



N° Ref :.....

Centre Universitaire

Abdelhafid Boussouf Mila

Institut des Sciences et de la Technologie Département de des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

En : - Filière: Science Biologique

- Spécialité: Biologie Appliquées et Environnement

- Option: Biochimie et Microbiologie Appliquées

Thème

**Etude de *Staphylococcus aureus* multirésistante
aux antibiotiques à l'hôpital de Mila:
Incidence, Epidémiologie et Analyse spatiale**

Préparé par: Sana Boukessira
Widad Labii

Soutenue devant le jury :

Président:	Moufida BOUCHEKRIT	Grade: M.A.A
Examineur:	Sawsen HADEF	Grade: M.A.B
Promoteur:	Abdelhafid BOUBENDIR	Grade: M.C.B

Année universitaire: 2014/2015

Dédicace

Louange et Gloire à DIEU le Tout Puissant qui m'a permis de mener à bien ce modeste travail.

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE :

Fatiha

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie.

A MON TRÈS CHER PÈRE :

Abdelhamid

Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu tout puissant puisse l'accueillir dans son vaste Paradis.

A ma seule sœur « *Houda* », son mari « *Tarek* » et son bébé

Puisse Dieu le tout puissant vous préserver du mal et exhausser tous tes vœux.

A Mon cher grand père maternel « *Salah* »

Ma chère grand-mère paternelle « *Zahra* »

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

A mes tantes, mes oncles .je cite en particulier

« *Wahida* », « *Nassifa* », « *Habiba* », « *Djamila* » et « *Mounir* »

A mes cousins et cousines particulièrement

« *Assala* » « *Chafiq* » « *Belkiss* » « *Chama* » « *Imane* » « *Ahlam* » « *Nouha* » et « *Salsabil* »

A mon encadreur « *Abdelhafid Boubendir* »

Je vous remercie de nous avoir poussés dans la bonne voie, celle du travail et de la patience, et consacrés un peu de votre temps précieux pour corriger notre mémoire.

A ma meilleur amie « *Imane Diafi* »

A tous mes amis de promo 2015 spécialement

« *Widad* », « *Hakima* », « *Malika* », « *Warda* » et « *Sihem* »

Sana

Dédicace

D'abord je remercie **Dieu** le tout puissant de m'avoir donné courage, santé, souffle et patience pour accomplir ce travail.

A MON TRÈS CHÈRE PÈRE

Ces quelques lignes ne sauraient exprimer toute l'affection et tout l'amour que je porte, tu es pour moi le symbole de l'honnête, de la justice et de la bonté. Tu es fait tant de sacrifice pour mon éducation et mes études, Aujourd'hui, je dépose entre tes mains le fruit de ta patience et de ton innombrable sacrifice.

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE

Rien au monde n'égale ton existence, tu as représenté pour moi le symbole de la bonté par excellence et la source de tendresse, tu as été toujours dans mon esprit et dans mon cœur malgré son absence, j'espère que finalement j'atteindre sa but, pourtant tu as parti avant d'en récolter le fruit, je n'ai jamais oublié toi et tu reste toujours dans mon cœur.

A mon grand frère «**ABDELRADE**», son épouse «**NADWA**» et ses enfants «**ABDELWAHLE**» et «**ALYELRAHMANE**». Pour son aide, soutient et encouragement.

A mes chères frères: «**Fouad**» et «**Foussine**»

A mes chères sœurs: «**SALHA**» et «**ROUFA**»

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Aussi je dédie ce travail à ce qui nous a suivis tout le long de notre travail Mr
Abdelhafid BOUBENDIR

A ma chère amie «**NARDA**»

L'amour que je porte est sans égal, tu es toujours pour moi la sœur bien aimée que j'apprécie énormément.

A ma belle amie de l'enfance «**amina**»

A tous mes amies surtout:
"Sana", "Hakima", "Malika" et "Siham"

NIDAD

Remerciements

Nous remercions, en premier lieu, le grand Dieu pour nous avoir donné la force et la volonté pour réaliser ce travail. Et nous voulions qu'il soit fait purement pour son visage

Nous remercions vivement :

Mr. BOUBENDIR Abdelhafid, Docteur en Microbiologie au Département des Sciences de la Nature et de la Vie au Centre Universitaire de Mila, pour avoir accepté de nous encadrer et nous diriger. Nous le remercions également pour ces précieux conseils, son grand sens d'humanisme, sa grande générosité et sa grande volonté à nous suivre le long de ce travail.

Mlle Sawsen HADEF Maitre Assistante, enseignante au Département des Sciences de la Nature et de la Vie au Centre Universitaire de Mila. Pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mlle Moufida BOUCHEKRIT Maitre Assistante, enseignante au Département des Sciences de la Nature et de la Vie au Centre Universitaire de Mila. Pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Sommaire

Liste des Figures

Numéro	Intitulé	Page
Figure 1	Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes codant l'ARNr 16S construit selon la méthode NJ, montrant les relations génétiques entre les différentes espèces du genre <i>Staphylococcus</i> (Takahashi <i>et al.</i> , 1999).	4
Figure 2	La morphologie de <i>S. aureus</i> . A: Coloration de Gram par le microscope optique. B: Observation par le microscope électronique (Gomez, 2014).	5
Figure 3	Paroi de <i>S. aureus</i> (Gras, 2006; El-Anzi, 2014).	7
Figure 4	Photos en microscopie électronique à transmission d'une souche de <i>S. aureus</i> capsulée (à gauche) et d'un mutant non capsulé (à droite). (Vieu, 2014).	8
Figure 5	Images obtenues par microscopie électronique de cellules de <i>S. aureus</i> adhérentes et formant des biofilms chez l'hôte sur une valve cardiaque (à gauche) et les étapes de développement de la structure spatiale d'un biofilm (à droite) (Daddi Oubekka, 2012).	8
Figure 6	Fermentation du mannitol par des souches de <i>S. aureus</i> (Robert, 2013).	9
Figure 7	Expression des quelques facteurs de virulence du <i>S. aureus</i> (Beaudry-Ferland; Collomb, 2011).	11
Figure 8	Voies de transmission des staphylocoques (Aouati, 2009).	14
Figure 9	Représentation circulaire du chromosome du <i>S. aureus</i> (N315) et des éléments génétiques spécifiques (MU50) (Keiichi <i>et al.</i> , 2001; Kuroda <i>et al.</i> , 2001; Baba <i>et al.</i> , 2002).	20
Figure 10	Voies d'acquisition des éléments génétiques mobiles (Muylaert et Mainil, 2012).	26
Figure 11	Le transfert génétique horizontal et vertical (Malachowa et Deleo, 2010).	27
Figure 12	Carte circulaire du plasmide conjugatif pWBG749 avec des points d'insertion pour les déterminants de la résistance aux antimicrobiens trouvés dans les plasmides non conjugatifs pBRZ01 et pWBG748. pWBG749 (Brien <i>et al.</i> , 2014).	28

Figure 13	Structures de quelques β -lactamines (Charlier <i>et al.</i> , 1998).	30
Figure 14	Épaississement de la paroi des souches (VISA) (Rebiahi, 2011).	33
Figure 15	Représentation schématique du transfert du transposon <i>Tn1546</i> provenant d'une souche d' <i>Enterococcus spp.</i> Vers <i>S. aureus</i> (Perchons et Courvalin, 2009).	34
Figure 16	Mécanismes d'action de la vancomycine et la résistance de <i>S. aureus</i> (Liesse Iyamba, 2012).	34
Figure 17	Les mécanismes de résistance de <i>S. aureus</i> aux macrolides (Prunier, 2004).	35
Figure 18	Conservation des souches à la gélose nutritive inclinée à 4°C.	47
Figure 19	Conservation des souches au glycérol liquide à -20°C.	47
Figure 20	Production de catalase par les cocci à Gram positif (Aouati, 2009).	50
Figure 21	Le test de la coagulase (Aouati, 2009).	51
Figure 22	La préparation de l'inoculum (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).	55
Figure 23	L'ensemencement sur la gélose Muller Hinton (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).	55
Figure 24	Application des disques d'antibiotiques (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).	56
Figure 25	Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu Chapman (01-02) et sur Gélose nutritive (03), les colonies sont lisses, rondes, bombées, brillantes, opaques, de 1 mm de diamètre (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).	57
Figure 26	Photos obtenues par microscopie optique des cellules de <i>S. aureus</i> après la coloration de Gram au grossissement 1000 (à gauche) et au grossissement 400 (à droite) à l'huile d'immersion (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).	58
Figure 27	Teste de la catalase. Le dégagement gazeux est en faveur de la	58

	présence de l'enzyme catalase dans le métabolisme respiratoire bactérien (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).	
Figure 28	Photos de la galerie biochimique (Mannitol Mobilité, TSI, Citrate de Simmons) avant (à gauche) et après la culture (à droite) (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).	59
Figure 29	Résultat de l'antibiogramme de la souche 1 (<i>S. aureus</i>) (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).	61
Figure 30	Incidence de l'isolement de <i>S. aureus</i> par rapport aux <i>Staphylococcus</i> spp. de 2014 à 2015.	63
Figure 31	Incidence de <i>S. aureus</i> selon l'âge de 2014 à 2015.	65
Figure 32	Incidence de <i>S. aureus</i> selon le sexe dans l'Hôpital de Mila de 2014 à 2015.	66
Figure 33	Incidence de <i>S. aureus</i> selon la nature du prélèvement dans l'hôpital de Milade 2014 à 2015.	68
Figure 34	Incidence de <i>S. aureus</i> selon les services hospitaliers de 2014 à 2015.	69
Figure 35	Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de <i>Staphylococcus aureus</i> , SASM et SARM à l'hôpital de Mila de 2007-2014.	72
Figure 36	Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de SARM à l'hôpital de Mila de 2007-2014.	75
Figure 37	Analyse spatiale de la résistance aux antibiotiques de SARM par ACP à l'hôpital de Mila (Algérie).	81
Figure 38	Fragment d'ADN chromosomique (à gauche) et le chromosome circulaire (à droite) de <i>S. aureus</i> révélé la localisation des gènes de résistance à la Tétracycline (<i>tetK</i>), Acide Fusidique (<i>fus</i>) et Norfloxacin (<i>norA</i>). (Mlynarczyk <i>et al.</i> , 1998).	83

Liste des Tableaux

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 01	Différent caractères bactériologique de <i>Staphylococcus aureus</i> (Benhamed, 2014).	6
Tableau 02	Facteurs de surface (Romilly, 2012).	12
Tableau 03	Principaux enzymes et toxines produits par les Staphylocoques (Bisognano, 2000).	13
Tableau 04	Les maladies causées par les Staphylocoques (Rebiahi, 2012).	16
Tableau 05	Les toxi-infections staphylococciques et les toxines impliquées (Philippe, 2004).	17
Tableau 06	Protéines de surface impliquées dans l'infection suppurative (Philippe, 2004).	17
Tableau 07	Les caractéristiques générales des génomes de <i>S. aureus</i> N315 et MU50 (Kuroda <i>et al.</i> , 2001; Baba <i>et al.</i> , 2002).	19
Tableau 08	Les gènes de résistance aux antibiotiques identifiés chez les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> N315 et MU50 (Kuroda <i>et al.</i> , 2001).	21
Tableau 09	Principaux mécanismes de résistances aux macrolides, les lincosamides et les streptogramines B chez <i>S. aureus</i> (Tankovic <i>et al.</i> , 1997).	36
Tableau 10	Mécanismes de la résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques.	40
Tableau 11	matériel et réactifs .	43
Tableau 12	Le Matériel et les réactifs utilisés dans l'antibiogramme.	54
Tableau 13	Résumé des résultats de l'identification biochimique réalisée au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila.	59
Tableau 14	Résumé du résultat du test de l'antibiogramme réalisé dans le Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila.	60
Tableau 15	Résultats des cultures bactériennes.	62
Tableau 16	Incidence d'isolement de <i>Staphylococcus</i> spp. et <i>S. aureus</i> .	62
Tableau 17	Isolement et antibiorésistance de 24 souches <i>Staphylococcus</i> spp. à l'hôpital de Mila (2014 et 2015).	63

Tableau 18	Incidence totale de <i>Staphylococcus</i> spp. Isolé à l'hôpital de Mila.	64
Tableau 19	Incidence de résistance des SARM dans l'hôpital de Mila (2007 à 2012).	78
Tableau 20	Matrice de corrélation (Pearson (n)).	79
Tableau 21	Valeur propre et variation (%) exprimées par les composantes principales.	79
Tableau 22	Corrélation des antibiotiques avec les axes 1 et 2.	80

Liste des abréviations

AAC: Aminoglycosides acétyltransférases
AC-FU/FA: Acide-Fusidique
ACP: Analyse en Composantes Principale
ADN: Acide désoxyribonucléique
Agr: Accessory gene regulator
AK: Kanamycine
AMC: Amoxicilline+Acide Clavulanique
AN: Amikacine
ANT: Aminoglycosides adényltransférases
APH: Aminoglycosides phosphotransférases
ARN: Acide ribonucléique
blaZ: Gène de résistance aux β -lactamines
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
C: Chromosome
C: Cytosine
CHIPS: Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococci
Cit: Citrate de Simone
CL: Clindamycine
ClfA: Clumping factor A
CIP: Ciprofloxacin
CMI: Concentration minimal inhibitrice
Cna: Collagène Binding Protein
Coa: Coagulase
ClfA: Clumping factor A
ClfB: Clumping factor B
Cs: Colistine
CT: Céfotétan
CTX: Céfotaxime
CZ: Céfazoline
DO: Densité optique
E: Erythromycine
Efb: Extracellular fibrinogen Binding protein
EF-G: Facteur d'élargissement G

ES: Entérotoxines staphylococciques
ET: Exfoliatines
Ext: Externe
F: Féminin
FnBPA: fibronéctine Binding Protein A
FnBPB: Fibronéctine Binding Protein A
Fos: Fosfomycine
G: Guanine
GLU: Glucose
GN: Gentamycine
GN: Gélose nutritive
GSC: Gélose au Sang Cuit
GTP: Guanosine-tri-phosphate
I: intermédiaire
II: Interleukines
In: Inconnu
Inf: Infectieux
IPA: îlots de pathogénicité
IPM: Imipenème
IS: Séquences d'insertion
KDa: Kilo dalton
Kb: Kilo base
L: Lincomycine
LAC: Lactose
LCR: Liquide Céphalo-rachidien
LPV: Leucocidine de panton et valentine
M: Masculin
Man: Mannitol Mobilité
MH: Mueller-Hinton
MLS: Macrolides, Lincosamides, Streptogramines
MSCRAMM: Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules
NCBI: National Center Biotechnology Information
NJ: Neighbor-Joining
NOR: Norfloxacin

O₂: Oxygène
OX: Oxacilline
P: Pénicilline
P: Promoteur
Pb: Paire de base
PCR: Polymérase chaîne réaction
Péd: Pédiatrie
PH: Potentiel d'hydrogène
PL: Ponction lombaire
PLP: Protéine liant la pénicilline
PT: Pristinamycine
R: Résistant
S: Sensible
SAK: Staphylokinase
Sar: Staphylococcal accessory regulator
S. aureus: *Staphylococcus aureus*
SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
SARV: *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine
SAIV: *Staphylococcus aureus* de résistant intermédiaire à la vancomycine
SCCmec: Staphylococcal cassette chromosome *mec*
Sdr: Bone sialoprotein Binding protein
SERAM: Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules
SP: Streptomycine
SXT: Triméthoprim+sulfaméthoxazole
TE: Tétracycline
TEA: toxine exfoliative A
Tn: Transposon
TSI: Triple Sugar Investigation
TSST: Toxine du choc staphylococcique

Sommaire

Remerciements

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	IV
Liste des abréviations.....	VI
Introduction.....	1

Partie I: Etude bibliographique

Chapitre 01: Généralités sur <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1. Taxonomie.....	3
2. Habitat.....	4
2.1. Chez l'être vivant.....	4
2.2. Dans l'environnement.....	5
2.3. Dans les aliments et leur environnement de production.....	5
3. Caractères.....	5
3.1. Caractères bactériologiques.....	5
3.1.1. Morphologie.....	5
3.1.2. Caractères culturels.....	6
3.2. Caractères structuraux.....	7
3.3. Caractères biochimiques.....	9
3.3.1. La fermentation du mannitol.....	9
3.3.2. Les enzymes.....	9
4. Pathogénicités de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
4.1. Les facteurs de virulence.....	11
4.1.1. Les protéines de surfaces.....	11
4.1.2. Les protéines sécrétées.....	12
4.2. Les systèmes de régulation de virulence.....	13
4.3. Mode de transmission.....	14
4.4. Les étapes de l'infection.....	15
4.4.1. Colonisation de l'hôte.....	15
4.4.2. Prolifération tissulaire.....	15

4.4.3. Contournement du système immunitaire.....	15
4.5. Les maladies causées par <i>Staphylococcus aureus</i>.....	15
4.6. Les infections à staphylocoques.....	16
4.6.1. Infection nosocomiale.....	16
4.6.2. Infection toxique.....	17
4.6.3. Infection suppurative.....	17
Chapitre 02: La résistance aux antibiotiques chez <i>Staphylococcus aureus</i>.....	18
1. Support génétique de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	18
1.1. Structure du génome.....	18
1.2. La cartographie	18
1.2.1. Les éléments génétiques mobiles.....	22
1.2.1.1. Plasmides.....	22
1.2.1.2. Bactériophages.....	23
1.2.1.3. Transposons.....	23
1.2.1.4. Ilots de pathogénicités.....	24
2. Types de résistances aux antibiotiques chez les <i>Staphylococcus aureus</i>.....	25
2.1. Résistance naturelle.....	25
2.2. Résistance acquise.....	25
2.2.1. Mutations.....	26
2.2.2. Transfert horizontale des gènes de résistance.....	26
3. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques chez les <i>Staphylococcus aureus</i>.....	29
3.1. Béta lactamines.....	29
3.1.1. Mécanisme d'action.....	30
3.1.2. Résistance à la pénicilline.....	30
3.1.3. Résistance à la méthicilline.....	31
3.2. Glycopeptides.....	32
3.2.1. Mécanisme d'action.....	32
3.2.2. Mécanisme de résistance.....	33
3.3. Macrolides, Lincosamides et Streptogramines.....	35
3.3.1. Mécanisme d'action.....	35
3.3.2. Mécanisme de résistance.....	35

3.4. Aminosides	37
3.4.1. Mécanisme d'action.....	37
3.4.2. Mécanisme de résistance.....	37
3.5. Fluoroquinolones	38
3.5.1. Mécanisme d'action.....	38
3.5.2. Mécanisme de résistance.....	38
3.6. Autres antibiotiques	39
4. Emergence de nouvelles résistances aux antibiotiques	41
5. Facteurs favorisant la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques	41

Partie II: Etude expérimentale

1. Matériel et Méthodes	43
1.1. Matériel	43
1.1.1. Matériel biologique.....	44
1.1.2. Récolte des souches de <i>S. aureus</i>	44
1.2. Méthodes	44
1.2.1. Nature des prélèvements.....	44
1.2.2. Isolement et purification.....	45
1.2.2.1. Réactivation des souches.....	45
1.2.2.2. Milieux de culture et d'isolement.....	46
1.2.2.3. Conservation des souches.....	46
1.2.3. Identification de <i>S. aureus</i>	47
1.2.3.1. Aspect macroscopique des colonies.....	47
1.2.3.2. Coloration de Gram.....	48
1.2.3.3. Identification biochimique.....	49
1.2.4. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	53
1.2.4.1. Protocole de l'antibiogramme.....	53
2. Résultats et discussion	57
2.1. Résultats de l'identification bactérienne	57
2.1.1. Aspect macroscopique des colonies.....	57
2.1.2. Coloration de Gram.....	58
2.1.3. Identification biochimique.....	58

2.1.4. Résultats du test de l'antibiogramme.....	60
2.2. Résultats des cultures bactériennes.....	61
2.3. Incidence de la résistance aux antibiotiques de <i>S. aureus</i> de 2014 à 2015.....	62
2.4. Incidence du genre <i>Staphylococcus</i> spp. de 2014 à 2015.....	64
2.5. Incidence de l'espèce <i>S. aureus</i> de 2014 à 2015.....	64
2.6. Incidence de <i>S. aureus</i> selon l'âge, le sexe, la nature de prélèvement et les services hospitaliers de 2014 à 2015.....	65
2.6.1. Incidence de <i>S. aureus</i> selon l'âge.....	65
2.6.2. Incidence de <i>S. aureus</i> selon le sexe.....	66
2.6.3. Incidence de <i>S. aureus</i> et de SARM selon la nature du prélèvement.....	67
2.6.4. Incidence de <i>S. aureus</i> et de SARM selon les services.....	69
2.7. Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de <i>S. aureus</i> de 2007 à 2014.....	70
2.8. Incidence de la résistance aux antibiotiques de SARM de 2007 à 2014.....	73
2.8.1. La résistance à la Vancomycine.....	74
2.8.2. La résistance à la Gentamycine.....	76
2.8.3. La résistance à la Streptomycine.....	77
2.8.4. La résistance à la Norfloxacin.....	77
2.9. Analyse spatiale de la résistance aux antibiotiques de <i>S. aureus</i> de 2007 à 2014.....	78
Conclusion et perspectives.....	85
Référence	86
Annexes	

Introduction

Introduction

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de la santé publique, la situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier (Lepelletier *et al.*, 2001 ; Leclercq, 2002). Les infections acquises à l'hôpital sont une réalité surtout dans des services à haut risque tels que le service de chirurgie. Parmi les micro-organismes les plus incriminés dans ces infections *Staphylococcus aureus* (Rebiahi *et al.*, 2011).

S. aureus est à la fois un germe commensal et un agent pathogène majeur de l'homme, impliqué dans 1 à 5% des infections communautaires et jusqu'à 30% des infections acquises en milieu hospitalier (nosocomiales). Le traitement des infections à *S. aureus* est de plus en plus difficile en raison de la prévalence élevée des souches mutirésistantes aux antibiotiques (Corne, 2004). Les *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) sont de plus en plus isolés à partir de malades ne présentant pas de facteurs de risques habituels. Certains ont pour origine l'hôpital, d'autres apparaissent d'origine communautaire. Ces dernières ont acquis des propriétés leur conférant un potentiel épidémique (Nour *et al.*, 2004).

Le SARM est longtemps resté le prototype du pathogène exclusivement nosocomial, ce qui permettait de maintenir les bêta-lactamines comme principal traitement présomptif des infections communautaires graves, où le SARM n'était pas à prendre en compte. La situation a radicalement changé en quelques années avec l'émergence presque simultanée, en Australie, en Europe, puis en Amérique du Nord, de plusieurs clones distincts de SARM d'acquisition communautaire (Tattevin, 2010).

La situation varie énormément selon les pays. La proportion des SARM par rapport à l'ensemble des souches de *S. aureus* isolées est inférieure à 1% aux Pays-Bas et dans les pays scandinaves. La proportion des SARM est de 30% en France (2000), elle atteint 72% au Etats unies et 70% en Sénégal (2007). En Egypte, au Maroc et en Tunisie elle était 25%, 15.5%, 19.5% (2004) (Corne, 2004 ; Rebiahi *et al.*, 2011).

En Algérie, ce phénomène enregistre une fréquence grandissante. En effet, la fréquence du SARM était de 4.5% en 2002, 33.2% en 2004, 45% en 2006, et 52% en 2011, ce qui produit un taux de mortalité élevé et un surcoût tout aussi important (Rebiahi *et al.*, 2012).

La détection de cette résistance permet de prévenir et de ralentir la diffusion de souches mutirésistantes et d'optimiser le choix de l'antibiothérapie (Liazid, 2012). Pour cela, et suite aux travaux réalisés par nos collègues étudiants de Master 2014, nous nous sommes intéressés à

étudier la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* dans l'hôpital de Mila durant notre stage de mémoire de Master 2015. De ce fait, nous avons décidé de compléter nos résultats obtenus durant 2014-2015 avec les travaux précédents, dans le souci de développer et enrichir encore la discussion des résultats.

Les objectifs de notre travail sont d'abord d'isoler et tester la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* à l'hôpital de Mila. Ensuite, expliquer à l'ombre de la bibliographie les mécanismes moléculaires de la résistance. Enfin, étudier les corrélations dans la résistance de *S. aureus* aux différents antibiotiques et les comparées à la cartographie génétique par une Analyse en Composantes Principales (ACP).

Pour atteindre ces objectifs les étapes suivantes sont suivies:

- Etude de l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques.
- Etude des mécanismes moléculaires et des bases génétiques de la résistance.
- Corrélation entre la distribution spatiale des résistances aux antibiotiques et la cartographie génétique par ACP.

Partie I:

Etude bibliographique

Chapitre I: Généralités sur *Staphylococcus aureus*

Le nom de « *Staphylococcus* » a été attribué à un regroupement de cocci causant un grand nombre de maladies pyogènes chez l'humain. Ces bactéries ont été isolées et analysées par le chirurgien écossais Sir Alexander Ogston en 1880 (El Haddad, 2010). *Staphylococcus aureus* est cliniquement l'espèce la plus importante du genre *Staphylococcus*, et responsable d'une grande variété d'infections chez l'homme (Diego, 2011). Cette espèce communément appelé le staphylocoque doré, est commensal de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux à sang chaud (Bouchard, 2013).

1. Taxonomie

Les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à gram positif (Benhamed, 2014).

Classe: *Bacilli*

Ordre: *Bacillales*

Famille: *Staphylococcaceae*

Genre: *Staphylococcus*

Espèce: *Staphylococcus aureus*

La différence entre les espèces de *S. aureus* peut s'établir grâce à des kits d'identification ainsi que par des galeries d'identification qui sont basés sur des caractères biochimiques. En effet, une absence et/ou une présence d'une activité enzymatique, de facteurs de virulence, de dégradation d'un substrat peut identifier l'une ou l'autre des espèces staphylococciques (Robert, 2013). La taxonomie de ce genre a subi plusieurs remaniements successifs (Figure 01) grâce au développement de séquençage d'ARNr 16S (Chaalal, 2013).

Le genre *Staphylococcus* regroupe 35 espèces (44 espèces et sous-espèces). En pratique médicale courante, les espèces les plus fréquentes (infection ou colonisation) sont *S. aureus*, *S. epidermitis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* et *S. warneri* (Brun et Bès, 2002).

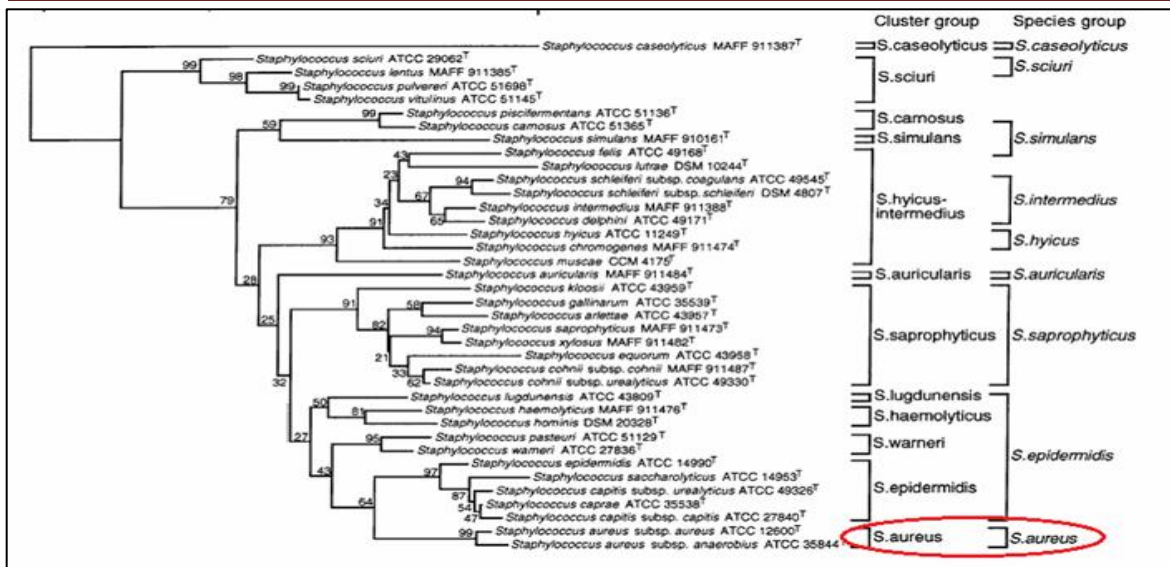


Figure 01: Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes codant l'ARNr 16S, construit selon la méthode NJ, montrant les relations génétiques entre les différentes espèces du genre *Staphylococcus* (Takahashi *et al.*, 1999). Les chiffres correspondent au niveau de confiance estimé par l'analyse bootstrap et sont exprimés en pourcentage. Le « Cluster group » correspond aux groupes d'espèce déterminés par Takahashi *et al.* (1999), sur la base des homologies de séquence des gènes codant les ARNr 16S. Le « Species group » correspond aux groupes d'espèce décrits par (Kloos et Schleifer, 1986).

2. Habitat

2.1. Chez l'être vivant

La présence de réservoirs de *S. aureus* chez les hôtes humains et animaux est une réalité. En effet, *S. aureus* sont des bactéries de la flore commensale cutanée et muqueuse des humains et des animaux (Eveillard, 2007; Trotot-voilliot, 2012).

La majorité des humains sont porteurs sains de *S. aureus* et représentent un réservoir important (Alomar, 2007). *S. aureus* est présent sur plusieurs sites corporels de l'homme, on le repère sur la surface de la peau, mais, il colonise principalement les fosses nasales, les glandes de la peau, les mains, la bouche, les glandes mammaires et les muqueuses intestinales ou génitales (Robert, 2013).

2.2. Dans l'environnement

S. aureus est ubiquitaire, il possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes. Il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux.

Cette bactérie peut être isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer, la surface des plantes. Concrètement, elle est largement présente dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces (Dworkin *et al.*, 2013). Les difficultés d'éradication du micro-organisme posent un problème en milieu hospitalier car les personnes hospitalisées peuvent être infectées par des *S. aureus* qui sont d'origine généralement humaine (Bisognano, 2000).

2.3. Dans les aliments et leur environnement de production

S. aureus peut se retrouver dans les aliments comme par exemple, le lait, les produits laitiers ou la viande. La contamination des aliments peut être due principalement à la matière première qui est contaminée ou d'origine humaine lors de la fabrication et/ou le conditionnement de l'aliment dans l'industrie agro-alimentaire. Ces contaminations sont souvent liées à un défaut d'hygiène du matériel de production ou de l'employé (Robert, 2013). La présence des *S. aureus* dans les aliments représente un risque majeur pour la santé humaine, parce que cette bactérie produit des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxi-infection alimentaire (De Buyser, 1996).

3. Caractères

3.1. Caractères bactériologiques

Il existe plusieurs caractères qui permettent de différencier *S. aureus* des autres espèces du genre staphylocoques.

3.1.1. Morphologie

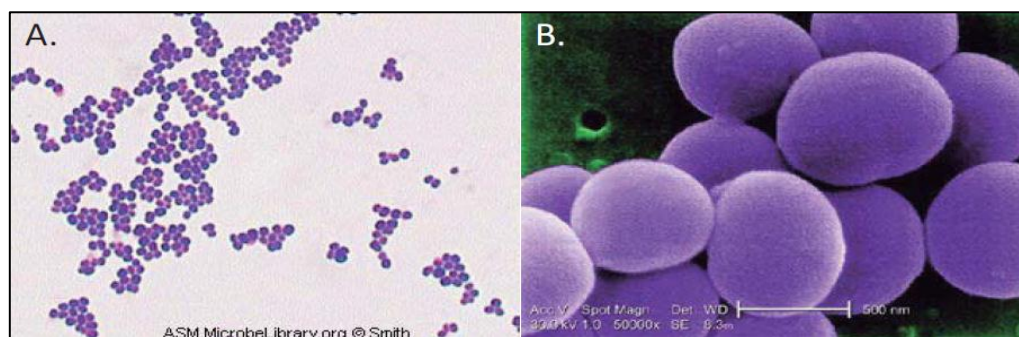


Figure 02: La morphologie de *S. aureus*. **A:** Coloration de Gram par le microscope optique. **B:** Observation par le microscope électronique (Gomez, 2014).

S. aureus est un coque à Gram positif, sphérique, de 0,5 à 1 μm de diamètre, isolés ou groupés en diplocoques, en tétrade, en courtes chaînettes ou en amas (Figure 02) (Mamadou Iouma,

2007; Chaalal, 2013). Ils sont immobiles et ne produisent pas des spores. S'ils sont généralement capsulés *in vivo*, ils perdent progressivement leur capsule en culture (Perez, 2013). Cette bactérie est aéro-anaérobie facultative, à catalase positive et à oxydase négative et la présence d'une protéine A dans la paroi caractérise *S. aureus* (Tableau 01) (Liesse Iyamba, 2012).

Tableau 01: Différents caractères bactériologique de *Staphylococcus aureus* (Benhamed, 2014).

Morphologie	Regroupé en paire, tétrade ou amas réguliers, Immobile : non sporulé mais sont résistants à la dessiccation
Dimension (µm)	0.8-1
Teneur en CG (mol%)	33%
Taille du génome (Mb)	2.8-2.9
Type respiratoire	Aéro anaérobie facultatif
Type trophique	Chimioorganotrophe
Métabolisme	Fermentaire et/ ou respiratoire Caractère positive- oxydase négative
Autres caractères	Halophile- mésophile (37°C) et psychrophile (6-12°C) Neutrophile pH _{opt} = 7 ; pH _m ; Aw : basse, jusqu'à 0.83

3.1.2. Caractères cultureux

Comme tous les germes très répandus dans la nature, *S. aureus* se cultive facilement sur les milieux usuels, à des conditions de pH et de température variables (Liesse Iyamba, 2012). Il est même capable de pousser dans des conditions hostiles, par exemple en présence de 7 % de NaCl, ce caractère est mis à profit dans le milieu de culture sélectif hypersalé de CHAPMAN pour isoler les staphylocoques (Loulergue et Tourret, 2003).

Le pH varie de 5.6 à 8.1; l'optimum est de 7.5. La température optimale de croissance est de 37 °C. Mais la culture est possible de 10 à 45 °C (Mamadou Iouma, 2007).

S. aureus est une bactérie aéro-anaérobie facultative c'est-à-dire qu'il est capable de se développer à la surface de la peau, en aérobie et aussi dans les tissus mal oxygénés. En bouillon ordinaire, la culture est rapide, un trouble homogène puis un dépôt sont observés. Sur milieu CHAPMAN, les colonies sont lisses, rondes et bombées. La plupart des souches élaborent un pigment jaune doré ou jaune-citron non diffusible dans le milieu (Diallo, 2007).

3.2. Caractères structuraux

A. Paroi

Elle est formée principalement du peptidoglycane, des acides teichoïques et lipoteichoïques (Figure 03) (Loulergue et Tourret, 2003).

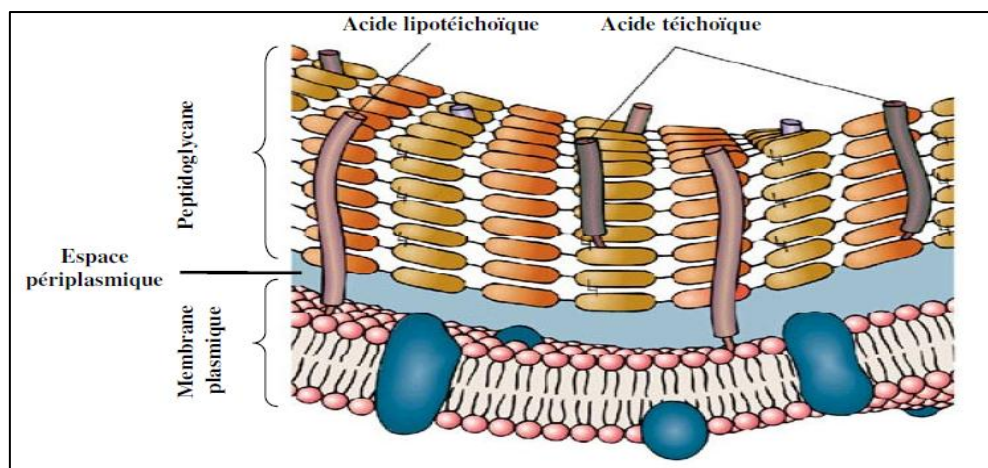


Figure 03: Paroi de *S. aureus* (Gras, 2006; El-Anzi, 2014).

- **Le peptidoglycane:** Permet la liaison (de façon covalente) de plusieurs protéines de surface des cellules à infecter (Robert, 2013), il joue un rôle dans l'activation du complément, stimule la sécrétion des cytokines par les macrophages ainsi que l'agrégation des plaquettes (Rebiahi, 2012).
- **L'acide téichoïques:** Sont des polymères linéaires du glycérol, liés de façon covalente au peptidoglycane (Aouati, 2009). Il est relié aussi directement aux lipides de la membrane plasmique (appelé acide lipoteichoïques) (Gras, 2006). Les acides téichoïques sont les récepteurs de bactériophages et donnent naissance à des anticorps que l'on retrouve dans le sérum du malade (Mamadou louma, 2007).

B. Capsule

La majorité des staphylocoques produisent des microcapsules polysaccharidiques (Figure 04). La capsule joue un rôle de facteur de virulence car elle impliquée dans le phénomène d'adhérence et permet également une meilleure résistance des souches à la phagocytose et à l'opsonisation (Collomb, 2011; Robert, 2013 et Vieu, 2014).

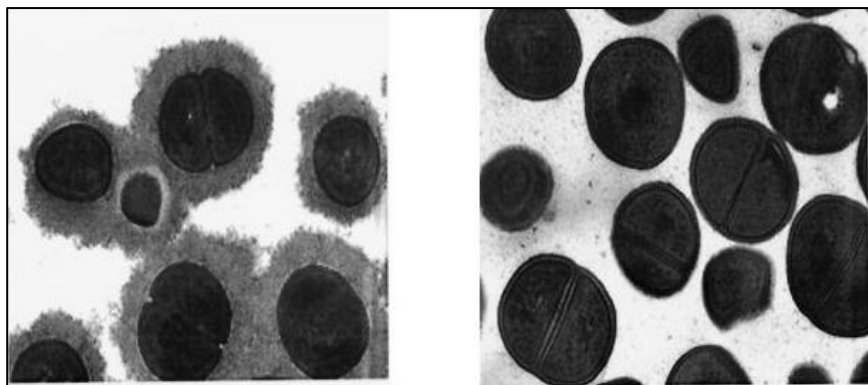


Figure 04: Photos en microscopie électronique à transmission d'une souche de *S. aureus* capsulée (à gauche) et d'un mutant non capsulé (à droite) (Vieu, 2014).

C. Génome

Il est composé d'un chromosome circulaire (environ 2800 pb), de prophages, de plasmides et de transposons. Des facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques ont été retrouvés à la fois dans le chromosome et dans les éléments extra-chromosomiques (Collomb, 2011).

D. Biofilm

Parmi les espèces bactériennes productrices de biofilm impliquées dans les infections, les espèces du genre *Staphylococcus* sont majoritaires, le biofilm est un ensemble de bactéries agrégées et entourées par une matrice polymérique de nature polysaccharidique, de protéines, de lipides, etc. (Figure 05). Le biofilm joue un rôle dans la physiopathologie notamment dans la résistance aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte (Daddi Oubekka, 2012; Vieu, 2014).

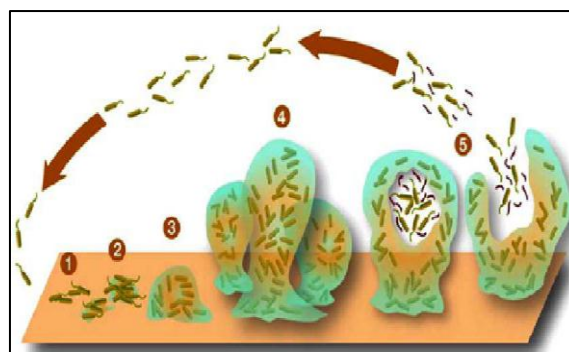
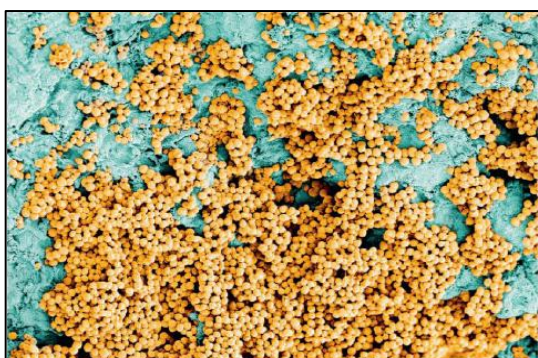


Figure 05: Images obtenues par microscopie électronique des cellules de *S. aureus* adhérentes et formant des biofilms chez l'hôte sur une valve cardiaque (à gauche) et les étapes de développement de la structure spatiale d'un biofilm (à droite) (Daddi Oubekka, 2012).

3.3. Caractères biochimiques

S. aureus possède plusieurs caractères biochimiques lui permettant de différencier des autres espèces du staphylocoque.

3.3.1. La fermentation du mannitol

Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés (glucose, saccharose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* (Aouati, 2009).

Généralement on détecte la fermentation du mannitol par un changement de couleur du milieu de culture qui passe de la couleur rouge à la couleur jaune (Figure 06). Ce changement de couleur se produit grâce à un indicateur coloré (le rouge de phénol). Cependant, certaines souches de staphylocoques à coagulase négative fermentent également le mannitol (Robert, 2013).

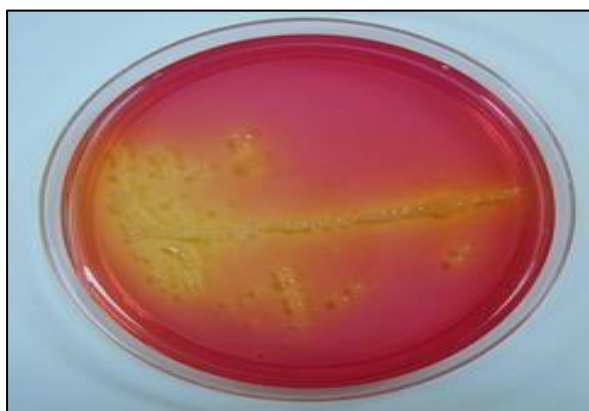


Figure 06: Fermentation du mannitol par des souches de *S. aureus* (Robert, 2013).

3.3.2. Les enzymes

S. aureus possède un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques (Aouati, 2009).

❖ Coagulase ou Staphylocoagulase

La staphylocoagulase libre est le produit du gène *coa*. Ce gène induit la production d'une protéine extracellulaire thermostable et non d'une enzyme (Rebiahi, 2012; Robert, 2013). Cette protéine est d'origine chromosomique capable de coaguler en quelques heures le plasma

humain (ou de lapin) (Aouati, 2009). C'est un marqueur classique d'identification de *S. aureus* joue un rôle dans la virulence des souches (Loulergue et Tourret, 2003).

A côté de cette coagulase "libre", il existe aussi une autre substance insoluble qui paraît être fixée au corps bactérien appelée coagulase liée ou "clumping factor" qui est une protéine de poids moléculaire 21 kDa qui peut être rencontrée chez certaines espèces de staphylocoques à coagulase négative (Mamadou louma, 2007; Aouati, 2009).

❖ **Catalase**

Le *S. aureus* possède une activité catalase positive comme tous les staphylocoques. Cette activité enzymatique permet la dégradation du peroxyde d'oxygène en eau et dioxygène (Robert, 2013). Elle inhibe la bactéricide en empêchant la formation de radicaux oxygénés toxiques pour la bactérie (Aouati, 2009).

❖ **Nucléases**

C'est une désoxyribonucléase qui a une activité ribonucléasique (Mamadou louma, 2007). Ayant des propriétés endo-exonucléasiques et active sur les ADN et les ARN. Elle est produite par la plupart des souches de *S. aureus* (Loulergue et Tourret, 2003). Ces nucléases interviennent dans la formation des lésions tissulaires (Aouati, 2009).

❖ **Autres enzymes**

✓ **β -lactamases**

Ce sont des enzymes situées dans la membrane cytoplasmique, elles inactivent les β -lactamines et jouent un rôle important dans la résistance des souches de staphylocoques à ces antibiotiques (Loulergue et Tourret, 2003, Aouati, 2009; Collomb, 2011).

✓ **Lipases**

S. aureus produit des enzymes appelées lipases qui détruisent les acides gras avant de causer des dommages au niveau de la membrane bactérienne (Mamadou louma, 2007; Aouati, 2009).

✓ **Hyaluronidase**

Cette enzyme extracellulaire thermolabile hydrolyse l'acide hyaluronique, substance fondamentale de la matrice du tissu conjonctif, ce qui permet la diffusion tissulaire des *S. aureus* (Mamadou louma, 2007; Aouati, 2009; Rebiahi, 2012).

✓ **Protéase**

Elles hydrolysent certaines protéines et contribuent à la destruction du caillot et à la formation de micro embolus bactériens, responsables de métastases septiques (Aouati, 2009).

4. Pathogénicités de *Staphylococcus aureus*

4.1. Les facteurs de virulence

S. aureus colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire, il exerce ensuite son pouvoir pathogène. En plus de sa capacité de survie, *S. aureus* capable de synthétiser des multiples facteurs de virulence (Figure 07), ces facteurs sont à l'origine de l'établissement de l'infection (Romilly, 2012; El-Anzi, 2013).

Les facteurs de virulence de *S. aureus* sont de deux types: les protéines de surface et les facteurs de virulence solubles. Ces facteurs de virulence ont chacun un rôle défini dans la colonisation et l'infection de l'hôte et sont synthétisés et/ou sécrétés à des moments différents en fonction de la phase de croissance bactérienne (El-Anzi, 2013).

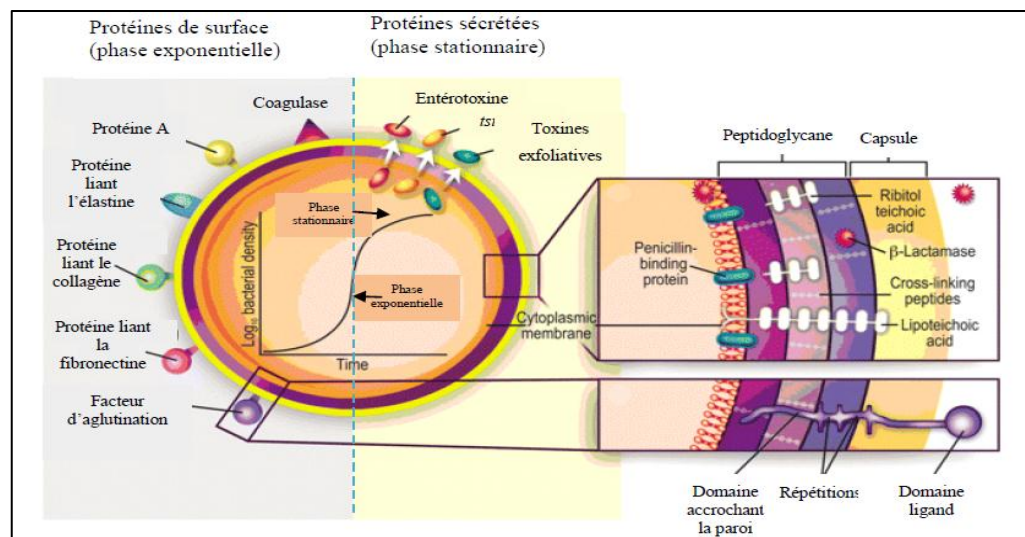


Figure 07: Expression des quelques facteurs de virulence du *S. aureus* (Collomb, 2011; Beaudry-Ferland, 2012; El-Anzi, 2014).

4.1.1. Les protéines de surfaces

Les protéines de surfaces (Tableau 02) peuvent intervenir dans la colonisation, l'adhésion, la diffusion et l'invasion dans un organisme cible, l'adhésion à la surface d'une cellule cible est essentielle pour la bactérie, c'est la première étape d'une infection (Robert, 2013). Les facteurs d'adhésion, qui sont généralement exprimés durant les phases précoces d'infection, se répartissent en deux catégories (Romilly, 2012):

Les MSCRAMM «Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules» sont des facteurs d'adhésion et qui sont en majorité ancrées aux peptidoglycanes de la paroi bactérienne (Gras, 2006), la liaison entre ces protéines et le peptidoglycane se fait

de façon covalente (Robert, 2013). Les adhésines de *S. aureus* les mieux caractérisées sont les protéines de liaison à la fibronectine, *FnBPA* et *FnBPB*, la protéine de liaison au collagène *Cna*, les protéines de liaison au fibrinogène (Clumping factor) *ClfA* et *ClfB*, et la protéine A (*Spa* pour staphylococcal protein A) vont permettre la fixation de *S. aureus* aux cellules (Liesse Iyamba, 2012).

Les SERAM (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) sont les nouvelles adhésines, ces protéines peuvent établir des liaisons non covalentes, de type hydrophobe, avec des protéines de la matrice extracellulaire, le terme regroupe plusieurs protéines. Chaque SERAM a des capacités et des rôles différents tels qu'*Efb* (extracellular fibrinogène Binding protein), *Sdr* (Bone sialoprotein Binding protein) ainsi que *Coa* (Coagulase), etc. (Romilly, 2012; Roberte, 2013).

Tableau 02: Facteurs de virulence de surface (Romilly, 2012).

Facteur de virulence	Gènes	Fonction
Clumping factor A/B	<i>clfA</i> <i>clfB</i>	Adhésion au fibrinogène
Fibrinogen Binding protein A/B	<i>FnbpA</i> <i>fnbpB</i>	Attachement à la fibronéctine
Collagène Binding protein	<i>cna</i>	Adhésion au collagène
Elastin binding protein	<i>Abps</i>	Liaison à l'élastine
Coagulase	<i>Coa</i>	Adhésion
Protéine A	<i>Spa</i>	Invasion possible de défense de l'organisme
Polysaccharides capsulaires	<i>Cap</i>	Molécule anti-phagocytose

4.1.2. Les protéines sécrétées

Les staphylocoques sécrètent une quantité impressionnante de toxines et d'enzymes hydrolysant différents constituants cellulaires (Tableau 03) (El Haddad, 2010), ces toxines et enzymes extracellulaire contribuent à la pathogénie des staphylocoques (Bisognano, 2000). En effet, certaines toxines ont plus un tropisme membranaire, d'autres une activité superantigénique et certaines un rôle d'extension du foyer infectieux (Robert, 2013).

Tableau 03: Principaux enzymes et toxines produites par les staphylocoques (Bisognano, 2000).

Toxines	Mode d'action	Effets biologiques
Leucocidine	Toxine formant des pores	Lyse les neutrophiles.
TSST 1	Superantigène ⇒ Hyper sensibilité	Activation des leucocytes, sécrétion des interleukines (II1, 2 et TNF), choc toxique
Exfoliative toxine	Toxine formant des pores	Epidermolyse
α-toxine	Toxine formant des pores	Hémolysines et formation de pores dans les membranes de nombreux types cellulaires
β-toxine		
δ-toxine		
γ-toxine		
Entérotoxine		Intoxications alimentaires
Coagulase	Activation de la prothrombine	Formation du caillot fibrineux
Staphylokinase	Dislocation des caillots	Dissémination de micro-emboles
Nucléase, Lipase, Estérase Hyaluronidase	Hydrolyse de leur substrat respectif (ADN, lipides, Hyaluronique)	Lésions tissulaire, lésions cutanées, lésions du tissu conjonctif.

4.2. Les systèmes de régulation de virulence

Le système régulateur est essentiel pour la survie de la bactérie. En faible densité bactérienne, le système de régulation est mis au repos, induisant l'expression des facteurs d'adhésions. Lors de la phase exponentielle de croissance, le système de régulation va s'enclencher. Cette activation est suivie par une inhibition de la production d'adhésines ainsi qu'une stimulation de l'expression des facteurs de sécrétions (Collomb, 2011; Robert 2013).

Les facteurs de virulence sont contrôlés par des régulateurs globaux dont les mieux connus sont *agr* (accessory gène regulator) et *sar* (staphylococcal accessory regulator) (Bisognano, 2000).

❖ Système *agr*

Le gène *agr* (Accessory gene regulator) est le plus étudié, il induit l'expression des gènes codant pour des protéines extracellulaires (El Haddad, 2010). En début de croissance bactérienne, le système *agr* n'est pas activé, permettant la synthèse des facteurs de virulence impliqués dans l'adhérence bactérienne. Puis il diminue l'expression de ces facteurs et stimule l'expression des facteurs de virulence solubles plus en avant dans la croissance bactérienne. Le locus *agr* est constitué de cinq gènes qui codent pour deux transcrits qui sont RNAII et

RNAIII eux même initiés par deux promoteurs distincts qui sont P2 et P3 (Gras, 2006; El-Anzi, 2014).

❖ Système *Sar*

Sar (Staphylococcal accessory regulator) est un autre régulateur global capable d'influencer l'expression des protéines sécrétées dans le milieu, ce système régulateur comporte au minimum trois promoteurs différents (P1, P2 et P3) conduisant à la synthèse de trois transcrits désignés respectivement *sarA*, *sarB* et *sarC*. Des études récentes ont montré la liaison de *SarA* aux promoteurs P2 et P3 de l'*agr* permettant leur activation (Bisognano, 2000; Gras, 2006).

4.3. Mode de transmission

Parmi les modes de transmission on a:

A) Le personnel colonisé (mains, narines) travaillant en salle de chirurgie peut directement transmettre une souche au patient (Davido, 2010).

B) Un autre mode de transmission fréquent est la colonisation indirecte du patient par des objets (gants, équipement médical) souillés (Bisognano, 2000).

C) Il existe aussi des possibilités de contamination par voie aérienne impliquant de microgouttelettes (5 µm de diamètre) ou de particules en suspension (poussière) (Ghernaout-Benchouk, 2013).

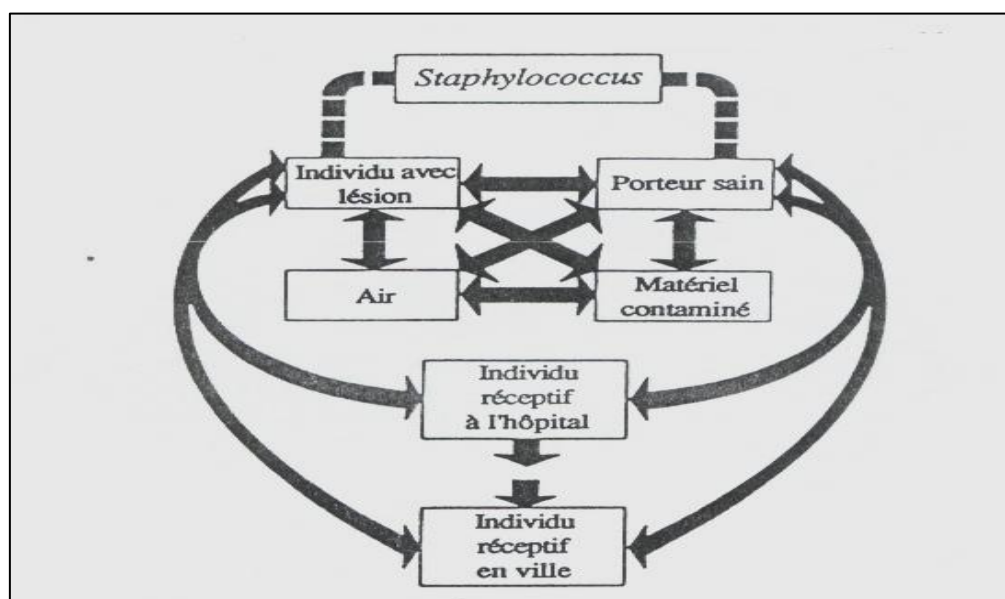


Figure 08: Voies de transmission des staphylocoques (Aouati, 2009).

4.4. Les étapes de l'infection

La pathogénicité des infections à *S. aureus* est liée à sa capacité à coloniser les tissus de l'hôte, à proliférer et à contourner le système de défense immunitaire grâce à des facteurs de virulence spécifiques (facteurs d'adhésion, production d'enzymes et de toxines) (Lowy, 1998).

4.4.1. Colonisation de l'hôte

La base de la colonisation de *S. aureus* est complexe mais semble impliquée dans le contact de la bactérie avec son hôte ainsi que dans son aptitude d'adhésion et d'évasion aux défenses immunitaires (Rebiahi, 2012). Cette colonisation se fait par les protéines d'adhésion (Daddi Oubekka, 2012).

4.4.2. Prolifération tissulaire

Après l'introduction du germe dans l'organisme, L'infection peut évoluer différemment en fonction de nombreux paramètres liés à l'agent infectieux lui-même et à l'état de l'organisme infecté. *S. aureus* sécrète de nombreuses enzymes extracellulaires qui lui permettent de détériorer les tissus de l'hôte et les toxines formant des pores qui peuvent lyser les membranes cytoplasmiques des cellules qui favorisent la multiplication et la propagation du pathogène (Daddi Oubekka, 2012; Rebiahi, 2012).

4.4.3. Contournement du système immunitaire

S. aureus est doté des facteurs qui lui permettent d'échapper au système de défense de l'hôte. Tout d'abord, il est partiellement protégé de la phagocytose grâce à la capsule polysaccharidique qui décore sa paroi externe, Ce pathogène produit des protéines CHIPS (Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococci), qui se lient à certains récepteurs de leucocytes et empêchent leur recrutement vers le site d'infection. De plus, la protéine A de *S. aureus* est capable de neutraliser les anticorps (Vincenot *et al.*, 2008; Chavakis *et al.*, 2007).

4.5. Les maladies causées par *Staphylococcus aureus*

S. aureus responsable de nombreuses type des maladies (Tableau 04), un diagnostic précis de ce type d'infection est important afin d'instaurer un traitement adéquat pour prévenir des complications éventuelles potentiellement sévères (Davido, 2010).

Tableau 04: Les maladies causées par les Staphylocoques (Rebiahi, 2012).

Infection de la peau et des tissus mous Furoncles, abcès Infection des plaies (traumatiques, chirurgicales) Cellulite Impétigo (aussi causé par les Streptocoque)
Bactériémies (souvent avec des abcès métastatiques)
Endocardites
Infection du système nerveux central Abcès du cerveau Méningite-rare Abcès épidural
Infection pulmonaire Embolie Aspiration
Muscles et squelette Ostéomyélite Arthrite
Tractus génito-urinaire Abcès rénal Infection du tractus urinaire infection
Maladie provoquées par des toxines Syndrome du choc toxique Intoxication alimentaire (gastroentérites)

4.6. Les infections à staphylocoques

S. aureus est l'une des principales bactéries pathogènes de l'homme qui elle entraîne un très large spectre d'infections suppuratives (cutanée, pulmonaire, cardiaque, osseuse, osteo-articulaire, etc.) et de maladies toxiques, aussi bien dans un contexte nosocomial que communautaire (Vandenesch, 2011).

4.6.1. Infection nosocomial

Une infection nosocomiale se définit comme une infection acquise dans un établissement de soins public ou privé (Gheraout-Benchouk, 2013), aussi c'est une réaction pathologique, causée par des microorganismes, dont l'origine est hospitalière. Elle peut concerner les personnes séjournant, visitant, ou travaillant à l'hôpital (Rebiahi, 2012).

Les services les plus touchés sont la réanimation, la chirurgie. De plus, il a été rapporté que 60 à 70% des infections nosocomiales sont liées à des manques d'hygiène et l'implantation de dispositifs médicaux (les cathéters veineux centraux, les sondes urinaires, les

prothèses orthopédiques, les dispositifs intra-utérins, et les lentilles de contact) (Daddi Oubekka, 2012).

4.6.2. Infection toxique

Les toxémies sont dues à des toxines produites par la souche in vivo, une fois installée chez l'hôte (TSST1 et exfoliatines) ou des toxines produites par la souche dans un environnement autre que l'hôte puis ingérées par l'organisme (Entérotoxine dans les aliments). En effet, l'ingestion de toxine en dehors de toute cellule bactérienne suffit à reproduire la maladie (Tableau 05)(Gras, 2006).

Tableau 05: Les toxi-infections staphylococciques et les toxines impliquées (Corne, 2004).

Infection	Toxine
Choc toxique staphylococcique	Toxine du choc staphylococcique 1 (TSST-1)
Maladie exfoliante généralisée	entérotoxine staphylococcique G et I (SEG et SEI)
Toxi-infection alimentaires	Exfoliatines A et B (ETA et ETB)
Pneumonie nécrosante	Entérotoxines staphylococciques A et M (SEA à SEM)
	Leucocidine de panton et valentine (LPV)

4.6.3. Infections suppuratives

Staphylococcus aureus, comme toute bactérie pyogène, est à l'origine d'infection suppurative, cette dernière implique une prolifération bactérienne, une invasion, une destruction des tissus de l'hôte et une réponse inflammatoire locale et systémique (Garnier et Denis, 2007). Les facteurs de virulence impliqués sont les protéines (Tableau 06) de surface qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte et les facteurs qui inhibent la phagocytose par les leucocytes (Tableau 6). Le staphylocoque est présent dans le site infectieux et le patient guérit de l'infection après élimination de la bactérie (Corne, 2004; Collomb, 2011).

Tableau 06 : Protéines de surface impliquées dans l'infection suppuratif (Corne, 2004).

Protéines	Sites de liaison	Pathogénie
Spa	Facteur Von Willebrand	Infection intravasculaire
Cna	épithélium voies aériennes	
FnBP	Collagène	Infection ostéo-articulaire
Clfa	Fibronectine	Infection sur corps étranger
EbhA, EbhB	Fibrinogène	Plaies, infection sur corps étranger
		endocardite

Chapitre 02: La résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique (Picot *et al.*, 2010). *Staphylococcus aureus* est un pathogène majeur de l'homme qui a la capacité d'entraîner un spectre très large d'infections. Initialement *S. aureus* est sensible à la quasi-totalité des antibiotiques mais progressivement s'adapte au développement de l'antibiothérapie en créant des mécanismes de résistance vis-à-vis de la plupart des produits, tout en manifestant une grande capacité de diffusion dans l'environnement (Descloux *et al.*, 2007).

1. Support génétique de *Staphylococcus aureus*

1.1. Structure du génome

Le génome de *S. aureus* consiste à un chromosome circulaire (Kafala, 1998), qui est conservés parmi les différentes souches, et d'autres éléments génétiques accessoires qui sont variables (plasmides, transposons, prophages, etc.) (Deghorain et Melderren, 2012).

Le chromosome circulaire est composé d'environ 2,8 millions de nucléotides et est environ mille fois plus petit que le génome humain (environ trois milliards de nucléotides). (Kuroda *et al.*, 2001).

La majeure partie du génome est composé des gènes présents dans toutes les souches qui codent pour des protéines impliquées dans des fonctions fondamentales telles que le métabolisme cellulaire, la croissance et la réplication. Environ 10% du génome est constitué d'ensembles de gènes qui varient entre les différentes lignées, entre 10% et 20% du génome se compose « des éléments génétiques mobiles » qui sont gagnés et perdus par des organismes à des fréquences élevées (Price *et al.*, 2013). Ces éléments mobiles, très souvent porteurs de résistances aux antibiotiques et autres facteurs de virulence apportant un avantage sélectif à la population bactérienne (Bouchard, 2013).

1.2. La cartographie génétique

La disponibilité des séquences du génome de *S. aureus* est grâce aux études qui ont tenté d'identifier les gènes essentielles soit pour la viabilité ou pour la capacité à provoquer les infections (Mingming Xia *et al.*, 1999).

Aujourd'hui, la cartographie chromosomique classique développée par rapport aux projets de séquençage génomique attire l'attention de la majorité des chercheurs.

Cependant, le travail magnifique de Kuroda *et al.*, (2001) qui ont dressés la carte génomique de *S. aureus*, représente une base extrêmement précieuse d'un projet de séquençage génomique chez cette bactérie. Ce travail consiste à séquencer le génome de deux souches de *S. aureus* (N315 et MU50). La souche N315 résistante à la méthicilline (SARM) a été isolée en 1982 à partir d'un frottis du pharynx d'un patient japonais et la souche MU50 SARM résistance à la vancomycine était obtenue en 1997 dans le pus d'un bébé de sexe masculin japonais avec une infection de la plaie chirurgicale. Les caractéristiques générales des génomes de N315 et de MU50 sont résumées dans le tableau 07.

Tableau 07: Les caractéristiques générales des génomes de *S. aureus* N315 et MU50 (Kuroda *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002).

	N315	Mu50
Chromosome		
Length of sequence (bp)	2 813 641	2 878 084
G+C content		
Total genome	32.8%	32.9%
Protein coding region	33.6%	33.6%
RNAs	49.5%	48.7%
Non-coding region	27.7%	27.8%
Open reading frames		
Percentage coding	84.5%	84.1%
Protein coding regions	2595	2697
Ribosomal RNAs		
16S	5	5
23S	5	5
5S	6	6
Transfer RNAs	62	60
tmRNAs	1	1
Insertion sequences		
IS1181	8	10
IS431	2	2
Others	10	11
Transposons		
Tn554	5	2
Others	0	1
Bacteriophages	1	2
SCCmec	1	1
Pathogenicity islands	3	3
Genomic islands	0	1
Plasmid		
Length of sequence (bp)	24 653	25 107
G+C content	28.7%	28.9%
Open reading frames		
Percentage coding	78.0%	80.9%
Protein coding regions	29	34

SCC=Staphylococcal cassette chromosome.

Les séquences de l'ensemble du génome de N315 et MU50 sont basées sur environ 64000 et 63000 séquences respectivement (Figure 09). Ils ont une faible teneur en G+C en moyenne 33%, l'identité des séquences nucléotidiques entre les deux souches est de 96%. La plupart des différences sont dues à l'insertion des éléments génétiques mobiles (Kuroda *et al.*, 2001).

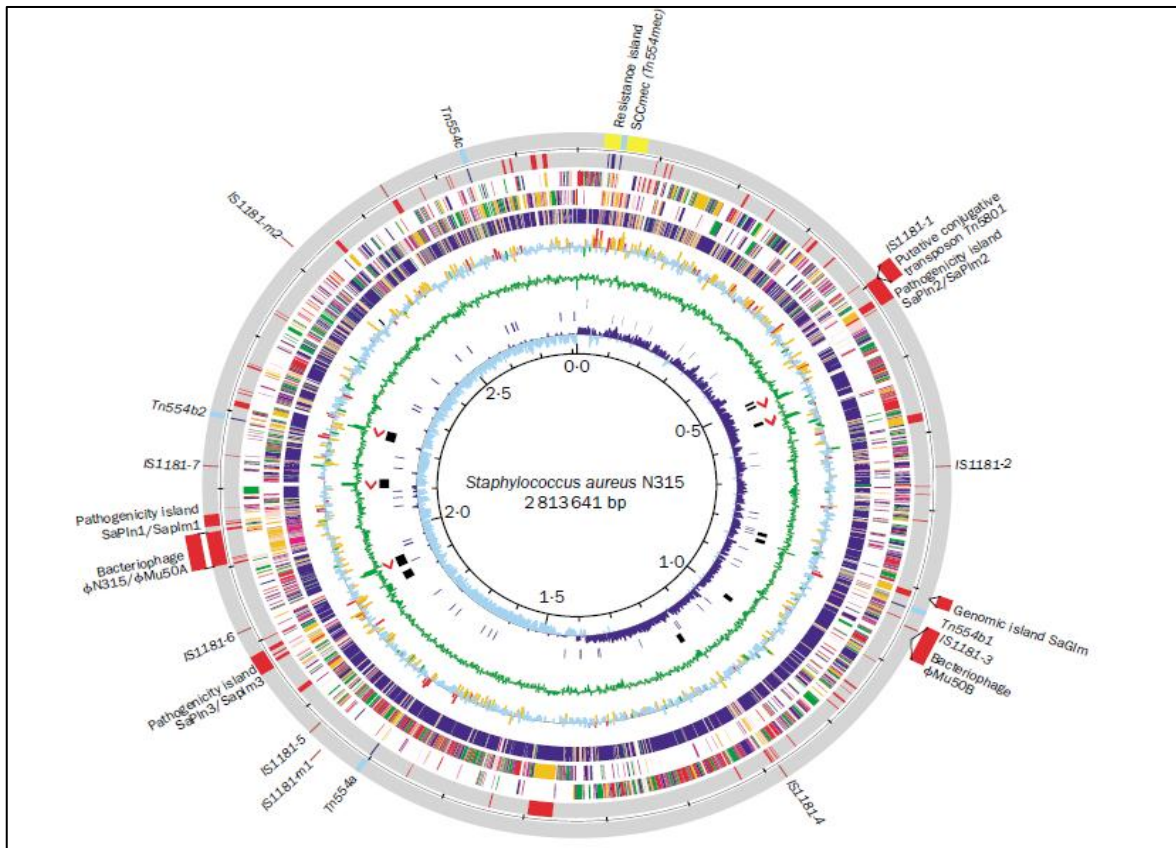


Figure 09: Représentation circulaire du chromosome du *S. aureus* (N315) et des éléments génétiques spécifiques (MU50) (Keiichi *et al.* 2001; Kuroda *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002).

Seuls les éléments spécifiques de MU50 sont illustrés dans le cercle extérieur.

Cercle extérieur = distribution des éléments génétiques mobiles (jaune: SCCmec; bleu clair: Tn554; rouges: phages et îlots de pathogénicité; marron: IS1181). Les cases rouges en cercle extérieur = emplacements des éléments MU50 spécifiques.

Deuxième cercle = every 100th open reading frame.

Troisième cercle = la pathogénicité (rouge) et les déterminants de résistance aux antibiotique (bleu).

Quatrième et cinquième cercles = régions prédit codantes pour des protéines.

Sixième cercle = la distribution taxonomique par BLAST (bleu: *Bacillus/Clostridium*; vert: Firmicutes; rose: Virus/insertion séquences/transposons; orange: Archaea/Eubactéries/Eucaryotes; blanche: sans succès ou ARN ribosomal et de transfert).

Septième cercle = contenu en GC à la troisième position de codon (GC3) et synonyme biais codon-utilisation de chaque cadre de lecture ouvert (vert, fortement exprimés; rouge, étranger putatif; orange, possible a lien basée sur GC3 biais, bleu, autre). Taille de la barre de colore correspond à l'écart de la valeur de GC3 de chaque trame de la moyenne de lecture ouvert.

Huitième cercle = distribution de contenu de GC avec la taille de la fenêtre d'un kb et l'incrément de déplacement de 1 kb. Flèche rouge = ARNr et son orientation. Les barres noires = emplacements des ARNt. Barres bleues = emplacements des séquences répétées de staphylocoque.

Neuvième cercle = le décalage de GC (bleu foncé: valeur positive; bleu clair: valeur négative).

Dixième cercle = position nucléotidique dans Mb.

Les principaux gènes de résistance aux antibiotiques chez (N315 et MU50): Les gènes de résistance aux antibiotiques identifiés dans le génome de N315 et MU50 sont énumérés dans le Tableau 08. Ils sont situés sur des plasmides ou autres éléments génétiques mobiles, y compris l'îlot de résistance (SCC *mec*) (Kuroda *et al.*, 2001).

Tableau 08: Les gènes de résistance aux antibiotiques identifiés chez les souches de *Staphylococcus aureus* N315 et MU50 (Kuroda *et al.*, 2001).

Gene name	Location	Function
<i>bleO</i>	SCC <i>mec</i>	Resistance to bleomycin
<i>mecA</i>	SCC <i>mec</i>	Resistance to β -lactams
<i>blaZ</i>	pN315	Hydrolysis of penicillins
<i>ermA</i>	<i>Tn554</i> in SCC <i>mec</i>	MLS resistance
<i>ermA</i>	<i>Tn554</i>	MLS resistance
<i>ant(4')</i>	SCC <i>mec</i>	Modification of aminoglycosides
<i>ant(9)</i>	<i>Tn554</i> in SCC <i>mec</i>	Modification of spectinomycin
<i>ant(9)</i>	<i>Tn554</i>	Modification of spectinomycin
<i>aacA-aphD</i>	<i>Tn4001</i> in pMu50	Modification of aminoglycosides
<i>tetM</i>	Putative conjugative transposon <i>Tn5801</i>	Resistance to tetracyclines
<i>qacA</i>	pMu50	Efflux-mediated antiseptic resistance

1.2.1. Les éléments génétiques mobiles

Les éléments génétiques mobiles sont typiquement identifiés comme des fragments d'ADN qui codent pour une série de déterminants de virulence et de résistance ainsi que les enzymes qui interviennent dans leur propre transfert (Frost *et al.*, 2002). *S. aureus* contient plusieurs types de ces éléments, y compris les plasmides, transposons (Tn), des séquences d'insertion (IS), les bactériophages, des îlots de pathogénicité, et les cassettes chromosomiques. Il est remarquable que la plupart des gènes codés par les éléments génétiques mobiles restent sous le contrôle des régulateurs universels situés dans le génome de base (Malachowa et Deleo, 2010).

1.2.1.1. Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires extra-chromosomiques capable d'autoréplication grâce à la machinerie moléculaire de l'hôte (Tremblay, 2007). Les staphylocoques portent typiquement une ou plusieurs par cellule, ces plasmides ont des contenus génétiques variés (Malachowa et Deleo, 2010). Les plasmides de *S. aureus* sont souvent porteurs de gènes de résistance et des gènes de virulence qui peuvent diffuser par le mécanisme de transfert horizontal de gènes (Mccarthy et Lindsay, 2012). Et permettent la circulation de matériels génétique entre les différents espèces bactérienne (Al-Hamdani *et al.*, 2012).

La résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques a été associée à des plasmides résistants (plasmides R) qui ont la capacité de la production des enzymes inactivées des médicaments tels que β -lactamases (Daini et Akano, 2009). Aussi autres résistances portés par les plasmides de *S. aureus* comprennent les aminosides, macrolides. Récemment, le séquençage des plasmides de *S. aureus* révélés des nouveaux gènes de résistance, comme le *apmA* et *vgaC* codant pour la résistance à l'apramycine et streptomycine respectivement (Mccarthy et Lindsay, 2012).

Le plasmide pSK41 détecté dans les souches de *S. aureus*, il conférer une résistance aux aminoglycosides, gentamicines, tobramycines et kanamycines, Au cours des prochains décennies, les nouveaux membres de cette famille de plasmide ont été identifiés par autre déterminants de la résistance abrités par diverses différents agents antimicrobiens, y compris pénicillines, mupirocines, triméthoprimes et vancomycines (Michael *et al.*, 2013).

Les plasmides staphylocoques peuvent également coder les gènes de toxines. Par exemple, un grand plasmide de 37.5 kb de *S. aureus*, pRW001, contient des gènes codant pour la toxine B exfoliative, bactériocine (Al-Hamdani *et al.*, 2012).

1.2.1.2. Bactériophages

Les bactériophages sont des virus infectant uniquement les bactéries présents se forme des parasites intracellulaires obligatoires (Duckworth, 1976). Tous les phages sont classés dans l'une des deux groupes distincts: Lytique et lysogénique, le premier cycle menant à la lyse de l'hôte suite à leur réplication de leur génome (phage virulent), dans le deuxième cycle, l'ADN de phage s'intègre au chromosome bactérien et se réplique passivement avec la cellule (El Haddad, 2010).

Les phages codent pour une grande partie des facteurs de virulence de *S. aureus* et de fournir à l'agent pathogène une grande variété de toxines, ce qui permet principalement d'échapper du système immunitaire de l'hôte. Des nombreux facteurs ont été décrits, Staphylokinase (SAK) responsable de la destruction des tissus de l'hôte, des Superantigènes qui sont des entérotoxines provoquant une intoxication alimentaire, et la Toxine exfoliative A (TEA) est impliqué dans les infections sévères de la peau (Deghorain et Melderne, 2012).

Autres phages ont également la capacité de transférer la résistance aux antibiotiques par transduction de plasmides ou des éléments de plasmide préalablement incorporés dans l'ADN chromosomique. Le plasmide pS194 de *S. aureus* est un facteur de résistance au chloramphénicol (Malachowa et Deleo, 2010).

Une étude comparative des génomes de trois phages tempérés de *S. aureus* 8325, effectuée par Iandolo *et al.*, (2002), parmi eux Φ 11 qui est un transducteur généralisé de chromosome et des gènes plasmidique, Φ 11 responsables de la transduction à haute fréquence de résistance à l'érythromycine et des particules expriment au cours de l'infection lytique par recombinaison avec l'ADN de phage.

1.2.1.3. Transposons

Les transposons sont des éléments d'ADN qui peuvent se déplacer d'un endroit à un autre entre les brins d'ADN, entre des plasmides, entre un plasmide et le chromosome bactérien ou entre un plasmide et un virus bactérien (bactériophage) (Tremblay, 2012).

La plupart des transposons sont capables de provoquer des mutations générées par leur insertion dans un nouveau site (Lea Hruska, 1993). Les transposons de *S. aureus* codent en majorité des gènes de résistance aux antibiotiques, ce groupe comprend Tn554, Tn552 et Tn4001, qui codent des gènes de résistance y compris, spectinomycine, macrolide, lincosamide, streptogramin B pour le Tn 554, pénicillinase pour Tn 552 et gentamicine pour Tn4001. Par comparaison, dans les grands transposons (> 18 kb) sont présents des gènes de résistance pour tétracycline, triméthoprim, aminosides, ou vancomycine (Saulnier et Andremon, 1997; Kuroda *et al.*, 2001; Malachowa et Deleo, 2010).

1.2.1.4. Ilots de pathogénicité

Les îlots de pathogénie (IPA) sont très répandus dans le génome de *S. aureus* (figure 09). Ils sont distincts des segments d'ADN chromosomique qui ont été acquis par transfert horizontal. Certains des IPA ne sont pas mobiles par eux-mêmes et s'appuient sur un phage auxiliaire (Deghorain et Melderne, 2012). Ils sont absents dans les micro-organismes non pathogènes de la même espèce. Ils occupent généralement de larges régions génomiques contribuant à la virulence. Les IPA sont des éléments génétiques entourés de répétitions directes, des séquences d'insertion ou de gènes de l'ARN de transfert, lesquels sont des sites pour la recombinaison dans l'ADN génomique (Tremblay, 2012).

Îlots de pathogénicité des staphylocoques sont des éléments génétiques mobiles de 14-17 Kb intégrés dans l'un des six sites spécifiques différents sur le chromosome. Ils peuvent être mobilisés suite à l'infection par certains bactériophages staphylocoques ou par induction de prophages endogènes. Ils codent des gènes essentiels pour des protéines régulatrices de la transcription et une région codant des intergrases. En plus de gènes de base, des entérotoxines ou toxine du syndrome de choc toxique (TSST) (Malachowa et Deleo, 2010). Les îlots de pathogénicité codent aussi des gènes de résistance aux antibiotiques comme l'acide fusidique (Denis, 2010).

2. Type de résistances aux antibiotiques chez les *Staphylococcus aureus*

La résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques repose sur deux grands types de mécanisme, la résistance naturelle et la résistance acquise.

2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien (Stalder, 2012). Elle est stable, transmise à la descendance (support génétique est le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (Lozniewski *et al.*, 2010).

Les staphylocoques présentent une résistance naturelle aux mécillinam, aztréonam, quinolones classiques, colistine (Peyrou, 2001; Merlet, 2010). Et plus précisément *S. aureus* résiste naturellement à la polymyxine B (Leclercq *et al.*, 1990), aussi il résiste aux pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames (Robert, 2013).

Par contre, d'autres chercheurs comme Vieu, (2014), ont classé le staphylocoque doré parmi les espèces dépourvues des résistances naturelles mais l'utilisation massive des antibiotiques responsable de l'émergence de bactéries résistantes à ces molécules.

2.2. Résistance acquise

La résistance acquise correspond à l'acquisition d'une résistance par une souche normalement sensible à l'antibiotique concerné (Stalder, 2012). Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien (Lozniewski *et al.*, 2010).

L'usage de plus en plus répandu des antibiotiques a permis de l'évolution de la résistance bactérienne. Cette évolution s'est traduite par la dissémination de gènes de résistance par différent mécanisme (figure 10) connus à des espèces au paravent sensibles, ainsi que par l'émergence de nouveaux caractères de résistance (Brisson-Noé *et al.*, 1988).

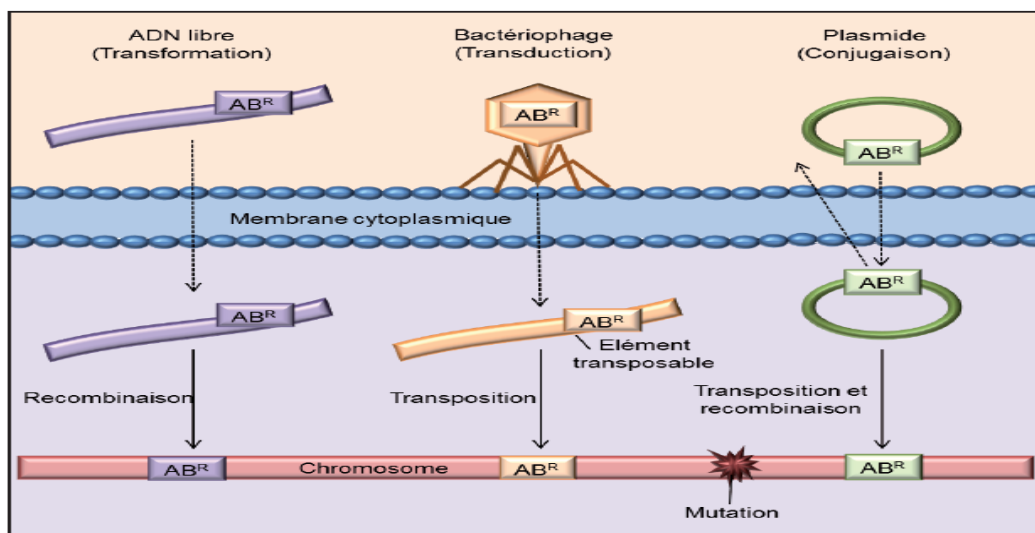


Figure 10: Voies d'acquisition des éléments génétiques mobiles (Muylaert et Mainil, 2012).

L'apparition de la résistance acquise chez les bactéries est associée à deux phénomènes: les mutations ou le transfert horizontal de gènes (Stalder, 2012) (Figure 10).

➤ **Mutations** (Evolution vertical)

Il s'agit d'erreurs lors de la réplication. Elles sont rares et aléatoires, mais stables et héréditaires (Collomb, 2011). La mutation chromosomique constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20 % des bactéries. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action. L'utilisation d'une association de deux ou de plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. Par exemple, la résistance à la rifampicine et aux quinolones résulte toujours d'une mutation (Carle, 2009; Stalder, 2012).

➤ **Transfert horizontal de gènes**

Des nombreux plasmides de résistance sont conjuguatifs ou mobilisables ce qui permet un transfert horizontal, ces transferts sont à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes ce qui fait qualifier la résistance plasmidique de "contagieuse ou d'infectieuse". Les plasmides de résistance sont susceptibles d'évoluer par acquisition ou pertes successives de déterminants de résistance portés par des éléments génétiques transposables (Lozniewski *et al.*, 2010). Ces plasmides

peuvent être incorporés dans des éléments génétiques mobiles: Les transposons et les intégrons (Bonnet, 2014).

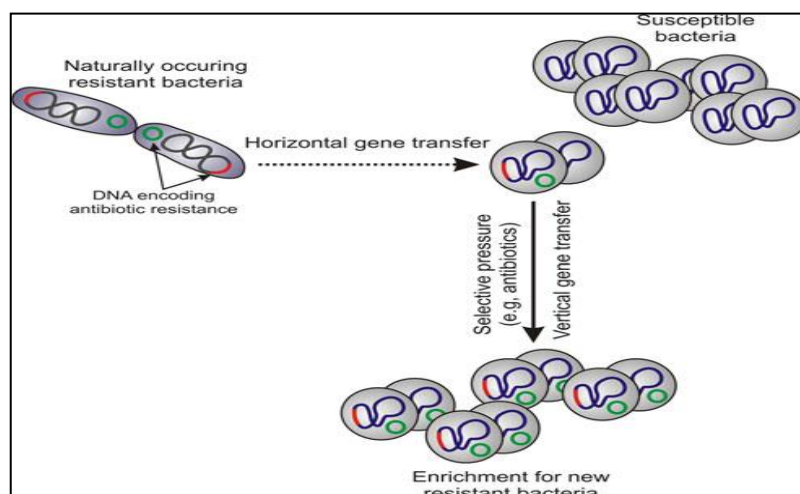


Figure 11 : Le transfert génétique horizontal et vertical (Malachowa et Deleo, 2010).

Actuellement 3 modes de transfert horizontal de gènes permettant le mouvement d'ADN d'une cellule à une autre sont connus: la transformation, la transduction et la conjugaison (Stalder, 2012; Bonnet, 2014).

- **Transformation**

Premier mécanisme de transfert horizontal décrit chez les procaryotes, ce processus permet à l'acquisition et l'incorporation d'ADN libre dans l'environnement (Carle, 2009). En effet, l'ADN absorbé, contient éventuellement des gènes de résistance vis-à-vis de différents antibiotiques, peut être récupéré par transformation et incorporé par recombinaison dans le génome des bactéries compétentes présentes dans le milieu (Muylaert et Mainil, 2012).

La compétence des bactéries est un phénomène lié à la perméabilité de la membrane qui peut être induit (par des chocs électriques ou des agents chimiques) ou se retrouver naturellement chez certaines espèces comme *Neisseria* spp. D'autres genres comme *Staphylococcus* et *Bacillus* utilisent aussi la transformation, mais seulement à certaines étapes de leur croissance (Tremblay, 2007).

En raison de la capacité limitée de *S. aureus* à acquérir à partir de l'ADN de l'environnement (faible compétence naturelle), la majeure partie du transfert intercellulaire de plasmides staphylococciques a lieu par conjugaison ou par transduction (Morikawa *et al.*, 2003).

• Conjugaison

La conjugaison est un processus au cours duquel l'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par un mécanisme complexe nécessitant un étroit contact cellulaire (Carle, 2009). Elle permet notamment du transfert horizontal des plasmides qui représentent le principal support génétique de gènes de résistance aux antibiotiques, aussi probablement est le mécanisme le plus important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Doublet *et al.*, 2012; Stalder, 2012).

Plus récemment, *S. aureus* acquis par conjugaison des éléments de résistance à la vancomycine à partir des entérocoques, entraînant l'émergence de *S. aureus* résistants à la vancomycine (SARV) (Malachowa et Deleo, 2010).

Une étude réalisée par Brien *et al.*, (2014), montre que l'émergence de la résistance aux antibiotiques menace le contrôle de la maladie infectieuse causée par *S. aureus*. Cette enquête a introduit la conjugaison de la résistance aux antibiotiques par différents plasmides parmi eux pWBG749 portant Tn551 peut conjuguer dans la population de *S. aureus* et mobiliser la résistance aux antimicrobiens des plasmides indépendants (plasmide non transféré) (figure 12).

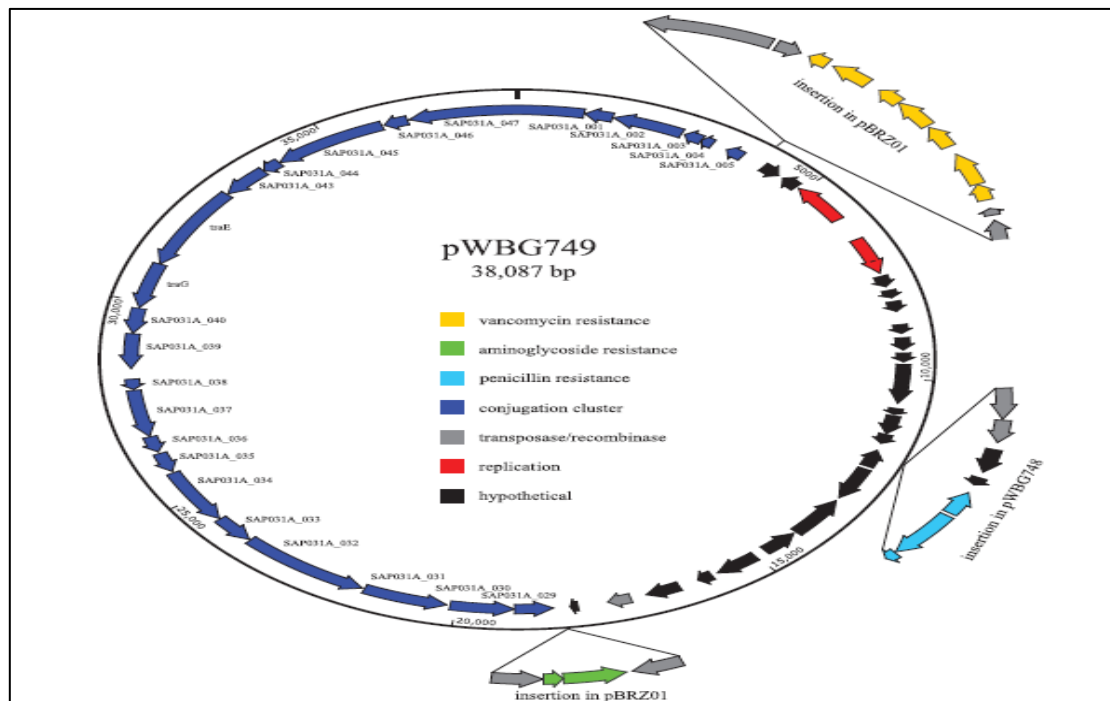


Figure 12: Carte circulaire du plasmide conjuguatif pWBG749 avec des points d'insertion pour les déterminants de la résistance aux antimicrobiens trouvés dans les plasmides non conjuguatifs pBRZ01 et pWBG748. pWBG749 (Brien *et al.*, 2014).

- **Transduction**

La transduction est un mécanisme de transfert de gènes, dont le vecteur est un virus bactérien appelé bactériophage. Ce mécanisme permet le transfert d'information génétique entre bactéries appartenant essentiellement à la même espèce. (Carle, 2009; Bonnet, 2014)

Les prophages créent une mobilité de certains îlots de pathogénicité des staphylocoques. L'exemple le plus commun est la capacité du phage auxiliaire 80 α d'excision et de servir le médiateur de transfert d'autres staphylocoques SaPI1. Les phages ont également la capacité de transférer la résistance aux antibiotiques par transduction de plasmides ou des éléments de plasmide préalablement incorporés dans l'ADN chromosomique. Chez *S. aureus* le plasmide pS194 avec un facteur de résistance au chloramphénicol et pI258 contenant résistance à l'érythromycine sont transduites par des phages Φ 11 et Φ 11 2, respectivement (Malachowa et Deleo, 2010).

3. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques chez les *Staphylococcus aureus*

Les gènes qui codent pour les mécanismes de résistance peuvent faire partie du patrimoine chromosomique de la bactérie, ou au contraire appartenir à un élément mobile, cela explique en partie la facilité d'adaptation vis-à-vis des antibiotiques (Fournier, 2006).

3.1. Béta lactamines

Les antibiotiques de la famille de β -lactamines sont les plus largement utilisés, en raison de leur activité élevée et de leur absence presque totale d'effets secondaires (Tankovic *et al.*, 1997). Cette famille comprend un grand nombre des molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame indispensable à l'activité des antibiotiques (figure 13) (Cavallo *et al.*, 2004).

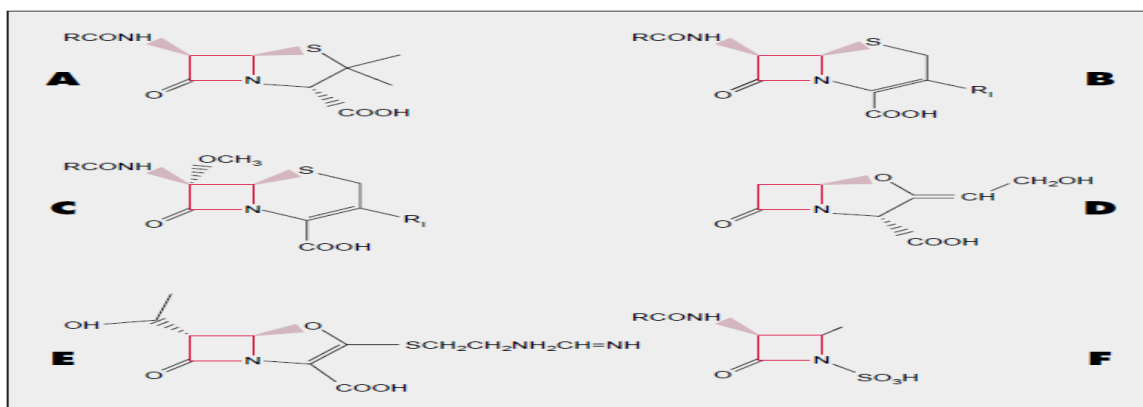


Figure 13: Structures de quelques β -lactamines. **A:** pénicillines, **B:** céphalosporines, **C:** céphamycines, **D:** acide clavulanique, **E:** imipénème (carbapénèmes), **F:** monobactames. (Charlier *et al.*, 1998)

3.1.1. Mécanisme d'action

Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action: Elles assurent une inhibition compétitive de la transpeptidase en se fixant de façon covalente, ceci est rendu possible par le fait que ces antibiotiques ont une analogie structurale importante avec la séquence terminale D-Alanyl -D-Alanine du pont qui relie les chaînes glycaniques, cette séquence ayant le substrat de la transpeptidase. Cette fixation (β -lactamines sur transpeptidase) va empêcher la réaction de transpeptidation (la polymérisation de la paroi bactérienne), donc altérer la structure de la paroi en la rendant notamment moins stable, plus fragile et incapable de résister à la pression osmotique interne très élevée. Ceci provoquera secondairement la lyse de la bactérie. Les transpeptidase, sont appelées protéines liant la pénicilline (PLP) et sont donné les cibles des β -lactamines (Berger-Bâchi, 1997; Sevin *et al.*, 1999; Cavallo *et al.*, 2004; Nour *et al.*, 2005).

3.1.2. Résistance à la pénicilline

Les staphylocoques s'adaptent rapidement à l'utilisation des bêta-lactamines en thérapeutique par le développement de résistances. Une β -lactamase est une enzyme qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines, les rendant inactives. Cette résistance implique aussi une résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline, la ticarcilline et à la pipéracilline (Quincampoix et Mainardi, 2001; Gangoue-Pieboji, 2007). Actuellement, plus de 90% des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline (Leclercq, 2002).

Le gène *blaZ* codant pour les pénicillinases de staphylocoque peut être porté par le chromosome ou des plasmides, parfois par des transposons ou des intégrons. La présence

des gènes sur ces éléments génétiques transférables facilite évidemment leur dispersion dans le monde bactérien (Charlier *et al.*, 1998).

Un opéron présent sur un plasmide de *S. aureus* dont sa fonction est la production de pénicillinase. L'opéron est composé de trois gènes: *blaZ*, codant pour pénicillinase et ses gènes régulateurs de transcription, *blaR1* et *Blai*. Lorsque la pénicilline traverse la membrane bactérienne, la protéine de transduction de signal membranaire *blaR1* reconnaît et transmet le signal vers le cytoplasme. Ensuite, la protéine *Blai*, qui se lie à proximité du promoteur de *blaZ* empêchant sa transcription, est clivée, laissant *blaZ* être transcrit pour produire efficacement la pénicillinase (Baba *et al.*, 2002).

3.1.3. Résistance à la méthicilline

Cette résistance est conférée par l'acquisition d'une cassette chromosomique *SCCmec* portant le gène *mecA*, qui code une protéine membranaire additionnelle (PLP2a) dont l'affinité pour les bêta-lactamines est très faible, entraînant une résistance croisée à toutes les molécules de cette famille (Marisa *et al.*, 2012). L'élément *SCCmec* peut exister dans les staphylocoques indépendamment du gène *mecA*. De même, le gène *mecA* peut exister en absence de *SCCmec* dans *S. aureus* (Hanssen *et al.*, 2004).

S. aureus produit 4 types de PLPs impliquées dans la transpeptidation: PLP1 à PLP4, mais la résistance à la méthicilline chez *S. aureus* nécessite la production d'une 5^{ème} PLP appelée PLP2a codé par le gène *mecA* présentant peu d'affinité pour la méthicilline et toutes les autres β -lactamines par rapport aux PLPs normales (Liesse Iyamba, 2012).

Le *SCCmec* correspond à un fragment d'ADN de 21 à 67 kb intégré dans le chromosome de SARM à un site unique localisé près de l'origine de réplication du chromosome bactérien (Nour *et al.*, 2004). Le *mec* ADN présentait des sites d'attachement pour des transposons et des séquences d'insertion pouvant capter des gènes de résistance à d'autres antibiotiques que les bêta-lactamines (Haidara, 2010; Mastouri *et al.*, (2006).

Dix types de *SCCmec* portant le gène *mecA* sont identifiés. Certains sont responsables d'une résistance isolée aux bêta-lactamines (*SCCmec* I, IV, V, VI et VII), alors que d'autres responsables de la multirésistance (fluoroquinolones, macrolides, lincosamides, aminosides, tétracyclines) (Tattevin, 2011; Perez, 2013). Pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes de certaines souches de *S. aureus* (Raymond et Bergeret, 2007).

Les hypothèses la plus probable quant à l'origine du gène *mecA* sont:

- ✓ La fusion du gène codant pour β -lactamases staphylococcique et d'un gène codant pour une PLP ancestrale d'origine inconnue. Cet évènement initial serait apparu chez une souche de staphylocoque à coagulase négative. Le gène ainsi formé aurait ensuite disséminé par transposition au sein des différentes espèces de staphylocoques (Sevin *et al.*, 1999).
- ✓ Le SCC*mec* n'a été retrouvé que dans le genre *Staphylococcus* mais le premier donneur demeure toujours inconnu. Néanmoins, *S. sciuri* a une PLP intrinsèque présentant 87.8% d'homologie avec la PLP2a codée par le gène *mecA*. Ces observations suggèrent que le gène codant pour cette PLP de *S. sciuri* serait le précurseur du *mecA* de *S. aureus* (Nour *et al.*, 2004).

A côté de ces mécanismes de résistance fréquents, d'autres mécanismes beaucoup plus rares conférant une résistance de bas niveau à méthicilline et non liés au gène *mecA* ont été décrits chez des souches qui n'ont en général pas de multirésistance associée. Ce bas niveau de résistance à méthicilline en l'absence du gène *mecA* peut être lié soit à l'hyperproduction de la pénicillinase plasmidique, soit à des modifications des PLP1 et 2 indépendantes de la PLP2a (Cavallo *et al.*, 2004). Autre mécanisme de résistance au méthicilline beaucoup plus rares par la production de méthicillinase (Sevin *et al.*, 1999; Hamdad *et al.*, 2006).

3.2. Glycopeptides

Les glycopeptides sont des molécules de haut poids moléculaire comportent un noyau central peptidique de sept acides aminés (Léone *et al.*, 2000). Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) constituent le traitement de choix dans les infections à SARM (Mainardi, 1997; Leclercq et Cattoir, 2012). Ils présentent de nombreuses limitations: une bactéricidie lente, une fluctuation de CMI, une faible pénétration intracellulaire, une toxicité potentielle, et enfin le développement de la résistance souvent associée à un échec thérapeutique (Liesse Iyamba, 2012).

3.2.1. Mécanisme d'action

Ces antibiotiques inhibent la synthèse du composant essentiel de la paroi; le peptidoglycane, en se liant à son précurseur; la (D-alanyl-D-alanine) (Figure 14). La liaison est due à l'affinité des glycopeptides pour l'acide amine terminal du précurseur, Cet dernière après avoir été synthétisés dans le cytoplasme bactérien, sont transportés à travers

la membrane cytoplasmique pour finalement être branchés par des enzymes (transglycosylases et transpeptidases) au peptidoglycane en cours d'élongation (Diallo, 2007; Leclercq et Cattoir, 2012). Ces deux enzymes clivent la liaison D-alanyl-D-alanine, puis relient la D-ala avec l'acide aminé porté par un pentapeptide d'une autre chaîne polysaccharidique (Léone *et al.*, 2000).

La fixation des glycopeptides au D-alanyl-D-alanine libres de la chaîne polysaccharidique provoque un arrêt de synthèse de peptidoglycane et par la suite bloque la croissance cellulaire (Montcriol *et al.*, 2003).

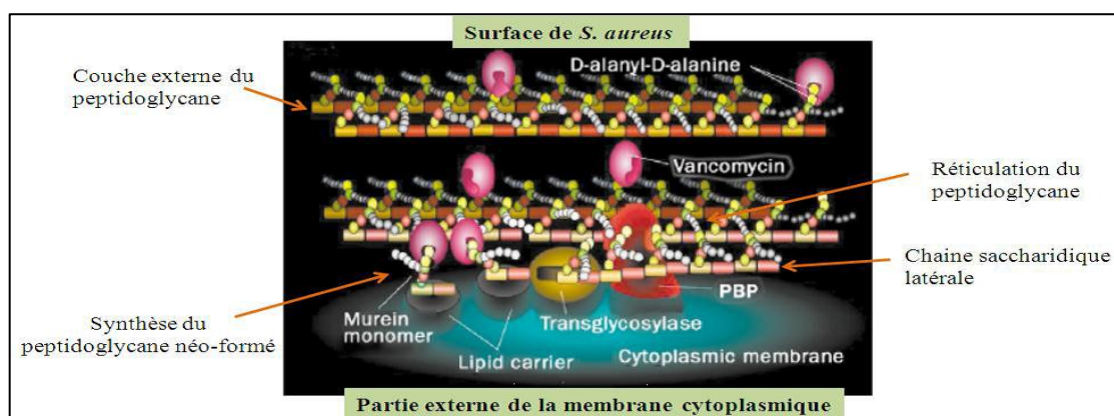


Figure 14: Épaississement de la paroi des souches de *S. aureus* de sensibilité intermédiaire à la vancomycine (VISA) (Rebiahi, 2012).

3.2.2. Mécanisme de résistance

La résistance aux glycopeptides chez *S. aureus* pourrait être liée à une diversité de mécanismes moléculaires responsables de la réorganisation de la structure de la paroi bactérienne (Joly-Guillou, 2004).

Le mécanisme qui confère une résistance de haut niveau aux glycopeptides, résulte de l'acquisition d'un gène exogène *vanA*. Ce gène est le plus fréquemment rencontré chez les entérocoques et, à ce jour, il reste le seul détecté chez *S. aureus*. Ce type de souche est également résistant à la teicoplanine (Aouati 2009; Pérez, 2013). L'acquisition de ce gène implique généralement le transfert horizontal entre *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* (figure 15) d'un plasmide conjugatif contenant le transposon *Tn1546* (Roy, 1997). Le staphylocoque doré détruit à son tour le plasmide étranger mais intègre le gène de résistance dans son propre plasmide (Rebiahi, 2012).

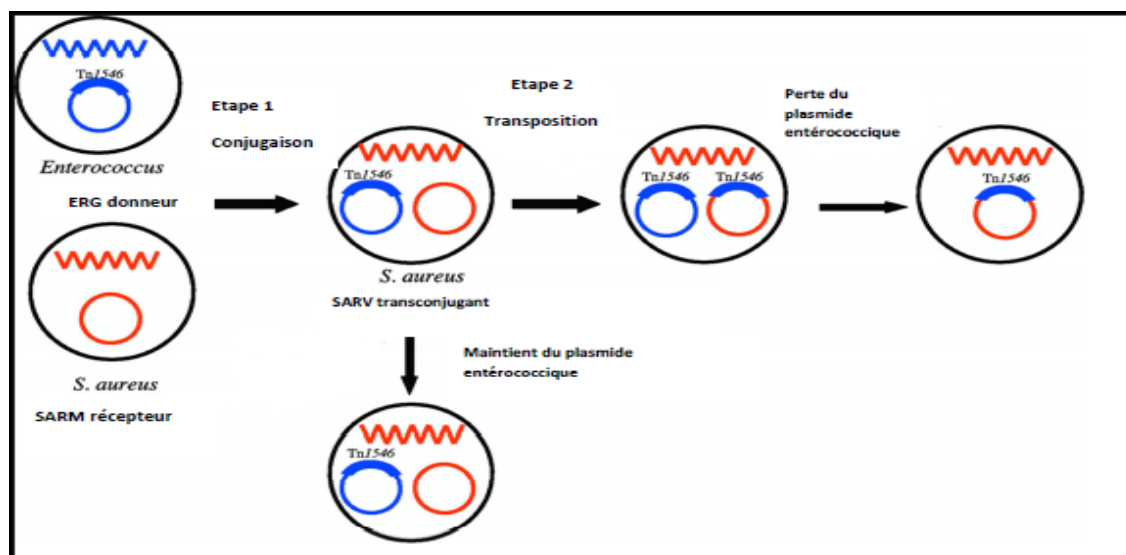


Figure 15: Représentation schématique du transfert du transposon *Tn1546* provenant d'une souche d'*Enterococcus spp.* Vers *S. aureus* (Périchon et Courvalin, 2009). Les Zigzag rouge et bleu représentent respectivement l'ADN chromosomique d'*Enterococcus* et *S. aureus*. Cercle Bleu : plasmide entérococcique avec une haute fréquence de transfert. Cercle rouge: plasmide staphylococcique. ERG: *Enterococcus* résistant aux glycopeptides SARV: *S. aureus* résistant à la vancomycine. SARM: *S. aureus* résistant à la méthicilline.

Expression de ce gène entraîne la formation, à la place des résidus D-alanine-D-alanine, de résidus D-alanine-D-lactate présentant une faible affinité pour la vancomycine et à un moindre degré pour la teicoplanine (Figure 16) (Montcriol, 2003).

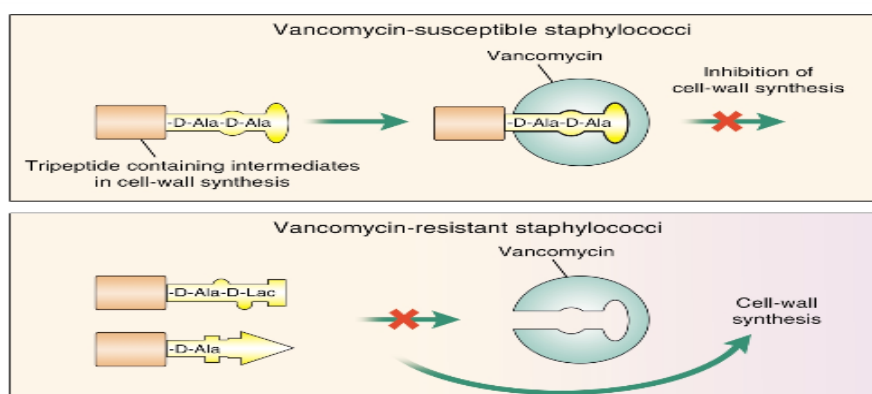


Figure 16: Mécanismes d'action de la vancomycine et la résistance de *S. aureus* (Liesse Iyamba, 2012).

3.3. Macrolides, Lincosamides et Streptogramines

Les macrolides constituent avec les lincosamides et les streptogramines une famille d'antibiotiques, les MLS, de structures différentes mais présentant des mécanismes d'action et un spectre antibactérien similaire (Prunier, 2004). Les macrolides (érythromycine) et les lincosamide (lincomycine et clindamycine) n'ont qu'une activité bactériostatique sur les staphylocoques alors que les streptogramines (pristinamycine), possédant une activité bactéricide (Lachgueur, 2013).

3.3.1. Mécanisme d'action

Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse protéique qui agissent lors de l'élongation des chaînes peptidiques (Tankovic *et al.*, 1997). Ils stimulent la dissociation du ribosome et du complexe ARNt. Cela entraîne une terminaison réversible de l'élongation protéique (Quincampoix et Mainardi, 2001). Elles se fixent à la sous-unité 50S ribosomale au niveau de l'ARNr 23S (Labrecque, 2007).

3.3.2. Mécanisme de résistance

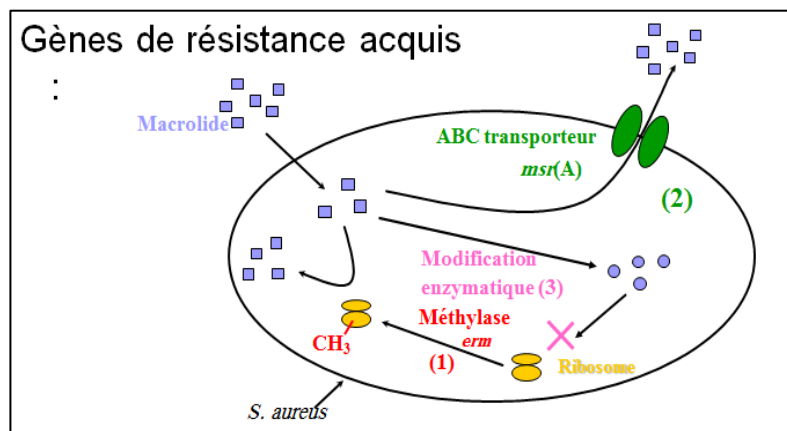


Figure 17: Les mécanismes de résistance de *S. aureus* aux macrolides (Prunier, 2004)

Trois mécanismes de résistance au MLS sont impliqués chez *S. aureus* (Figure 17):

➤ Résistance par modification de la cible de l'antibiotique

Chez *S. aureus*, cette résistance correspond à une méthylation d'une adénine de l'ARNr 23S de la sous-unité ribosomale 50S (Prunier, 2004; Labrecque, 2007). Ce nucléotide est un point de contact essentiel pour les MLS. Sa modification réduit l'affinité de

l'antibiotique pour sa cible soit en empêchant son accès soit en modifiant la structure du site de fixation (Canu et Leclercq, 2002). Ces méthylases sont codées par les gènes *erm* possèdent un support chromosomique ou plasmidique (Quincampoix et Mainardi, 2001).

La résistance conférée chez *S. aureus* est croisée entre l'ensemble des macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, (Tankovic *et al.*, 1997). Cette résistance peut être constitutive, résistance à toutes les molécules du groupe, ou inducible, résistance aux macrolides uniquement (Labrecque, 2007)

➤ Résistance par enzymes inactivatrices

Ces enzymes, qui modifient l'antibiotique lui-même, peuvent appartenir à la classe des hydrolases (gènes *vgb* et *vgbB*), des acétyltransférases (gènes *linA* et *vat*) ou des phosphotransférases (gène *mphC*). Le support de ces gènes est souvent plasmidique (Lachgueur, 2013).

➤ Résistance par efflux

Chez les *S. aureus*, les gènes *msrA* et *msrB* sont les principaux codant pour des pompes à efflux pour la résistance aux MLS et sont portés par un plasmide (Labrecque, 2007).

Par ailleurs, des gènes spécifiques de la résistance aux streptogramines A, *vga* codant les protéines d'efflux, ont été détectés chez *S. aureus*, mais ceux-ci n'empêchent pas l'activité synergique de l'association streptogramines A et B (Quincampoix et Mainardi, 2001; Prunier, 2004).

Tableau 09: Principaux mécanismes de résistances aux macrolides, les lincosamides et les streptogramines B chez *S. aureus* (Tankovic *et al.*, 1997).

Mécanisme	Génotype	Phénotype	Ery ^a	Spi	Lin	Cli	Pri I	Pri II	Pri
Modification de cible	<i>erm</i> (inductible)	MLS _{Bi}	R	S	S	S	S	S	S
	<i>erm</i> (constitutif)	MLS _{Bc}	R	R	R	R	R	S	(s) ^b
Inactivation	ND ^c	Em	R	R	S	S	ND	ND	ND
	<i>linA-linA'</i>	L	S	S	R	(s)	S	S	S
	<i>vat, vatB</i>	(L) SA	S	S	S/I/R	S/I/R	S	R	(s)/R
	<i>vgb</i>	S _B	S	S	S	S	R	S	ND
Efflux actif	<i>msrA</i>	Em	R	S	S	S	S ^c	S	S
	<i>vga</i>	(L) SA	S	S	S/I/R	S/I/R	S	R	(s)/R

Ery: Erythromycine; **Spi:** Spiramycine; **lin:** lincosamides; **Clin:** Clindamycine; **Pri I:** Pristinamicine Facteur I; **Pri II:** Pristinamicine Facteur II; **S:** Sensible; **I:** Intermédiaire; **R:** Résistant; **ND:** Non déterminé.

3.4. Aminosides

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides contrairement aux autres antibiotiques inhibiteurs de synthèse protéique (Leclercq *et al.*, 1990). Ils se répartissent en deux groupes chimiquement distincts: le groupe de la streptidine (comprenant la streptomycine) et le groupe de la 2-désoxystreptamine (kanamycine, gentamicine, amikacine, nétilmicine). Cette classe d'antibiotique a naturellement tué les staphylocoques (Quincampoix et Mainardi, 2001).

3.4.1. Mécanisme d'action

L'effet majeur est la fixation irréversible sur l'ARNr 16S de la sous-unité 30S du ribosome bactérien, interférant dans la synthèse protéique au niveau du site A (site accepteur de l'ARNt). Il y a donc inhibition de la synthèse au stade de l'initiation, l'élongation, et la terminaison, avec synthèse de protéines non fonctionnelles (Asseray et Madani, 2006). Ils inhibent également la réplication de l'ADN et dégradent les ARN. De plus les aminosides altèrent la membrane cytoplasmique (Leclercq, 2002).

3.4.2. Mécanisme de résistance

S. aureus résiste aux aminosides par le biais de trois enzymes modifiant leur structure et empêche sa fixation sur la cible (Leclercq, 2002; Ficca *et al.*, 2006; Labrecque, 2007)

- **Aminoglycosides acétyltransférases (AAC):** La résistance à la gentamicine, tobramycine et kanamycine est médiée par le gène *aac* qui code pour une enzyme ayant un effet AAC. Ce gène est situé sur un transposon, le *Tn4001*. Le *Tn4001* se retrouve sur des plasmides et sur le chromosome.
- **Aminoglycosides adényltransférases (ANT):** La résistance à la néomycine, kanamycine et tobramycine et à l'amikacine est médiée par l'enzyme ANT codée par le gène *ant*. Ce gène est retrouvé sur des plasmides de faibles poids moléculaires et parfois en combinaison avec le gène *mecA*.
- **Aminoglycosides phosphotransférases (APH):** la résistance pour la néomycine et la kanamycine est également médiée par une enzyme APH codée par le gène *aph* situé sur un chromosome et sur un plasmide.

3.5. Fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des molécules obtenues par synthèse chimique avec un large spectre d'action (Van Bambeke, 2008). Cette molécule obtenue par la fixation d'un groupement fluor sur le noyau quinolone. Les quinolones sont classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et de leur date de mise sur le marché. Les premières quinolones, dites de première génération (ex. acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique) (Kesteman, 2009). Par la suite tous les dérivés synthétisés par la suite sont désignés « fluoroquinolones » du fait de la présence d'un atome de fluor en position C6 (Cattoir, 2012).

3.5.1. Mode d'action

Les fluoroquinolones inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la réplication de l'ADN. Ces molécules ont une action ciblée sur les topo-isomérases. Les topo-isomérases regroupent les topo-isomérases de classe II: les gyrases, constituées de deux sous-unités *GyrA* et *GyrB* (codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*) permettre le surenroulement de l'ADN, ce qui permet une réduction de l'espace occupé par l'ADN dans la cellule, et par les topo-isomérases de classe IV (composées de deux sous-unités codées par les gènes *grlA* et *grlB*) qui entraînent un désenchevêtrement de l'ADN à la fin de la réplication (Tankovic *et al*, 1997; Labrecque, 2007; Lachgueur, 2013).

Les fluoroquinolones interagissent avec le complexe enzyme-ADN (la gyrase ou la topo-isomérase IV), ceci crée des changements conformationnels qui entraînent l'inhibition de l'activité normale de l'enzyme. La mort cellulaire induite par les fluoroquinolones passe par deux étapes. La première est réversible (bactériostatique), elle consiste au blocage la progression de la fourche de réplication et inhibe ainsi la synthèse de l'ADN bactérien, la seconde étape, qui conduit à la fragmentation des chromosomes (Kesteman, 2009).

3.5.2. Mode de résistance

Trois mécanismes de résistance aux fluoroquinolones sont impliqués essentiellement chez *S. aureus* (Quincampoix et Mainard, 2001).

- la modification de la cible qui implique une mutation au niveau des gènes chromosomique *grlA* ou *grlB* de la topo-isomérase IV.
- l'altération des sous-unités A ou B de la gyrase par introduction d'une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*.

- pompes à efflux grâce à une protéine transmembranaire codée par le gène *norA*, chromosomique.

La résistance aux fluoroquinolones est croisée entre les différentes molécules. Chez les SAMR, le taux de résistance est supérieur à 90 % (Lachgueur, 20013).

3.6. Autres antibiotiques

- **La rifampicine**

La rifampicine est très active sur *S. aureus*, elle possède un effet bactéricide. La rifampicine inhibe l'ARN polymérase intervient dans la transcription de l'ADN. Des mutations au sein du gène chromosomique *rpoB* codant la chaîne bêta de l'ARN polymérase sont responsables du phénotype de résistance à cet antibiotique (Daurela et Leclercq, 2008).

- **La Fosfomycine**

Cet antibiotique agit au début de la synthèse du peptidoglycane en inhibant une enzyme, la pyruvyl-transférase. La fosfomycine pénètre dans le cytoplasme bactérien par deux systèmes de transport actif : celui des L-a glycéro-phosphates et celui des hexoses-phosphates. La résistance à la fosfomycine rapportées est le fait de mutation qui a été décrite chez *S. aureus* portant sur le transport de l'antibiotique, grâce au gène *fosB* qui est porté chez *S. aureus* par des petits plasmides de 2,7 Kb (Tankovic et al., 1997).

- **L'Acide fusidique**

L'acide fusidique inhibe la synthèse protéique en interférant avec une GTPase (facteur d'élongation G (EF-G)), empêchant la progression de la chaîne polypeptidique au niveau du ribosome. Il existe deux mécanismes de résistance à cet antibiotique chez *S. aureus*: mutation dans le gène *fusA* codant le facteur d'élongation G ou diminution de la perméabilité. (Tankovic et al., 1997; Daurela et Leclercq, 2008).

Tableau 10: Mécanismes de la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques

Antibiotiques		Gènes de résistance	Produit de gène	Mécanismes de résistance	Site de gène	Références
β-lactamines		<i>blaZ</i>	β-lactamase	Hydrolyse le cycle β-lactame des antibiotiques.	Tn, Pl, C	Charlier <i>et al.</i> , (1998)
		<i>mecA</i>	PLP2a	Une affinité réduite pour l'antibiotique.	C:SCCm	Marisa <i>et al.</i> , (2012); Hanssen <i>et al.</i> , (2004)
Glycopeptides		<i>vanA</i>	D-alanine-D-lactate	Une faible affinité pour l'antibiotique.	Pl	Pérez, (2013) Montcriol, (2003)
Macrolides, lincosamides et streptogramines		<i>erm</i>	Méthylases	Modification de la cible de l'antibiotique.	C, Pl, Tn	Quincampoix et Mainardi, (2001)
		<i>Vgb</i> <i>linA</i> , <i>vat</i> <i>mphC</i>	Hydrolases Acétyltransférases phosphotransférases	Synthèse des enzymes inactivées l'antibiotique.	Pl	Lachgueur, (2013)
		<i>Msr</i> , <i>vga</i>	Pompes à efflux	Résistance par efflux.	Pl	Labrecque, (2007)
Aminosides		<i>Aac</i>	Acétyltransférases	Enzyme modifie l'antibiotique.	Tn (C, Pl)	Leclercq, (2002)
		<i>Ant</i>	Adényltransférases	Enzyme modifie l'antibiotique.	Pl, SCCmec	Ficca <i>et al.</i> , (2006)
		<i>aph</i>	phosphotransférases	Enzyme modifie l'antibiotique.	C, Pl	Labrecque, (2007)
Fluoroquinolones		<i>Grl</i>	Topo-isomérase IV	modification de la cible.	C	Quincampoix et Mainard, (2001)
		<i>Gyr</i>	Gyrase	modification de la cible.	C	
		<i>norA</i>	Pompes à efflux	Résistance par efflux.	C	
Autres	Rifampicine	<i>rpoB</i>	ARN polymérase	Modification de la cible	C	Daurela et Leclercq, 2008).
	Fosfomycine	<i>fosB</i>	pyruvyl-transférase	Modification de la cible	P	Tankovic <i>et al.</i> , 1997
	Acide fusidique	<i>fusA</i>	altération au niveau du facteur EF-G	Modification de la cible	C	Tankovic <i>et al.</i> , 1997 et Daurela et Leclercq, 2008

Pl: plasmide; **C:** chromosome; **Tn:** transposon; **SCCmec:** Staphylococcal cassette chromosome *mec*.

4. Emergence des nouvelles résistances aux antibiotiques

L'évolution régulière de *S. aureus* vers une plus grande résistance aux antibiotiques représente un risque majeur de la santé publique. Cette évolution progressive de la résistance est apparue après la découverte des antibiotiques (Andremont, 2002).

L'émergence de souches résistantes à la pénicilline en 1948 et à la méthicilline en 1961 a eu lieu peu d'années après l'introduction de ces molécules sur le marché (Grohs, 2009). Depuis cette date, les SARM se sont répandus de façon épidémique dans les hôpitaux à partir des années 70, pour devenir vers 1980 multi-résistants aux antibiotiques (Tristan *et al*, 2005).

Dans les années 1990, sont apparues des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée à la vancomycine (Benhamou *et al*, 2005). Cependant des 1997, des staphylocoques résistants à la vancomycine ont été identifiés (SARV) (Grohs, 2009). *S. aureus* ne sont généralement pas retrouvées en dehors de l'hôpital sauf chez certains patients ayant des facteurs de risque établis. Depuis 1999, on assiste à l'émergence de nouvelles souches de SARM détectées en dehors de l'hôpital chez des sujets jeunes, sans facteur de risque particulier (Durupt *et al*, 2005). Enfin, depuis le milieu des années 2000, la dernière vague de résistance à laquelle nous sommes confrontés est celle de SARM isolés chez l'animal (Marisa *et al.*, 2012).

5. Facteurs favorisant la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques

La progression de la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* ne peut pas être expliquée par une différence significative de production de facteurs de virulence ou d'adhésion entre la souche sensible et la souche multi-résistante (Aubry-Damon et Soussy, 2000).

La présence d'antibiotiques dans le milieu constitue un facteur sélectif puissant pour l'apparition des mutations et la diffusion de des gènes de résistance aux antibiotiques (Guillemot, 1999). La diffusion du SARM, par rapport au *S. aureus* sensible à la méthicilline, est favorisée par sa capacité d'adaptation à l'environnement (résistance aux antibiotiques et antiseptiques) en utilisant des mécanismes de résistance très différents tels que la modification de la cible, la modification enzymatique des antibiotiques et l'efflux actif. De plus, les gènes (exemple : gènes de la région *mec*) codant pour ces mécanismes ont intégrés dans le génome de *S. aureus*, favorisant la diffusion vertical (Aubry-Damon et Soussy, 2000).

La facilité de transfert du matériel génétique joue un rôle important dans la propagation de l'antibiorésistance d'une souche bactérienne à une autre. Les gènes de résistance ont par conséquent un fort potentiel de diffusion parmi les bactéries (Moritz, 2001). Les mutants résistants peuvent être sélectionnés *in vivo* relativement facilement, ce qui explique en partie la diffusion rapide de la résistance acquise qui s'est produite chez les staphylocoques (Tankovic *et al.*, 1997).

Partie II:

Etude expérimentale

1. Matériel et méthodes

Durant notre stage de Master (2014-2015) nous nous sommes intéressés à isoler et identifier *Staphylococcus aureus* et tester son antibiorésistance. La grande partie du présent travail expérimental a été réalisée à l'hôpital des frères Maghlawa de Mila au niveau du laboratoire de Microbiologie, le reste est réalisé dans le laboratoire de Microbiologie du département des Sciences de la Nature et de la Vie au Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila. Les résultats obtenus durant nos séjours de stage sont renforcés par ceux obtenus par nos collègues de Master (2013-2014).

1.1. Matériel

Le matériel et les réactifs utilisés au niveau de l'hôpital de Mila et dans le laboratoire de notre université sont résumés dans le Tableau 11.

Tableau 11: Matériel et réactifs.

Matériel	Réactifs
-Aiguille, seringue et écouvillon	-Le violet de Gentiane
-Etuve d'incubation	-Liquide de lugol
-Autoclave	-Alcool 96°
-Verrerie	-Solution de fuchsine
-Bec Bunsen,	-Plasma de lapin
-Microscope (OPTIKA)	-Glycérol liquide
-Réfrigérateur	-Gélose au Sang Cuit, Gélose
-Balance analytique	Nutritive, Gélose Chapman, Gélose
-plaque chauffante agitée	Muller Hinton
-Vortex	

1.1.1. Matériel biologique

Un total de 442 prélèvements ont été analysés pendant les années de 2014 et 2015. Les échantillons étaient d'origine interne (hospitalière) des différents services de l'hôpital (médicaux, pédiatrie, chirurgie, urgences médicales, etc.) et d'origine externe (communautaire).

1.1.2. Récolte des souches de *S. aureus*

Un total de 15 prélèvements ont été révélés positifs à *S. aureus* parmi 21 souches ont été isolées entre le début du mois de Janvier 2014 et la fin du mois de Janvier 2015. Les bactéries ont été stockées dans le glycérol liquide (20%) en tube à Eppendorf à 20 C, jusqu'à l'utilisation ultérieure. Aussi, les renseignements cliniques ont été rassemblés auprès du personnel compétent: l'âge et le sexe du patient, le service d'hospitalisation et la nature du prélèvement.

1.2. Méthodes

1.2.1. Nature des prélèvements

Les souches de *S. aureus* ont été isolées à partir de divers prélèvements pathologiques, provenant de patients hospitalisés dans différents services ou de sujets non hospitalisés venus en consultation externe. Les prélèvements réalisés ont été des natures suivantes:

Hémoculture

L'hémoculture est un examen très performant, essentiel en pathologie infectieuse, sa réalisation doit être conduite avec une grande rigueur. Elle permet de porter un diagnostic étiologique formel, elle est positive au cours des septicémies et des bactériémies. Le sang est prélevé après une antisepsie soignée de la peau par ponction veineuse directement dans des flacons, chez l'adulte 10 ml sont prélevés et 1 à 2 ml chez l'enfant (Deschamps *et al.*, 1981)

Les hémocultures sont acheminées immédiatement au laboratoire et mises en incubation à 37°C pendant 7 à 10 jours. Le résultat des examens bactériologiques dépend pour une grande part des conditions de prélèvement et de transport de l'échantillon (Mamadou Louma, 2007).

Liquide Céphalo-rachidien "LCR"

Dans des conditions très rigoureuses d'asepsie, le liquide est prélevé au niveau lombaire, entre les espaces vertébraux, à l'aide d'une aiguille à ponction lombaire (PL) et recueilli dans des tubes stériles accompagnés d'un minimum de renseignements cliniques (en particulier l'âge, le diagnostic présumptif, les traitements antibiotiques antérieurement reçus par le malade). La quantité moyenne collectée par écoulement en goutte du LCR suffisante pour la majorité des examens à réaliser est de 3 ml (Aouati, 2009).

Pus et sérosités

Le prélèvement de pus est effectué par écouvillonnage pour les infections superficielles et par ponction à l'aide d'une seringue pour les infections profondes, il doit porter exclusivement sur le pus et éviter toute contamination. Ce produit pathologique étant souvent polymicrobien et est lui-même un excellent milieu de culture (Mamadou Louma, 2007; Aouati *et al.*, 2009)

Liquides de ponctions

Le prélèvement (liquide pleural, ponction d'ascite, liquide péritonéal) est réalisé stérilement à l'aide d'une seringue, sans bulle d'air et analysé rapidement (Guiraud, 2012).

Urine

L'urine est un liquide biologique normalement stérile. Toute présence confirmée de bactéries dans l'urine intravésicale est pathologique. Il peut contenir des germes commensaux qui peuvent être emmenés par le flux urines. Le plus souvent une seule espèce est isolée. On utilise des tubes stériles pour le recueil des urines (Grosjeau *et al.*, 2011).

1.2.2. Isolement et purification

1.2.2.1. Réactivation s souches

Un échantillon de la souche stockée est introduit à l'aide de l'anse de platine dans 5ml de bouillon nutritif, il permet après une incubation à 37°C pendant 24 heures dans l'étuve d'obtenir une multiplication de *S. aureus* (même si initialement dans le prélèvement ils sont en faible nombre).

1.2.2.2. Milieux de culture et d'isolement

Il existe trois milieux de culture solides (Gélose Chapman, Gélose nutritive, Gélose au sang) et un milieu de culture liquide pour l'enrichissement des staphylocoques (Bouillon cœur-cervelle) (Aouati, 2009; et Afissa, 2014).

✓ Milieux d'isolement

- Milieu CHAPMAN

Il est utilisé en bactériologie médicale, c'est un milieu hypersalé à 7,5% de NaCl et 1% de mannitol et contenant du rouge de phénol (indicateur de pH), il permet principalement la croissance des espèces du genre *Staphylococcus* au détriment des autres bactéries contenues dans un produit pathologique.

- Gélose nutritive (GN)

Elle constitue un excellent milieu de culture, utilisée en bactériologie médicale, elle permet le développement de la plupart des microorganismes, parmi eux le staphylocoque. La bactérie étalée à la surface de la gélose formera autant de colonies qu'il y avait des bactéries à l'origine.

- Gélose au Sang Cuit (GSC)

Ce milieu obtenu par l'ajout de 5ml de sang cheval pour chaque 100ml de gélose ordinaire préalablement fondue et refroidie à 70°C, la température est maintenue à 70°C pendant 10 minutes. Le milieu est refroidi à 50°C avant de le couler en boîtes de Pétri pour éviter la condensation des globules rouges.

✓ Milieux d'enrichissement «Infusion cœur-cervelle »

L'infusion cœur-cervelle est un milieu liquide, suffisamment riche pour permettre la culture d'un maximum d'espèces microbiennes. Un échantillon du prélèvement est introduit dans 5ml de cœur-cervelle, il permet après une incubation à 37°C pendant 24 heures d'obtenir une multiplication des microorganismes (même si initialement dans le prélèvement ils sont en faible nombre).

1.2.2.3. Conservation des souches

❖ En tube de gélose nutritive inclinée

Les souches de *S. aureus* sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinés et incubées à 37°C pendant 24h ensuite elles sont conservées dans le réfrigérateur à 4°C, ces

bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication (Figure 18).

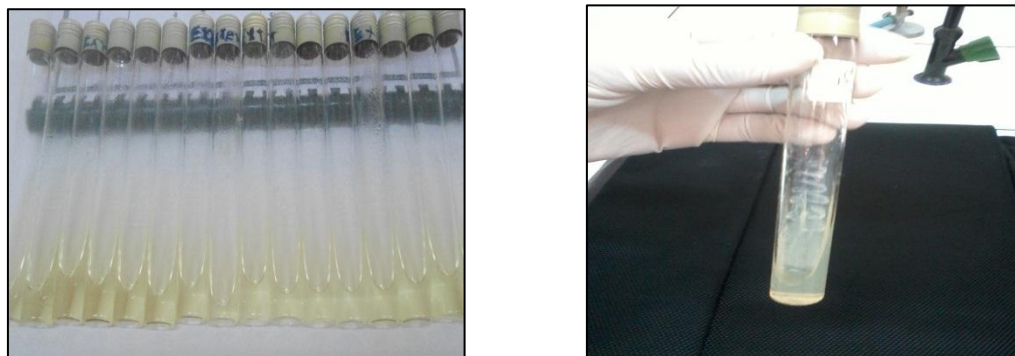


Figure 18: Conservation des souches à la gélose nutritive inclinée à 4°C.

❖ Au glycérol liquide

Les souches de *S. aureus* sont conservées dans des tubes Eppendorf avec le glycérol liquide à (20%) à température de congélation à -20°C (Figure 19). On utilise la pipette pasteur pour prélever 200ml de glycérol liquide puis ajouté 800ml de culture bactérienne sur bouillon nutritive.

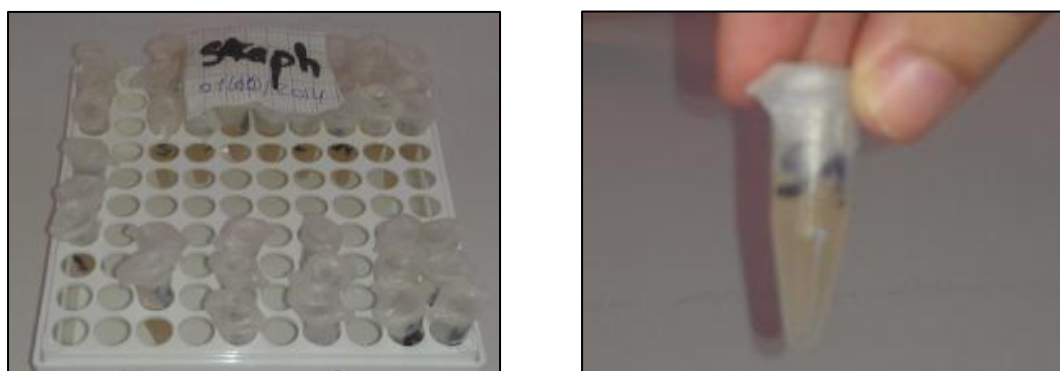


Figure 19: Conservation des souches au glycérol liquide à -20°C.

1.2.3. Identification de *S. aureus*

1.2.3.1. Aspect macroscopique des colonies

- Les colonies de staphylocoques sur Gélose nutritive sont pigmentées en jaune, lisses et rondes. Sur le milieu CHAPMAN les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté sinon les colonies sont de couleur blanche. Ces colonies sont bombées, opaques, arrondies et brillantes à bords réguliers de 1 mm de diamètre après 24h.

- Sur gélose au sang cuit, après 24 heures les colonies sont circulaires, volumineuses, opaques, éventuellement pigmentées et de couleur jaune blanche ou jaune pigmentée, d'un diamètre variant entre 1 à 3 mm, dorées et légèrement bombées ou aplaties, elles présentent une surface luisante et humide (Afissa, 2014).

1.2.3.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose au sang cuit présentant l'aspect caractéristique du staphylocoque. Aussi, elle peut être réalisée à partir du milieu de CHAPMAN, pour confirmer la présence de cocci en diplocoques et en grappes de raisin (Afissa, 2014).

La coloration de Gram utilise 4 réactifs (Gillet *et al.*, 2009):

- Le Violet de Gentiane qui colore tout en violet.
- Le Lugol, qui se complexe au cristal violet, formant un colorant violet soluble dans l'alcool.
- L'Alcool qui décolore certaines bactéries (celles dont la paroi est perméable à l'alcool), mais pas d'autres (celles dont la paroi est imperméable à l'alcool).
- La Fuchsine de Ziehl, qui colore en rouge/rose les bactéries décolorées par l'alcool, sans modifier la couleur des autres bactéries (violet foncé/bleu).

☒ Méthode de la coloration de Gram

La coloration de Gram est réalisée par les étapes suivantes (Denis *et al.*, 2007; Guezlane *et al.*, 2010 ; Senouci et Abdelouahid, 2010):

- Préparer la lame et les échantillons bactériens à examiner, issus d'une culture de *S. aureus*.
- L'étalement doit se faire en couche mince et régulière avec une pipette Pasteur, sur une lame propre dégraissée.
- Laisser sécher à l'air libre, ou approcher la lame à 15-20 cm au-dessus de la flamme du bec bunsen. Le frottis doit devenir terne mais ne doit ni brunir, ni brûler.
- L'étape de fixation qui suit, consiste à tuer les bactéries, à rendre les membranes plus perméables, à fixer les structures sans trop insister sous peine de carboniser le frottis; sinon

tenir la lame avec une pince et écraser trois fois la flamme avec la lame, le frottis est prêt à subir une coloration.

- Couvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir 2 min. Jeter l'excès de colorant.
- Egoutter sans rincer et faire deux bains de lugol dont chacun dure 45 secondes.
- Egoutter et plonger la lame dans l'alcool 96°C durant 30 secondes exactement. La décoloration trop forte comme la décoloration trop faible étant des sources d'erreurs.
- Arrêter la différenciation par un lavage doux et abondant à l'eau distillée.
- Recolorer les germes décolorés par le différenciateur, en faisant agir sur la préparation un colorant de contraste, la fuchsine ou la safranine filtrée pendant 2 minutes.
- Laver à l'eau distillée et sécher la lame au-dessus de la flamme.
- Observer à l'huile d'immersion et dessiner les bactéries se trouvant dans un champ microscopique moins riche, dans la périphérie de la préparation.

1.2.3.3. Identification biochimique

Toutes les souches ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards (test de catalase et de coagulase).

Identification du genre

Les *Staphylococcus* sont de forts producteurs de catalase, cette caractéristique permet de les différencier facilement des *Streptococcus* qui sont catalase négatifs. Ils se caractérisent aussi par leur capacité à fermenter le glucose ainsi que par l'absence de production d'oxydase (Collomb, 2011).

❖ Test catalase

- **Principe**

La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d' O_2 sous forme gazeuse (Afissa, 2014).

- **Technique**

A partir d'un milieu solide et aérobie, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame. La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d'O₂ (Figure 20) (Rebiahi, 2012).

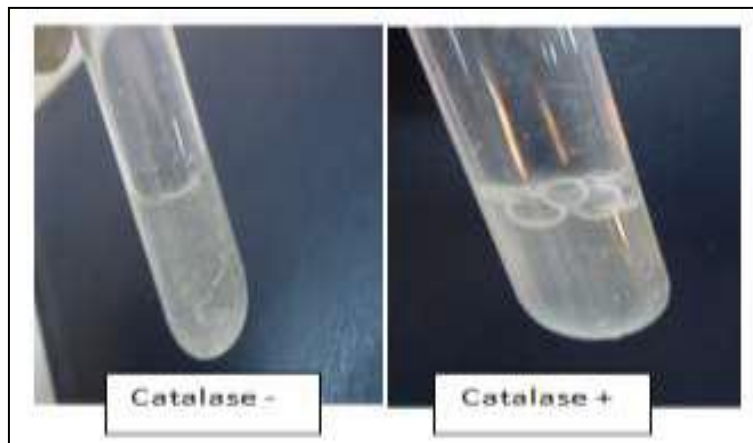


Figure 20: Production de catalase par les cocci à Gram positif (Aouati, 2009).

Identification de l'espèce :

S. aureus se distingue des autres staphylocoques par la pigmentation dorée de ses colonies et sa capacité à synthétiser une coagulase et une désoxyribonucléase (El-Anzi, 2014).

❖ **Test coagulase**

- **Principe**

La production de coagulase par *S. aureus* provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un culot de coagulation (Bankolé *et al.*, 2014). (figure 21)

- **Technique**

- A partir d'une culture de la souche à étudier, réaliser une subculture en bouillon staphylocoagulase ou en bouillon nutritif ordinaire.
- Incuber la culture 18 h à 37 °C.
- Mélanger dans un tube à hémolyse 0,5 ml de plasma de lapin réhydraté et 0,5 ml de la culture en bouillon de la souche.

- Incuber le mélange à 37 °C pendant 24 h.

Le test positif montre une coagulation du plasma en un temps variant d'une demi-heure à 24 h. Un caillot moins compact visible avant la 24ème heure doit être considéré comme positif (Diallo, 2007).



Figure 21: Le test de la coagulase (Aouati, 2009).

❖ Test thermonucléase

• Principe

La thermonucléase est une endonucléase résistante aux températures élevées (15 minutes à 100°C) qui est caractéristique des souches de *S. aureus* d'origine animale ou humaine. Un halo rose autour du puits traduit la présence de composés d'hydrolyse de l'ADN. (Delarras, 2007).

• Technique

- Repiquer la souche à identifier dans un tube de bouillon cœur-cerveau.
- Placer un aliquote de la culture agitée de 18 à 24 h au bain-marie ou dans une étuve à 37°C durant 3 à 4 heures.
- Chauffer la culture en bouillon cœur-cerveau à 100°C pendant 15 minutes, puis laisser refroidir.
- Prendre une boîte de Pétri de milieu ADN-bleu de toluidine dont la surface a été séchée. Découper à l'emporte-pièce, dans ce milieu, 4 à 6 puits de 4 à 5 mm de diamètre.

- A l'aide d'une pipette pasteur stérile remplir totalement un puits avec quelques μl ($8\mu\text{l}$ au minimum) de la culture. Remplir autant de puits qu'il y a de souches à étudié (Rebiahi, 2012).

❖ **Galerie biochimique**

Les galeries de tests biochimiques sont utilisées pour étudier les différents caractères biochimiques des bactéries et ainsi permettre de les identifier à l'aide d'une base de données. Dans notre étude on réalise trois tests de galerie (TSI, Citrate de Simmons, Mannitol Mobilité) (Cariello, 2012).

❖ **Triple Sugar Investigation (TSI)**

• **Principe**

-Déterminer la capacité de la bactérie d'utiliser plus d'un des sucres (glucose, lactose ou saccharose), avec ou sans production de gaz, et de produire du sulfure d'hydrogène (H_2S).

• **Technique**

- En partant d'une colonie, inoculer le culot en piquant avec un fil droit au centre puis inoculer la pente en effectuant une strie sinueuse.

- Incuber à 37°C jusqu'au lendemain.

• **Résultats**

-Fermentation du glucose seulement: culot jaune et pente rouge.

-Fermentation du glucose et un des deux autres sucres (lactose ou sucrose): culot et pente jaune.

-Aucun sucre dégradé: pente rouge et culot rouge ou orange.

-Production de gaz: bulle(s) de gaz, milieu complètement séparé ou soulevé.

-Production de H_2S : précipité noirâtre plus ou moins abondant.

❖ **Citrate de Simmons**

Le but de ce test est de savoir si la bactérie utilise le citrate comme source de carbone. La transformation du triacide (acide citrique) en diacide par décarboxylation oxydative donne

élévation du pH qui se traduit par un virage au bleu, Et dans le cas des résultats négatifs le milieu restent vert (Bouamer et Guerbati, 2008).

❖ **Teste de mannitol mobilité**

L'agar Mannitol mobilité permet de chercher simultanément la mobilité et l'utilisation de mannitol, Le virage du milieu rouge au jaune indique la positivité de la réaction et la mobilité s'exprime par l'apparition d'un trouble au milieu dû à la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement. Pratiquement, on ensemence aseptiquement la suspension bactérienne par piquer centrale et profonde au moyen d'un fil de platine sur l'agar Mannitol mobilité en tube à essai (Mouloudi, 2013).

1.2.4. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

1.2.3.1. Protocole de l'antibiogramme

L'antibiogramme est effectué selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur milieu gélosé à partir de disque selon la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Anonyme 1, 2011).

Principe

L'antibiogramme par diffusion permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'un panel d'antibiotiques. Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé (milieu de Mueller-Hinton) préalablement ensemencé avec une dilution calibrée de la bactérie à tester. L'arrêt de la croissance à distance du disque se produit en présence de la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique.

Matériel

❖ **Milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé est le milieu Mueller-Hinton, il permet la croissance de nombreuses bactéries et il ne doit pas contenir d'inhibiteurs des antibiotiques, c'est un milieu standardisé de 4 mm d'épaisseur en boîte de pétrie. Il peut être additionné de 5 % de sang de cheval ou de mouton pour les bactéries plus exigeantes.

❖ **Les disques d'antibiotiques**

Ils doivent être conservés à 2-8 °C avec un déshydratant. Le diamètre des disques est de 6,35 mm.

L'autre matériel utilisé est résumé dans le Tableau 12:

Tableau 12: Le Matériel et les réactifs utilisés dans l'antibiogramme.

Matériel	Réactifs
-Une souche pure de la bactérie à étudier -Un écouvillon -Anse de platine -Pipette pasteur -Etalon de Mac Farland ($1.5 \cdot 10^8$ UFC/ml) pas compris -Les tubes à essai	-Eau physiologique stérile

❖ **Mode opératoire**

- **Préparation de l'inoculum**

- ✓ A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques (Figure 22).
- ✓ Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.
- ✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- ✓ L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

- ✓ L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

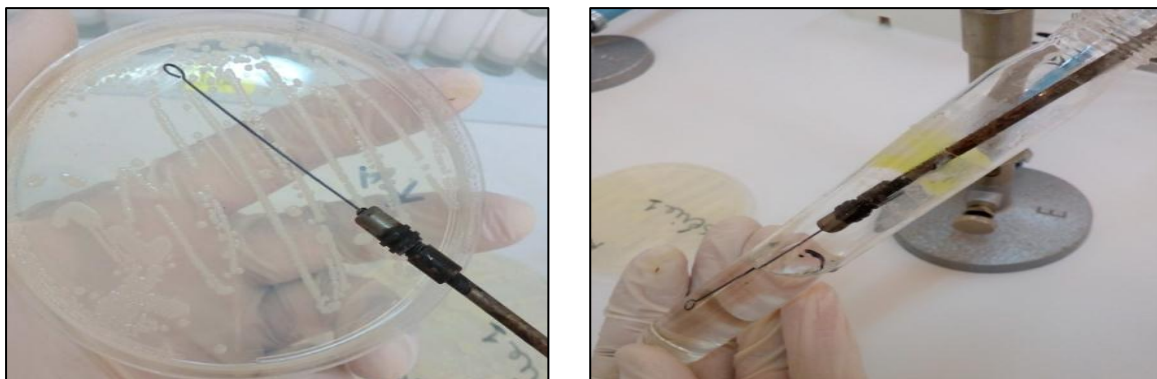


Figure 22: La préparation de l'inoculum (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

- **Ensemencement**

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum (Figure 23).
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube afin de décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60°C à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ✓ Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

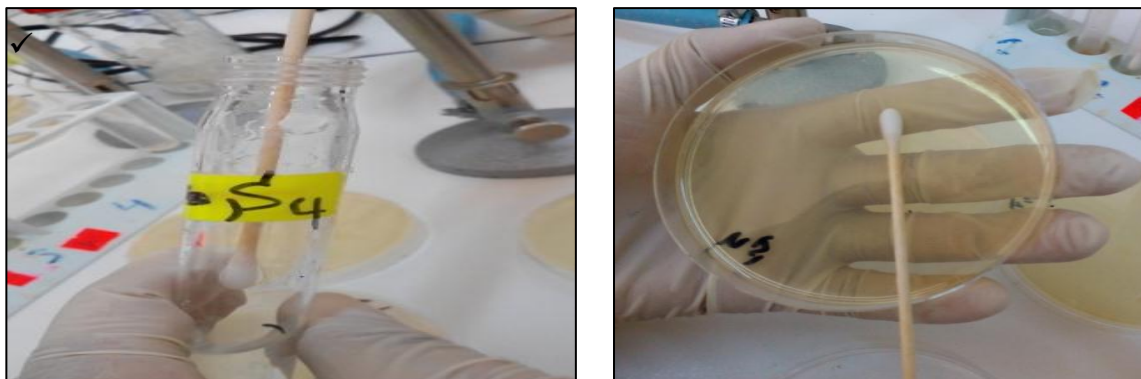


Figure 23: L'ensemencement sur la gélose Muller Hinton (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

- **Application des disques d'antibiotiques**

- ✓ Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90mm. Pour les bactéries exigeantes (*Streptococcus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus* spp., etc.), ne pas mettre plus de 4 disques par boîte de 90 mm (Figure 24).
- ✓ Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application.

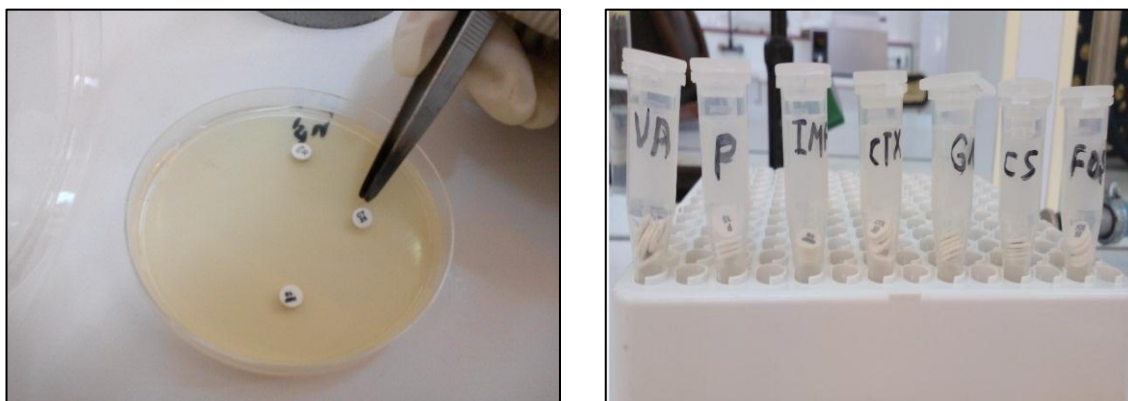


Figure 14: Application des disques d'antibiotiques (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

- **Incubation**

- ✓ Incuber 20-24 heures à 35-37 °C.
- ✓ L'incubation se fait en atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

- **Lecture**

- ✓ Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- ✓ Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton simple, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétrie fermée.
- ✓ Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans le tableau de lecture correspondant (Annexe 04).
- ✓ Classer la bactérie dans l'une des catégories, résistante, sensible et intermédiaire.

2. Résultats et discussion

Ce travail a été réalisé entre le 22/01/2014 et 29/01/2015 au Laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital de Mila-Algérie. Un total de 15 souches de *Staphylococcus aureus* a été isolé à partir des prélèvements pathologiques différents.

2.1. Résultats de l'identification bactérienne

2.1.1. Aspect macroscopique des colonies

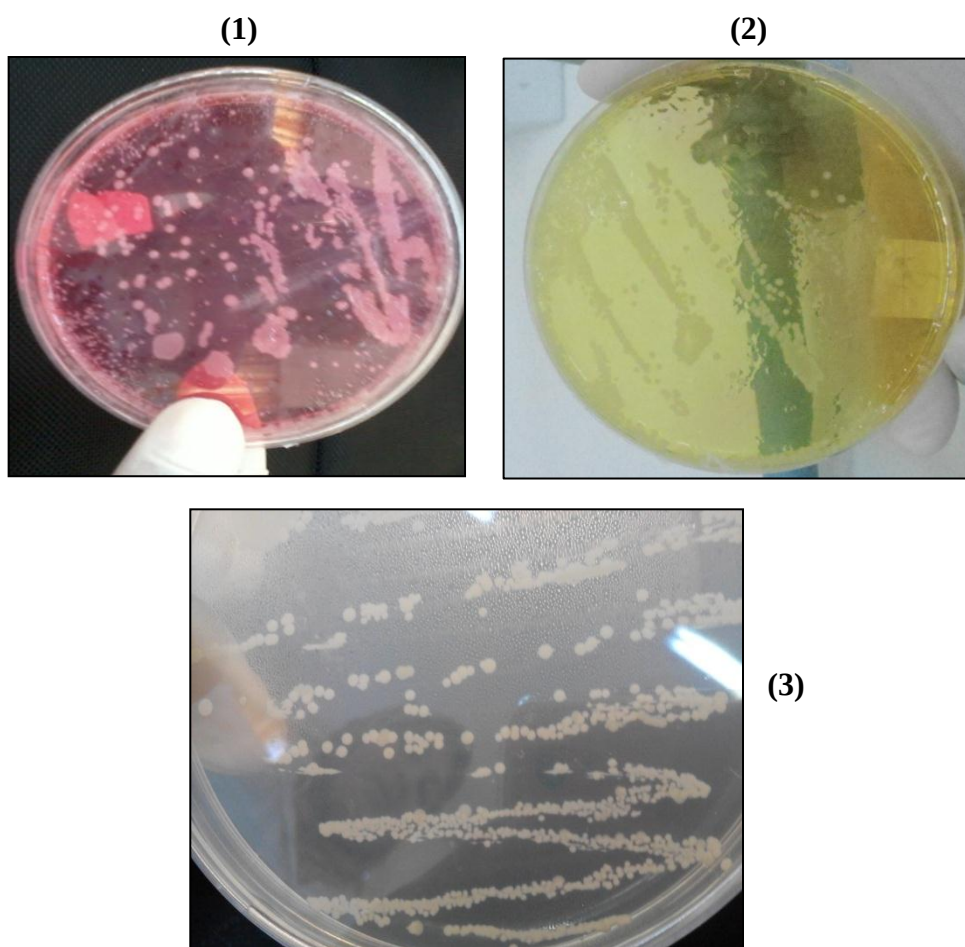


Figure 25: Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu CHAPMAN (01-02) et sur Gélose nutritive (03), les colonies sont lisses, rondes, bombées, brillantes, opaques, de 1 mm de diamètre (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

2.1.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram est réalisée à partir du milieu CHAPMAN, pour confirmer la présence de cocci en diplocoques et en grappes de raisin avec une couleur violet sous microscope (Figure 26).

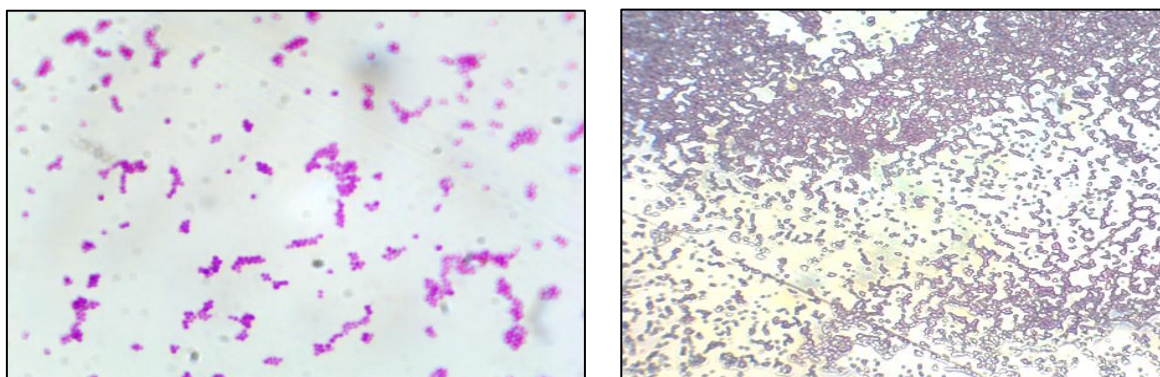


Figure 26: Photos obtenues par microscopie optique des cellules de *S. aureus* après la coloration de Gram au grossissement 1000 (à gauche) et au grossissement 400 (à droite) à l'huile d'immersion (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

2.1.3. Identification biochimique

❖ Teste de catalase

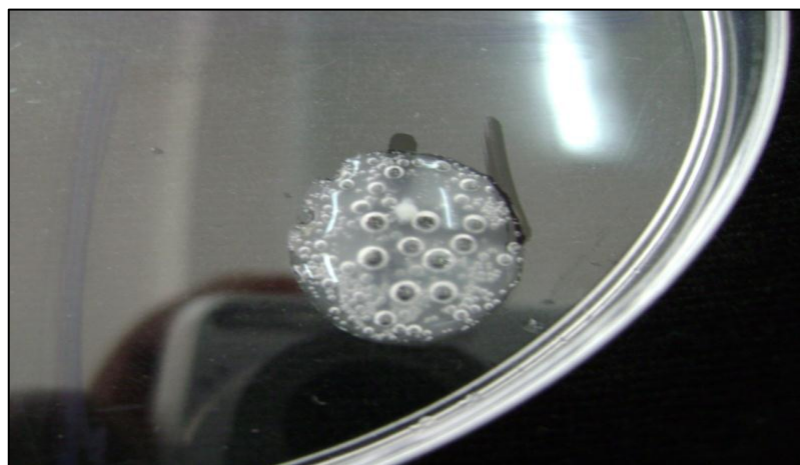


Figure 27: Teste de la catalase. Le dégagement gazeux est en faveur de la présence de l'enzyme catalase dans le métabolisme respiratoire bactérien (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

❖ Galerie biochimique

Staphylococcus spp. ensemencé dans la galerie biochimique (Figure 28 et Tableau 13), a montré, sur le milieu TSI (Tri-Sugar-Investigation) qu'il fermente le glucose (GLU+), se traduisant par une réaction positive en jaune et est Saccharose (SAC+/-), Lactose (LAC+) et H₂S-. La réaction au test du métabolisme du Citrate a été négative sur le milieu Citrate de Simmons. La réaction dans le milieu Mannitol Mobilité a été toujours négative pour la mobilité, cependant elle été variable pour le Mannitol.

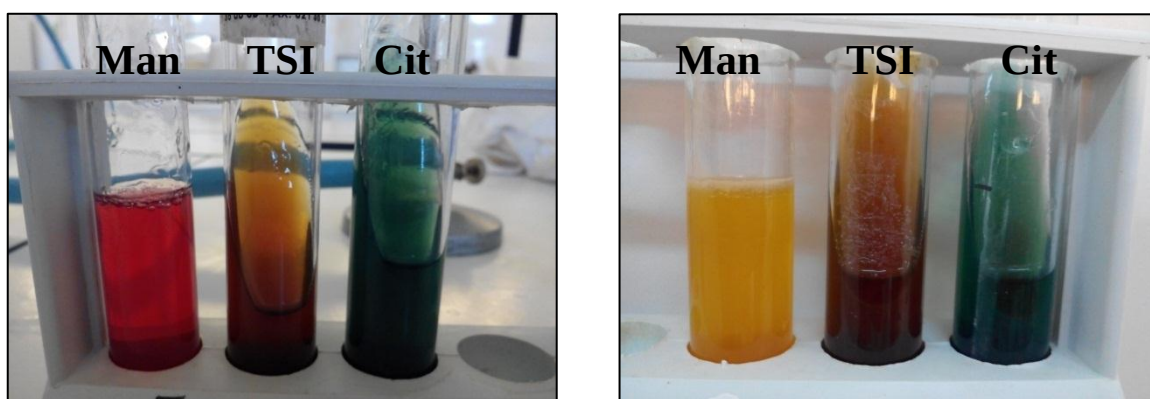


Figure 28: Photos de la galerie biochimique (Mannitol Mobilité, TSI, Citrate de Simmons) avant (à gauche) et après la culture (à droite) (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila). **Man:** Mannitol Mobilité, **TSI:** Tri-Sugar-Investigation, **Cit:** Citrate de Simmons

Tableau 13: Résumé des résultats de l'identification biochimique réalisée au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila.

Code	Mannitol Mobilité		Citrate de Simmons	TSI		
	Fermentation	Mobilité		Glucose	Lactose	Saccharose
S ₁	+	-	-	-	-	-
S ₂	+	-	-	-	-	-
S ₃	-	-	-	-	-	-
S ₄	+	-	-	-	-	-
S ₅	-	-	-	-	-	-
S ₆	+	-	-	-	-	-
S ₇	+	-	-	-	-	-

2.1.4. Résultat du test de l'antibiogramme

Tableau 14: Résumé du résultat du test de l'antibiogramme réalisée au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila.

Code	Antibiotiques testés	Diamètre de lyse (mm)	Résultat		
			S	I	R
S ₁	Vancomycine	19	+		-
	Fosfomycine	29	+		-
	Gentamycine	26	+		-
	Pénicilline	16	-		+
	Céfotaxime	14	+		-
	Colistine	31	-		+
	Imipénème	14		+	
S ₄	Vancomycine	20	+		-
	Fosfomycine	32	+		-
	Gentamycine	28	+		-
	Pénicilline	18	-		+
S ₅	Céfotaxime	15	+		-
	Colistine	16	+		-
	Imipénème	21	+		-
	Vancomycine	18	+		-
	Fosfomycine	15	+		-
	Gentamycine	32	+		-
	pénicilline	0	-		+

S: Sensible, **I:** Intermédiaire, **R:** Résistante

Le teste de l'antibiogramme de trois souches de *S. aureus* provenant du service de pédiatrie de l'hôpital de Mila (Tableau 14, Figure 29), a révélé que toutes les souches sont, sensibles pour la Vancomycine, Fosfomycine, Gentamycine et Céfotaxime, alors que elles sont toutes résistantes à la Pénicilline. D'autre part, il y a une seule souche résistante à la Colistine. La résistance à Imipénème est intermédiaire pour une souche est sensible pour une autre.

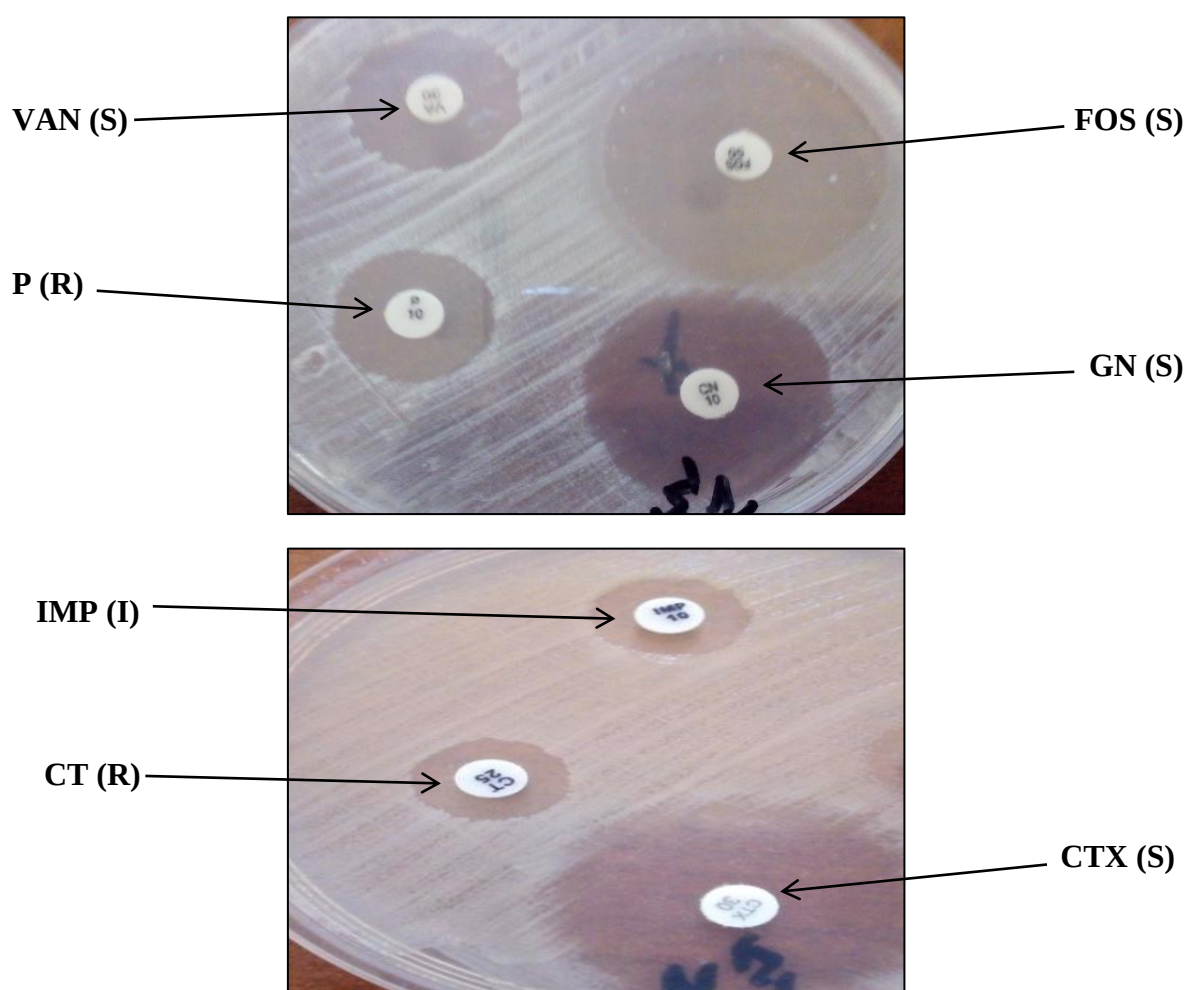


Figure 29: Résultat de l'antibiogramme de la souche 01 (*S. aureus*) (photos réalisées au laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila). **Van:** Vancomycine, **P:** Pénicilline; **Fos:** Fosfomycine; **GN:** Gentamycine; **IMP:** Imipénème; **CT:** colistine; **CTX:** Céfotaxine; **S:** Sensible; **I:** Intermédiaire; **R:** Résistante

2.2. Résultats des cultures bactériennes

Sur 442 prélèvements analysés, 84 se sont révélés positifs (Tableau 15), soit un taux de 19% (près du 1/4 des prélèvements), alors que 79% sont négatifs. Nous considérons comme positifs, les prélèvements qui après culture sur les différents milieux utilisés, montrent un développement bactérien. Il faut noter que l'interprétation des résultats est parfois difficile. En effet, il n'est pas toujours aisé de distinguer entre la simple colonisation ou même la contamination d'une véritable infection, vu le manque d'informations sur les bons de demandes d'examens.

Tableau 15: Résultats des cultures bactériennes

Culture	Nombre	Pourcentage
Positif	84	19%
Négatif	350	79%
Contaminée	8	2%
Total	442	100%

Nous constatons aussi, que 8 prélèvements se sont révélés contaminés (2%) (Tableau 14) (un prélèvement est déclaré contaminer si nous isolons 3 germes et plus). Cette contamination peut avoir deux origines; soit au niveau du patient donc au cours du prélèvement lui-même, soit au laboratoire au cours du traitement. Dans les deux situations, la principale cause est le manque d'hygiène qui engendre l'inoculation de bactéries de l'environnement qui ne sont pas en relation avec l'infection mais qui peuvent coloniser le malade (dans le cas de la contamination chez celui-ci) et provoquer chez lui des infections nosocomiales.

Nos résultats représentent un taux de 71.42% de *S. aureus* sur l'ensemble des souches de *Staphylococcus spp.* isolées (15/21), 17.85% sur la totalité des prélèvements qui se sont avérés positifs (15/442) et 3.39% sur la totalité des prélèvements examinés (15/442) (Tableau 16). Contrairement, nos résultats sont inférieur à ceux trouvés par Duran et al., (2012) qui ont rapporté un taux d'isolent de *S. aureus* est de 46.6% par rapport aux l'ensemble des souches de *Staphylococcus spp.*

Tableau 16: Incidence d'isolement de *Staphylococcus spp.* et *S. aureus*

Nombre total de prélèvement	Cultures positives	Nombre de souches <i>Staphylococcus spp.</i>	Nombre de souches <i>S. aureus</i>	% de <i>S. aureus</i> /nombre pvts total	% de <i>S. aureus</i> /cultures positive	% de <i>S. aureus</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>
442	84	21	15	3.39%	17.85%	71.42%

2.3. Incidence de la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* de 2014 à 2015

Le Tableau 17 résume les caractères de résistance de 15 souches de *S. aureus* isolées durant notre stage de Master 2014-2015 au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital de Mila, les renseignements cliniques ont été rassemblés auprès du personnel compétent: l'âge et le sexe du patient, le service d'hospitalisation et la nature du prélèvement.

Tableau 17: Isolement et antibiorésistance de 24 souches *Staphylococcus* spp. à l'hôpital de Mila (2014 et 2015).

Date du prélèvement	Type du Staph	Sexe	Age (an)	Nature prélèvement	Service	Antibiogramme		
						R	S	I
22/01/2014	<i>aureus</i>	M	57	Pus	In	VA, E, CIP	IMP, CTX	
04/02/2014	spp.	M	In	oculaire	In	CT, AK	AMC, OX, FA, CTX	GN
03/03/2014	<i>aureus</i>	F	In	Pus	Ext	CT, OX, CTX, AX,AM,P	CIP, FA, PT, IMP, AK, CXT	
17/03/2014	spp.	F	47	Vaginale	Inf	CTX, OX, SXT, FA	IPM, AK, CT, VA, FF	
07/04/2014	<i>aureus</i>	F	47	Vaginale	Ext	SXT, FF, VA, ACF, OX, CTX	CT, AK	
07/04/2014	<i>aureus</i>	F	In	Vaginale	Ext	OX, CTX, CL, SXT	VA, AK	FF
27/04/2014	spp.	F	In	In	Ext	AMC, CTX	AF,IPM, AK, OX, CL, FF	
30/04/2014	spp.	M	42	Pus	Inf	CT, CTX	IPM,FF, AK, AF, SXT, AN,VA	
26/04/2014	<i>aureus</i>	F	66	Pus	Inf	AMC, OX, E, IPM, L, CTX, AK, CIP, FA, VA, PT	FOS	
04/06/2014	<i>aureus</i>	F	50	Pus	Ext	CO ₂₅ , L, CTX,	GN, IPM	CT
09/07/2014	<i>aureus</i>	F	In	Pus	Ext	SXT, CTX, CN, CT, VA	IPM	CIP
15/07/2014	<i>aureus</i>	F	In	Pus	In	CS, VA, PT	IPM, VA	P, OX
20/07/2014	spp.	F	In	Ascite	Ext	CTX, SXT, VA	GN, IPM, CIP	
07/09/2014	<i>aureus</i>	F	40	Vaginale	Inf	SXT, L, CTX, AMC, AK, VA	IPM, CO ₂₅	
09/09/2014	<i>aureus</i>	M	65	Pus	Inf	CT, AMC	CO ₂₅ , CTX, FF, VA	CIP, CTX
22/09/2014	<i>aureus</i>	F	43	Vaginale	In	VA, L, FF ₅₀	CIP, IPM, FOX, AMC, SXT	
24/11/2014	spp.	M	In	Ascite	Péd	P, E, FF	OX, PT, CIP, VA, FA, L	SXT
11/12/2014	<i>aureus</i>	M	In	In	In	AX, AMC, FF, AN, CO, AK ,VA	CIP, IPM, VA	CT, NTX
06/01/2015	<i>aureus</i>	F	48	Pus	In	In	in	in
14/01/2015	<i>aureus</i>	F	07	In	Péd	FC	CIP, VA, CO, FF, E, OX, L	
29/01/2015	<i>aureus</i>	F	32	Pus	In	In	In	In
S ₁		In	In	In	Péd	P, CT	VA, Fos, GN, CTX	IMP
S ₂		In	In	In	Péd	P	VA, Fos, GN	
S ₃		In	In	In	Péd	P	VA, Fos, GN, CTX, IMP,CT	

VA: Vancomycine; **GN:** Gentamycine; **IPM:** Imipénème; **Fos:** Fosfomycine; **L:** Lincomycine; **OX:** Oxacilline; **AMC:** Amoxicilline+Acide Clavulanique; **CZ:** Céfazoline; **TE:** Tétracycline; **SP:** Streptomycine; **E:** Erythromycine; **CL:** Clindamycine; **SXT:** Triméthoprim+ulfaméthoxazole; **NOR:** Norfloxacin; **AC-FU/FA:** Acide-Fusidique; **CTX:** Céfotaxime; **CIP:** Ciprofloxacine; **P:** Pénicilline; **CT:** Céfotétan; **AN:** Amikacine; **PT:** Pristinamycine; **AK:** Kanamycine; **Cs:** Colistine; **(FF, FC et Co₂₅:** inconnus); **M:** Masculin; **F:** Féminin, **In:** Inconnu; **Ext:** Externe; **Inf:** Infectieux; **Péd:** pédiatrie; **R:** Résistant; **S:** Sensible; **I:** Intermédiaire.

2.4. Incidence du genre *Staphylococcus* spp. de 2014 à 2015

Nous notons, que sur 84 prélèvements positifs, 21 souches appartiennent au genre *Staphylococcus*, soit une fréquence de près de 25% (21/84) (Tableau 18). Ce taux élevé démontre l'importance de l'infection (ou du portage) par ce germe dans l'hôpital de Mila. Le résultat obtenu est plus faible que celui trouvé par Kumar et al. (2001), dans leur étude en Inde qui ont trouvé que parmi 84 prélèvements 66 (78.6%) étaient positifs pour *S. aureus*.

Tableau 18: Incidence totale de *Staphylococcus* spp. isolé à l'hôpital de Mila

Total des cultures Positive	Total des <i>Staphylococcus</i> spp. isolés	Pourcentage
84	21	25%

2.5. Incidence de l'espèce *S. aureus* de 2014 à 2015

L'étude bactériologique nous a permis d'isoler 15/21 souches de *Staphylococcus* spp. Qui se sont avérées des coques à Gram positif, sphérique, immobiles, aéro-anaérobies facultatives possédant une catalase, une coagulase et une thermonucléase positifs, ce qui a permis de les assigner à l'espèce *Staphylococcus aureus*. Ce résultat confirme la prédominance de cette espèce par rapport aux *Staphylococcus* spp.

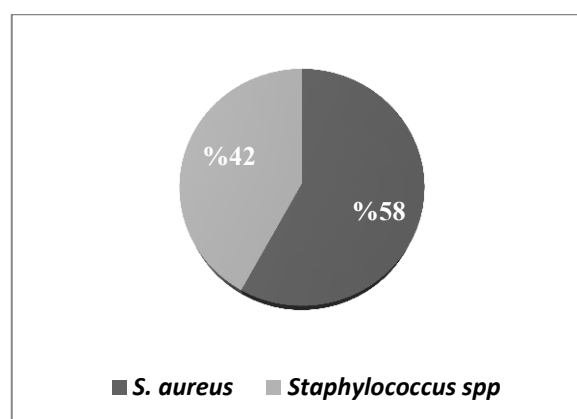


Figure 30: Incidence de l'isolement de *S. aureus* par rapport aux *Staphylococcus* spp. de 2014 à 2015

2.6. Incidence de *S. aureus* selon l'âge, le sexe, la nature de prélèvement et les services hospitaliers de 2014 à 2015

2.6.1. Incidence de *S. aureus* selon l'âge

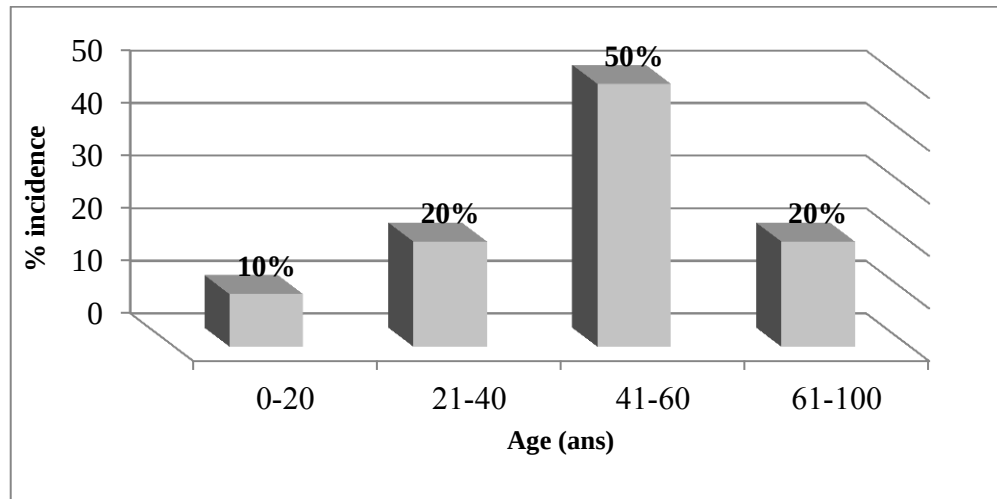


Figure 31: Incidence de *S. aureus* selon l'âge de 2014 à 2015

Sur des patients âgés de 7 à 66 ans, les résultats montrent que la moitié (50%) des patients a une infection à *S. aureus* parmi la tranche d'âge de 41 à 60 ans, 10% ont une tranche d'âge de 0 à 21 ans. La même proportion de 20% est remarquée pour les tranches d'âge entre 21-40 et 61-100 ans (Figure 31).

Une étude réalisée au Liban conduite sur 6 mois par Sfeir et al., (2013), a montré des résultats comparables aux résultats présents. Ils ont rapporté que l'âge avancé est un facteur de risque infectieux, cela est expliqué par le rôle des contacts accrus avec un travailleur de soins de santé, la présence d'un dispositif intravasculaire ou prothèse et l'affaiblissement de système immunitaire. Kumar et al. (2011), en Inde ont montré que les travailleurs de la santé, les médecins et les techniciens de laboratoire étaient les principaux réservoirs pour la propagation du SARM, et que les staphylocoques isolés étaient de 47 (71.2%) à partir des échantillons prélevés des médecins et 19 (28.8%) des techniciens de laboratoire, les narines peuvent servir la source de l'infection à d'autres patients.

Par contre, ces résultats sont en désagrément par rapport à ceux obtenus par nos collègues de l'année précédent qui ont rapporté un pourcentage élevé de 37% pour la tranche d'âge entre 21 et 40 ans. Aussi, une étude réalisée sur l'incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à Peshawar, au Pakistan, réalisée par Rahman et al. (2011), a considéré que le

principal groupe d'âge à risque est de 20 à 29 ans associé à plusieurs facteurs de risque comprennent, l'hospitalisation, les diabétiques, le système immunitaire compromis, et des personnes ayant des antécédents de consommation de drogues. Également, les souches de SARM peuvent coloniser et infecter les enfants en grande partie, les facteurs de risque liés à l'environnement pour la colonisation, comme la participation à des garderies, les écoles, et des installations récréatives. Les enfants peuvent être plus sensibles aux infections du SARM communautaire par suite d'une colonisation de la peau ou par la différence définie dans la défense de l'hôte (Delorme *et al.*, 2009).

2.5.2. Incidence de *S. aureus* selon le sexe

Il a été remarqué que les femmes sont plus infectées que les hommes par *S. aureus* avec un taux de 80% et 20% respectivement (Figure 32). Ces résultats confirment ceux déjà décrits par nos collègues de Master 2014. Pareillement, dans une étude réalisée par Deliere-Baron *et al.* (1996), pendant 7 mois, a montré que l'incidence des infections était augmentée de façon significative chez les femmes par rapport aux hommes. En effet, l'élévation du pH chez les femmes est responsable de la colonisation vaginale par les germes, de même, l'urètre féminin est plus courte que l'urètre masculin (il mesure 2 à 2.5 cm de long) et expose la femme à davantage d'infections urinaires par colonisation gastro-intestinale. Le risque de survenue d'une infection urinaire est donc plus élevé chez la femme que chez l'homme (Kouamé, 1995; Gonthier, 2000).

Par contre, Elazhari *et al.* (2010), dans leur étude sur 158 souches de *S. aureus* ont montré que 55% des cas (88 souches) des souches proviennent de personnes de sexe masculin.

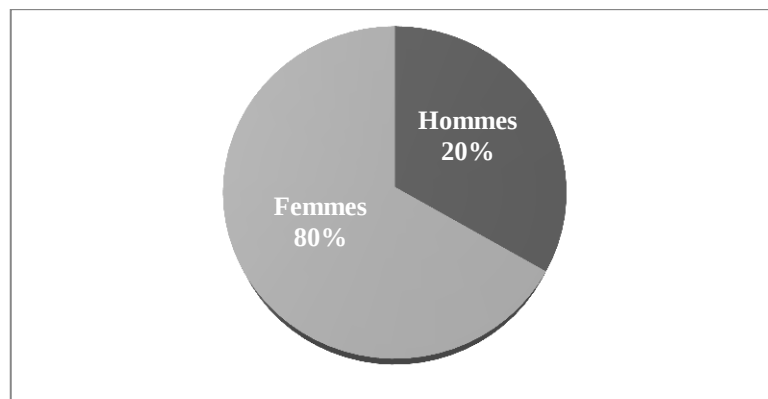


Figure 32: Incidence de *S. aureus* selon le sexe dans l'Hôpital de Mila de 2014 à 2015.

2.5.3. Incidence de *S. aureus* et de SARM selon la nature du prélèvement

☒ Incidence de *S. aureus* selon la nature du prélèvement

La répartition de la fréquence d'isolement des *S. aureus* dans notre étude (Figure 33) a été également variable en fonction de la nature de prélèvement. Le *S. aureus* représente 60% des germes isolés des pus, et montre que le site préférentiel des infections à *S. aureus* est cutané. Les prélèvements vaginaux représentent la deuxième source la plus importante (27%) de *S. aureus*, suivi par le prélèvement oculaire (13%). Dans les autres prélèvements (hémocultures et urines) la fréquence d'isolement des *S. aureus* a été nulle (0%). L'incidence élevée des *S. aureus* dans les prélèvements de pus (60%) est semblable à celle remarquée par Elhamzaoui et al. (2009), dans leur étude la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans deux hôpitaux universitaires à Rabat, Maroc, qui ont rapporté un taux de 62% de *S. aureus* isolés des pus.

La plupart des souches (60%) ont été isolé du pus, cette situation s'explique par la capacité de *Staphylococcus* spp. de former une collection suppurative, et leur classification parmi les germes pyogènes (Bachir-Pacha *et al.*, 2014). Egalement, ces résultats sont conformes à une étude réalisée par Tiwari et al. (2009), qui ont révélé qu'une grande incidence de *S. aureus* (66.9%) est signalée dans le centre de soins de brûlure de l'hôpital à l'ouest du Népal, ceci parce que les brûlures impliquent de vastes plaies ouvertes et donc une bonne occasion pour la transmission et la colonisation bactérienne.

En revanche, nos résultats ne concordent pas avec une étude réalisée au Liban par Sfeir et al. (2013) qui ont considéré que les narines sont le site de colonisation primaire de *S. aureus*, et que environ 30% de la population en bonne santé porte *S. aureus* dans leur antérieur narine. Pareillement, une étude sur le dépistage nasal de travailleurs de la santé pour le transport nasal de SARM coagulase positifs et la prévalence de la colonisation nasale avec *Staphylococcus aureus* réalisée par Kumar et al. (2011), explique l'association entre les staphylocoques et l'écouvillon nasale par un polymorphisme du gène de récepteur des glucocorticoïdes (substance hormonale anti-inflammatoire secrétées par la corticosurrénale), conduisant à l'insensibilité de celle-ci, et peut provoquer une amélioration de précipitation immunitaire auto-immune troubles, tout en protégeant la colonisation nasale de *S. aureus*. Aussi, une autre étude sur la prévalence et

l'antibiogramme de *staphylococcus aureus* en Inde a révélé que 35.7% des isolats étaient issus des prélèvements de gorge suivie du pus (33.6%) (Rajaduraipandi *et al.*, 2010).

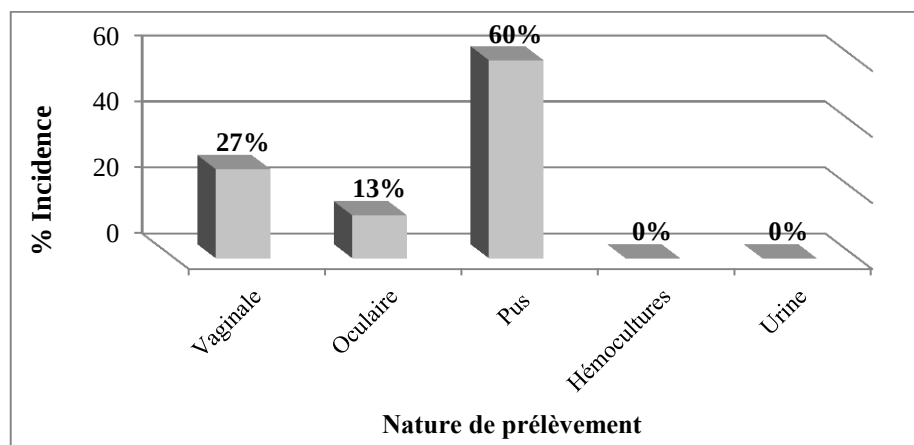


Figure 33: Incidence de *S. aureus* selon la nature du prélèvement dans l'hôpital de Mila de 2014 à 2015.

☒ Incidence de SARM selon la nature du prélèvement

Les résultats de notre étude indiquent que parmi les 5 souches de SARM isolées, 2 sont présentes essentiellement dans le pus et 2 dans le prélèvement vaginal. La souche restante, a été isolée à partir du prélèvement oculaire. Alors que, le SARM a été absent dans les hémocultures, les urines et sérosité. Nos collègues de Master 2014 ont observé que l'incidence de SARM a été de 93.75% dans le pus et sérosité. Aussi, Mastouri *et al.* (2004), ont observé que les SARM sont isolés essentiellement du pus et des produits pathologiques divers. En France, Eveillard (2007), a remarqué parmi les patients porteurs de SARM, le site extra nasal a été identifié dans 80% des cas.

Benouda et Elhamzaoui en 2009 ont rapporté dans une étude d'épidémiologie et prévalence des souches résistantes à la méthicilline (SARM) au Maroc que le pus provenait essentiellement des prélèvements cutanés et des parties molles.

Aouati en 2009, indique dans son étude sur la sensibilité de SARM aux autres familles d'antibiotiques menée à l'Université Mentouri de Constantine que les SARM sont présents principalement dans le pus et les hémocultures avec la même fréquence (47%), les deux autres souches ont été isolées à partir d'un liquide pleural (2.50%) et d'un drain (2.50%), et

montre également que les infections à *S. aureus* résistants à la méthicilline sont principalement cutanées et quand elles sont sévères une septicémie peut être observée.

2.5.5. Incidence de *S. aureus* et de SARM selon les services

☒ Incidence de *S. aureus* et selon les services

Au cours de la période d'étude, la fréquence d'isolement de *S. aureus* (Figure 34) a été variable selon les services concernés, mais la fréquence la plus élevée (56%) d'isolement de *S. aureus* est enregistrée pour des prélèvements externes (communautaires), suivis par les services médicaux, essentiellement le service des maladies infectieuses avec une fréquence de 33% des germes isolés. Cependant, la fréquence, la plus faible concerne le service de pédiatrie (11%). Dans les autres services (services chirurgicaux, urgences médicales) la fréquence d'isolement des *S. aureus* a été nulle (0%).

Ces résultats sont très similaires à ceux obtenu par nos collègues de Master 2014 qui ont rapporté le *S. aureus* était présent dans le service de la maladie infectieux avec des taux de 50% et 12% dans le service de pédiatrie. Par contre, ils ont remarqué que l'incidence de *S. aureus* représente des fréquences de 30% et 7.5% dans les services chirurgicaux et urgences médicales respectivement. Egalement, le service de médecine tunisien a enregistré une fréquence élevée de 54% suivie par le service chirurgical (18%) et pédiatrie (12%) dans un hôpital général tunisien (Boukadida, 2003).

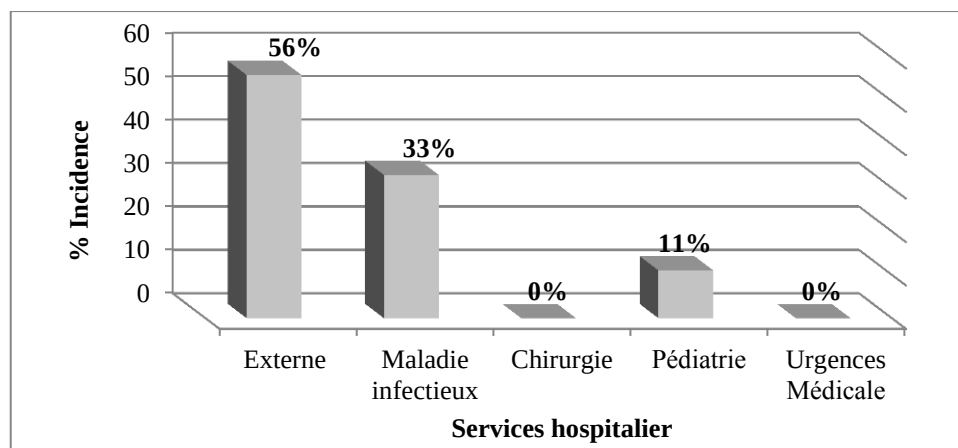


Figure 34: Incidence de *S. aureus* selon les services hospitaliers de 2014 à 2015.

☒ Incidence de SARM selon les services

Les SARM sont présents essentiellement le service des maladies infectieuses dans 2/5 des cas, et 2/5 des souches de SARM ont été isolé des prélèvements externes. L'origine de la souche restante est inconnue. Les services d'urgences médicales, de réanimation, de pédiatrie et les services chirurgicaux n'ont pas enregistré de cas positifs pour le SARM. Contrairement, Aouati et al. (2010), ont trouvé dans leur étude au centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis de Constantine-Algérie que le SARM était présent dans les services des urgences (35%), services médicaux (30%), services chirurgicaux (15%), pédiatrie (10%) ainsi que de patients non hospitalisés (10%). Aussi, Benouda et Elhamzaoui. (2009) ont remarqué au Maroc que les souches provenaient essentiellement des services de réanimation (15/25) suivis des services de chirurgie (5/25) et de médecine (5/25).

D'autre part, nos résultats diffèrent complètement avec ceux obtenu par Yahyaoui. (2013), dans leur études portage nasal de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) au Centre Hospitalière Hassan II au Maroc, que les souches provenaient essentiellement des services de réanimation (53%) suivi du service de dermatologie (32%), puis du service de médecine interne avec (15%). Le dépistage systématique des SARM est préconisé chez les personnes à risque notamment les patients immunodéprimés et les patients hospitalisés en réanimation et en oncologie, afin de mettre en place les mesures préventives pour éviter la diffusion de ce germe mutirésistantes.

2.7. Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* de 2007 à 2014

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion de disques, en milieu gélosé MH (Mueller-Hinton) selon les recommandations décrites par l'institut pasteur.

La Figure 35 illustre le caractère des souches de *S. aureus* résistant (SARM) et sensible à la Méthicilline (Oxacilline) par rapport des souches de *S. aureus*. Le SARM a présenté une résistance à 100 % croisée aux β -lactamines qui s'étend aux autres familles d'antibiotiques dépassent 50% pour la plupart des cas. À l'inverse, les souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la Méthicilline ont affiché un niveau de sensibilité plus important surtout celui marqué pour la Pénicilline (77.42%) et de la Fosfomycine (71.43%).

Contrairement aux SARM, les souches de *S. aureus* présentent un taux de résistance intermédiaire pour la plupart des antibiotiques. Concernant la famille de β -lactamines *S. aureus* enregistre un taux de résistance de 24% identique pour l'Oxacilline, Amoxicilline+Acide Clavulanique et Céfazoline, une fréquence de résistance de 66.38% est observée pour la Pénicilline.

Pour la famille des aminosides, la Gentamycine et la Streptomycine ont présenté respectivement des pourcentages de résistance de 22.73% et de 34.78%. Dans la famille des macrolides, 53.85% des souches de *S. aureus* étaient résistantes à l'Erythromycine et 69.64% pour la Clindamycine. Il est également noté que 37.50% des *S. aureus* étaient résistantes à la Vancomycine et 55.56% à la Tétracycline. Pour les autres antibiotiques testés, les taux de résistance étaient variables. Ils variaient de 66.67% pour la Fosfomycine et 53.66% pour le Triméthoprim+Sulfaméthoxazole et 40.91% pour l'Acide fusidique. Alors que, le taux de résistance à la Norfloxacin 17.65% était plus petit par rapport aux autres antibiotiques.

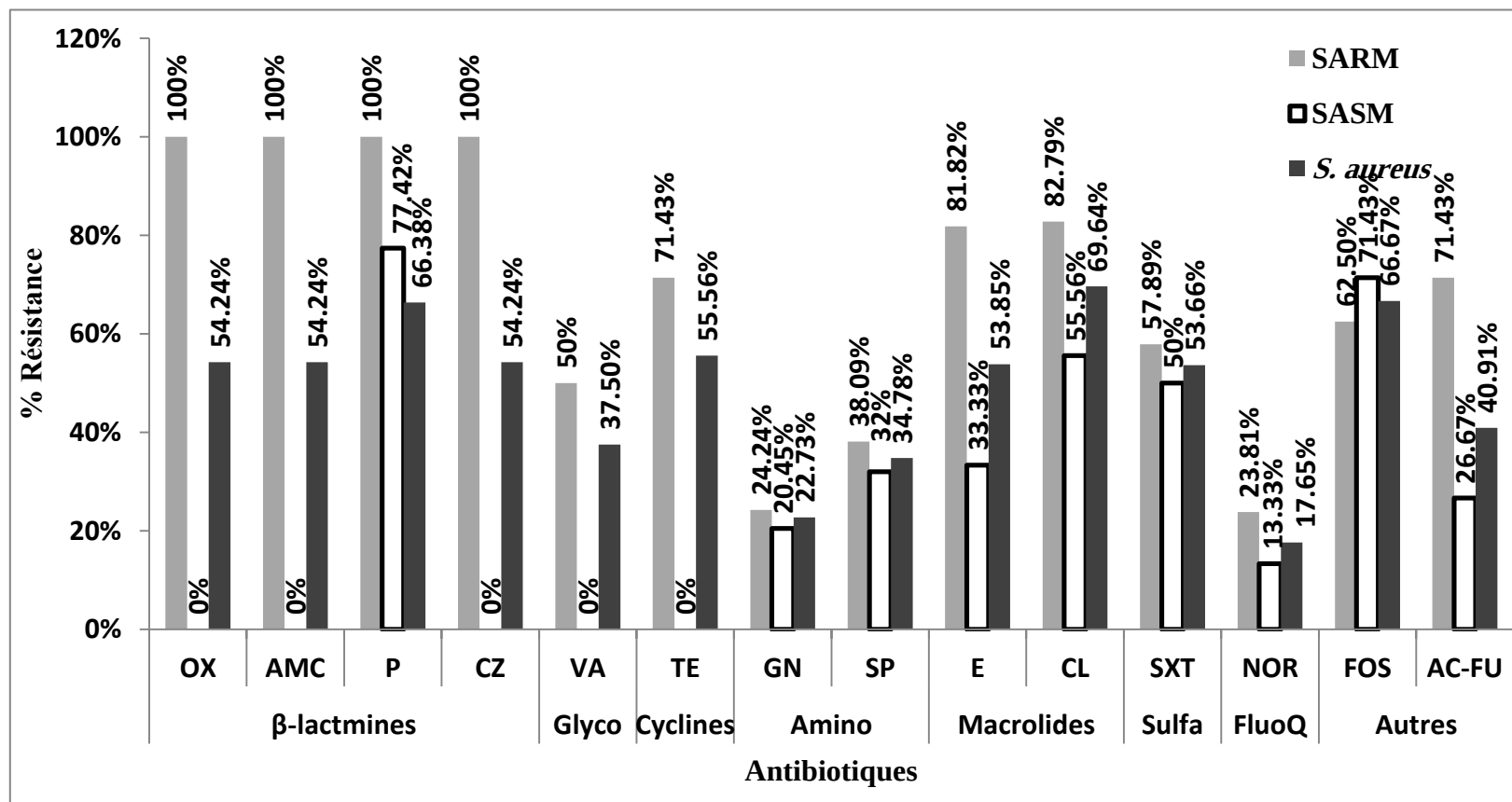


Figure 35: Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus*, SARM et SASM à l'hôpital de Mila de 2007- 2014.

Glyco: Glycopeptides; **Amino:** Aminosides; **Sulfa:** Sulfamides; **FluoQ:** Fluoroquinolones; **OX:** Oxacilline; **AMC:** Amoxicilline+Acide Clavulanique; **P:** Pénicilline; **CZ:** Céfazoline; **VA:** Vancomycine; **TE:** Tétracycline; **GN:** Gentamycine; **SP:** Streptomycine; **E:** Erythromycine; **CL:** Clindamycine; **SXT :** Triméthoprim+sulfaméthoxazole; **NOR:** Norfloxacin; **FOS:** Fosfomycine; **AC-FU:** Acide-Fusidique; **SARM:** *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline, **SASM:** *Staphylococcus aureus* sensible à la Méthicilline.

2.8. Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de SARM de 2007 à 2014

La Figure 36 illustre le caractère de 128 (54.23%) souches de *S. aureus* résistante à la Méthicilline (SARM) par rapport 236 souches de *S. aureus*. Une incidence presque semblable (48.68%) est observée à l'hôpital Mustapha Bacha (Algérie) (Bachir-Pacha *et al.*, 2014). Par contre, ce résultat est plus élevé par rapport aux taux déclarés entre 1999 et 2002 dans divers pays européens comme la Belgique (22%-27%), Irlande (39%-45%), Allemagne (9%-19%), Pays-Bas (0.4%-1%) et Royaume-Uni (31%-45%) (Tiwari *et al.*, 2009).

Le SARM a présenté une résistance à 100 % croisée aux β -lactamines en réduisant ainsi le choix des molécules thérapeutiques. La totalité (100%) des SARM isolées dans ce travail sont avérés résistants à la Pénicilline, Amoxicilline+Acide Clavulanique, Céfazoline, ce résultat est quasiment identique avec le taux de résistance rencontré à l'hôpital des soins tertiaires à l'ouest du Népal qui a révélé que toutes les souches de SARM trouvées résistaient à la pénicilline. Aussi, des taux de résistance de 91.9% et 87.4% étaient remarqués à l'Amoxicilline, Ampicilline, respectivement (Tiwari *et al.*, 2009).

Les souches ont également échappé à l'action des macrolides traduisant des taux de résistance allant de 81.82% pour l'Erythromycine jusqu'à 82.79% pour la Clindamycine (Figure 36), ces incidences ont été plus élevées que ceux obtenues dans une étude réalisée en Turquie par Adaleti *et al.* (2010), qui ont trouvé que 54.6% des isolats étaient résistants à l'Erythromycine et 48% pour la Clindamycine.

Les SARM ont été remarquablement résistants à la Tétracycline et l'Acide-fusidique en exprimant un taux identique de résistance de 71.43%, ce dernier est plus supérieur aux résultats déclarés par Srifi *et al.* (2012), dans leur étude au centre Hospitalier Ibn-Sina de Rabat au Maroc qui ont montré un taux de résistance de 14.9% et 13.6% pour l'Acide fusidique et Erythromycine respectivement. Par ailleurs, la Fosfomycine et la Triméthoprine+Sulfaméthoxazole ont présenté respectivement des pourcentages de résistance de 62.50% et de 57.89%.

Les causes de l'évolution de résistance de SARM par rapport aux autres antibiotiques sont complexes et multiples comprenant, la circulation accrue des patients porteurs entre

les différents établissements de soins et le milieu extrahospitalier qui entraînent une diversification des souches peuvent être incriminés (Tankovic *et al.*., 1997), mais à l'état moléculaire l'évolution de résistance de SARM aux autres antibiotiques a montré que la cassette chromosomique SCCmec qui porte le gène *mec* de résistance à la méthicilline présentait des sites d'attachement pour des transposons et des séquences d'insertion pouvant capter des gènes de résistance à d'autres antibiotiques que les bêta-lactamines (Haidara, 2010; Mastouri *et al.*, (2006).

L'analyse des résultats montre que les antibiotiques qui restaient actifs (sensibles) sont la Vancomycine, la Gentamycine, la Streptomycine et la Norfloxacin, ces derniers ont montré tous des fréquences de résistance inférieure à 50%. Malgré ces taux de résistance faibles par rapport aux autres antibiotiques nous nous sommes intéressés à expliquer ce début d'évolution vers la résistance (Figure 36).

2.8.1. La résistance à la Vancomycine

Dans présente étude, le taux de résistance à la Vancomycine de la famille des glycopeptides est 50% (Figure 36). En Algérie, cette valeur est plus élevée par rapport au résultat obtenu à l'hôpital de Mustapha Bacha (0.92%) (Bachir-Pacha *et al.*, 2014), et du centre hospitalier universitaire de Tlemcen (1.8%) (Rebiahi *et al.*, 2011). Pareillement, ce résultat reste très élevé comparé avec ceux obtenu, au Maroc, par Elhamzaoui *et al.* (2009), et au Liban, par El Ayoubi *et al.* (2014), qui ont rapporté une fréquence de résistance nulle (0%). Dans d'autres pays et en particulier la Tunisie en 2004, l'émergence des souches *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) est rapportée évoquant une crainte de développer un aspect épidémique. En effet, l'incidence des GRSA varie en fonction des pays et de la population étudiée.

Dans la majorité des études, la Vancomycine demeure encore le traitement de première intention des infections causées par le *S. aureus* résistant à la méthicilline et dans de nombreux pays depuis le milieu des années 1990, une augmentation de la résistance a été observée conduisant dans certaines situations à des échecs thérapeutiques (Martin, 2004; Michel et Pharm, 2012). C'est-à-dire est une insuffisance du dosage du glycopéptide administré au malade sont sans doute à l'origine d'échecs thérapeutiques (Joly-Guillou, 2004).

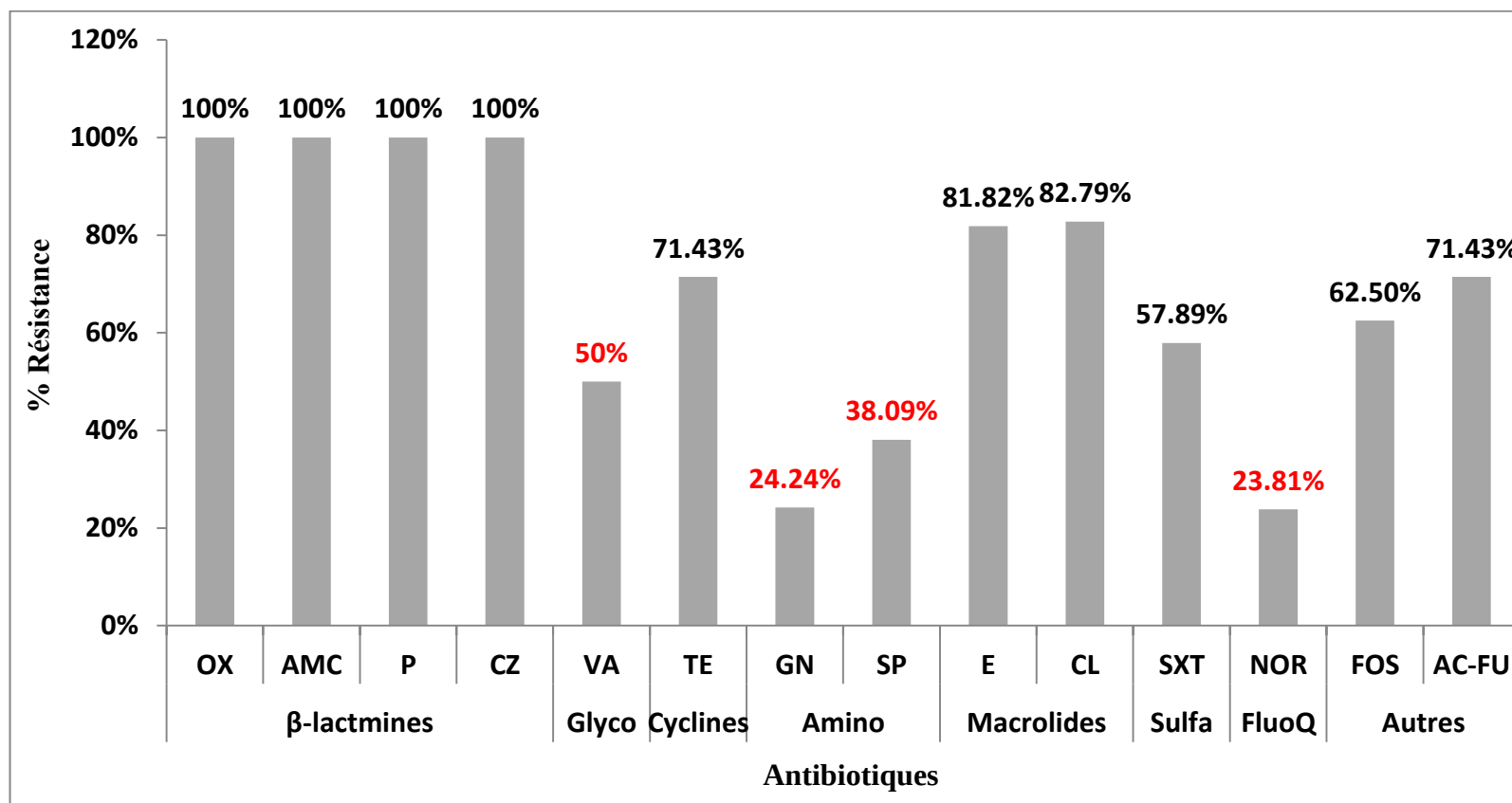


Figure 36: Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de SARM à l'hôpital de Mila de 2007-2014.

Glyco: Glycopeptides; **Amino:** Aminosides; **Sulfa:** Sulfamides; **FluoQ:** Fluoroquinolones; **OX:** Oxacilline; **AMC:** Amoxicilline+Acide Clavulanique; **P:** Pénicilline; **CZ:** Céfazoline; **VA:** Vancomycine; **TE:** Tétracycline; **GN:** Gentamycine; **SP:** Streptomycine; **E:** Erythromycine; **CL:** Clindamycine; **SXT:** Triméthoprim+sulfaméthoxazole; **NOR:** Norfloxacin; **FOS :** Fosfomycine; **AC-FU:** Acide-Fusidique; **SARM:** *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline

Le mécanisme qui confère une résistance de haut niveau aux glycopeptides, résulte de l'acquisition d'un gène exogène *vanA*. Ce gène est le plus fréquemment rencontré chez les entérocoques et, à ce jour, il reste le seul détecté chez *S. aureus*. Ce type de souche est également résistant à la teicoplanine (Aouati 2009; Pérez, 2013). L'acquisition de ce gène implique généralement le transfert horizontal entre *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* (figure 36) d'un plasmide conjugatif contenant le transposon *Tn1546* (Roy, 1997). Le Staphylocoque doré détruit à son tour le plasmide étranger mais intègre le gène de résistance dans son propre plasmide (Rebiahi, 2011). L'expression de ce gène entraîne la formation, à la place des résidus D-alanine-D-alanine, de résidus D-alanine-D-lactate présentant une faible affinité pour la Vancomycine et à un moindre degré pour la Teicoplanine (Figure) (Montcriol, 2003).

2.8.2. La résistance à la Gentamycine

Les souches de SARM isolées ont également échappé à l'action des aminoglycosides traduisant un taux de résistance de 24.24% pour la Gentamicine (Figure 36). Cette résistance est comparable au taux observé de 28% à l'hôpital algérien de Mustapha Bacha par Bachir-Pacha et al. (2014), également, cette résistance est plus élevée, par rapport à des taux obtenus par Mastouri et al. (2006), en Tunisie (18%). D'autre part, ce taux observé est moins important, en comparaison aux résultats d'une étude en Iran (57%) (Rahimi *et al.*, 2013); et par rapport une autre étude en Algérie au centre hospitalo-universitaire ben badis de Constantine (37.5 %) (Aouati *et al.*, 2010).

L'effet majeur de la Gentamycine est sa fixation irréversible sur l'ARNr 16S de la sous-unité 30S du ribosome bactérien, interférant donc dans la synthèse protéique (Leclercq, 2002), La résistance à la Gentamicine, est médiée par le gène *aac* qui code pour une enzyme ayant un effet aminoglycosides acétyltransférases. Ce gène est situé sur un transposon, le *Tn400I*. Le *Tn400I* se retrouve sur des plasmides et sur le chromosome (Ficca *et al.*, 2006; Labrecque, 2007).

Une étude réalisée en Pologne par Hauschild et al. (2008), qui consiste à détecter la sensibilité par la méthode de diffusion en gélose et comparer avec les résultats d'analyse de gènes dans des isolats de staphylocoques. Les souches portant le gène *aac* synthétisent une enzyme qui confère la résistance à la Gentamicine et même à tous les aminoglycosides. Cependant, dans cette étude ce gène a été détecté dans deux isolats sensibles à la

Gentamicine. La détection de gènes de résistance à un antibiotique à des isolats sensibles peut être due à l'amplification du gène répresseur de la résistance aux antibiotiques. Ce résultat est également rapporté par des études similaires comme ceux du Duran et al. (2012), en Turquie.

2.6.3. La résistance à la Streptomycine

La Streptomycine a présenté un pourcentage de résistance de 38.09% à l'hôpital de Mila (Figure 36), en Algérie la résistance des SARM à la Streptomycine montre que son taux est en progression, elle présente 61.8% à Tlemcen en 2011 (Rebiahi *et al.*, 2011).

La Streptomycine appartient à un groupe chimiquement distinct, son activité n'est pas altérée par la présence des enzymes inactivant les autres aminosides qui ont plusieurs sites de fixation ribosomiaux qui ne se chevauchent pas (Quincampoix et Mainardi, 2001).

Chez les staphylocoques, l'altération de la cible ribosomale concerne principalement la Streptomycine, qui par sa fixation sur une protéine ribosomale, permet la sélection de mutants résistants (Rebiahi, 2012).

2.6.4. La résistance à la Norfloxacin

L'augmentation de la résistance aux fluoroquinolones observée est faible (23.81%). En 2005, au centre hospitalier situé à l'île de la Réunion (île française de l'Océan Indien), 14.3% de souches résistantes aux fluoroquinolones s'observent essentiellement parmi les SARM (Picot *et al.*, 2010).

Selon Tankovic (1997), la résistance acquise aux quinolones est croisée entre les différentes molécules et touche essentiellement les staphylocoques hospitaliers, en particulier le staphylocoque doré résistant à la méthicilline (> 90 % de résistance). Pour agir sur leurs cibles, les fluoroquinolones doivent préalablement pénétrer dans la bactérie, le passage des enveloppes bactériennes s'effectuant par diffusion passive. Une diminution de la pénétration de l'antibiotique n'a pas été impliquée dans la résistance chez *S. aureus*, en revanche, un mécanisme d'efflux actif au niveau de la membrane cytoplasmique médiée par la protéine de transport *NorA* a été décrit. *NorA* est présente chez les souches sensibles. Bien que son rôle physiologique ne soit pas connu, elle peut causer une résistance aux fluoroquinolones, tout particulièrement à la Norfloxacin, en cas de surexpression par mutation. L'efflux actif lié à *NorA* dépend de la force protomotrice et plus particulièrement

du gradient de pH membranaire. *NorA* est en fait une protéine de multirésistance car son activité n'est pas spécifique aux quinolones, mais touche aussi d'autres composés de structures variées comme le bromure d'éthidium et le chloramphénicol.

2.9. Analyse spatiale de la résistance aux antibiotiques du SARM

L'analyse spatiale a été conduite par Analyse en Composantes Principale (ACP), en utilisant le programme XLSTAT 2008. La variable étudiée est l'incidence de la résistance aux antibiotiques en pourcentage de 2007 à 2012.

Tableau 19: Incidence de la résistance du SARM en pourcentage à l'hôpital de Mila de 2007 à 2012.

	TE	GN	SP	E	CL	SXT	NOR	FOS	AC-FU
2007	0	25	66.67	75	66.67	0	20	0	100
2008	66.67	23.53	16.67	0	57.14	33.33	0	0	0
2009	0	29.41	25	0	70	100	33.33	0	0
2010	0	33.33	33.33	0	0	0	0	100	0
2011	0	23.08	0	0	54.54	0	0	0	0
2012	0	28.57	0	0	0	75	0	33.33	0

TE: Tétracycline; **GN:** Gentamycine; **SP:** Streptomycine; **E:** Erythromycine; **CL:** Clindamycine; **SXT:** Triméthoprim+ sulfaméthoxazole; **NOR:** Norfloxacin; **FOS:** Fosfomycine; **AC-FU:** Acide-Fusidique.

La matrice de corrélation est représentée dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Matrice de corrélation (Pearson (n))

Variables	TE	GN	SP	E	CL	SXT	NOR	FOS	AC-FU
TE	1								
GN	-0,445	1							
SP	-0,136	0,117	1						
E	-0,200	-0,264	0,845	1					
CL	0,237	-0,638	0,316	0,380	1				
SXT	-0,016	0,243	-0,343	-0,390	0,040	1			
NOR	-0,302	0,112	0,505	0,378	0,622	0,472	1		
FOS	-0,270	0,826	0,037	-0,270	-0,839	-0,242	-0,408	1	
AC-FU	-0,200	-0,264	0,845	1,000	0,380	-0,390	0,378	-0,270	1

TE: Tétracycline; **GN:** Gentamycine; **SP:** Streptomycine; **E:** Erythromycine; **CL:** Clindamycine; **SXT:** Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole ; **NOR:** Norfloxacin; **FOS :** Fosfomycine; **AC-FU:** Acide-Fusidique.

Les deux axes (Tableau 21) donnent une information égale à 68.474% de la représentation.

Tableau 21: Valeur propre et variation (%) exprimées par les composantes principales.

	Axe 1 : Composante principale 1	Axe 2 Composante principale 2
Valeur propre	3.734	2.429
Variabilité (%)	41.484	26.990
% cumulé	41.484	68.474

La contribution de la résistance aux antibiotiques dans la construction des deux composantes principales est le résultat de leurs corrélations avec ces axes. Selon le Tableau 22, nous constatons une forte corrélation entre la Fosfomycine et l'axe 1 (vertical) avec $r = 0.747$, et entre la résistance à l'Erythromycine et l'Acide-Fusidique et l'axe 2 (horizontal) avec $r = 0.884$.

Tableau 22: Corrélation des antibiotiques avec les axes 1 et 2

	F1	F2
TE	-0,610	-0,023
GN	0,702	-0,496
SP	0,567	0,744
E	0,382	0,884
CL	-0,521	0,767
SXT	-0,349	-0,222
NOR	0,031	0,593
FOS	0,747	-0,616
AC-FU	0,382	0,884

Le cercle des corrélations (Figure 37) montre les nuages de points des antibiotiques obtenus par corrélations. Trois clusters importants regroupant des antibiotiques à comportement spatiale similaire et valeurs de corrélation élevés sont remarqués. Le Cluster I regroupe Streptomycine (SP), Erythromycine (E), Acide fusidique (AC-FU), Norfloxacin (NOR) et Clindamycine (CL). Le Cluster II regroupe Triméthoprim+Sulfaméthoxazole (SXT) et Tétracycline (TE). Le Cluster III regroupe Fosfomycine (FOS) et Gentamycine (GN).

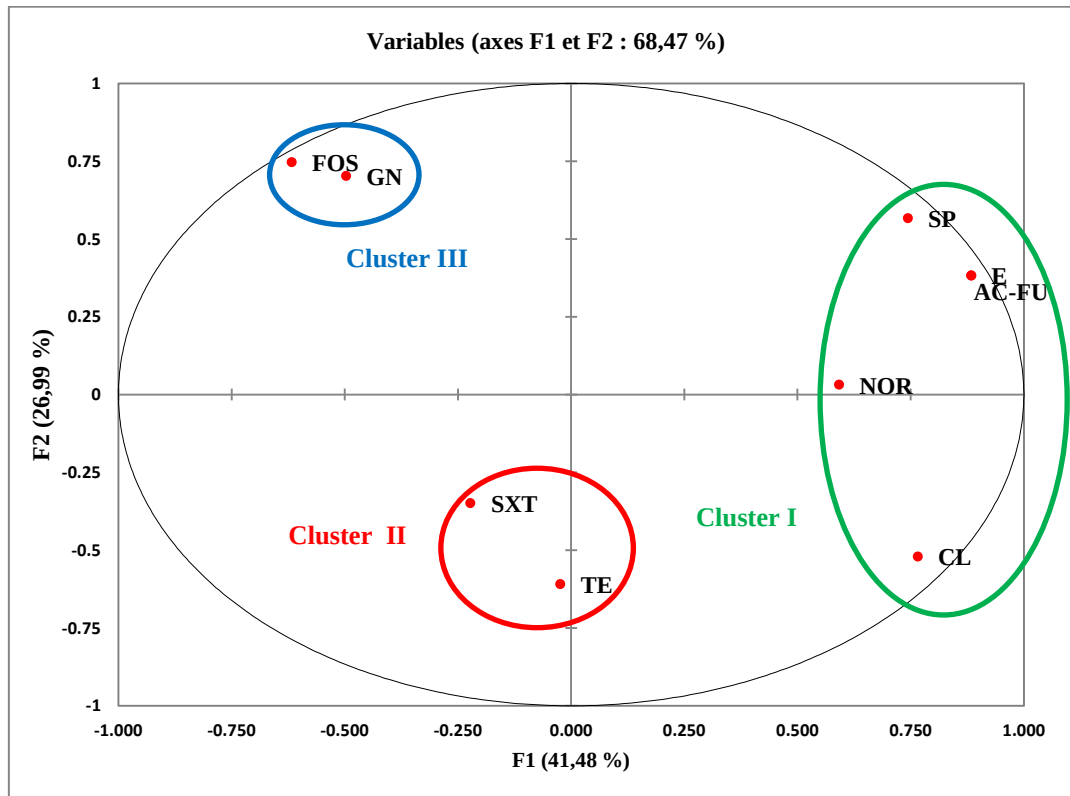


Figure 37 : Analyse spatiale de la résistance aux antibiotiques du SARM par ACP à l'hôpital de Mila (Algérie). **TE:** Tétracycline; **GN:** Gentamycine; **SP:** Streptomycine; **E:** Erythromycine; **CL:** Clindamycine; **SXT:** Triméthoprim+Sulfaméthoxazole; **NOR:** Norfloxacin; **FOS:** Fosfomycine; **AC-FU:** Acide-Fusidique.

- **Erythromycine et l'Acide fusidique**

Il y a une corrélation parfaite ($r = 1$) entre l'Erythromycine (E) et l'Acide fusidique (AC-FU) de Cluster I. En effet, d'un point de vue épidémiologique, la résistance par acquisition du gène *mecA* est plus grave car ce gène est porté par un élément génétique mobile pouvant non seulement favoriser la dissémination de la résistance à la méthicilline mais aussi transporter d'autres gènes codant pour la résistance à d'autres antibiotiques (Mastouri *et al.*, 2004). De plus, Denis (2010) et Vieu (2014), ont confirmé dans leurs études que la cassette staphylococcique SCCmec comporte, en plus du gène *mecA* des gènes de résistance à d'autres antibiotiques de manière variable selon le type de cassette tel que l'Erythromycine et l'Acide fusidique, ceci pourrait expliquer la parfaite corrélation ($r = 1$) observée entre ces deux antibiotiques.

- **Streptomycine et Erythromycine**

Il y a une corrélation positive ($r = 0.845$) dans le Cluster I entre la Streptomycine (SP) de la famille des aminosides et l'Erythromycine (E) de la famille des macrolides. L'analyse globale du profil de résistance des SARM aux antibiotiques confirme le caractère multirésistant de ces bactéries aux différentes familles d'antibiotiques. Cette multirésistance est due au fait que les souches résistantes à la méthicilline sont souvent résistantes aux aminosides et aux macrolides (Aouati *et al.*, 2010). Aussi, Boukadida *et al.* (2003), ont rapporté que la résistance aux macrolides, aminosides et fluoroquinolones est le plus souvent associée à la résistance à la méthicilline.

De plus, selon Rebiahi *et al.* (2011) la corrélation positive entre la Streptomycine de la famille des Aminosides et l'Erythromycine de la famille des Macrolides ($r = 0.845$) pourrait être expliqué par la présence des gènes de résistance à d'autres antibiotiques Aminosides et Macrolides portés par le gène plasmidique de la pénicillinase. D'ailleurs Vieu, (2014), a mentionné que *S. aureus* possède une très grande plasticité génétique. Sous la pression de sélection des antibiotiques, il a très rapidement acquis des gènes portés par des plasmides codant pour des pénicillinases.

- **Streptomycine et l'Acide fusidique**

Une corrélation positive entre la Streptomycine et l'Acide-Fusidique ($r = 0.845$) dans le Cluster I est observée. Cette association n'est pas claire, en effet, la résistance à l'Acide fusidique est secondaire soit à la sélection de mutants résistants au niveau du facteur d'élongation intervenant dans la synthèse protidique soit à une modification de la perméabilité d'origine plasmidique (Corne, 2004). Alors que la Streptomycine appartient à un groupe chimiquement distinct qui par sa fixation sur une protéine ribosomale, permet encore de la sélection de mutants résistants (Rebiahi *et al.*, 2011).

- **Tétracycline, Acide fusidique et Norfloxacin**

Il y a des corrélations négatives entre la Tétracycline (TE) du Cluster II et l'Acide fusidique (AC-FU) du Cluster I ($r = -0.200$) d'une part, et entre la Norfloxacin (NOR) de Cluster I et la Tétracycline (TE) du Cluster II ($r = -0.302$) d'autre part. La résistance à Tétracycline codé par le gène *tetK* est localisée sur des plasmides et des transposons, aussi sur la cassette chromosomique *SCCmec* (Mlynarczyk *et al.*, 1998). Egalement, le mécanisme de

résistance à l'acide fusidique chez *S. aureus* est codé par le gène chromosomique *fus*, ce gène probablement porté par des plasmides (Tankovic *et al.*, 1997; Mlynarczyk *et al.*, 1998). Pareillement, Harmouche (2010), a montré que la résistance à la norfloxacine est codée par le gène *NorA* chez *S. aureus*.

Les corrélations négatives entre ces antibiotiques pourraient être expliquées par la localisation différente des gènes de résistance sur le génome plasmidique ou chromosomique de *S. aureus*. Contrairement, la Figure 38 illustre que la distance génétique entre les gènes de résistance *tetK*, *fusA* et *norA* est faible, encore, la cassette chromosomique SCCmec responsable de la résistance à la méthicilline contiennent des sites privilégiés où les plasmides et des transposons s'intègrent entraînant ainsi la résistance aux antibiotiques non β -lactamines comme la Tétracycline (*tetK*), et l'Acide fusidique et Norfloxacine (*norA*) (Denis, 2010; Liesse Iyamba, 2012; Reygaert, 2013).

Aussi, Mlynarczyk *et al.* (1998), ont mentionnaient que la distance génétique faible entre les gènes de résistance à l'Acide fusidique (*fusA*) et Norfloxacine (*norA*) (Figure 38) expliquent la corrélation positive ($r = 0.378$) chez deux antibiotiques.

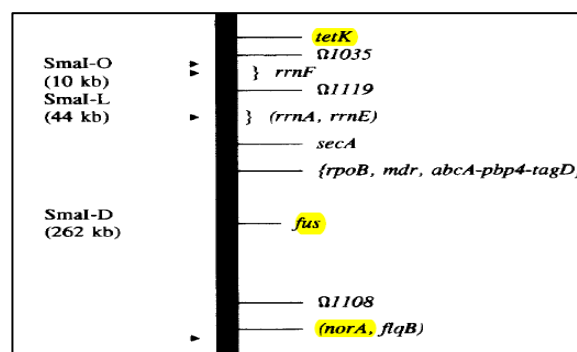


Figure 38: Fragment d'ADN chromosomique de *S. aureus* révélant la localisation des gènes de résistance à la tétracycline (*tetK*), Acide fusidique (*fus*) et Norfloxacine (*norA*). (Mlynarczyk *et al.*, 1998).

- **Fosfomycine et Gentamycine**

Dans le Cluster III, la corrélation est positive entre la Gentamicine de la famille des Aminosides et la Fosfomycine ($r = 0.826$). La résistance à la Gentamicine est médiée par le gène *aac*. Ce gène est situé sur des transposons, ces deux transposons se retrouve sur des plasmides et sur le chromosome, aussi, le gène *aac* est localisé sur la cassette

chromosomique SCCmec (Mlynarczyk *et al.*, 1998). La résistance à la Fosfomycine est médiée par le gène *Fos* localisé sur le chromosome. Les résistances plasmidique pour la fosfomycine est rares (Mlynarczyk *et al.*, 1998; Leclercq, 2002).

La corrélation positive entre la Gentamicine de la famille des aminosides et la Fosfomycine pourrait être liée à l'utilisation de la fosfomycine et des aminosides en association réservés aux infections nécessitant un traitement intraveineux, c'est-à-dire, cette corrélation positive est attachée à la sélection de mutants résistants. Cette sélection est très probablement liée au traitement d'antibiotique (Corne, 2004; Perez, 2013).

En conclusion, en observant l'ACP, les corrélations observées entre les différents antibiotiques pourraient être expliquées par la localisation différente des gènes de résistance sur le génome plasmidique ou chromosomique, ou bien par leurs distances génétiques faibles qui se manifeste par un comportement spatiale similaire. Plus que la distance génétique est faible plus que la chance d'événements d'expression phénotypique conjointe est important. De ce fait, la modélisation spatiale pourrait prédire la cartographie génétique.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Il a été remarqué que la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* concordait souvent avec les résultats obtenus dans le monde. La différence dans certains cas est probablement due à l'origine géographique différentes des isolats.

Les résultats obtenus confirment que l'état de l'antibiorésistance à l'hôpital de Mila en Algérie est très alarmante, vue le comportement mutirésistant des souches *S. aureus* isolées observé. Aussi, les résultats ont montré que les antibiotiques: Vancomycine, Gentamycine, Streptomycine et la Norfloxacin restaient actifs (sensibles) et ont montré tous des fréquences de résistance inférieure à 50%: 50%, 24.24%, 38.09% et de 23.81% respectivement. Cependant, cette résistance quoi que faible est aussi inquiétante, vue l'évolution globale vers la résistance des autres antibiotiques constatée. Il est fort probable, que ces antibiotiques pourraient avoir le même comportement dans le futur.

En observant l'ACP, les corrélations observées entre les différents antibiotiques pourraient être expliquées par la localisation différente des gènes de résistance sur le génome plasmidique ou chromosomique, ou bien par leurs distances génétiques faibles qui se manifeste par un comportement spatiale similaire. Plus que la distance génétique est faible plus que la chance d'événements d'expression phénotypique conjointe est important. De ce fait, la modélisation spatiale pourrait prédire la cartographie génétique.

Le présent travail alarme les responsables de la santé publiques, les praticiens et les chercheurs à prendre les mesures de prévention en urgence contre le développement de la résistance aux antibiotiques en milieux hospitalier ou communautaire.

En perspectives :

- Ce travail préliminaire constitue une base de départ pour poursuivre la surveillance épidémiologique et l'évolution phénotypique et génotypique de la résistance aux antibiotiques des souches de SARM.
- Etudier les gènes de résistance aux antibiotiques par PCR, séquençage et confrontation aux bases de donnée tel que Gene Bank sur NCBI.

Références

Références

1. **Adaleti R., Nakipoglu Y., Ceran N., Tasdemir C., Kaya F., Tasdemir S. (2010).** Prévalence de la résistance phénotypique de *Staphylococcus aureus* au macrolide, lincosamide, streptogramines B, ketolid et des antibiotiques linézolide en Turquie. *Brasilia Journal of Infections Diseases*.14.
2. **Afissa H.S. (2014).** Etude de l'antibiorésistance des souches de Staphylocoques isolées à partir des dispositifs médicaux à l'hôpital de Mohamed Boudiaf Ouargla. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 67p.
3. **Al-Hamdani Q., Maithem H., Intisar G. (2012).** Etude de profil plasmidique, les profils de sensibilité de *Staphylococcus aureus* clinique isolé chez des patients avec otite moyenne chez les Bassora. *Journal de Recherches du Bassora*.38: 79-80.
4. **Alomar J. (2007).** Etude de propriétés physiologique de lactococcus Lactis et Lactococcus garvieae pour la maitrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromage. *Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaire*.p12.
5. **Andremont A. (2002).** Pression de sélection antibiotique, flores commensales et évolution de la résistance. *Pharmacologie*. 15 : 5-160.
6. **Anonyme 1 (2011).** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire).
7. **Aouati H. (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Université Mentouri. Constantine. 94p.
8. **Aouati H., Arafa N., Benlabed K., Boulahrouf A., Bousseboua H. (2010).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at University Hospital center Ben Badis of Constantine-Algeria. *Revue tunisienne d'infectiologie*. 4: 129-133.
9. **Asseray., Madani N. (2006).** Traitement des infections a staphylocoque doré par aminosides et glycopeptides : mieux predire le succes ou l'echec. Approche experimentale et *in vitro*. Université de Nantes. 107p.
10. **Aubry-Damon H., Soussy C.J. (2000).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : facteurs responsables de l'endémie. *Rev Méd Interne*. 21: 52-344.
11. **Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., Yuzawa H., Aoki K., Oguchi A et al. (2002).** Genome and virulence determinants of high virulence Community-acquired MRSA. *Mechanisms of Disease*. 359: 27-1819.

12. **Bachir-Pacha M., A. Bouyoucef A., Triki-Yamani R. R., Khaled H., Teggat F., Tachet F. (2014).** Antibiorésistance study of *Staphylococcus aureus* strains isolated in Algerian hospitals. Agriculture-Science and Practice. 144-150.
13. **Bankolé H.S., Dougnon T.V., Fiogbé E.P., Amoussou A.N., Baba-Moussa L. (2014).** Identification de *Staphylococcus aureus* : est-il possible de réduire le volume de plasma de lapin sans influencer la recherche de la staphylocoagulase libre. Journal of Applied Biosciences 73: 6027-6032.
14. **Beaudry-Ferland M. (2012).** Étude sur le *staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez le porc à l'abattoir au québec, Canada. Université de Montréal. 97p.
15. **Benhamed N. (2014).** Evolution de la qualité microbiologique et sanitaire du lait cru dans la région d'Oran, Algérie: Etude du profile moléculaire virulent des *Staphylococcus aureus* impliquées dans les mammites bovines. Mémoire de Doctorat. Université d'Oran. 39-40p.
16. **Benhamou D., Carrié A.S., Lecomte F. (2005).** *Staphylococcus aureus* : place et impact dans la prise en charge des pneumopathies nosocomiales. Rev Mal Respir. 22: 595-603.
17. **Benouda A., Elhamzaui S. (2009).** *Staphylococcus aureus* : Epidémiologie et prévalence des souches résistantes à la méthicilline (SARM) au Maroc. Rev Tun Infectiol. 3: 15-20.
18. **Berger-Bâchi B. (1997).** Résistance aux bêta-lactamine. Méd Mal Infect. 27:195-200.
19. **Brun M., Bes Y. (2002).** *Staphylococcus* : actualités taxonomiques et identification. Revue Française des Laboratoires. 343: 23-30.
20. **Bisognano C. (2000).** Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. Mémoire de Doctorat. Université de Genève. 110p.
21. **Bonnet J. (2014).** Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin démarche d'accompagnement dans sept élevages. La faculté de médecine de créteil. 123p.
22. **Bouamer., Guerbati. (2008).** Fréquence de l'otite moyenne causée par *Pseudomonas aeruginosa* dans la région d'Ouargla (Isolement, identification, antibiogramme). Université Kasdi Merbah Ouargla. 62p.
23. **Bouchard D. (2013).** Potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin contre les mammites à *Staphylococcus aureus*. Mémoire de Doctorat. Université de Rennes 1. 41p.

24. **Boukadida J., Ben Abdullah H., Boukadida N. (2003).** Profil et sensibilité aux antibiotiques de 115 staphylocoques impliqués dans des septicémies dans un hôpital général tunisien. *Bull Soc Pathol Exot.*4: 283-285.
25. **Brien F. G., Ramsay J.P., Monecke S., Coombs G., W Robinson O. J et al. (2014).** *Staphylococcus aureus* plasmids without mobilization genes are mobilized by a novel conjugative plasmid from community isolates. *Journal of Antimicrobien Chemotherapy.*1-4.
26. **Brisson-Noé A., arthur M., courvalin P. (1988).** Transfert hétérogramique de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les conditions naturelles. 225-229.
27. **Canu A., Leclercq R. (2002).** Les macrolides : une diversité de mécanismes de résistance. *Méd Mal Infect.* 32: 32-44.
28. **Cariello C. (2012).** La spectrométrie de masse maldi-Tof et le diagnostic microbiologique. *Laboratoire de microbiologie.* 15p.
29. **Carle S, (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Centre Universitaire de Sante McGill.* 6-21.
30. **Cattoir V. (2012).** Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Revue Francophone des Laboratoires.* 445:79-87.
31. **Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004).** Bêtalactamines. *EMC-Maladies Infectieuses.* 1: 129-202.
32. **Chaalal W. (2013).** Occurrence et profil d'antibiorésistance de *staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaires. *Université d'Es-Senia Oran Faculté des science.* 94p.
33. **Charlier P., Coyette J., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé et al. (1998).** Résistance bactérienne aux β -lactamines. *Médecine/Sciences.* 14: 55-544.
34. **Chavakis T., Preissner K.T., Herrmann M. (2007).** The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol.* 28: 408-418.
35. **Collomb A. (2011).** Caractérisation de La différence desensibilité à l'infection par *Staphylococcus aureus* de deux lignées de souris. *Mémoire de Doctorat. l'Université Paul-Sabatier de Toulouse* [http:// oatao.univ-Toulouse.fr/](http://oatao.univ-Toulouse.fr/) . 69p.
36. **Corne P. (2004).** *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. *Mémoire de Doctorat. Université Montpellier I.* 174p.
37. **Daddi Oubekka S. (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* apport de la microscopie de fluorescence multimodale. *Mémoire de Doctorat. Université Paris Sud XI.* 190p.

38. **Daini O.A., Akano SA. (2009).** Résistance plasmique aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* chez les patients et non les patients. La Recherche Scientifique et Essai. 4: 346-350.
39. **Daurela C., Leclercq R. (2008).** L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. Revue Francophone des Laboratoires. 407: 81-90.
40. **David B. (2010).** Etude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré . Mémoire de Doctorat. Université Denis Diderot (Paris VII).60p.
41. **De Buyser M.L. (1996).** Les staphylocoques en Microbiologie alimentaire. Technique et Documentation.106-119.
42. **Deghorain M., Melderne L. V. (2012).** The Staphylococci Phages Family: An Overview. Vireuses. 4: 3316-3335.
43. **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Médical Internationales. Paris. 476p.
44. **Deliere-Baron E., Jourdan B., Duviuet M., Abramowitz C.L. (1996).** Importation et acquisition à la méthicilline isolé en milieu gériatrique institutionnel. Méd Mal Infect. 26: 50-644.
45. **Delorme T., Rose S., Senita J., Callahan C., Nasr P. (2009).** Épidémiologie et de susceptibilités de résistant à la méthicilline *Staphylococcus aureus* dans le nord de l'Ohio. Microbiologie et maladies infectieuses. 132: 668-677.
46. **Denis F. (2010).** Contribution to the molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Belgian populations. Université Libre de Bruxelles. 144p.
47. **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bing E., Quentin R. (2007).** Bactériologie Médicale: Techniques usuelles. Elsevier Masson SAS. 581p.
48. **Deschamps PH., Fauchère JL., Simonet M. and Veron M. (1981).** Comparaison des performances de milieux commercialisés pour hémocultures: Etude faite sur 1580 prélèvements. Ann Biol Clin. 39: 29-32.
49. **Descloux E., Mohammedia I., Gileta Y., François B., Etienne J. (2007).** Pneumonie nécrosante à *Staphylococcus aureus* communautaire résistant à la méthicilline et producteur de Leucocidine de Pantone-Valentine chez un adulte. Reanimation.16: 256-258.
50. **Diallo A. (2007).** Le Portage nasal de *Staphylococcus aureus* en milieu chirurgical à l'hôpital du point G. Université de Bamako. 80p.

51. **Diego S. (2011).** Test d'identification de *Staphylococcus aureus* isolé d'une culture. Gen-Probe Incorporated. 21-64.
52. **Doublet B., Bousquet-Méloué A., Madece J.Y. (2012).** Le concept « One Health » en antibiorésistance et les flux de gènes. *Innovations Agronomiques*. 24: 79-90.
53. **Duckworth D.H. (1976).** Who discovered bacteriophage. *Bacteriologie*. 40: 793-802.
54. **Duran N., Ozer B., Duran G.G., Onlen Y., Demir C. (2012).** La résistance aux agents antimicrobiens. *Indian J Med Res*.1-12.
55. **Durupt F., Tristan A., Bes M., Vandenesch F., Etienne J. (2005).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline d'origine communautaire Community-acquired méthicilline résistant *Staphylococcus aureus*. *Méd Mal Infect*. 35: 38-40.
56. **Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schkeufer K.H., Stackebrandt E. (2006).** The Prokaryotes: Bacteria, Firmicutes, Cyanobacteria 3^{ème} éd. New-York . 4-75.
57. **El-Anzi O. (2014).** Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées au Centre Hospitalier Ibn Sina de Rabat. Mémoire de Doctorat. Université Mohammed V – Souissi 2. 99p.
58. **El Ayoubi M D., Hamze M., Mallata H., Achkarc M., Dabboussi F. (2014).** Article Glycopéptide intermediate *Staphylococcus aureus* and prevalence of the luk-PV gene in clinical isolates, in Northern Lebanon. *Méd Mal Infect*. 44: 223-228.
59. **Elazhari M., Zerouali K., Elhabchi D., Cohen N., El malki1 A., Dersi1 N., Hassar M., Timinouni M., Saile R. (2010).** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* communautaires à Casablanca (Maroc). *Revue Tunisienne d'Infectiologie*. 4 : 134-140.
60. **Elhamzoui S., Benouda A., Allali F., Abouqual R., Elouennass M. (2009).** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans deux Hôpitaux Universitaires à Rabat, Maroc. *Méd Mal Infect*. 39: 891-895.
61. **El Haddad L. (2010).** Caractérisation des phages de *Staphylococcus aureus*. Université Laval Québec. 80p.
62. **Eveillard M. (2007).** Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline à l'admission: Adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Mémoire de Doctorat. Université D'angers. 159p.
63. **Ficca G., Chauvel M., Moüy D. (2006).** Étude de la prévalence de la résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus* communautaire. *Méd Mal Infect*. 36: 207-212.

64. **Fournier S. (2006).** Relation entre consommation des antibiotiques et résistance bactérienne. P9
65. **Frost L.S., Leplae R., Summers A.O. (2002).** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3: 722-732.
66. **Gangoue-Pieboji J. (2007).** Caractérisation des Béta-lactamines et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Université de Liège.
67. **Garnier et Denis. (2007).** Cocci à Gram positif. *Bactériologie médicale*. 288-320.
68. **Ghernaout-Benchouk S. (2013).** Prevalence du portage nasal de *staphylococcus aureus*: Son rôle dans l'infection du site opératoire. Mémoire de Doctorat. Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen. 18-44.
69. **Gillet P., Boel L., Jacobs J. (2009).** Bactériologie médicale tropicale. Institut de Médecine Tropicale. 46p.
70. **Gomez S.E. (2014).** *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in animals: Molecular epidemiology, antimicrobial resistance, virulence and zoonotic potential. Université de la Rioja. 15 p.
71. **Gras D. (2006).** Etude des interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humaines normales et mucoviscidiques et *Staphylococcus aureus*. Université Déréims Champagne-Ardenne u.f.r. de Médecine. 158p.
72. **Gonthier R. (2000).** Infection urinaire du sujet âgé. *Revue de Gériatrie* 25: 95-103.
73. **Grohs P. (2009).** Évolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques: La méthicilline est-elle encore un marqueur de multirésistance. *Pathologies Biologie*. 57:1-8.
74. **Grosjean J., Clavé D., Archamdoud M., Pasquier C.H. (2011).** Bactériologie et virologie pratique. Edition de Boeck Université. Paris 2^{ème} édition. 290p.
75. **Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B., Atmani-guemouri S. (2010).** Microbiologie Travaux pratique. 3^{ème} édition corrigée office des Publications Universitaires. 139p.
76. **Guillemot. (1999).** Médicament et risque d'antibiotique sur le développement des résistances, ou concerner une population. Enfin la réalité des bénéfices thérapeutiques doit être évaluée au niveau individuel et populationnel. *Médecin Epidémiologiste* 27: 38-41.
77. **Guiraud J.P. (2012).** Microbiologie alimentaire. Le mensuel de l'innovation alimentaire. 651p.

78. **Haidara W. (2010).** Pneumopathie nécrosante a *Staphylococcus aureus* producteur de Leucocidine de panton et valaentine d'origine communautaire a propose d'un cas clinique. Mémoire de Doctorat. Université Mohammed. P 17.
79. **Hamdad F., Donda F., Laurans G., Canarelli B., Rousseau F., Biendo M., Thomas D. (2006).** Performances des différentes méthodes de détection de la résistance à l'oxacilline de souches atypiques de *Staphylococcus aureus*. Pathologie Biologie. 54: 447-452.
80. **Hanssen A., Kjeldsen G., Ericson Sollid J. (2004).** Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: Evidence of horizontal gene transfer. Antimicrob Agents Chemother. 48:96-285.
81. **Harmouche A. (2010).** Etude de l'antibiorésistance chez 83 souches autochtones de bactéries lactiques. Université d'Oran. 94p.
82. **Hauschild T., Sacha P., Wieczorek P., Zalewska M., Kaczynska K., Tryniszewska. (2008).** Résistance des aminosides dans les isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* d'un hôpital universitaire à Bialystok, Pologne. Folia Histochem Cytobiol. 46: 225-228.
83. **Iandolo J., Worrella V., Kajetan H., Qianb Y., Tianb R et al. (2002).** Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages f11, f12 and f13 of *Staphylococcus aureus*. Gene. 289:109-118.
84. **Joly-Guillou M.L. (2004).** Le point sur les staphylocoques dorés de moindre sensibilité aux glycopeptides en réanimation. Réanimation. 13: 185-189.
85. **Joly-Guillou M. L. (2004).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Association des Anciens Elevés de l'Institut Pasteur. 46: 1-100.
86. **Kafala B. (1998).** Isolement du groupe des gènes *hemCDBL*, codant pour les enzymes nécessaires aux étapes précoces de la voie de biosynthèse de l'hème chez *Staphylococcus aureus*. Mémoire de Doctorat. Université de Montréal. 219p.
87. **Keiichi H., Longzhu C., Makoto K, Teruyo I. (2001).** The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology. 10: 486-493.
88. **Kesteman A.S. (2009).** Influence des facteurs associés à une antibiothérapie de type métagy lactique sur les relations pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) des antibiotiques. Conséquences sur les schémas posologiques et sur l'émergence de résistance. Mémoire de Doctorat. Université Toulouse III. 181p.
89. **Kloos W. E; Schleifer K. H. (1986).** Genus IV *Staphylococcus* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1013-1035.

90. **kouamé paul-Gérard K. (1995).** Prévalence de l'infection urinaire: chez des sondes "dans le service d'urologie du chu de cocody étude préliminaire". Université nationale de Côte D'ivoire.74p.
91. **Kumar P., Shukla I., Varshney S. (2011).** Le dépistage nasal de travailleurs de la santé pour le transport nasal de SARM coagulase positifs et la prévalence de la colonisation nasale avec *Staphylococcus aureus*. Biologie et Médecine 3: 182-186.
92. **Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I et al. (2001).** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet. 357: 1225-1240.
93. **Labrecque O. (2007).** Sensibilité d'isolats de *Staphylococcus aureus* d'origine bovine aux antimicrobiens et présence de gènes de résistance. Université de Montréal. 100p.
94. **Lachgueur A. (2013).** Etude de la colonisation des nouveaux nés par la flore à Gram positifs dans le service de néonatalogie de l'EHS de Tlemcen Université Aboubekr Belkaid Tlemcen. 46p.
95. **Lea Hruska L. (1993).** Genetic and physical analysis of the *Staphylococcus aureus* chromosome using twoTn917 derivatives. University Microfilms International. P 4.
96. **Leclercq B. (2002).** Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. Réanimation. 21: 83-375.
97. **Leclercq R. (2002).** Les coques à Gram-positif mutirésistantes aux antibiotiques : intérêt du linézolide. Méd Mal Infect. 32: 449-459.
98. **Leclercq R., Bismuth R., Pierre J. (1990).** Sensibilité et résistance aux antibiotiques des staphylocoques a coagulase négative. Méd Mal Infect. 29-40.
99. **Leclercq R., Cattoir B. (2012).** Bacteries a Gram positif et glycopeptides. Revue Francophone des Laboratoires. 454: 41-46.
100. **Léone M., Ayem M. L., Martin C. (2000).** Les glycopeptides. Revue générale. 19: 87-177.
101. **Lepelletier D., Richet H. (2001).** Surveillance et contrôle des infections à *Staphylococcus aureus* résistants a la meticilline dans les hôpitaux français. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire(BEH).6.
102. **Liaqid A. (2012).** Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen. Unéversité Abou Bekr Belkaid-Tlemcen. 95p.

103. **Liesse Iyamba J. M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Université Libre de Bruxelles. 229p.
104. **Loulergue P., Turret S. (2003).** Le staphylocoque doré résistant à la méthicilline d'origine communautaire. 27p.
105. **Lowy F.D. (1998).** *Staphylococcus aureus* infections. Engl J Med. 339: 520-532.
106. **Lozniewski A., Rabaud C., Nancy Juillet. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections Associées Aux Soins. 1-4.
107. **Mainardi, (1997).** Résistance des staphylocoques aux glycopeptides. Méd Mal Infect. 27: 940-942.
108. **Malachowa N., Deleo F. R. (2010).** Les éléments génétiques mobiles de *Staphylococcus aureus*. Cellular and Molecular Life Sciences. 76: 3057-3071.
109. **Mamadou Iouma T. (2007).** Prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline au CHU du Point G. Mémoire de Doctorat. Université de Bamako. 89p.
110. **Mastouri M., Nour M., Ben Nejma M., Bouallegue O., Hammami M., Khedher M. (2006).** Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie. Pathologie Biologie. 54: 33-36.
111. **Marisa H., Jouy E., Jean-Yves M., Laurent M. (2012).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline: un partage entre l'Homme et l'animal. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation. 53: 40-43
112. **Martin C. (2004).** Hétérogénéité des milieux gélosés cœur-cerveille (BHI) : Effets sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à la vancomycine et à la teicoplanine des souches de *Staphylococcus aureus*. Pathologie Biologie. 52: 450-454.
113. **Mccarthy A., Lindsay J.A. (2012).** The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. BMC Microbiology. 12: 1-8.
114. **Merlet A. (2010).** Implication de la leucocidine de Panton et Valentine dans les infections sévères à *Staphylococcus aureus* en Nouvelle-Calédonie. Mémoire de Doctorat. Université Bordeaux 2 - Victor Segalen. 56: 117p.
115. **Michael A., Stephen M., Slade O., Anthony J. Firth N. (2013).** Biology of The staphylococcal conjugative multirésistance plasmid psk41. Plasmide. 70: 42-51.

116. **Michel M.C., Pharm B. (2012).** Infection nosocomiale à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez un patient adulte hospitalisé : Quel antibiotique choisir. *Pharmactuel*. 1: 23-46.
117. **Mingming Xia R., Dwayne L., Damien M., Serban I. (1999).** Méthode rapide pour l'identification des essential gènes dans *Staphylococcus aureus*. *Plasmide*. 42: 144-149.
118. **Mlynarczyk A., Mlynarczyk G., Jeljaszewicz J. (1998).** The Genome of *Staphylococcus aureus*: A Review *Bacteriology*. 287: 277-314.
119. **Montcriol A., Reverdy M.E., Koeck J.L. (2003).** Mécanisme et méthodes de détection de la résistance de *staphylococcus aureus* aux glycopeptides. *Revue Française des Laboratons*. 352: 31-39.
120. **Morikawa K., Inose Y., Okamura H., Maruyama A., Hayashi H., Takeyasu K., Ohta T.A. (2003).** New staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: Functional significance and implication for the evolutionary processes. *Gen Cell*. 8: 699-712.
121. **Moritz V.V. (2001).** Résistance aux antibiotiques, notamment en aviculture. *Conf OIE*. 123-134.
122. **Mouloudi F. (2013).** La qualité hygiénique et microbiologique de la restauration collective: cas de restaurants universitaire d'Oran. *Universitaire d'Oran Es-Senia*. 111p.
123. **Muylaert A., Mainil G. J. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : Les mécanismes et leur « contagiosité ». *Unéversité de Liège*. 109-123.
124. **Nour M., Mastouri M., Ben Nejma M. (2005).** Le staphylocoque doré résistant à la méthicilline : Emergence et bases moléculaires de la résistance. *Pathologie Biologie*. 53: 334-340.
125. **Perez P. (2013).** Typage de *Staphylococcus aureus* par MLVA : Etude de faisabilité de la détection par HRM. *Mémoire de Doctorat. Université de Lorraine*. 52p.
126. **Périchon B., Courvalin P. (2009).** Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 4580-4587.
127. **Peyrou M. (2001).** Antibiorésistance des souches bactériennes d'origine équine : Etude Bibliographique et exemple de l'hôpital vétérinaire de st-hyacinthe. *Université Toulouse*. P19.
128. **Picot S., Rakotomalala R.S., Farny R., Simac C., Michault A. (2010).** Évolution de la résistance aux antibiotiques de 1997 à 2005 à la Réunion. *Méd Mal Infect*. 40: 617-624.

129. **Price J.R., Didelot X., Crook D.W., Llewellyn M.J., Paul J. (2013).** Whole Genome Sequencing in the Prevention and control of *Staphylococcus aureus* Infection. *Journal of Hospital Infection*. 83: 14-21.
130. **Prunier A.L. (2004).** Hypermutabilité et adaptation chez les souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mucoviscidose : Rôle des gènes *mutS* et *mutL* et impact sur la résistance aux macrolides. Université de Caen/Basse-Normandie. 133p.
131. **Quincampoix J.C., Mainardi J.L., (2001).** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation* 10: 75-267.
132. **Rajadurai K., Mani K.R., Selvam K P., Mani M., Bhaskar M., Manikandan P. (2006).** Prévalence et antibiogramme de *Staphylococcus aureus* doré résistant : Une étude multicentrique. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24: 8-34.
133. **Rahimi F., Bouzari M., Katouli M., Pourshafie M.R. (2013).** Prophages typing of methicillin resistance staphylococcus aureus isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Jundishapur Microbial*. 6: 80-85.
134. **Rahman S., Mumtaz S, Mufti A.J., Shah S.H., Rahman M. (2011).** Incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à Peshawar. *J Med Ayub Coll Abbottabad*. 23: 99-101.
135. **Raymond J., Bergeret M. (2007).** Résistance aux antibiotiques des *Staphylococcus aureus* responsables d'infections ostéoarticulaires. *Archives de Pédiatrie*. 14: 97-101.
136. **Rebiahi S.A. (2012).** Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen. Mémoire de Doctorat. Université de Tlemcen. 131p.
137. **Rebiahi S.A., Abdelouahid D.E., Rahmoun M., Abdelali S ., Azzaoui H. (2011).** Emergence de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine isolées du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen (Algérie Nord-ouest). *Méd Mal Infect*. 41: 646-651.
138. **Robert D. (2013).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM): Généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive. Mémoire de Doctorat. UFR sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé. 125p.
139. **Reygaert W. C. (2013).** Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education*. 297-305.

140. **Romilly C. (2012).** Fonction de nouveaux ARN non codant dans la régulation de l'expression des gènes de *Staphylococcus aureus*: Adaptation à l'environnement et virulence. Mémoire de Doctorat. Université de Strasbourg. 336p.
141. **Roy P.H. (1997).** Dissémination de la résistance aux antibiotiques: Le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. médecine/sciences. 13: 33-927.
142. **Saulnier P., Andremont A. (1997).** Les marqueurs moléculaires chez *Staphylococcus aureus* résistants la méthicilline. Analyse critique. Institute Gustave Roussy.159-163.
143. **Senouci B.M., Abdelouahid D.E. (2010).** Méthodes et techniques en bactériologie, Office des Publication Universitaires, Edition .04: 131p.
144. **Sevin E., Larmaraud-Sevin O., Legrand L. (1999).** Approche moléculaire de la résistance à la méthicilline de *Staphylococcus aureus*. 315: 31-35.
145. **Sfeir M., Obeid Y., Eid C., SalibyM., Farra A., Farhat H., Mokhbat J.E. (2013).** Prevalence of *Staphylococcus aureus* methicillin-sensitive and methicillin-resistant nasal and pharyngeal colonization in outpatients. Lebanon American Journal of Infection Control.1-4.
146. **Soussy C.J. (2007).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Monographies en urologie.
147. **Stalder T. (2012).** Implication des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée sur la dissémination de l'antibiorésistance: Dynamique des intégrons de l'émission au rejet. Mémoire de Doctorat. Université De Limoges. 254p.
148. **Takahashi T., Satoh I., Kikuchi N. (1999).** Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S ARNr gene sequence analysis. International Journal of Systematic Bacteriology. 20p.
149. **Tankovic J., Aubry-Damon H., Leclercq R. (1997).** Résistance aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. Méd Mal Infect. 27: 16-207.
150. **Tattevin P. (2011).** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. Médecine et maladies infectieuses. 41: 167-175.
151. **Tiwari H K., Kumar A., Sapkota D., Sivarajan K, Kumar V. (2009).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline: prévalence et antibiogramme dans un hôpital de soins tertiaires dans l'ouest du Népal. J Infect Dev Ctries 3: 681-684.
152. **Tremblay C. (2012).** Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine animale du Québec. Pharmacie. 5: 284- 295.

153. **Tremblay S. (2007).** Etude moléculaire du recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques. Université Laval Québec. 109p.
154. **Tristan A., Durand G., Durupt F., Ferry F., Elisabeth M et al. (2005).** SARM : données épidémiologie récent et évolution de la résistance. Revue Francophone des Laboratoires. 376:75-79.
155. **Trotot –Voilliot C. (2012).** Aspect clinique des infections cutanées à *Staphylocoques aureus* sécréteurs de Leucocidine de panton valentine à propos de 15 cas. Mémoire de Doctorat. Université de Lorraine. 93p.
156. **Van Bambeke F. (2008).** Antibiotiques. Université Catholique de Louvain. 202p.
157. **Vandenesch F. (2011).** Leucocidine de panton valentine : facteur indépendant de gravité des pneumonies à *Staphylococcus aureus*. Centre de Biologie et Pathologie Est. 24p.
158. **Vieu G. (2014).** Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Etude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Mémoire de Doctorat. Université Toulouse iii – Paul Sabatier. 107p.
159. **Vincenot F., Saleh M., Prévost G. (2008).** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Revue Francophone des Laboratoires. 407: 61-69.
160. **Yahyaoui G., Tlemçani I., Benjelloun S., Mahmoud M. (2013).** Portage nasal de *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline (SARM) au chu Hassan II de FES. Société Marocaine de Microbiologie Médicale.

Annexes

Annexe 1: Composition de certains milieux de culture**❖ Le bouillon nutritif : (milieu de base, complexe, liquide)**

- Extrait de viande sec5g
- Bacot-peptone.....10g
- Chlorure de sodium.....5g
- Eau distillée.....1000ml
- pH=7.2-7.4
- Stérilisation par autoclavage pendant 15 min à 120 °C

❖ La gélose Chapman (milieu complexe gélosé, à la fois sélectif et différent)

- Peptone10g
- Extrait de viande de bœuf1g
- Chlorure de sodium75g
- Mannitol.....10g
- Agar agar.....15g
- Eau distillée1000ml
- pH=7.4
- Stérilisation par autoclavage, à 110°C pendant 30 min.

❖ Gélose nutritif

- Peptone10g
- Extrait de viande4g
- Chlorure de sodium5g
- Agar13g
- pH=7.2

Préparation

29 g par litre d'eau distillée, stérilisation par autoclavage, à 120°C pendant 20 min.

❖ Gélose. Muller-Hinton

- Infusion de viande de bœuf 300 ml
- Peptone de caséine17.5g
- Amidon de maïs1.5g
- Agar10g
- pH=7.4

Préparation

37g par litre de l'eau distillée, stérilisation par l'autoclavage à 116 °C pendant 15min.

❖ Gélose pour la conservation

- Peptone.....10g
- Extrait de viande5g
- Chlorure de sodium..... 5g
- Agar.....10g
- pH=7.3

Préparation

Prêt à l'emploi en petits tubes fins

❖ Base pour gélose au sang

- Mélange spéciales de peptone23g
- Amidon1g
- Chlorure de sodium5g
- Agar..... 0.7g
- pH=7.3

Préparation

42.5 g /l d'eau distillée, stérilisation par autoclavage à 120 °C pendant 20min, le sang est ajouté stérilement dans le milieu stérile en surfusion.

❖ Milieu mannitol mobilité pH = 7.6-7.8

- Peptone trypsine de viande..... 20g
- Agar..... 04g
- Nitrate de potassium..... 01g
- Rouge de phénol à 1%..... 04ml

❖ Milieu citrate de SIMMONS

- Sulfate de magnésium..... 0.2g
- Milieu urée indole..... 01g
- milieu mannitol mobilité..... 01g

❖ Tri-Sugar-Investigation (TSI)

-Tryptone.....	10 g
-Peptone.....	15 g
-Lactose.....	10 g
-Saccharose.....	10 g
-Glucose.....	1 g
-Ferreux sulfate d'ammonium.....	0.2 g
-Chlorure de sodium.....	5 g
-thiosulfate de sodium.....	0.2 g
-Gélose.....	14 g
-Le rouge de phénol.....	0.02g
-pH=7.4 +/- 0.2	

Annexe 2: Les réactifs utilisés

Réactifs de la coloration de Gram

❖ **Violet de gentiane:**

- Phénol..... 2.0 g
- Violet de gentiane..... 1.0 g
- Éthanol à 90°..... 10 ml
- eau distillée..... 100 ml

❖ **Lugol:**

- Iodure de potassium..... 2.0 g
- Iode métalloïde..... 1.0 g
- Eau distillée 300 ml

❖ **Alcool (éthanol)**❖ **Fuchsine de Ziehl**

- Fuchsine basique..... 1.0g
- Phénol..... 5.0 g
- Éthanol à 90°..... 10 ml
- Eau distillée 100 ml

❖ **Plasma de lapin**

- Plasma de lapin lyophilisé 1 flacon : 10ml
- Diluant (oxalate de sodium 1 ampoule : 10ml)

Annexe 3: Les antibiotiques testés sur les souches de *S. aureus* (Rebiahi, 2012).

Familles des antibiotiques	Antibiotiques testés	Single	Charge de disque (µg)
βêta-lactamines	Pénicilline	P	6µg (10µl)
	Céfoxitine	FOX	30 µg
	Oxacilline	OX	6 µg
	Céfazoline	CZ	10 µg
Carbapénèmes	Imipénème	IPM	10 µg
Aminosides	Gentamycine	GN	10 µg
	Streptomycine	SP	10UI
	Kanamycine	K	30 µg
	Tobramycine	TOB	10 µg
Macrolides	Erythromycine	E	15 UI
Lincosamides	Clindamycine	CM	2 UI
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30 µg
Fluoroquinolones	Norfloxacin	NOR	5 µg
Autres	Fosfomycine	FOS	50 µg
	Acide fusidique	FUS	10 µg

UI: Unité Internationale; **µg:** microgramme

Annexe 4 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus* spp.
(Aouati, 2009).

Antibiotiques testés	Diamètres critiques (mm)		
	Sensible	Intermédiaire	Résistances
<u>βéta-lactamines</u>			
Pénicilline	≥29	-	≤28
Céfoxitine	≥22	-	≤21
Oxacilline	≥13	11-12	≤10
<u>Carbapénèmes</u>			
Imipénème	≥16	14-15	≤13
<u>Aminosides</u>			
Gentamycine	≥15	13-14	≤12
Kanamycine	≥18	14-17	≤13
Tobramycine	≥15	13-14	≤12
<u>Macrolides</u>			
Erythromycine	≥23	14-22	≤13
<u>Lincosamides</u>			
Clindamycine	≥21	-	≤14
<u>Glycopeptides</u>			
Vancomycine	≥15	-	-
<u>Fluoroquinolones</u>			
Norfloxacin	≥18	15-17	≤14
<u>Autres</u>			
Fosfomycine	≥14	-	≤14
Acide fusidique	≥22	15-21	≤15

Résumé

Au cours de notre étude à l'hôpital de Mila, l'analyse globale de la sensibilité aux antibiotiques a confirmé le caractère de mutirésistantes des souches *S. aureus* isolées, ainsi que l'incidence alarmante du SARM (33.33%). Aussi, les résultats ont montré que les antibiotiques: Vancomycine, Gentamycine, Streptomycine et la Norfloxacin restaient actifs (sensibles) et ont montré tous des fréquences de résistance inférieure à 50%: 50%, 24.24%, 38.09% et de 23.81% respectivement. Cependant, cette résistance quoi que faible est aussi inquiétante, vue l'évolution globale vers la résistance des autres antibiotiques constatée. Il est fort probable, que ces antibiotiques pourraient avoir le même comportement dans le futur.

Mots clés: SARM, antibiotiques, multirésistance, Mila.

Abstract

During our internship in the hospital of Mila, the overall analysis of antibiotic susceptibility confirmed the mutiresistant character of *S. aureus* isolated, and the alarming incidence of SARM (33.33%). Also, the results showed that the antibiotics: Vancomycin, Gentamicin, Streptomycin and Norfloxacin remained active (sensitive) and showed resistance frequencies all less than 50%: 50%, 24.24%, 38.09% and 23.81% respectively. However, these low resistances are worrying regarding the overall development of resistance to other antibiotics remarked. More likely, these antibiotics may have the same behavior in the future.

Keywords: MRSA, antibiotics, multiresistance, Mila.

ملخص

خلال دراستنا بمستشفى ميلة، أكد تحليل شامل لحساسية المضادات الحيوية أن المكورات الذهبية العنقودية المعزولة مقاومة لجميع المضادات الحيوية، و أن نسبة مقاومتها للمضاد الحيوي الميثيسيلين تثير القلق (33.33%). كما أظهرت النتائج أن المضادات الحيوية: فنكوميسين، جنتاميسين، ستربتومييسين ونورفلوكساسين ظلت نشطة (حساسة) و أن نسب مقاومتها هي أقل من 50%: 50%، 24.24%، 38.09% و 23.81% على التوالي. ومع ذلك، فإن هذه المقاومة المنخفضة مقلقة، نظرا لتطورها إلى مقاومة شاملة للمضادات الحيوية الأخرى. ومن المحتمل أن هذه المضادات الحيوية قد يكون لها نفس السلوك في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية المقاومة للمضاد الحيوي الميثيسيلين (م ع م)، المضادات الحيوية، مقاومة المضادات الحيوية، ميلة.