antimicrobial Chemotherapy. (2006). Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *Journal of hospital infection*, 63, S1-S44.
- Coll, F., Raven, K. E., Knight, G. M., Blane, B., Harrison, E. M., Leek, D., ... & Peacock, S. J. (2020). Definition of a genetic relatedness cutoff to exclude recent transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a genomic epidemiology analysis. *The Lancet Microbe*, 1(8), e328-e335.

## Références bibliographiques

---

- Conceição, T., Santos Silva, I., de Lencastre, H., & Aires-de-Sousa, M. (2014). *Staphylococcus aureus* nasal carriage among patients and health care workers in São Tomé and Príncipe. *Microbial Drug Resistance*, 20(1), 57-66.
- Cong, Y., Yang, S., & Rao, X. (2020). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *Journal of advanced research*, 21, 169-176.
- Crespo-Piazuelo, D., & Lawlor, P. G. (2021). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonisation. *Irish Veterinary Journal*, 74, 1-12.
- Crosby, H. A., Kwiecinski, J., & Horswill, A. R. (2016). *Staphylococcus aureus* Aggregation and Coagulation Mechanisms, and Their Function in Host-Pathogen Interactions. *Advances in applied microbiology*, 96, 1–41.
- Croucher, N. J., Page, A. J., Connor, T. R., Delaney, A. J., Keane, J. A., Bentley, S. D., ... & Harris, S. R. (2015). Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic acids research*, 43(3), e15-e15.
- Cuny, C., Friedrich, A., Kozytska, S., Layer, F., Nübel, U., Ohlsen, K., Strommenger, B., Walther, B., Wieler, L., & Witte, W. (2010). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 300(2-3), 109–117.
- Dai, Y., Liu, J., Guo, W., Meng, H., Huang, Q., He, L., ... & Li, M. (2019). Decreasing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections is attributable to the disappearance of predominant MRSA ST239 clones, Shanghai, 2008–2017. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 471-478.
- Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., ... & Stevens, R. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic acids research*, 48(D1), D606-D612.
- Dawood, W. S., & Dawood Al-zubaidi, H. Q. (2020). Prevalence and susceptibility of antimicrobial microorganisms in surgical sites. *EurAsian Journal of Biosciences*, 14(2).
- De Sousa, M. A., Sanches, I. S., Ferro, M. L., Vaz, M. J., Saraiva, Z., Tendeiro, T., ... & De Lencastre, H. (1998). Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Journal of clinical microbiology*, 36(9), 2590-2596.
- De Souza, M. D. L. R. (2018). Methods for the identification, characterization, and tracking the spread of *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus aureus* (pp. 105-125). Academic Press.
- Denis, O. (2017). Route of transmission of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2), 124-125.
- Deurenberg, R. H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M. A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., ... & Rossen, J. W. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of biotechnology*, 243, 16-24.

## Références bibliographiques

---

- Diep, B. A., Carleton, H. A., Chang, R. F., Sensabaugh, G. F., & Perdreau-Remington, F. (2006). Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital-and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases*, 193(11), 1495-1503.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 16–34.
- Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., & Sritharan, V. (2019). Hemolysins of *Staphylococcus aureus* —An update on their biology, role in pathogenesis and as targets for anti-virulence therapy. *Advances in Infectious Diseases*, 9(2), 80-104.
- Djahmi, N., Messad, N., Nedjai, S., Moussaoui, A., Mazouz, D., Richard, J. L., ... & Lavigne, J. P. (2013). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), E398-E404.
- Djoudi, F., Benallaoua, S., Aleo, A., Touati, A., Challal, M., Bonura, C., & Mammina, C. (2015). Descriptive epidemiology of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients admitted to two healthcare facilities in Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 21(2), 218-223.
- Djoudi, F., Bonura, C., Benallaoua, S., Touati, A., Touati, D., Aleo, A., ... & Mammina, C. (2013). Pantone-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a staphylococcal cassette chromosome mec type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. *New Microbiol*, 36(1), 49-55.
- Djoudi, F., Bonura, C., Touati, A., Aléo, A., Benallaoua, S., & Mammina, C. (2016). *Staphylococcal* cassette chromosome mec typing and mec A sequencing in methicillin-resistant staphylococci from Algeria: a highly diversified element with new mutations in mec A. *Journal of Medical Microbiology*, 65(11), 1267-1273.
- Donker, T., Henderson, K. L., Hopkins, K. L., Dodgson, A. R., Thomas, S., Crook, D. W., ... & Robotham, J. V. (2017). The relative importance of large problems far away versus small problems closer to home: insights into limiting the spread of antimicrobial resistance in England. *BMC medicine*, 15(1), 1-11.
- Donker, T., Wallinga, J., & Grundmann, H. (2010). Patient referral patterns and the spread of hospital-acquired infections through national health care networks. *PLoS computational biology*, 6(3), e1000715.
- Donkor, Eric S., Dorota Jamrozy, Richael O. Mills, Thomas Dankwah, Philip K. Amoo, Beverly Egyir, Ebenezer V. Badoe, Joana Twasam, and Stephen D. Bentley. "A genomic infection control study for *Staphylococcus aureus* in two Ghanaian hospitals." *Infection and Drug Resistance* (2018): 135-145.
- Downer, R., Roche, F., Park, P. W., Mecham, R. P., & Foster, T. J. (2002). The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 243-250.

## Références bibliographiques

---

- Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R. P., Bes, M., ... & Lina, G. (2002). High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species.
- Dulon, M., Haamann, F., Peters, C., Schablon, A., & Nienhaus, A. (2011). MRSA prevalence in European healthcare settings: a review. *BMC infectious diseases*, *11*, 1-13.
- Earls, M. R., Kinnevey, P. M., Brennan, G. I., Lazaris, A., Skally, M., O'Connell, B., ... & Coleman, D. C. (2017). The recent emergence in hospitals of multidrug-resistant community-associated sequence type 1 and spa type t127 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* investigated by whole-genome sequencing: Implications for screening. *PLoS One*, *12*(4), e0175542.
- Ebruke, C., Dione, M. M., Walter, B., Worwui, A., Adegbola, R. A., Roca, A., & Antonio, M. (2016). High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonising the nasopharynx of Gambian villagers before widespread use of pneumococcal conjugate vaccines. *BMC microbiology*, *16*(1), 1-9.
- Edwards, D. J., & Holt, K. E. (2013). Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microbial informatics and experimentation*, *3*, 1-9.
- Effelsberg, N., Stegger, M., Peitzmann, L., Altinok, O., Coombs, G. W., Pichon, B., ... & Mellmann, A. (2020). Global epidemiology and evolutionary history of *Staphylococcus aureus* ST45. *Journal of clinical microbiology*, *59*(1), 10-1128.
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, *38*(3), 1008-1015.
- Falagas, M. E., Karageorgopoulos, D. E., Leptidis, J., & Korbila, I. P. (2013). MRSA in Africa: filling the global map of antimicrobial resistance. *PloS one*, *8*(7), e68024.
- Falugi, F., Kim, H. K., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2013). Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *MBio*, *4*(5), 10-1128.
- Fetsch, A., Etter, D., & Johler, S. (2021). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* —Current situation and impact from a One Health perspective. *Current Clinical Microbiology Reports*, *8*(3), 103-113.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., ... & Venter, J. C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *science*, *269*(5223), 496-512.
- Fluit, A. C., Wielders, C. L. C., Verhoef, J., & Schmitz, F. J. (2001). Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *Journal of clinical microbiology*, *39*(10), 3727-3732.

## Références bibliographiques

---

- Foster T. (1996). *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>
- Foster, T. J. (2019). Surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology spectrum*, 7(4), 7-4.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews microbiology*, 12(1), 49-62.
- Gardy, J., Loman, N. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nat Rev Genet* **19**, 9–20 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.88>
- Garner, J. S., Jarvis, W. R., Emori, T. G., Horan, T. C., & Hughes, J. M. (1988). CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *American journal of infection control*, 16(3), 128-140.
- Garrine, M., Costa, S. S., Messa Jr, A., Massora, S., Vubil, D., Ácacio, S., ... & Couto, I. (2023). Antimicrobial resistance and clonality of *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia in children admitted to the Manhiça District Hospital, Mozambique, over two decades. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Gehanno, J. F., Louvel, A., Nouvellon, M., Caillard, J. F., & Pestel-Caron, M. (2009). Aerial dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital rooms by infected or colonised patients. *Journal of Hospital Infection*, 71(3), 256-262.
- Gilchrist, C. A., Turner, S. D., Riley, M. F., Petri Jr, W. A., & Hewlett, E. L. (2015). Whole-genome sequencing in outbreak analysis. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 541-563.
- Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J. C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piémont, Y., Brousse, N., Floret, D., & Etienne, J. (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* (London, England), 359(9308), 753–759.
- Goering, R. V., Larsen, A. R., Skov, R., Tenover, F. C., Anderson, K. L., & Dunman, P. M. (2009). Comparative genomic analysis of European and Middle Eastern community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CC80: ST80-IV) isolates by high-density microarray. *Clinical microbiology and infection*, 15(8), 748-755.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351.
- Goolam Mahomed, T., Kock, M. M., Masekela, R., Hoosien, E., & Ehlers, M. M. (2018). Genetic relatedness of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from cystic fibrosis patients at a tertiary academic hospital in Pretoria, South Africa. *Scientific Reports*, 8(1), 12222.

## Références bibliographiques

---

- Götz, F. (1991). Staphylococcal lipases and phospholipases. *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. VCH Publishers. Weinheim, Germany, 285-292.
- Götz, F., Verheij, H. M., & Rosenstein, R. (1998). Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chemistry and physics of lipids*, 93(1-2), 15-25.
- Gould, I. M., David, M. Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T., & Peters, G. (2012). New insights into meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 39(2), 96-104.
- Grad YH, Lipsitch M. Epidemiologic data and pathogen genome sequences: a powerful synergy for public health. *Genome Biol*. 2014 Nov 18;15(11):538. doi: 10.1186/s13059-014-0538-4. PMID : 25418119; PMCID: PMC4282151.
- Grema, H. A., Geidam, Y. A., Gadzama, G. B., Ameh, J. A., & Suleiman, A. (2015). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a review. *Adv Anim Vet Sci*, 3(2), 79-98.
- Grubb, W. B., O'Brien, F., & Coombs, G. (2004). All methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are not equal. *Australian Infection Control*, 9(1), 17-28.
- Grumann, D., Nübel, U., & Bröker, B. M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 21, 583–592.
- Gudding, R. O. A. R. (1983). Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. *Journal of clinical microbiology*, 18(5), 1098-1101.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 107.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
- Hallin, M., Friedrich, A. W., & Struelens, M. J. (2009). spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols*, 189-202.
- Hanssen, A. M., & Ericson Sollid, J. U. (2006). SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46(1), 8-20.
- Harris SR, Cartwright EJ, Török ME, Holden MT, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Ellington MJ, Quail MA, Bentley SD, Parkhill J, Peacock SJ. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2013 Feb;13(2):130-6. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70268-2. Epub 2012 Nov 14. PMID: 23158674; PMCID: PMC3556525.

## Références bibliographiques

---

- Herold, B. C., Immergluck, L. C., Maranan, M. C., Lauderdale, D. S., Gaskin, R. E., Boyle-Vavra, S., ... & Daum, R. S. (1998). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *Jama*, 279(8), 593-598.
- Herschleb, J., Ananiev, G., & Schwartz, D. C. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature protocols*, 2(3), 677-684.
- Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, Baba T. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *J Infect Chemother*. 2014 Oct;20(10):593-601. doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.001. Epub 2014 Aug 27. PMID: 25172776.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 9(10), 486-493.
- Hirvonen J.J., 2014. The use of molecular methods for the detection and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomark Med*. 2014 ; 8(9) :1115-25. doi: 10.2217/bmm.14.60. PMID : 25402581.
- Holden, M. T., Hsu, L. Y., Kurt, K., Weinert, L. A., Mather, A. E., Harris, S. R., ... & Nübel, U. (2013). A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome research*, 23(4), 653-664.
- Hong-Ki, J. (2006). Purification and characterization of collagenase produced by *Staphylococcus aureus* JJ-11 isolated from the human skin. *Journal of Life Science*, 16(2), 245-252.
- Hsu, L. Y., Harris, S. R., Chlebowicz, M. A., Lindsay, J. A., Koh, T. H., Krishnan, P., ... & Holden, M. T. (2015). Evolutionary dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within a healthcare system. *Genome Biology*, 16(1), 1-13.
- Hu, Y., Meng, J., Shi, C., Hervin, K., Fratamico, P. M., & Shi, X. (2013). Characterization and comparative analysis of a second thermonuclease from *Staphylococcus aureus*. *Microbiological research*, 168(3), 174-182.
- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal : prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11, 1-11.
- Illumina, <https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>.
- Inouye, M., Dashnow, H., Raven, L. A., Schultz, M. B., Pope, B. J., Tomita, T., ... & Holt, K. E. (2014). SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome medicine*, 6(11), 1-16.
- Jackson, R. W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S., & Murillo, J. (2011). The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mobile genetic elements*, 1(1), 55-65.

## Références bibliographiques

---

- Jacobs, S. I., Willis, A. T., & Goodburn, G. M. (1963). Significance of deoxyribonuclease production by staphylococci. *Nature*, 200(4907), 709-710.
- Jenul, C., & Horswill, A. R. (2019). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology spectrum*, 7(2), 7-2.
- Jian, Y., & Li, M. (2021). A narrative review of single-nucleotide polymorphism detection methods and their application in studies of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bio-X research*, 4(01), 1-9.
- Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018 Sep 24 ;3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1. PMID : 30345391 ; PMCID : PMC6192448.
- Kaiser-Thom, S., Gerber, V., Collaud, A., Hurni, J., & Perreten, V. (2022). Prevalence and WGS-based characteristics of *Staphylococcus aureus* in the nasal mucosa and pastern of horses with equine pastern dermatitis. *BMC veterinary research*, 18(1), 1-13.
- Kale, P., & Dhawan, B. (2016). The changing face of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian journal of medical microbiology*, 34(3), 275-285.
- Katz, D. S. (2010). Coagulase test protocol. *American Society for Microbiology Laboratory Protocols*. Available online: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol,3220>.
- Karlsson, A., & Arvidson, S. (2002). Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor sarA. *Infection and immunity*, 70(8), 4239-4246.
- Kateete, D. P., Bwanga, F., Seni, J., Mayanja, R., Kigozi, E., Mujuni, B., ... & Joloba, M. L. (2019). CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1-9.
- Kaya, H., Hasman, H., Larsen, J., Stegger, M., Johannesen, T. B., Allesøe, R. L., ... & Larsen, A. R. (2018). SCC mec Finder, a web-based tool for typing of staphylococcal cassette chromosome mec in *Staphylococcus aureus* using whole-genome sequence data. *Msphere*, 3(1), e00612-17.
- Ke, W., Huang, S. S., Hudson, L. O., Elkins, K. R., Nguyen, C. C., Spratt, B. G., ... & Lipsitch, M. (2012). Patient sharing and population genetic structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), 6763-6768.
- Khusro, A., & Aarti, C. (2022). Metabolic heterogeneity and techno-functional attributes of fermented foods-associated coagulase-negative staphylococci. *Food Microbiology*, 105, 104028.

## Références bibliographiques

---

- Kim, J.M., Kim, I., Chung, S.H., Chung, Y., Han, M., Kim, J.S. (2019). Rapid Discrimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by MALDI-TOF MS. *Pathogens*, 8(4):214.
- Kinnevey, P. M., Kearney, A., Shore, A. C., Earls, M. R., Brennan, G. I., Poovelikunnel, T. T., ... & Coleman, D. C. (2022). Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* transmission among healthcare workers, patients and the environment in a large acute hospital under non-outbreak conditions investigated using whole-genome sequencing. *Journal of Hospital Infection*, 127, 15-25.
- Kinnevey, P. M., Shore, A. C., Mac Aogáin, M., Creamer, E., Brennan, G. I., Humphreys, H., ... & Coleman, D. C. (2016). Enhanced tracking of nosocomial transmission of endemic sequence type 22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* type IV isolates among patients and environmental sites by use of whole-genome sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(2), 445-448.
- Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (1975). Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of clinical microbiology*, 1(1), 82-88.
- Kluytmans- Vanden Bergh, M. F. Q., & Kluytmans, J. A. J. W. (2006). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 9-15.
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A., Witte, W., & Friedrich, A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(41), 19688.
- Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2013). *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. *MBio*, 4(5), 10-1128.
- Kwiecinski, J., Jacobsson, G., Karlsson, M., Zhu, X., Wang, W., Bremell, T., ... & Jin, T. (2013). Staphylokinase promotes the establishment of *Staphylococcus aureus* skin infections while decreasing disease severity. *The Journal of infectious diseases*, 208(6), 990-999.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E. L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E. M., Vazquez, V., Höök, M., Etienne, J., Vandenesch, F., & Bowden, M. G. (2007). *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*, 315(5815), 1130-1133.
- Ladhani S., 2003. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 39(2), 181-189.
- Ladhani, S. (2001). Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(6), 301-307.
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), 10-1128.

## Références bibliographiques

---

- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357-359.
- Lawal OU, Ayobami O, Abouelfetouh A, Mourabit N, Kaba M, Egyir B, Abdulgader SM, Shittu AO. A 6-Year Update on the Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Africa: A Systematic Review. *Front Microbiol.* 2022 May 3;13:860436. doi: 10.3389/fmicb.2022.860436. PMID : 35591993 ; PMCID : PMC9113548.
- Le, K. Y., & Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Frontiers in microbiology*, 6, 1174.
- LeClaire, R. D., Hunt, R. E., & Bavari, S. (2002). Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infection and immunity*, 70(5), 2278-2281.
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews. Disease primers*, 4, 18033.
- Lee, J. Y. (2023). The Principles and Applications of High-Throughput Sequencing Technologies. *Development & Reproduction*, 27(1), 9-24.
- Lena, P., Ishak, A., Karageorgos, S. A., & Tsioutis, C. (2021). Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Mrsa) on healthcare workers' attire: A systematic review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(2), 42.
- Leonard, F. C., & Markey, B. K. (2008). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinary journal*, 175(1), 27–36.
- Li, J., Lai, S., Gao, G. F., & Shi, W. (2021). The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature*, 600(7889), 408-418.
- Li, X., Huang, T., Xu, K., Li, C., & Li, Y. (2019). Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates in Hainan, China. *BMC infectious diseases*, 19(1), 1-12.
- Licitra G. Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg Infect Dis.* 2013 Sep ;19(9):1553. doi: 10.3201/eid1909.ET1909. PMCID : PMC3810938.
- Lin, Y. C., Liao, Y. J., Lee, Y. H., Tseng, S. F., Liu, J. Y., Chen, Y. S., Shui, H. A., Lin, F. Z., Lin, K. H., Chen, Y. C., Tsai, M. C., Sytwu, H. K., Wang, C. C., & Chuang, Y. P. (2019). Staphylococcal phosphatidylinositol-specific phospholipase C potentiates lung injury via complement sensitisation. *Cellular microbiology*, 21(10), e13085.
- Lindsay, J. A. (2014). *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(2), 103-109.
- Lindsay, J. A., & Holden, M. T. (2004). *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends in microbiology*, 12(8), 378-385.

## Références bibliographiques

---

- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., & Yang, J. (2022). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 50(D1), D912-D917.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., ... & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Liu, Y., Zhang, J., & Ji, Y. (2016). Suppl-1, M2: PCR-based Approaches for the Detection of Clinical Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The open microbiology journal*, 10, 45.
- Lynch, T., Petkau, A., Knox, N., Graham, M., & Van Domselaar, G. (2016). A primer on infectious disease bacterial genomics. *Clinical microbiology reviews*, 29(4), 881-913.
- Madani, A., Garakani, K., & Mofrad, M. R. K. (2017). Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesin, CNA, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. *PloS one*, 12(6), e0179601.
- Mairi, A., Touati, A., Pantel, A., Zenati, K., Martinez, A. Y., Dunyach-Remy, C., ... & Lavigne, J. P. (2019). Distribution of toxinogenic methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from different ecological niches in Algeria. *Toxins*, 11(9), 500.
- Makris, G., Wright, J. D., Ingham, E., & Holland, K. T. (2004). The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus* –a virulence factor? *Microbiology*, 150(6), 2005-2013.
- Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J. P., & Molle, V. (2021). *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*, 13(10), 677.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, 24(3), 133-141.
- McAdow M., Missiakas D.M., et Schneewind O., 2012. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *Journal of innate immunity*, 4(2), 141-148.
- McClure-Warnier, J. A., Conly, J. M., & Zhang, K. (2013). Multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (79), e50779.
- Mediavilla, J. R., Chen, L., Mathema, B., & Kreiswirth, B. N. (2012). Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Current opinion in microbiology*, 15(5), 588-595.
- Mesrati, I., Saidani, M., Ennigrou, S., Zouari, B., & Redjeb, S. B. (2010). Clinical isolates of Panton–Valentine leucocidin-and  $\gamma$ -haemolysin-producing *Staphylococcus aureus* : prevalence and association with clinical infections. *Journal of Hospital Infection*, 75(4), 265-268.

## Références bibliographiques

---

- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
- Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2013). Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current protocols in microbiology*, 28(1), 9C-1.
- Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al., (2011) A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One 6: 1–24.
- Morton, H. E., & Cohn, J. (1972). Coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources. *Applied Microbiology*, 23(4), 725-733.
- Motro, Y., & Moran-Gilad, J. (2017). Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology. *Biomolecular detection and quantification*, 14, 1-6.
- Murray, J. L. C. et al., (2020). Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)*, 396(10258), 1223–1249. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30752-2).
- Nadon, C. A., Trees, E., Ng, L. K., Møller Nielsen, E., Reimer, A., Maxwell, N., ... & the MLVA Harmonization Working Group, C. (2013). Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. *Eurosurveillance*, 18(35).
- Nagarajan N and Pop M. 2013. Sequence assembly demystified. *Nat Rev Genet*14:157–167.
- Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol.* 2019 Oct;74:103935. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103935. Epub 2019 Jun 22. PMID: 31233781.
- Neoh, H. M., Yieng, C. Y., Abd, R. M. F. B. R., Hussin, S., & Jamal, R. (2017). Simplified protocol of gel-based multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) for *Staphylococcus aureus* typing. *Germs*, 7(2), 98.
- Ngoa, U. A., Schaumburg, F., Adegnika, A. A., Kösters, K., Möller, T., Fernandes, J. F., ... & Lell, B. (2012). Epidemiology and population structure of *Staphylococcus aureus* in various population groups from a rural and semi urban area in Gabon, Central Africa. *Acta tropica*, 124(1), 42-47.
- Nguyen, L. T., & Vogel, H. J. (2016). Staphylokinase has distinct modes of interaction with antimicrobial peptides, modulating its plasminogen-activation properties. *Scientific reports*, 6, 31817.
- Nurjadi, D., Olalekan, A. O., Layer, F., Shittu, A. O., Alabi, A., Ghebremedhin, B., ... & Zanger, P. (2014). Emergence of trimethoprim resistance gene *dfpG* in *Staphylococcus aureus* causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2361-2368.

## Références bibliographiques

---

- Ogston A., 1881. Report upon micro-organisms in surgical diseases. *Br Med J* 1:369–375.
- Ogston, A., 1882. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* 16, 526-267,
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10(6), 252.
- Olsen K, Danielsen K, Wilsgaard T, Sangvik M, Sollid JU, Thune I, et al. Obesity and *Staphylococcus aureus* nasal colonization among women and men in a general population. *PLoS One* 2013;8: e63716.
- Omuse, G., Kabera, B., & Revathi, G. (2014). Low prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as determined by an automated identification system in two private hospitals in Nairobi, Kenya: a cross sectional study. *BMC infectious diseases*, 14, 1-6.
- Oosthuysen, W. F., Orth, H., Lombard, C. J., Sinha, B., & Wasserman, E. (2014). Population structure analyses of *Staphylococcus aureus* at Tygerberg Hospital, South Africa, reveals a diverse population, a high prevalence of Pantón–Valentine leukocidin genes, and unique local methicillin-resistant *S. aureus* clones. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), 652-659.
- Ostojić, M. (2008). Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Bosnian journal of basic medical sciences*, 8(3), 259.
- Otter, J. A., & French, G. L. (2011). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, 79(3), 189-193.
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature reviews microbiology*, 7(8), 555-567.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., ... & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pangenome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693.
- Page, A. J., Taylor, B., Delaney, A. J., Soares, J., Seemann, T., Keane, J. A., & Harris, S. R. (2016). SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microbial genomics*, 2(4).
- Pal, M., Shuramo, M. Y., Tewari, A., Srivastava, J. P., & Steinmetz, C. H. (2023). *S Staphylococcus aureus* from a Commensal to Zoonotic Pathogen: A Critical Appraisal. *Int. J. Clin. Exp. Med. Res*, 7, 220-228.
- Parastan, R., Kargar, M., Solhjoo, K., & Kafilzadeh, F. (2020). *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. *Gene Reports*, 20, 100739.
- Parfentjev, I. A., & Catelli, A. R. (1964). Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *Journal of bacteriology*, 88(1), 1-3.

## Références bibliographiques

---

- Parisi, A., Caruso, M., Normanno, G., Latorre, L., Sottili, R., Miccolupo, A., ... & Santagada, G. (2016). Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. *Food microbiology*, *58*, 36-42.
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**, 5607-5612; DOI: [10.1099/ijsem.0.004332](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332).
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., & Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, *16*, 38-53.
- Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl Microbiol*. 2007 Dec ;103(6):2046-55. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x. PMID: 18045388.
- Peton V, Le Loir Y. 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol* 21:602–615 <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.011>.
- Piro, R. M. (2020). Sequencing technologies for epigenetics: From basics to applications. In *Epigenetics of the Immune System* (pp. 161-183). Academic Press.
- Planet, P. J., Narechania, A., Chen, L., Mathema, B., Boundy, S., Archer, G., & Kreiswirth, B. (2017). Architecture of a species: phylogenomics of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, *25*(2), 153-166.
- Plano, L. R. (2004). *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: how they cause disease. *Journal of investigative dermatology*, *122*(5), 1070-1077.
- Pokhrel, R. H., Aung, M. S., Thapa, B., Chaudhary, R., Mishra, S. K., Kawaguchiya, M., ... & Kobayashi, N. (2016). Detection of ST772 Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Bengal Bay clone) and ST22 *S. aureus* isolates with a genetic variant of elastin binding protein in Nepal. *New Microbes and New Infections*, *11*, 20-27.
- Pop, M., Phillippy, A., Delcher, A. L., & Salzberg, S. L. (2004). Comparative genome assembly. *Briefings in bioinformatics*, *5*(3), 237-248.
- Price, J. R., Cole, K., Bexley, A., Kostiou, V., Eyre, D. W., Golubchik, T., ... & Paul, J. (2017). Transmission of *Staphylococcus aureus* between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(2), 207-214.
- Puspasari, V., Ridhova, A., Hermawan, A., Amal, M. I., & Khan, M. M. (2022). ZnO-based antimicrobial coatings for biomedical applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *45*(9), 1421-1445.

## Références bibliographiques

---

- Quainoo, S., Coolen, J. P., van Hijum, S. A., Huynen, M. A., Melchers, W. J., van Schaik, W., & Wertheim, H. F. (2017). Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clinical microbiology reviews*, 30(4), 1015-1063.
- Rakotovo-Ravahatra, Z. D., Randriatsarafara, F. M., Milasoanjara, R. N., Ranaivosoa, M. K., Rakotovo, A. L., & Rasamindrakotroka, A. (2019). Assessment of the coagulase test in the identification of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Biotechnology and Biomedicine*, 2(3), 105-111.
- Ramdani-Bouguessa, N., Bes, M., Meugnier, H., Forey, F., Reverdy, M. E., Lina, G., ... & Etienne, J. (2006). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(3), 1083-1085.
- Ratner, H. B., & Stratton, C. W. (1985). Thermonuclease test for same-day identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures. *Journal of clinical microbiology*, 21(6), 995-996.
- Rebiahi, S. A., Abdelouahid, D. E., Rahmoun, M., Abdelali, S., & Azzaoui, H. (2011). Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). *Médecine et maladies infectieuses*, 41(12), 646-651.
- Reddy, P. N., Srirama, K., & Dirisala, V. R. (2017). An update on clinical burden, diagnostic tools, and therapeutic options of *Staphylococcus aureus*. *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 10, 1179916117703999.
- Rosenbach, F. J. (1884). Mikroorganismenbeiden Wundinfektionskrankheiten des Menschen. *J. F. Berg- man, Wiesbaden*.
- Rubin IM, Hansen TA, Klingenberg AM, Petersen AM, Worning P, Westh H, Bartels MD. A Sporadic Four-Year Hospital Outbreak of a ST97-IVa MRSA With Half of the Patients First Identified in the Community. *Front Microbiol*. 2018 Jul 10;9:1494. doi: 10.3389/fmicb.2018.01494. PMID : 30042745; PMCID: PMC6048196.
- Ruimy, R., Maiga, A., Armand-Lefevre, L., Maiga, I., Diallo, A., Koumaré, A. K., ... & Feil, E. J. (2008). The carriage population of *Staphylococcus aureus* from Mali is composed of a combination of pandemic clones and the divergent Panton-Valentine leukocidin-positive genotype ST152. *Journal of bacteriology*, 190(11), 3962-3968.
- Ruppitsch, W. (2016). Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation/Molekulare Typisierung von Bakterien für die epidemiologische Überwachung und Ausbruchsabklärung. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 67(4), 199-224.
- Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J. L., Rolain, J. M., & Blin, O. (2018). *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Frontiers in microbiology*, 9, 2419.
- Salam AM, Quave CL. Targeting Virulence in *Staphylococcus aureus* by Chemical Inhibition of the Accessory Gene Regulator System *In Vivo*. *mSphere*. 2018 Jan 17;3(1):e00500-17. doi : 10.1128/mSphere.00500-17. PMID : 29359191 ; PMCID : PMC5770542.

## Références bibliographiques

---

- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2002) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Science Press, Beijing, 461-471.
- Sanchini, A. (2022). Recent developments in phenotypic and molecular diagnostic methods for antimicrobial resistance detection in *Staphylococcus aureus*: a narrative review. *Diagnostics*, 12(1), 208.
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., ... & Malonia, S. K. (2023). Next-generation sequencing technology: Current trends and advancements. *Biology*, 12(7), 997.
- Saunders, N. A., & Holmes, A. (2014). Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols*, 113-130.
- Schaumburg, F., Alabi, A. S., Mombo-Ngoma, G., Kaba, H., Zoleko, R. M., Diop, D. A., ... & Becker, K. (2014). Transmission of *Staphylococcus aureus* between mothers and infants in an African setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6), O390-O396.
- Schaumburg, F., Alabi, A. S., Peters, G., & Becker, K. (2014). New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), 589-596.
- Schaumburg, F., Ngoa, U. A., Köck, R., Adegnika, A. A., Kremsner, P. G., Lell, B., ... & Becker, K. (2011). Virulence factors and genotypes of *Staphylococcus aureus* from infection and carriage in Gabon. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(10), 1507-1513.
- Schmidt, T., Kock, M. M., & Ehlers, M. M. (2015). Antimicrobial Resistance in *Staphylococci* at the Human– Animal Interface. InTech. doi: 10.5772/61785.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Shaghayegh, G., Cooksley, C., Ramezanpour, M., Wormald, P. J., Psaltis, A. J., Vreugde, S. (2022). Chronic Rhinosinusitis, *S. aureus* Biofilm and Secreted Products, Inflammatory Responses, and Disease Severity. *Biomedicines*, 10(6), 1362.
- Shariati, A., Dadashi, M., Moghadam, M. T., van Belkum, A., Yaslianifard, S., & Darban-Sarokhalil, D. (2020). Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates : a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 10(1), 12689.
- Shih, H. I., Chang, C. M., Shen, F. C., Lee, Y. J., Wu, C. H., Hsu, H. C., & Chi, C. Y. (2021). High prevalence nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among long term care facility healthcare workers in relation to patient contact. *Infection Prevention in Practice*, 3(1), 100117.

## Références bibliographiques

---

- Shopsin, B., Mathema, B., Alcabes, P., Said-Salim, B., Lina, G., Matsuka, A., ... & Kreiswirth, B. N. (2003). Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 456-459.
- Silva, V., Monteiro, A., Pereira, J. E., Maltez, L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2022). MRSA in humans, pets and livestock in Portugal: Where we came from and where we are going. *Pathogens*, 11(10), 1110.
- Silveira, A. C., Cunha, G. R., Caierão, J., Cordova, C. M. D., & d'Azevedo, P. A. (2015). MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19, 384-389.
- Silversides, J. A., Lappin, E., & Ferguson, A. J. (2010). Staphylococcal toxic shock syndrome: mechanisms and management. *Current infectious disease reports*, 12, 392-400.
- Sivaraman, K., Venkataraman, N., & Cole, A. M. (2009). *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors. *Future microbiology*, 4(8), 999-1008.
- Skov, R., Christiansen, K., Dancer, S. J., Daum, R. S., Dryden, M., Huang, Y. C., & Lowy, F. D. (2012). Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *International journal of antimicrobial agents*, 39(3), 193-200.
- Skov, R., Smyth, R., Larsen, A. R., Bolmstrom, A., Karlsson, A., Mills, K., ... & Kahlmeter, G. (2006). Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar. *Journal of clinical microbiology*, 44(12), 4395-4399.
- Smith, T. C., Moritz, E. D., Larson, K. L., & Ferguson, D. D. (2010). The environment as a factor in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Reviews on environmental health*, 25(2), 121-134.
- Soheir, A. R., Sahar M, F., & Nagwa Abdel Ghany, K. (2006). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] by: disk diffusion, E-test, latex agglutination test and real-time PCR.
- Solberg, C. O. (2000). Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 32(6), 587-595.
- Song, J. H., Hsueh, P. R., Chung, D. R., Ko, K. S., Kang, C. I., Peck, K. R., ... & Carlos, C. C. (2011). Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(5), 1061-1069.
- Spellberg, B., & Daum, R. (2012). Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, pp. 335-348). Springer-Verlag.

## Références bibliographiques

---

- Speziale, P., Pietrocola G., 2020. The Multivalent Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in Host Infections. *Front Microbiol.* 2020 Aug 26 ; 11:2054. doi : 10.3389/fmicb.2020.02054. PMID : 32983039 ; PMCID : PMC7480013.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Rindi, S., Provenzano, M., Provenza, G., Di Poto, A., Visai, L., & Arciola, C. R. (2009). Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future microbiology*, 4(10), 1337–1352.
- Spoor, L. E., McAdam, P. R., Weinert, L. A., Rambaut, A., Hasman, H., Aarestrup, F. M., ... & Fitzgerald, J. R. (2013). Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio*, 4(4), 10-1128.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., & MacKenzie, F. M. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents*, 39(4), 273-282.
- Stein, L. (2001). Genome annotation: from sequence to biology. *Nature reviews genetics*, 2(7), 493-503.
- Stewart C.M., 2003. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. Ch 12 In: Hocking AD (ed) Food borne Microorganisms of Public Health Significance. 6th ed. Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney, Pp. 359- 380.
- Strommenger, B., Braulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nubel, U., & Witte, W. (2008). spa typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 574-581.
- Struelens, M. J., & Brisse, S. (2013). From molecular to genomic epidemiology: transforming surveillance and control of infectious diseases. *Eurosurveillance*, 18(4), 20386.
- Sulaiman, I. M., Banerjee, P., Hsieh, Y. H., Miranda, N., Simpson, S., & Kerdahi, K. (2018). Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and related species isolated from food, environment, cosmetics, a medical device, and clinical samples using the VITEK MS microbial identification system. *Journal of AOAC International*, 101(4), 1135-1143.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., ... WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(3), 318–327

## Références bibliographiques

---

- Tam, K., & Torres, V. J. (2019). *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiology spectrum*, 7(2), 7-2.
- Tang P, Croxen MA, Hasan MR, Hsiao WWL, Hoang LM. Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am J Infect Control*. 2017 Feb 1;45(2):170-179. doi: 10.1016/j.ajic.2016.05.015. PMID: 28159067.
- Tang, P., & Gardy, J. L. (2014). Stopping outbreaks with real-time genomic epidemiology. *Genome medicine*, 6(11), 1-3.
- Tang, Y. W., & Stratton, C. W. (2010). *Staphylococcus aureus*: an old pathogen with new weapons. *Clinics in laboratory medicine*, 30(1), 179-208.
- Tegally, H., San, J. E., Giandhari, J., & de Oliveira, T. (2020). Unlocking the efficiency of genomics laboratories with robotic liquid-handling. *BMC genomics*, 21(1), 1-15.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233–2239.
- Thabet, L., Aa, M., Mbarek, M., Turki, A., Meddeb, B., & Redjeb, B. (2008). Surveillance of multidrug resistant bacteria in a Tunisian hospital. *La Tunisie medicale*, 86(11), 992-995.
- Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections : epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):603-61.
- Trindade, P. A., Mcculloch, J. A., Oliveira, G. A. D., & Mamizuka, E. M. (2003). Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7, 32-43.
- Tuffs, S. W., Haeryfar, S. M., & McCormick, J. K. (2018). Manipulation of innate and adaptive immunity by staphylococcal superantigens. *Pathogens*, 7(2), 53.
- Turlej, A. G. A. T. A., Hryniewicz, W. A. L. E. R. I. A., & Empel, J. (2011). Staphylococcal cassette chromosome mec (Scmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*, 60(2), 95-103.
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 17, 203–218 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>.
- Uehara, Y. (2022). Current status of staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec). *Antibiotics*, 11(1), 86.
- Van Dalen, R., Peschel, A., & van Sorge, N. M. (2020). Wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* host interaction. *Trends in microbiology*, 28(12), 985-998.

## Références bibliographiques

---

- Van El, C. G., Cornel, M. C., Borry, P., Hastings, R. J., Fellmann, F., Hodgson, S. V., ... & De Wert, G. M. (2013). Whole-genome sequencing in health care. *European Journal of Human Genetics*, 21(6), 580-584.
- Van Griethuysen, A., Bes, M., Etienne, J., Zbinden, R., & Kluytmans, J. (2001). International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 86-89.
- Van Leeuwen, W. B., van Pelt, C., Luijendijk, A. D., Verbrugh, H. A., & Goessens, W. H. (1999). Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test. *Journal of clinical microbiology*, 37(9), 3029-3030.
- Van Nes, A., & Wulf, M. W. H. (2012). MRSA in animals and humans: occurrence and control. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 99.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., ... & Etienne, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging infectious diseases*, 9(8), 978.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., ... & Etienne, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging infectious diseases*, 9(8), 978.
- Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004-12. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:2913–9.
- Visansirikul, S., Kolodziej, S. A., & Demchenko, A. V. (2020). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(5), 783-798.
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 55(4), 641-658.
- Wang, X., Li, X., Liu, W., Huang, W., Fu, Q., & Li, M. (2016). Molecular characteristic and virulence gene profiles of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients in Shanghai, China. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1818.
- Wang, Y., Zhang, P., Wu, J., Chen, S., Jin, Y., Long, J., ... & Yang, H. (2023). Transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between animals, environment, and humans in the farm. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(37), 86521-86539.
- Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., & Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature biotechnology*, 39(11), 1348-1365.
- Weidenmaier, C., Goerke C., Wolz, C. (2012). *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. *Trends Microbiol*. 20, 243–250

## Références bibliographiques

---

- Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet. Infectious diseases*, 5(12), 751–762.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology*, 13(6), e1005595.
- Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., ... & Christner, M. (2011). MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(1), 64-68.
- Wyres, K. L., Conway, T. C., Garg, S., Queiroz, C., Reumann, M., Holt, K., & Rusu, L. I. (2014). WGS analysis and interpretation in clinical and public health microbiology laboratories: what are the requirements and how do existing tools compare? *Pathogens*, 3(2), 437-458.
- Yang, S., & Rothman, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet infectious diseases*, 4(6), 337-348.
- Yu, J., Tien, N., Liu, Y. C., Cho, D. Y., Chen, J. W., Tsai, Y. T., ... & Chen, C. J. (2022). Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF MS and machine learning from over 20,000 clinical isolates. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e00483-22.
- Zhang, K., Sparling, J., Chow, B. L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D. L., ... & Conly, J. M. (2004). New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *Journal of clinical microbiology*, 42(11), 4947-4955.
- Zhang, J., Gu, F. F., Zhao, S. Y., Xiao, S. Z., Wang, Y. C., Guo, X. K., ... & Han, L. Z. (2015). Prevalence and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* among residents of seven nursing homes in Shanghai. *PloS one*, 10(9), e0137593.

# **Annexes**

---

**Annexe 1. Questionnaire.**

<p><b>République Algérienne Démocratique et Populaire</b>  <b>Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique</b>  <b>Université de Hassiba Ben Bouali de Chlef</b>  <b>Faculté des Sciences de la nature et de la vie</b>  <b>Département de Biologie</b>  <b>Laboratoire de Biologie Moléculaire, Génomique et Bioinformatique</b></p>	
<b>Établissement</b>	
<b>Service</b>	
<b>Date de prélèvement</b>	
<b>Date de collection</b>	
<b>Age</b>	
<b>Sexe</b>	
<b>Type de pathologie</b>	
<b>Prise d'antibiotiques</b>	
<b>Atteintes de maladies chroniques</b>	

## Annexe

### Annexe 2. Les milieux de culture et solutions.

Milieu de culture	Ingrédients	Quantité	pH
<b>Bouillon nutritif</b>	Tryptone Extrait de viande Chlorure de sodium Eau distillée	10g 5g 5g 1L	7,2±0,2
<b>Gélose Chapman/ Mannitol Salt Agar</b>	Extrait de bœuf Peptone D-mannitol Chlorure de sodium Rouge de phénol Agar Eau distillée	1g 10g 10g 75g 25mg 15g 1L	7.5±0.2
<b>Gélose nutritive</b>	Tryptone Extrait de viande Extrait de levure Chlorure de sodium Agar Eau distillée	5g 3g 2g 5g 15g 1L	6.8±0.2
<b>Gélose nutritive Molle</b>	Tryptone Extrait de viande Extrait de levure Chlorure de sodium Agar Eau distillée	5g 1g 2g 5g 8g 1L	6.8±0.2
<b>Gélose Mueller Hinton</b>	Hydrolysate acide de caséine Extrait de viande Amidon soluble Agar Eau distillée	17.5g 2g 1.5g 15g 1L	7.3±0.2
<b>Solutions</b>	<b>Ingrédients</b>	<b>Quantité</b>	<b>pH</b>
<b>Eau physiologique</b>	Chlorure de sodium Eau distillée	9g 1L	

**Annexe 3. Protocole de préparation de la bibliothèque d'ADN par Illumina Nextera XT.** (Illumina, 2019), <https://manuals.plus/fr/illumina/nextera-xt-dna-library-prep-kit-manual#ixzz8OsPI6KcL>

**Étape 1: Tagmentation de l'ADN génomique**

1. Pour chaque échantillon, ajouter les volumes suivants dans l'ordre indiqué, dans un puit d'une plaque à 96 puits.

- 10 µl Tampon Tagment DNA Buffer (TD).
  - 5 µl (1 ng) de l'ADN génomique (0.2ng/ul). Pipeter pour mélanger.
2. 5 µl du mélange Amplicon Tagment Mix (ATM). Pipeter pour mélanger.

3. Centrifuger à  $280 \times g$  à 20°C pendant 1 min.

Placer dans un thermocycleur et exécuter le programme de tagmentation TAG PCR (55°C pendant 5 min, puis maintenir à 10°C). Lorsque l'échantillon atteint 10°C, passer immédiatement à l'étape 5.

4. Ajouter 5 µl de Neutralize Tagment Buffer (NT). Pipeter pour mélanger.
5. Centrifuger à  $280 \times g$  à 20°C pendant 1 minute.
6. Incuber à température ambiante pendant 5 min.

**Étape 2: Amplification des bibliothèques**

Ajoutez les volumes d'adaptateur d'index suivants par échantillon :

1. 5 µL de chaque index Index 1 (i7) et Index 2 (i5) (soit 10 µL) :
2. Ajouter 15 µL de Nextera PCR Master Mix (NPM). Pipeter pour mélanger.
3. Centrifuger à  $280 \times g$  à 20°C pendant 1 min.
4. Placer dans le thermocycleur et exécuter le programme NXT PCR suivant :
  - 3 min à 72°C
  - 30 s à 95°C
  - 12 cycles de :
    - 10 s à 95°C
    - 30 s à 55°C
    - 30 s à 72°C
  - 5 min à 72°C
  - Maintenir à 10°C

**Étape 3: Purification des bibliothèques**

1. Centrifuger à  $280 \times g$  à 20°C pendant 1 min.
2. Transférer 50 µL de surnageant de chaque puit de la plaque PCR aux puits correspondants d'une nouvelle plaque MIDI.
3. Ajouter 30 µL de billes AMPure XP (Beckmann Coulter) dans chaque puit de la plaque MIDI.
4. Agiter à 1800 rpm pendant 2 min.
5. Incuber à température ambiante pendant 5 min.
6. Placer sur le support magnétique jusqu'à ce que le liquide soit clair.
7. Retirer et jeter tout le surnageant dans chaque puit.
8. Laver deux fois avec 200 µL d'éthanol à 80 %.
9. Utiliser une pipette de 20 µL pour aspirer et jeter l'éthanol résiduel.
10. Sécher à l'air libre sur le support magnétique pendant 15 min.
11. Retirer le support magnétique.
12. Ajouter 52.5 µL de tampon de remise en suspension (RSB).
13. Sceller la plaque, puis agiter à 1800 tr/min pendant 2 min.
14. Incuber à température ambiante pendant 2 min.

15. Placer sur le support magnétique jusqu'à ce que le liquide soit clair.
16. Transférer 50 µL de surnageant dans une *plaque PCR* de type "Hardshell" à 96 puits.

#### Étape 4 : Vérification de la qualité et la quantité de la bibliothèque

1. Vérifier la qualité et la quantité de la bibliothèque en analysant 1 µL de la bibliothèque nettoyée et non diluée avec un bioanalyseur Agilent Technology 2100 avec un kit ADN haute sensibilité.

#### Étape 5 : Normalisation des bibliothèques

Ce processus normalise la quantité d'ADN dans chaque bibliothèque pour garantir une représentation égale des bibliothèques dans la bibliothèque poolée.

1. Transférer 20 µL de surnageant de la *plaque PCR* de type "Hardshell" dans une nouvelle *plaque PCR* MIDI à 96 puits.
2. Pour chaque échantillon, mélanger les volumes suivants dans un tube conique de 15 mL.
  - 44 µl d'additifs de normalisation de bibliothèque (LNA1).
  - 8 µl de billes de normalisation de bibliothèque (LNB1).
3. Pipeter pour mélanger.
4. Transférer 45 µL du mélange LNA1/LNB1 dans chaque puit de la *plaque PCR* MIDI contenant 20 µL de la bibliothèque.
5. Agiter à 1800 rpm pendant 30 min.
6. Placer sur le support magnétique jusqu'à ce que le liquide soit clair.
7. Retirer et jeter tout le surnageant de chaque puit.
8. Laver deux fois avec 45 µL de solution de lavage de normalisation de bibliothèque 1 (LNW1).
9. Ajouter 30 µl de NaOH 0.1 N.
10. Agiter à 1800 rpm pendant 5 min.
11. Ajouter 30 µl de tampon de stockage de normalisation de bibliothèque (LNS1) dans chaque puit d'une nouvelle *plaque PCR* à 96 puits étiquetée SGP (*plaque* de stockage).
12. Placer sur un support magnétique jusqu'à ce que le liquide soit clair.
15. Une fois l'élution de 5 min terminée, transférer 30 µl de surnageant (contenant l'ADN) de la *plaque* MIDI à la *plaque* SGP contenant LNS1.
16. Centrifuger à 1000 × g pendant 1 min.

#### Étape 6 : Pooling des bibliothèques

Le pooling consiste à mélanger des quantités égales de plusieurs bibliothèques normalisées dans un seul tube.

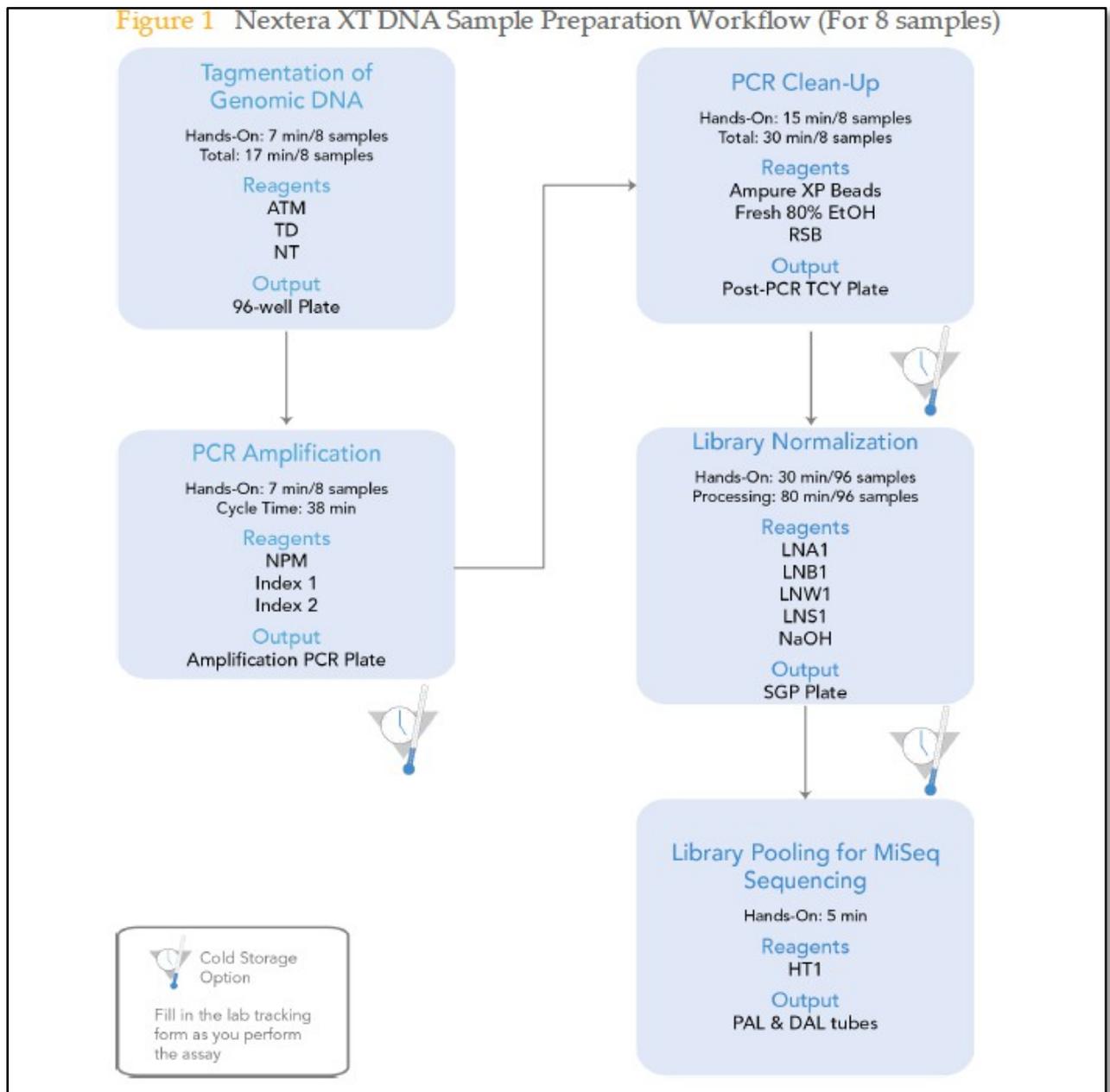
1. Transférer 5 µl de chaque bibliothèque normalisée de la *plaque* SGP dans un tube Eppendorf. Mélanger en inversant le tube.

#### Étape 7 : Dilution et dénaturation du pool des bibliothèques

Après le pooling des bibliothèques, diluer le pool à la concentration recommandée pour le système de séquençage Illumina, qui est de 20 pM, puis dénaturer les ADN à la chaleur, comme suit :

1. Mélanger dans un tube de microcentrifuge 24 µL du pool de bibliothèques et 576 µL de tampon d'hybridation (HT1) pré-réfrigéré.
2. Placer le tube dans un incubateur préchauffé à 98°C pendant 2 min.
3. Refroidissez immédiatement sur de la glace pendant 5 min.

24µL de cette librairie ont été prélevés et mélangés à 576 µL de tampon d'hybridation (Illumina) afin d'en assurer la dilution à 20pM, concentration recommandée par Illumina pour le chargement dans l'automate.





Annexe 5. Les diamètres critiques des zones d'inhibition.

76

Macrolides, lincosamides, streptogramines et peuronnulines	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres : commentaires généraux ou portant sur les concentrations critiques Lettres : commentaires portant sur les diamètres critiques
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Erythromycine	1 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>		15	21 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>		<p>1/A. L'érythromycine peut être utilisée pour le dépistage des résistances aux macrolides. Si l'érythromycine est sensible (diamètre ≥ 21 mm ou CMI ≤ 1 mg/L), les souches peuvent être catégorisées sensibles à l'azithromycine, à la clarithromycine et à la roxithromycine. Si le test de dépistage est positif (diamètre &lt; 21 mm ou CMI &gt; 1 mg/L), les autres macrolides doivent être testés individuellement.</p> <p>2. Pour les souches sensibles à la clindamycine, une résistance inducible peut être mise en évidence par une image d'antagonisme (D-test) entre la clindamycine et l'érythromycine (antibiogramme par diffusion), ou en comparant les CMI de la clindamycine en présence et en l'absence d'érythromycine (microdilution en milieu liquide). Même si une résistance inducible est détectée, les souches peuvent être rendues « sensibles » à la clindamycine (et à la spiramycine), mais le compte rendu doit faire l'objet d'un commentaire indiquant le risque de sélection de mutants résistants et d'échec clinique.</p> <p>3/B. La quinupristine-dalfopristine peut être utilisée pour déterminer la sensibilité à la pristinamycine. La sensibilité des souches détectées « résistantes » par diffusion doit être confirmée par la détermination de la CMI.</p>
Roxithromycine	1 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>			Note <sup>a</sup>	Note <sup>a</sup>		
Clarithromycine	1 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>			Note <sup>a</sup>	Note <sup>a</sup>		
Azithromycine	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>			Note <sup>a</sup>	Note <sup>a</sup>		
Clindamycine <sup>1</sup>	0,25	0,25		2	22	22		
Pristinamycine	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>			EP <sup>a</sup>	EP <sup>a</sup>		
Quinupristine-dalfopristine	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>		15	21 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>		
Léfamuline, <i>S. aureus</i>	0,25	0,25		5	23	23		

Autres	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres : commentaires généraux ou portant sur les concentrations critiques Lettres : commentaires portant sur les diamètres critiques
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Acide fusidique	1	1		10	24	24		<p>1. Interprétation valable pour le thiampéricol.</p> <p>Une résistance au chloramphénicol peut révéler une résistance croisée aux phénicolés et aux oxazolidinones due aux gènes transférables <i>orf-like</i>, <i>optrA</i> et <i>poxA</i> (voir note B).</p> <p>2. Les souches résistantes à la daptomycine sont exceptionnelles. Vérifier le résultat ainsi que l'identification, et envoyer la souche à un laboratoire référent pour expertise si les résultats sont confirmés.</p> <p>Ne pas rendre la daptomycine pour les souches d'infections respiratoires.</p> <p>3. La CMI de la daptomycine doit être déterminée en présence de Ca<sup>2+</sup> (50 mg/L - méthode de dilution en milieu liquide). Suivre les recommandations du fabricant pour les méthodes commercialisées.</p> <p>4. La méthode de référence pour déterminer la CMI de la fosfomycine est la méthode de dilution en milieu gélosé (les CMI doivent être déterminées en présence de glucose-6-phosphate, à raison de 25 mg/L dans le milieu de culture).</p>
Chloramphénicol <sup>1</sup>	8	8		30	18	18		
Daptomycine <sup>2</sup>	1 <sup>3</sup>	1 <sup>3</sup>			Note <sup>a</sup>	Note <sup>a</sup>		
Fosfomycine iv <sup>4</sup>	32	32			Note <sup>a</sup>	Note <sup>a</sup>		
Linézolide	4	4		10	21 <sup>B</sup>	21 <sup>B</sup>		
Mupirocine	1 <sup>5</sup>	1 <sup>5</sup>		200	30 <sup>C</sup>	30 <sup>C</sup>		
Nitrofurantoïne (cystites)	64	64		100	13	13		
Rifampicine	0,06	0,06		5	26	26		
Tédzolid	0,5 <sup>6</sup>	0,5 <sup>6</sup>		2	20 <sup>D</sup>	20 <sup>D</sup>	19	
Triméthoprime (cystites)	4	4		5	14	14		
Triméthoprime-sulfaméthoxazole <sup>7</sup>	2	4		1,25-23,75	17	14		

77

Céphalosporines	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres : commentaires généraux ou portant sur les concentrations critiques Lettres : commentaires portant sur les diamètres critiques
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
La sensibilité des staphylocoques aux céphalosporines est déduite de celle de celle de la céfoxitine, à l'exception du céfème, du céfotaxime, de la céftiaxone, de la ceftazidime, de l'association ceftazidime-avibactam, et de l'association céftolozane-lazobactam qui ne doivent pas être utilisés pour le traitement des infections staphylocoociques. La plupart des SARM sont sensibles à la céftaroline et au ceftobiprole, mais leur activité doit être testée séparément.								
Céfoxitine (dépistage), <i>S. aureus</i> et staphylocoques à coagulase négative autres que <i>S. epidermidis</i> ou <i>S. lugdunensis</i>	Note <sup>1,2</sup>	Note <sup>1,2</sup>		30	22 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>		<p>1. <i>S. aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i> caractérisés par des CMI de la céfoxitine &gt; 4 mg/L, et <i>S. saprophyticus</i> caractérisé par des CMI de la céfoxitine &gt; 8 mg/L sont résistants à la méticilline principalement du fait de la présence d'un gène <i>mec</i> supplémentaire.</p> <p>2. Pour les staphylocoques autres que <i>S. aureus</i>, <i>S. lugdunensis</i> et <i>S. saprophyticus</i>, la détermination de la CMI de la céfoxitine est moins performante que la méthode de diffusion.</p> <p>3/B. Pour <i>S. pseudintermedius</i>, <i>S. schleiferi</i> et <i>S. coagulans</i>, le disque de céfoxitine est moins prédictif de la résistance à la méticilline que pour les autres staphylocoques. Utiliser le disque d'oxaciline à 1 µg avec les diamètres critiques S ≥ 20 mm et R &lt; 20 mm.</p> <p>4/C. Les souches de <i>S. aureus</i> sensibles à la méticilline sont sensibles à la céftaroline et au ceftobiprole. Les souches catégorisées sensibles à forte posologie ou résistantes à la céftaroline ou résistantes au ceftobiprole sont rares. Vérifier le résultat ainsi que l'identification, et envoyer la souche à un laboratoire référent pour expertise si les résultats sont confirmés.</p> <p>A. En l'absence d'identification au rang d'espèce pour un staphylocoque à coagulase négative, utiliser les diamètres critiques suivants : S ≥ 27 mm ; R &lt; 27 mm.</p>
Céfoxitine (dépistage), <i>S. pseudintermedius</i> , <i>S. schleiferi</i> et <i>S. coagulans</i>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>			Note <sup>a</sup>	Note <sup>a</sup>		
Ceftaroline, <i>S. aureus</i>	1 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	1	5	20 <sup>C</sup>	17 <sup>C</sup>	19-20	
Ceftaroline (pneumonies), <i>S. aureus</i>	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>	1	5	20 <sup>C</sup>	20 <sup>C</sup>	19-20	
Ceftobiprole, <i>S. aureus</i>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	2	5	17 <sup>C</sup>	17 <sup>C</sup>	16-17	

Carbapénèmes	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres : commentaires généraux ou portant sur les concentrations critiques Lettres : commentaires portant sur les diamètres critiques
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
La sensibilité des staphylocoques aux carbapénèmes est déduite de celle à la céfoxitine.								

# Annexe

V1.0 Mai 2022

74

Staphylococcus spp.

74

Fluoroquinolones	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres : commentaires généraux ou portant sur les concentrations critiques Lettres : commentaires portant sur les diamètres critiques
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Norfloxacine (dépistage)	NA	NA		10	17 <sup>A</sup>	Note <sup>A</sup>		<p>1/C. La suppression des concentrations et des diamètres critiques de l'ofloxacine est liée à l'efficacité inférieure de l'ofloxacine pour le traitement des infections systémiques, comparativement à celle des autres fluoroquinolones.</p> <p>A. Le disque de norfloxacine peut être utilisé pour le dépistage des résistances aux fluoroquinolones. Si le test de dépistage est négatif (diamètre ≥ 17 mm), les souches peuvent être catégorisées sensibles à la moxifloxacine et à la délafloxacine, et « sensibles à forte posologie » à la ciprofloxacine et à la lévofloxacine. Si le test de dépistage est positif, les autres fluoroquinolones doivent être testées individuellement, et si une ou plusieurs fluoroquinolones sont rendues « sensibles » ou « sensibles à forte posologie » il faut préciser qu'il existe un risque élevé de sélection in vivo de mutants résistants et d'échec clinique.</p> <p>Une souche résistante à la lévofloxacine ou à la moxifloxacine doit être répondeuse résistante à toutes les fluoroquinolones (à l'exception de la délafloxacine dont il faut tester la sensibilité si nécessaire).</p> <p>B. La méthode par diffusion n'a pas encore été développée pour cette molécule : déterminer la CMI.</p>
Ciprofloxacine, S. aureus	0,001	1		5	50 <sup>A</sup>	21 <sup>A</sup>		
Ciprofloxacine, S. non-aureus	0,001	1		5	50 <sup>A</sup>	24 <sup>A</sup>		
Délafloxacine, S. aureus	0,016	0,016			Note <sup>B</sup>	Note <sup>B</sup>		
Délafloxacine (infections de la peau et des tissus mous), S. aureus	0,25	0,25			Note <sup>B</sup>	Note <sup>B</sup>		
Lévofloxacine, S. aureus	0,001	1		5	50 <sup>A</sup>	22 <sup>A</sup>		
Lévofloxacine, S. non-aureus	0,001	1		5	50 <sup>A</sup>	24 <sup>A</sup>		
Moxifloxacine, S. aureus	0,25	0,25		5	25 <sup>A</sup>	25 <sup>A</sup>		
Moxifloxacine, S. non-aureus	0,25	0,25		5	28 <sup>A</sup>	29 <sup>A</sup>		
Ofloxacine	Note <sup>A</sup>	Note <sup>A</sup>			Note <sup>A</sup>	Note <sup>A</sup>		

Aminosides	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres : commentaires généraux ou portant sur les concentrations critiques Lettres : commentaires portant sur les diamètres critiques
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Pour les infections systémiques, les valeurs critiques proposées correspondent aux ECOFFs qui distinguent les souches sauvages des souches ayant acquis un mécanisme de résistance.								
Gentamicine <sup>1</sup> , S. aureus	2	2		10	18	18		<p>1. Les souches résistantes à la gentamicine sont résistantes à tous les aminosides.</p> <p>2. Interprétation valable pour l'amikacine.</p> <p>3. Les souches résistantes à la tobramycine sont résistantes à la kanamycine et à l'amikacine.</p>
Gentamicine <sup>1</sup> , S. non-aureus	2	2		10	22	22		
Kanamycine <sup>3</sup> , S. aureus	8	8		30	18	18		
Kanamycine <sup>3</sup> , S. non-aureus	8	8		30	22	22		
Tobramycine <sup>3</sup> , S. aureus	2	2		10	18	18		
Tobramycine <sup>3</sup> , S. non-aureus	2	2		10	20	20		

**Annexe 6. Les données brutes de séquençage produites dans cette étude et les méta-données** associées ont été déposées dans la base de données SRA (*Short Read Archive*) du NCBI sous le numéro d'accès BioProject PRJNA930663.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA930663>

**NIH** National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

BioProject

Accession: PRJNA930663 ID: 930663

**Staphylococcus aureus**

**Whole genome sequencing and molecular epidemiology of clinical isolates of Staphylococcus aureus from Algeria**

In this study we used WGS to genotype *S. aureus* clinical isolates from two Algerian hospitals

Accession	PRJNA930663
Data Type	Genome sequencing and assembly
Scope	Multisolate
Organism	<b>Staphylococcus aureus</b> [Taxonomy ID: 1280] Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus; Staphylococcus aureus
Submission	Registration date: 2-Feb-2023 <b>University Hassiba Benbouali of Chief</b>

**Project Data:**

Resource Name	Number of Links
SEQUENCE DATA	
SRA Experiments	17
OTHER DATASETS	
BioSample	51

**SRA Data Details**

Parameter	Value
Data volume, Gbases	6
Data volume, Mbytes	3064

**Related information**

- BioSample
- SRA
- Taxonomy

**Recent activity**

- Staphylococcus aureus BioProject
- PRJNA930663 (1) BioProject
- Clinical isolate of Staphylococcus aureus from Algeria biosample
- BioSample Links for BioProject (Select 930329) (1) BioSample
- Rachida namoune (1) BioSample

[See more...](#)



## Article

# Whole Genome Sequencing and Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Algeria

Rachida Namoune <sup>1</sup>, Abla Djebbar <sup>1</sup>, Rebecca Mekler <sup>2</sup>, Martin McHugh <sup>2</sup>, Mohammed El Amine Bekara <sup>1</sup>, Arun Decano <sup>2</sup>, Matthew T. G. Holden <sup>2</sup> and Mohammed Sebahia <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Hassiba Benbouali of Chlef, Chlef 02000, Algeria; r.namoune@univ-chlef.dz (R.N.); ab.djebbar@univ-chlef.dz (A.D.)

<sup>2</sup> School of Medicine, University of St Andrews, St Andrews KY16 9TF, UK; mtgh@st-andrews.ac.uk (M.T.G.H.)

\* Correspondence: m.sebahia@univ-chlef.dz

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* is an important pathogen responsible for various healthcare- and community-acquired infections. In this study, whole genome sequencing (WGS) was used to genotype *S. aureus* clinical isolates from two hospitals in Algeria and to characterize their genetic determinants of antimicrobial resistance. Seventeen *S. aureus* isolates were included in this study. WGS, single-nucleotide polymorphism (SNP)-based phylogenetic analysis, in silico multilocus sequence typing (MLST), *spa* and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing and in silico antimicrobial resistance profiling were performed. Phenotypic antibiotic susceptibility testing was performed using the Vitek 2 system and the disk diffusion method. The isolates were separated into sequence types (STs), with ST80 being predominant; five clonal complexes (CCs); four *spa* types (t044, t127, t368, t386); and two SCC*mec* types (IVc and IVa). Whole genome analysis revealed the presence of the resistance genes *mecA*, *blaZ*, *ermC*, *fusB*, *fusC*, *tetK*, *aph(3')*-IIIa and *aad(6)* and mutations conferring resistance in the genes *parC* and *fusA*. The rate of multidrug resistance (MDR) was 64%. This work provides a high-resolution characterization of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates and emphasizes the importance of continuous surveillance to monitor the spread of *S. aureus* in healthcare settings in the country.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; MRSA; WGS; MLST; antibiotic resistance; Algeria



**Citation:** Namoune, R.; Djebbar, A.; Mekler, R.; McHugh, M.; Bekara, M.E.A.; Decano, A.; Holden, M.T.G.; Sebahia, M. Whole Genome Sequencing and Molecular Epidemiology of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Algeria. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2047. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082047>

Academic Editor: Elisabeth Grohmann

Received: 18 July 2023  
Revised: 2 August 2023  
Accepted: 6 August 2023  
Published: 9 August 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

*S. aureus* is the leading cause of nosocomial infections worldwide [1]. Although it is a normal resident of the skin and mucous membranes of humans and animals, *S. aureus* can become an opportunistic pathogen by deploying a plethora of virulence factors to cause a variety of infections, ranging from mild skin and soft tissue infections to severe and life-threatening diseases, such as toxic shock syndrome and sepsis [2]. This strong potential of *S. aureus* to cause diseases is aggravated by its propensity to acquire resistance to multiple antibiotics, limiting the therapeutic options against this pathogen [3].

MRSA is a group of *S. aureus* strains that have developed resistance to methicillin and to the majority of the  $\beta$ -lactam antibiotics following the acquisition of a *mecA* gene. This gene which resides on a complex mobile genetic element known as “Staphylococcal Cassette Chromosome” *mec* element (SCC*mec*) encodes a 78 kDa penicillin-binding protein (PBP2a) that has a low affinity for  $\beta$ -lactams [3]. MRSA is recognized as one of the leading pathogens responsible for nosocomial and community-associated infections worldwide [4]. Effective MRSA control and prevention strategies in the healthcare system as well as in the community depend on accurate characterization of circulating MRSA clones and identification of their reservoirs and sources of transmission.

Although the prevalence and molecular epidemiology of MRSA in Europe and North America have been extensively documented [5], comparatively, data available from North

Africa are limited or scarce. However, from the available data, it appears that the prevalence of MRSA in this region is increasing [6,7].

In Algeria, analyses of *S. aureus* from diverse geographic locations and clinical origins were mainly based on genotyping methods. These studies showed that the dominant clone was the European ST80 IV PVL+ community-associated (CA)-MRSA [8–11]; however, WGS-based studies were applied only in a single study on three healthcare-associated (HA)-MRSA isolates [11]. Thus, here we report the characterization of MRSA and MSSA clinical isolates from patients admitted to two tertiary healthcare hospitals in the province of Chlef in Algeria using WGS.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Setting and Sample Collection

We investigated 17 clinical *S. aureus* isolates from pus, cerebrospinal fluid (CSF) and blood samples of patients admitted to two hospitals in the Chlef province, Algeria, during the period between November 2018 and July 2019.

All patients gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of the Algerian Thematic Research Agency for Health and Life Sciences (ATRSSV387).

### 2.2. *S. aureus* Culture and Identification

Bacteria were enriched in brain heart infusion broth and incubated at 37 °C for 18 h–24 h before being cultured on Mannitol salt agar (Merck, Darmstadt, Germany) for 24 h at 37 °C. Isolates were initially identified by standard microbiological methods using Gram staining, catalase and coagulase tests. Putative staphylococcal isolates were confirmed as *S. aureus* by PCR targeting the *nuc* gene as described by Zhang et al. [12]. The PCR reaction was carried out in a total volume of 25 µL, containing 5 µL of chromosomal DNA, 3 µL of each primer (10 µM), 0.5 µL of mixed dNTPs, 2.5 µL of buffer (10×), 0.25 µL of Taq polymerase and 10.75 µL of ultra-pure H<sub>2</sub>O. The PCR amplification program was as follows: an initial denaturation at 94 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 58 °C for 30 s and 72 °C for 1 min and a final extension step at 72 °C for 7 min. The PCR products were separated on 2% agarose stained with ethidium bromide and visualized using a UV transilluminator.

### 2.3. Genomic DNA Extraction and Whole Genome Sequencing

The *S. aureus* isolates were grown overnight at 37 °C on tryptic soy broth medium under agitation. Whole DNA extraction was performed using MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit (Lucigen, Middleton, WI, USA). The quality of the DNA was assessed with a Qubit® fluorometer 3.0 (Invitrogen, Life Technologies, Singapore). Genomic DNA libraries were prepared using the Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and were sequenced on the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA). De novo assembly was performed using the normal mode of Unicycler pipeline v.0.4.7 [13]. The quality of the assembly was assessed by using Quast 4.6, and the assembly was then annotated with the Prokka software version 1.10 [14], using the default parameters.

### 2.4. MLST Analysis

In silico MLST of the isolates was performed with the Short Read Sequence Typing for bacterial pathogens (SRST2) program [15], which employs bowtie2 to call loci directly from Illumina reads based on the *S. aureus* MLST database PubMLST (<https://pubmlst.org/saureus/>, accessed on 15 November 2022).

### 2.5. SNP-Based Phylogenetic Analysis

The assembled complete genomes were aligned to a reference genome of the *S. aureus* strain MSSA476 (an MSSA isolate belonging to ST1, with accession number BX571858

retrieved from EMBL/GenBank databases) using snp-sites (<https://github.com/sanger-pathogens/snp-sites>, accessed on 15 November 2022) [16]. Pangenome analysis was performed using the Roary pipeline (version 3.11.2) [17], and SNPs were identified using Gubbins software v2.3.2 [18]. A maximal likelihood tree was constructed using RAxML version 8.0.26 [19].

### 2.6. SCCmec and Spa Typing

The SCCmec chromosomal cassettes were identified in the genomes using SCCmecFinder v.1.2 [20], with minimum thresholds set at 60% for sequence coverage and at 90% for sequence identity. Spa typing was performed using spaTyper v.1.0 [21], using the default parameters.

### 2.7. Analysis of Virulence-Associated Genes

The Panton–Valentine leukocidin (PVL) toxin (*lukF-PV* and *lukS-PV*) and the toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) genes were identified by querying the genome sequences against the database Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC version 3.6.12: <https://www.patricbrc.org/>, accessed on 10 December 2022) with the VFDB and Victors tools [22].

### 2.8. Genotypic Antimicrobial Resistance Analysis

The presence of antimicrobial resistance genes (ARGs) was assessed by screening the whole genomes against the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [23].

### 2.9. In Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing

Microdilution susceptibility testing of isolates was performed using either the Vitek<sup>®</sup> 2 system (bioMérieux<sup>®</sup>, Marcy L’Etoile, France) or the disk diffusion method. The Vitek<sup>®</sup> 2 was used with the following antibiotics: erythromycin (ERY), clindamycin (CLI), lev- ofloxacin (LVX), linezolid (LZD), moxifloxacin (MXF), nitrofurantoin (NIT), quinupristin/ dalfopristin (QD), tigecycline (TGC), teicoplanin (TEC), tetracycline (TET), trimethoprim + sulfamethoxazol (SXT) and vancomycin (VAN).

The disk diffusion method on Mueller–Hinton agar was performed with the following antibiotic disks: amikacin (AMK; 30 µg), cefoxitin (FOX; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), chloramphenicol (CHL; 30 µg), fusidic acid (FUS; 10 µg), gentamycin (GEN; 10 µg), kanamycin (KAN; 30 µg), ofloxacin (OFX; 5 µg) and rifamycin (RIF; 5 µg). Results were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [24] and the Committee of the Antibiogram of the French Society of Microbiology [25]. MDR was defined as resistance to three or more classes of antibiotics.

## 3. Results

### 3.1. Identification of *S. aureus*

This study included 17 clinical isolates of *S. aureus*, isolated from pus ( $n = 15$ , 88%), CSF and blood ( $n = 1$ , 6%, each). The demographic and clinical data of patients as well as the characteristics of the *S. aureus* isolates used in this study are presented in Table 1. The majority of the isolates (58.8%,  $n = 10$ ) were from patients admitted for more than 48 h and were therefore considered as HA-*S. aureus*, according to the CDC definition [26]. Twelve (70.6%) of the *S. aureus* isolates were from adults and five were from children (29.4%); of these isolates, eight (47.1%) were from males and nine (52.9%) were from females. Out of the 17 *S. aureus* isolates, 7 (41.2%) were identified as MRSA by being resistant to cefoxitin and harboring the *mecA* gene, and 10 (85.8%) were MSSA (Table 1).

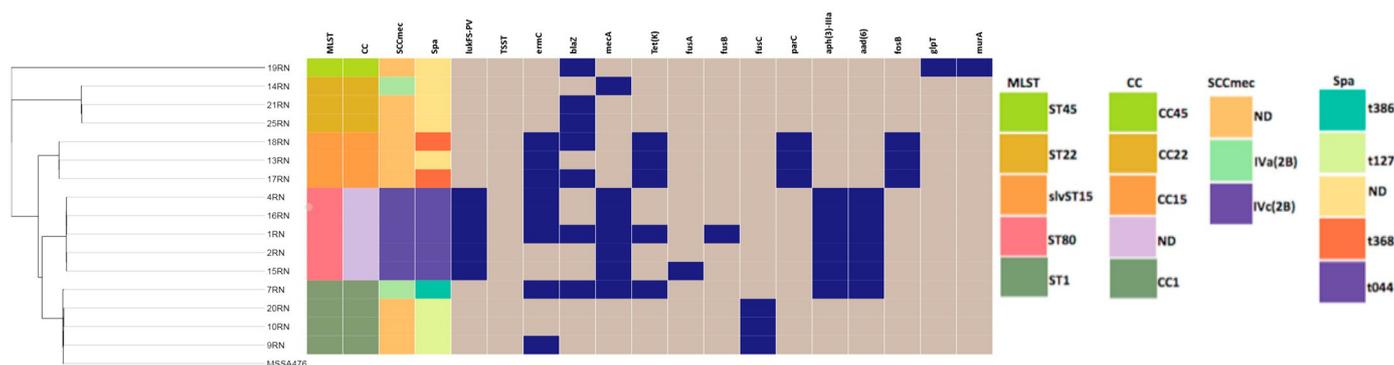
**Table 1.** Patient and *S. aureus* isolate characteristics.

Isolate	MSSA/MRSA	HA/CA	Age	Sex	Admission Date	Collection Date	Hospital	Ward	Specimen
1RN	MRSA	HA	AD	F	20.12.2018	24.12.2018	A	Trauma	Pus
2RN	MRSA	HA	CH	F	15.01.2019	20.01.2019	A	Pediatric	Pus
4RN	MRSA	CA	CH	M	30.12.2018	31.12.2018	A	Pediatric	Pus
7RN	MRSA	HA	AD	F	17.01.2019	20.01.2019	A	Emergency	Pus
9RN	MSSA	CA	CH	M	26.02.2019	27.02.2019	A	Pediatric	Blood
10RN	MSSA	CA	AD	M	21.04.2019	22.04.2019	A	IM	Pus
13RN	MSSA	HA	AD	F	18.04.2019	21.04.2019	A	IM	CSF
14RN	MRSA	CA	CH	M	22.01.2019	23.01.2019	A	Pediatric	Pus
15RN	MRSA	CA	AD	F	28.11.2018	29.11.2018	A	Emergency	Pus
16RN	MRSA	CA	AD	M	21.01.2019	22.01.2019	A	Trauma	Pus
17RN	MSSA	HA	CH	F	11.02.2019	24.02.2019	A	Pediatric	Pus
18RN	MSSA	HA	AD	F	14.02.2019	25.02.2019	A	Emergency	Pus
19RN	MSSA	CA	AD	M	13.03.2019	14.03.2019	B	ENT	Pus
20RN	MSSA	HA	AD	M	09.05.2019	13.05.2019	A	IM	Pus
21RN	MSSA	HA	AD	F	09.05.2019	13.05.2019	A	IM	Pus
25RN	MSSA	HA	AD	F	21.03.2019	24.03.2019	B	IM	Pus
29RN	MSSA	HA	AD	M	23.04.2019	29.04.2019	A	IM	Pus

MRSA: Methicillin-Resistant *S. aureus*; MSSA: Methicillin-Susceptible *S. aureus*; CA: Community-Associated; HA: Healthcare-Associated; AD: Adult; CH: Child; F: Female; M: Male; IM: Internal Medicine; ENT: Ear, Nose and Throat; CSF: Cerebrospinal Fluid.

### 3.2. MLST Analysis

In silico MLST analysis of the *S. aureus* isolates revealed four different STs, ST1, ST22, ST45 and ST80, and a novel single-locus variant of ST15 (slvST15). ST80 was the most prevalent ( $n = 5$ , 29.4%), followed by ST1 and ST22 ( $n = 4$ , 23.5%, each), slvST15 ( $n = 3$ , 17.6%) and ST45 ( $n = 1$ , 5.8%) (Figure 1). The MRSA isolates were distributed across three STs, the majority (71.4%, 5/7) in ST80 and one each (14.3%) in ST1 and ST22. The isolates belonged to five known CCs, CC1 (ST1), CC22 (ST22), CC45 (ST45), CC15 (slvST15) and CC80 (ST80) (Figure 1).



**Figure 1.** Core genome maximum likelihood phylogenetic tree of the 17 *S. aureus* isolates and the reference genome of the *S. aureus* strain MSSA476, visualized using Phandango [27]. The phylogeny tree on the left is linked to the metadata in the middle: STs, CCs, SCCmec types, Spa types (represented by various colors as indicated in the legend on the right); presence (dark blue) and absence (grey) of PVL, TSST and antibiotic resistance gene/mutation.

### 3.3. SCCmec, Spa and PVL Typing

A total of four *spa* types, t044 ( $n = 5$ , 29.4%), t127 ( $n = 3$ , 17.6%), t368 ( $n = 2$ , 11.7%) and t386 ( $n = 1$ , 5.9%), were detected among 11 *S. aureus* isolates; the *spa* type of the six remaining *S. aureus* isolates could not be determined (Figure 1). Among the MRSA isolates, two types of SCCmec, type IVc ( $n = 5$ , 71.4%) and IVa ( $n = 2$ , 28.6%), have been identified (Figure 1). The genes encoding the two components of the PVL toxin (*lukF-PV* and *lukS-PV*)

were detected in five (1RN, 2RN, 4RN, 15RN and 16RN) out of the seven MRSA isolates, all of which belong to ST80 (71%). Notably, the gene encoding the TSST-1 was detected in one isolate (29RN) belonging to ST22.

### 3.4. Phylogenetic Analysis

Core genome SNP-based phylogeny revealed that the SNP differences among the 17 *S. aureus* isolates ranged from 0 to 60210. Phylogenetic reconstruction grouped the isolates into five separate clusters which matched their respective STs (Figure 1).

### 3.5. Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing

The 17 isolates were tested for susceptibility against a panel of 21 antibiotics belonging to 13 classes. All *S. aureus* isolates were susceptible to VAN, QD, SXT, LZD, TEC, TGC and NIT.

The resistance rates observed in this study included 53% to ERY, CLI, AMK and KAN ( $n = 9$ , each); 47% to FUS ( $n = 8$ ); 41.2% to FOX ( $n = 7$ ); 35% to OFX and TET ( $n = 6$  each); 23.5% to CIP ( $n = 4$ ); 17.6% to GEN ( $n = 3$ ); 11.7% to RIF ( $n = 2$ ); and 5.9% to CHL ( $n = 1$ ) (Table 2).

**Table 2.** Phenotypic antimicrobial resistance profiles of the *S. aureus* isolates.

Isolate	MIC (µg/mL)											Inhibition Zone Diameter										
	LVX	MXF	ERY	CLIN	QD	LZD	TEC	VAN	TET	TGC	NIT	SXT	CHL	GEN	AMK	KAN	FOX	CIP	OFX	FUS	RIF	MDR
1RN	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	I	R	R	S	Y
2RN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	Y
4RN	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	I	R	S	R	Y
7RN	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	Y
9RN	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	Y
10RN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	N
13RN	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	I	Y
14RN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	R	S	S	S	S	N
15RN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	N
16RN	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	I	R	I	R	R	S	Y
17RN	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	Y
18RN	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	I	S	R	S	Y
19RN	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	R	S	R	Y
20RN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	Y
21RN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
25RN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	N
29RN	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	N
Total																						
<i>n</i>	0	0	9	9	0	0	0	0	6	0	0	0	1	3	9	9	7	4	6	8	2	11
(%)	(0%)	(0%)	(53%)	(53%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(35%)	(0%)	(0%)	(0%)	(5.9%)	(17.6%)	(53%)	(53%)	(41.2%)	(23.5%)	(35%)	(47%)	(11.7%)	(64.7%)

MIC: Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL); *n*: Number; R: Resistant; I: Intermediate; S: Susceptible; MDR: Multidrug Resistance; Y: Yes; N: No; AMK: Amikacin; CHL: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin; CLIN: Clindamycin; ERY: Erythromycin; FOX: Ceftiofur; FUS: Fusidic Acid; GEN: Gentamycin; KAN: Kanamycin; LVX: Levofloxacin; LZD: Linezolid; MXF: Moxifloxacin; NIT: Nitrofurantoin; OFX: Ofloxacin; QD: Quinupristin/Dalfopristin; RIF: Rifampin; SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazole; TEC: Teicoplanin; TET: Tetracycline; TGC: Tigecyclin; VAN: Vancomycin.

Three isolates exhibited co-resistance to two antibiotic classes (β-lactams and aminoglycosides or β-lactams and fusidic acid), whereas three isolates were resistant to β-lactam antibiotics only.

More than half of the *S. aureus* isolates (64.7%,  $n = 11$ ) displayed multidrug resistance (MDR), displaying resistance to three or more antibiotic classes. The rate of MDR in the MRSA isolates (71.42%, 5/7) was higher than that in the MSSA isolates (60%, 6/10) (Table 2).

### 3.6. In Silico Analysis of Antimicrobial Resistance Genes

Analysis of the genomes of the 17 *S. aureus* isolates revealed the presence and distribution of 10 acquired antibiotic resistance genes conferring resistance to β-lactams (*blaZ* and *mecA*), erythromycin (*ermC*), tetracycline (*tet(K)*), fosfomycin (*fosB*), fusidic acid (*fusB* and *fusC*), aminoglycosides (*aad(6)* and *aph(3')-IIIa*) and streptothrin (*sat-4*) (Figure 1) and mutations in four core genes conferring resistance to fusidic acid (*fusA*), fosfomycin (*glpT* and *murA*) and fluoroquinolones (*parC*).

Seven *S. aureus* isolates (41%) carried the methicillin resistance gene *mecA* and were therefore considered as MRSA.

The *ermC* gene encoding a 23S rRNA adenine-N-6 methyltransferase that confers resistance to the macrolide–lincosamide–streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) class of antibiotics was the most frequent antibiotic resistance genetic determinant identified in our collection of isolates, being present in eight isolates (47%). The *blaZ* gene encoding a type C β-lactamase was present in seven (41%) *S. aureus* isolates. The *fusC* or *fusB* genes encoding proteins that block the binding of fusidic acid to EF-G responsible for fusidic acid resistance were identified in four isolates (23.5%), whereas fusidic acid resistance conferred by a mutation H457Q in *fusA* was detected in one isolate (5.8%), 15RN (ST80) (Figure 1).

The fosfomycine resistance gene *fosB*, encoding a fosfomycin-modifying enzyme, was detected in three isolates (17.6%), and a fourth isolate, 19RN (ST45), had mutations A100V in *glpT* and E291D and T396N in *murA*.

Three isolates (17.6%) harbored an S80F mutation in *parC*, conferring resistance to fluoroquinolones (Figure 1).

Of note, the majority of the above resistance genetic determinants (*mecA*, *blaZ*, *ermC*, *fusB*, *tetK*, *aad(6)*, *aph(3′)-IIIa*) were carried by one HA-MRSA isolate (1RN), which had MDR and carried the PVL toxin genes *lukF/lukS-PV*.

### 3.7. Correlation between Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing and Genotype

The observed correlation between phenotypic resistance and genotype varied widely. It was high for FOX/*mecA* (100%), ERY/CLI/*ermC* (94%), TET/*tet(K)* (94%), MOX/*parC* (82%) and LVX/*parC* (76%); moderate for AMK/GEN/KAN/*aph(3′)-IIIa/aad(6)* (64–70%); and poor for FUS/*fusB/fusC* and OFX/*parC* (58%), CIP/*parC* (52%), QD/*ermC* and FUS/*fusA* (47%).

## 4. Discussion

In this study, WGS was used to determine the phylogeny and molecular characteristics of 10 MSSA and 7 MRSA isolated from clinical samples. The percentage of MRSA among *S. aureus* isolates in our study (41.1%, 7/17) was in line with that reported in North African countries, 31% in Libya, 45% in Algeria and Tunisia and 52% in Egypt [7]. The prevalence of MRSA in Europe varied from 2% in the Netherlands to 58% in Italy [28,29], and that in Asia varied from 22.6% (India) to 86.5% (Sri Lanka) [28], with an average of 25% in both continents [28,30].

The results presented in this study revealed diversity among our collection of *S. aureus* isolates with the isolates falling to one of five clonal complexes. The MRSA clone ST80-*spa*-t044-SCC*mec*-IVc(2b)-PVL+ which was predominant in this study was also reported as dominant in many parts of the world as a cause of infections in both hospital and community settings [31]. This clone was also previously identified as dominant in different ecological niches in Algeria [32,33].

The second most abundant clone, ST1-t127, was identified in the 1990s as the first CA-MRSA clone [34] and then emerged in diverse healthcare settings [35–37], and it was also recovered from companion animals, livestock and livestock products in several countries [38–40]. Interestingly, the ST1-t127 clone, which was mainly found as MRSA in many studies [41], was both MRSA and MSSA in this study.

The other second most predominant clone in our study, ST22, was represented by three MSSA and one MRSA (SCC*mec* type IVa). MRSA belonging to ST22 (EMRSA-15) were reported as the most frequently responsible for nosocomial infections in Europe, are becoming widespread in Asia, Australia, Europe and North America [42–45], and have also been sporadically isolated in Algeria, Tunisia and South Africa [46]. However, the ST22 MRSA identified in this study does not belong to the EMRSA-15 clone as it contains a type IVa SCC*mec* element rather than a type IVh and is also ciprofloxacin-sensitive, whereas EMRSA-15 is ciprofloxacin-resistant [42].

Our least frequent clone, ST45, which was commonly reported in North America, Australia and Europe as both MSSA and MRSA in both healthcare and community settings, was also less frequently isolated in South America, Asia and Africa [47].

The SNP-based analysis revealed that the ST1 isolates (10RN and 20RN) were indistinguishable (0 SNP differences). Interestingly, these isolates were recovered from two patients who were admitted 19 days apart to the same hospital and ward (internal medicine), suggesting ward contamination and intra-ward transmission between patients.

Similarly, all the isolates of the ST80 lineage were isolated from the same hospital, two of which (1RN and 16RN) differed by six SNPs only and were from two different patients admitted to the same ward (trauma), but 30 days apart. Isolates 2RN and 15RN, also having a six-SNP difference, were isolated from patients admitted 45 days apart to separate wards in the same hospital. Isolates 2RN and 4RN, which differed by five SNPs, were isolated from two children admitted 15 days apart to the same ward. The identification of these genomic clusters potentially suggests a persistent contamination of the hospital by the above three clones.

On the other hand, the ST22 isolates (21RN and 25RN) differed by two SNPs; however, they were recovered 51 days apart from two different patients admitted to different hospitals. Considering that (i) the two hospitals are in close proximity (within the same catchment area), (ii) a patient's choice of being re-admitted to a particular hospital is not restricted, (iii) patients' health records are decentralized and (iv) inter-hospital patient transfers (for diagnostic procedure or for extra medical care) are frequent, it is therefore possible that any of the above types of patients' movements and/or referrals between hospitals may have contributed to the dissemination of the *S. aureus* clones 21RN and 25RN between the two hospitals. Indeed, patient movements between healthcare facilities have been recognized as an important route of pathogen transmission [48].

The three CC15 isolates 13RN, 17RN and 18RN were also closely related, with 7-SNP differences between 13RN and 17RN and 17RN and 18RN and an 11-SNP difference between 13RN and 18RN. These three isolates were recovered from different patients admitted to different wards in the same hospital, suggesting an inter-ward transmission in the same hospital.

Irrespective of the exact mode of intra- or inter-hospital transmissions highlighted above, all the possible scenarios should be considered as breaches in infection control and prevention.

The antibiotic sensitivity testing revealed that all the *S. aureus* isolates exhibited susceptibility to VAN, QD (a valuable alternative to vancomycin for the treatment of MRSA infections), SXT, LZD, TEC, TGC and NIT. A similar antibiotic susceptibility profile was also reported in a Kenyan study [49].

The prevalence of vancomycin resistance varied globally from 1% in Europe, 3% in South America and 4% in North America to 5% in Asia and 16% in Africa. Similarly, the susceptibility of all our isolates to SXT was interesting, as a high resistance level to this antibiotic was reported among MRSA isolates in Latin America (up to 100%), Taiwan (89%), China (21%) and Africa (from 55% to 72%) [50].

Overall, the rate of MDR in the present study was relatively high (64%), which is consistent with previous reports from Algeria [11,51,52].

The global prevalence of PVL among MRSA strains varied remarkably between geographical regions and populations [53]. The prevalence of PVL among our MRSA isolates (29.4%) falls within the range of other studies [54]. While PVL is generally considered as a potential genetic marker for the differentiation of CA-MRSA and HA-MRSA [55,56], it was, however, equally present in CA-MRSA and HA-MRSA isolates in the present investigation, which was also consistent with a study from Uganda [57].

## 5. Conclusions

This study suffers from some limitations, mainly the small sample size; despite this, it provides preliminary insights into the genetic diversity and antibiotic resistance of *S. aureus* strains circulating in hospital settings in Algeria. To the best of our knowledge, this is the first WGS-based study that included a relatively large collection of clinical *S. aureus* isolates from Algeria, a country where surveillance of *S. aureus* has been limited thus far.

Our findings stress the need for effective MRSA control and prevention strategies in the Algerian healthcare system. In addition, this work highlights the importance of WGS as a useful approach in clinical settings, as it provides high-resolution analyses of pathogens, allowing the determination of the relatedness between epidemic strains and the tracing of their transmission events.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.T.G.H. and M.S.; formal analysis, R.N., A.D. (Abla Djebbar), M.E.A.B., A.D. (Arun Decano), M.T.G.H. and M.S.; funding acquisition, M.T.G.H. and M.S.; investigation, R.N., A.D. (Abla Djebbar), R.M. and M.M.; methodology, M.T.G.H. and M.S.; project administration, M.S.; supervision, M.S.; writing—original draft, R.N.; writing—review and editing, A.D. (Abla Djebbar), M.T.G.H. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (DGRSDT/MESRS) and by grants from the Wellcome Trust (098731/z/11/z to St Andrews University Bioinformatics Unit), the Chief Scientists Office (SIRN10 to M.T.G.H.), and the National Institute for Health Research, Medical Research Council and the Department of Health and Social Care (MR/S004785/1 to M.T.G.H.); this award is also part of the EDCTP2 program supported by the European Union.

**Data Availability Statement:** Raw reads from Illumina sequencing generated in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject accession number PRJNA930663.

**Acknowledgments:** We thank the core sequencing and informatics team at the University of St Andrews for sequencing the isolates described in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Solberg, C.O. Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: Causes and prevention. *Scand. J. Infect. Dis.* **2000**, *32*, 587–595. [CrossRef] [PubMed]
2. Cheung, G.Y.; Bae, J.S.; Otto, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **2021**, *12*, 547–569. [CrossRef] [PubMed]
3. Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00020-18. [CrossRef] [PubMed]
4. Chen, C.J.; Huang, Y.C. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 605–623. [CrossRef]
5. Köck, R.; Becker, K.; Cookson, B.; van Gemert-Pijnen, J.E.; Harbarth, S.; Kluytmans, J.A.J.W.; Mielke, M.E.; Peters, G.; Skov, R.L.; Struelens, M.J.; et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance* **2010**, *15*, 19688. [CrossRef]
6. Borg, M.A.; de Kraker, M.; Scicluna, E.; van de Sande-Bruinsma, N.; Tiemersma, E.; Monen, J.; Grundmann, H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 1310–1315. [CrossRef]
7. Falagas, M.E.; Karageorgopoulos, D.E.; Leptidis, J.; Korbila, I.P. MRSA in Africa: Filling the global map of antimicrobial resistance. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68024. [CrossRef]
8. Djoudi, F.; Bonura, C.; Benallaoua, S.; Touati, A.; Touati, D.; Aleo, A.; Calà, C.; Fasciana, T.; Mammina, C. Panton-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a staphylococcal cassette chromosome mec type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. *New Microbiol.* **2013**, *36*, 49–55.
9. Antri, K.; Rouzic, N.; Dauwalder, O.; Boubekri, I.; Bes, M.; Lina, G.; Vandenesch, F.; Tazir, M.; Ramdani-Bouguessa, N.; Etienne, J. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 526–532. [CrossRef]
10. Ramdani-Bouguessa, N.; Bes, M.; Meugnier, H.; Forey, F.; Reverdy, M.E.; Lina, G.; Vandenesch, F.; Tazir, M.; Etienne, J. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1083–1085. [CrossRef]
11. Aouati, H.; Hadjadj, L.; Aouati, F.; Agabou, A.; Ben Khedher, M.; Bousseboua, H.; Bentchouala, C.; Rolain, J.M.; Diene, S.M. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239/241 SCCmec-III mercury in Eastern Algeria. *Pathogens* **2021**, *10*, 1503. [CrossRef]

12. Zhang, K.; Sparling, J.; Chow, B.L.; Elsayed, S.; Hussain, Z.; Church, D.L.; Gregson, D.; Louie, T.J.; Conly, J.M. New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4947–4955. [CrossRef] [PubMed]
13. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005595. [CrossRef] [PubMed]
14. Seemann, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [CrossRef] [PubMed]
15. Inouye, M.; Dashnow, H.; Raven, L.A.; Schultz, M.B.; Pope, B.J.; Tomita, T.; Zobel, J.; Holt, K.E. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med.* **2014**, *6*, 90. [CrossRef]
16. Holden, M.T.; Titball, R.W.; Peacock, S.J.; Cerdeño-Tárraga, A.M.; Atkins, T.; Crossman, L.C.; Pitt, T.; Churcher, C.M.; Mungall, K.L.; Bentley, S.D.; et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14240–14245. [CrossRef]
17. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693. [CrossRef]
18. Croucher, N.J.; Page, A.J.; Connor, T.R.; Delaney, A.J.; Keane, J.A.; Bentley, S.D.; Parkhill, J.; Harris, S.R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e15. [CrossRef]
19. Stamatakis, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1312–1313. [CrossRef]
20. Kaya, H.; Hasman, H.; Larsen, J.; Stegger, M.; Johannesen, T.B.; Allesøe, R.L.; Lemvig, C.K.; Aarestrup, F.M.; Lund, O.; Larsen, A.R. SCC mec Finder, a web-based tool for typing of staphylococcal cassette chromosome mec in *Staphylococcus aureus* using whole-genome sequence data. *MSphere* **2018**, *3*, e00612-17. [CrossRef]
21. Bartels, M.D.; Petersen, A.; Worning, P.; Nielsen, J.B.; Larner-Svensson, H.; Johansen, H.K.; Andersen, L.P.; Jarløv, J.O.; Boye, K.; Larsen, A.R.; et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 4305–4308. [CrossRef] [PubMed]
22. Wattam, A.R.; Abraham, D.; Dalay, O.; Disz, T.L.; Driscoll, T.; Gabbard, J.L.; Gillespie, J.J.; Gough, R.; Hix, D.; Kenyon, R.; et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D581–D591. [CrossRef] [PubMed]
23. Alcock, B.P.; Raphenya, A.R.; Lau, T.T.; Tsang, K.K.; Bouchard, M.; Edalatmand, A.; Huynh, W.; Nguyen, A.V.; Cheng, A.A.; Liu, S.; et al. CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D517–D525. [CrossRef]
24. *CLSI M100*; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32th ed.; CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institutes: Malvern, PA, USA, 2022.
25. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology Guidelines. Available online: [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2022/06/CASFM2022\\_V1.0.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2022/06/CASFM2022_V1.0.pdf) (accessed on 12 July 2022).
26. Garner, J.S.; Jarvis, W.R.; Emori, T.G.; Horan, T.C.; Hughes, J.M. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am. J. Infect. Control* **1988**, *16*, 128–140. [CrossRef] [PubMed]
27. Hadfield, J.; Croucher, N.J.; Goater, R.J.; Abudahab, K.; Aanensen, D.M.; Harris, S.R. Phandango: An interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 292–293. [CrossRef] [PubMed]
28. Fluit, A.C.; Wielders, C.L.C.; Verhoef, J.; Schmitz, F.J. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 3727–3732. [CrossRef]
29. Dulon, M.; Haamann, F.; Peters, C.; Schablon, A.; Nienhaus, A. MRSA prevalence in European healthcare settings: A review. *BMC Infect. Dis.* **2011**, *11*, 138. [CrossRef] [PubMed]
30. Song, J.H.; Hsueh, P.R.; Chung, D.R.; Ko, K.S.; Kang, C.I.; Peck, K.R.; Yeom, J.; Kim, S.W.; Chang, H.; Kim, Y.; et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: An ANSORP study. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 1061–1069. [CrossRef]
31. Goering, R.V.; Larsen, A.R.; Skov, R.; Tenover, F.C.; Anderson, K.L.; Dunman, P.M. Comparative genomic analysis of European and Middle Eastern community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CC80: ST80-IV) isolates by high-density microarray. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 748–755. [CrossRef]
32. Achek, R.; El-Adawy, H.; Hotzel, H.; Hendam, A.; Tomaso, H.; Ehrlich, R.; Neubauer, H.K.; Nabi, I.; Hamdi, T.M.; Monecke, S. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Human and Food Samples in Northern Algeria. *Pathogens* **2021**, *10*, 1276. [CrossRef]
33. Mairi, A.; Touati, A.; Pantel, A.; Zenati, K.; Martinez, A.Y.; Dunyach-Remy, C.; Sotto, A.; Lavigne, J. Distribution of toxinogenic methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from different ecological niches in Algeria. *Toxins* **2019**, *11*, 500. [CrossRef]
34. Herold, B.C.; Immergluck, L.C.; Maranan, M.C.; Lauderdale, D.S.; Gaskin, R.E.; Boyle-Vavra, S.; Leitch, C.; Daum, R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* **1998**, *279*, 593–598. [CrossRef]

35. Otter, J.A.; French, G.L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J. Hosp. Infect.* **2011**, *79*, 189–193. [CrossRef]
36. Caboclo RM, F.; Cavalcante, F.S.; Iorio, N.L.P.; Schuenck, R.P.; Olendzki, A.N.; Felix, M.J.; Chamon, R.C.; dos Santos, K.R.N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. *Am. J. Infect. Control* **2013**, *41*, e21–e26. [CrossRef]
37. Zhang, J.; Gu, F.F.; Zhao, S.Y.; Xiao, S.Z.; Wang, Y.C.; Guo, X.K.; Ni, Y.; Han, L.Z. Prevalence and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* among residents of seven nursing homes in Shanghai. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137593. [CrossRef] [PubMed]
38. Kaiser-Thom, S.; Gerber, V.; Collaud, A.; Hurni, J.; Perreten, V. Prevalence and WGS-based characteristics of *Staphylococcus aureus* in the nasal mucosa and pastern of horses with equine pastern dermatitis. *BMC Vet. Res.* **2022**, *18*, 79. [CrossRef]
39. Parisi, A.; Caruso, M.; Normanno, G.; Latorre, L.; Sottili, R.; Miccolupo, A.; Fraccalvieri, R.; Santagada, G. Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. *Food Microbiol.* **2016**, *58*, 36–42. [CrossRef]
40. Carfora, V.; Giacinti, G.; Sagrafoli, D.; Marri, N.; Giangolini, G.; Alba, P.; Feltrin, F.; Sorbara, L.; Amoroso, R.; Caprioli, A.; et al. Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 4251–4258. [CrossRef] [PubMed]
41. Earls, M.R.; Kinnevey, P.M.; Brennan, G.I.; Lazaris, A.; Skally, M.; O’Connell, B.; Humphreys, H.; Shore, A.C.; Coleman, D.C. The recent emergence in hospitals of multidrug-resistant community-associated sequence type 1 and spa type t127 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* investigated by whole-genome sequencing: Implications for screening. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0175542. [CrossRef] [PubMed]
42. Holden, M.T.; Hsu, L.Y.; Kurt, K.; Weinert, L.A.; Mather, A.E.; Harris, S.R.; Strommenger, B.; Layer, F.; Witte, W.; de Lencastre, H.; et al. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Res.* **2013**, *23*, 653–664. [CrossRef]
43. Hsu, L.Y.; Harris, S.R.; Chlebowicz, M.A.; Lindsay, J.A.; Koh, T.H.; Krishnan, P.; Tan, T.Y.; Hon, P.Y.; Grubb, W.; Bentley, S.D.; et al. Evolutionary dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within a healthcare system. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 81. [CrossRef] [PubMed]
44. Kinnevey, P.M.; Shore, A.C.; Mac Aogáin, M.; Creamer, E.; Brennan, G.I.; Humphreys, H.; Rogers, T.R.; O’Connell, B.; Coleman, D.C. Enhanced tracking of nosocomial transmission of endemic sequence type 22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* type IV isolates among patients and environmental sites by use of whole-genome sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 445–448. [CrossRef] [PubMed]
45. Pokhrel, R.H.; Aung, M.S.; Thapa, B.; Chaudhary, R.; Mishra, S.K.; Kawaguchiya, M.; Urushibara, N.; Kobayashi, N. Detection of ST772 Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Bengal Bay clone) and ST22 *S. aureus* isolates with a genetic variant of elastin binding protein in Nepal. *New Microbes New Infect.* **2016**, *11*, 20–27. [CrossRef] [PubMed]
46. Schaumburg, F.; Alabi, A.S.; Peters, G.; Becker, K. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Africa. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 589–596. [CrossRef] [PubMed]
47. Effelsberg, N.; Stegger, M.; Peitzmann, L.; Altinok, O.; Coombs, G.W.; Pichon, B.; Kearns, A.M.; Randad, P.R.; Heaney, C.D.; Bletz, S.; et al. Global epidemiology and evolutionary history of *Staphylococcus aureus* ST45. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *59*, 10–1128. [CrossRef]
48. Donker, J.M.; van der Laan, L.; Hendriks, Y.J.; Kluytmans, J.A. Evaluation of *Staphylococcus aureus* nasal carriage screening before vascular surgery. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38127. [CrossRef]
49. Omuse, G.; Kabera, B.; Revathi, G. Low prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as determined by an automated identification system in two private hospitals in Nairobi, Kenya: A cross sectional study. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 669. [CrossRef]
50. Coelho, C.; de Lencastre, H.; Aires-de-Sousa, M. Frequent occurrence of trimethoprim-sulfamethoxazole hetero-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in different African countries. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 1243–1252. [CrossRef]
51. Rebiahi, S.A.; Abdelouahid, D.E.; Rahmoun, M.; Abdelali, S.; Azzaoui, H. Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). *Médecine Mal. Infect.* **2011**, *41*, 646–651. [CrossRef]
52. Alioua, M.A.; Labid, A.; Amoura, K.; Bertine, M.; Gacemi-Kirane, D.; Dekhil, M. Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. *Médecine Mal. Infect.* **2014**, *44*, 180–183. [CrossRef]
53. Bhatta, D.R.; Cavaco, L.M.; Nath, G.; Kumar, K.; Gaur, A.; Gokhale, S.; Bhatta, D.R. Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: A matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 199. [CrossRef] [PubMed]
54. Abdulgader, S.M.; Shittu, A.O.; Nicol, M.P.; Kaba, M. Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: A systematic review. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 348. [CrossRef] [PubMed]
55. Vandenesch, F.; Naimi, T.; Enright, M.C.; Lina, G.; Nimmo, G.R.; Heffernan, H.; Liassine, N.; Bes, M.; Greenland, T.; Reverdy, M.E.; et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 978. [CrossRef] [PubMed]

56. Boyle-Vavra, S.; Daum, R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Panton–Valentine leukocidin. *Lab. Investig.* **2007**, *87*, 3–9. [CrossRef]
57. Kateete, D.P.; Bwanga, F.; Seni, J.; Mayanja, R.; Kigozi, E.; Mujuni, B.; Ashaba, F.K.; Baluku, H.; Najjuka, C.F.; Källander, K.; et al. CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital settings in Uganda. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 94. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.