



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

Identification des *Staphylococcus aureus*

Porteur du gène *pvl*

Présenté par : Mouatassem Bouchra

Encadré par : Pr. Iraqui Houssaini Mohammed

Pr. Oumokhtar Bouchra

Soutenu le : 08/06/2018.

Devant le jury composé de :

- **Pr. Iraqui Houssaini Mohammed**
- **Pr. Oumokhtar Bouchra**
- **Pr. Tazi Abdelali**

Stage effectué à : Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire-
Faculté de Médecine et Pharmacie de Fès

Année universitaire 2017-2018

Remerciement

Après Dieu, je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à tout le corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

*Je remercie spécialement mon encadrant interne monsieur **Iraqi Houssaini Mohammed**, Professeur à la faculté des sciences et de techniques de Fès pour son orientation, ses conseils avisés et le temps qu'il m'a accordé pour mon encadrement. Mes vifs remerciements pour son soutien et son encouragement, sa clairvoyance et ses compétences professionnelles qui m'ont été d'une aide inestimable à l'acheminement de ce travail*

*Parallèlement, toute ma gratitude et reconnaissance à mon honorable encadrant externe à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, Professeur **Bouchra Oumokhtar**, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elle m'a fait vivre durant ces deux mois de stage; pour son précieuse aide, sa confiance, ses conseils pertinents, sa bienveillance, ces orientations et les efforts qu'elle a consentis pour permettre la réalisation de ce travail.*

*Mes profonds remerciements vont aussi au Pr **Tazi Abdelali** pour avoir accepté de juger ce travail.*

Je tiens à remercier aussi la direction et l'ensemble du personnel de laboratoire de médecine et de pharmacie de Fès de m'avoir accueilli parmi eux pour effectuer un stage dans les meilleures conditions qu'elles puissent être.

Que toutes les personnes m'ayant accueillie, aidée, enseignée, écoutée, conseillée, guidée et suivie se sentent personnellement et sincèrement remerciées.

Dédicaces

Je tiens à dédier cet humble travail dans un cadre d'amour parfumé par l'odeur du profond respect :

A mon père

A celle qui a attendu avec patience le fruit de sa bonne éducation, source de tendresse et d'amour et modèle de labeur et de persévérance

A ma chère Maman

A celui qui a été un pilier solide et incontournable pour mon parcours, qui a sacrifié afin de s'assurer de mon éducation dans les meilleures conditions, que Dieu vous donne la santé et longue vie.

*A mes frères **Yassmine, Mohamed et Aya.***

*A mes amis **Fatima Omari, Zineb Mardy et Sara Kamouni.***

Je vous exprime à travers ce modeste travail mes sentiments d'amour et d'affection.

A tous mes Professeurs et mes collègues

Votre collaboration et votre aide m'ont été très précieux.

Sommaire

I. Revue bibliographique	2
1. Généralités sur le genre <i>Staphylococcus</i>	2
1.1. Dénomination	2
1.2. Classification	3
1.3. Habitat	3
1.4. Caractères bactériologiques.....	4
1.4.1. Morphologie	4
1.4.2. Caractères cultureux.	4
1.4.3. Caractères biochimiques.....	5
2. Rôle de <i>S. aureus</i> dans les infections humaines	5
2.1. Mode de transmission.....	5
2.2. Les différentes infections causées par <i>Staphylococcus aureus</i>	6
3. Facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i> et leurs physiopathologies	6
3.1. Les substances élaborées par <i>S. aureus</i>	7
3.1.1. Les toxines.....	7
3.1.2. Les enzymes non toxiques :.....	9
3.2. Facteurs d'adhésion et d'invasion	10
3.3. Les composants de la paroi cellulaire.....	10
4. La résistance bactérienne aux antibiotiques	11
4.1. Définition.....	11
4.1.1. Résistance acquise	11
4.1.2. Résistance naturelle	11
4.2. Les mécanismes de résistance	11
4.2.1. L'inactivation des enzymes de l'antibiotique	12
4.2.2. Modification de la cible de l'antibiotique.....	13
4.2.3. L'efflux actif.....	13
4.2.4. La réduction de la perméabilité membranaire	13
4.3. La résistance à la Méricilline.....	13
4.3.1. Support de la résistance à la méricilline : Le gène <i>mecA</i>	14
4.3.2. Mécanisme.....	14
4.4. Relation entre la résistance à la méricilline et la présence du gène <i>pvl</i>	15
5. Traitement pour lutter contre les infections des <i>S. aureus</i>	15
II. Matériel et méthodes.....	16
1. prélèvement	17
2. Isolement	17
3. Test d'identification.....	17

3.1. Coloration de Gram	17
3.2. Test catalase.....	18
3.3. Test coagulase	19
3.4. Galerie API.....	19
4. L'antibiogramme	20
5. Etude génotypique	21
5.1. Extraction d'ADN.....	21
5.2. Amplification génique ou PCR.....	22
5.3. Révélation du produit d'amplification par électrophorèse	22
1. Identification des isolats	25
2. Etude du profil de résistance des souches <i>S. aureus</i> d'origine clinique	25
3. Résultat de la recherche du gène <i>pvl</i> chez les souches de <i>S. aureus</i> isolées.....	27
IV. Conclusion	28
V. Référence.....	29
VI. Annexes.....	32

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence du portage à *S. aureus* selon les sites anatomiques

Figure 2 : Facteurs de virulence de *S.aureus*

Figure 3 : Action des exfoliatines sur l'épiderme humain

Figure 4 : Mode d'action des leucotoxines de *S.aureus*

Figure 5 : Utilisation des antibiotiques et acquisition de résistance par *S. aureus* chez l'homme

Figure 6 : Les mécanismes de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries gram positive

Figure 7 : La structure de SCCmec

Figure 8 : Aspect du staphylocoque, grossissement (X100)

Figure 9 : Résultats test Catalase (+ : positif, - : négatif)

Figure 10 : Coagulase négatif (-), coagulase (+)

Figure 11 : Api STAPH avant et après 24h d'incubation avec la suspension bactérienne

Figure 12 : Le gel d'agarose dans le support de la solidification

Figure 13 : Dispositif d'électrophorèse.

Figure 14 : Fréquence de la résistance des isolats de *S. aureus* d'origine clinique

Figure 15 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose du produit d'amplification

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau des antibiotiques utilisés

Tableau 2 : Les amorces utilisées pour la détection des gènes *luk-PV*

Tableau 3 : Résistance des souches isolées aux antibiotiques étudiés

Liste d'abréviation

- BET : Bromure d'ethidium
- BHI : Brain Heart Infusion
- CA-SFM : Comité De L'antibiogramme De La Société Française De Microbiologie
- dNTP: DesoxyriboNucleotide TriPhosphate
- EDTA : Ethylene Diamine Tetra-Acétique
- MH : Muller Hinton
- MSCRAMMs : microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
- MLS : macrolides, lincosamides, streptogramines
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PLP2a : Proteine liant la pénicilline additionnelle
- PVL : Panton-Valentine Leukocidin
- *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*
- SARM : *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline
- SCCmec : Cassette chromosomique mec staphylococcique
- SCTS : Syndrome de choc toxique staphylococcique
- TBE : Tris, acide borique, EDTA
- TSA : Tryptophane Soja Agar
- TIAC : Toxi-infections alimentaires collectives
- TSST-1 : La toxine responsable du choc toxique staphylococcique

Introduction

Staphylococcus aureus est un germe ubiquitaire responsable de nombreux types d'infections chez l'Homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections hospitalières et communautaires, son équipement biochimique complexe lui permet d'exercer ses effets pathogéniques et d'exprimer sa virulence, à travers de multiples localisations cutanées, osseuses, méningées, endocardiques (**Wertheim et al., 2005**).

La plasticité de son génome à s'adapter à différentes conditions environnementales lui permet d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotiques. Les infections staphylococciques relèvent d'un véritable problème de santé publique tant par la virulence de la bactérie que par l'émergence des souches multi résistantes aux antibiotiques (**Mccormick, Schlievert and Yarwood, 2001**).

Depuis l'introduction de la pénicilline au cours des années quarante du siècle passé, un grand nombre d'agents antibactériens ont été développés et parallèlement, on a remarqué l'émergence de la résistance à ces antibiotiques. La plupart des souches bactériennes de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) peuvent également produire une leucotoxine appelé Leucocidine Panton-Valentine (PVL) (**Bhatta DR et al., 2016**).

La leucocidine de Panton-Valentine (PVL) est incriminée comme facteur de virulence majeur de *Staphylococcus aureus*. En effet, des souches de SARM sécrétant cette toxine ont émergé à travers le monde et ont été responsables d'infections cutanées primitives, de pneumopathies nécrosantes et d'ostéomyélites sévères, d'où la nécessité de surveiller de façon active l'épidémiologie de ces souches à fort potentiel pathogène (**Tristan et al., 2007**).

Dans ce travail nous visons les objectifs suivants :

- ✓ Isolement des souches *S. aureus* porteuses du gène *pvl* qui code pour la Leucocidine Panton-Valentine (PVL).
- ✓ Identification du profil de résistance des isolats de *S. aureus*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur le genre *Staphylococcus*

1.1. Dénomination

Le terme « *staphylocoque* » a été synthétisé à partir du mot grec « staphylé » ce qui signifie grappe de raisin, pour leur capacité à former des grappes microscopiques de raisin, et le terme « coccus » signifie les grains ou les baies (**Dufour et al., 2002**).

1.2. Classification

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des Micrococcaceae. Parmi les nombreuses espèces et sous espèces des *staphylocoques*, seules dix-huit espèces ont été retrouvées chez l'homme dont certaines sont associées à des infections. La majorité n'est retrouvée que chez l'animal (**Fleurette, 1982**).

Les espèces du genre *Staphylococcus* sont classées en deux groupes selon qu'elles produisent ou non une coagulase libre active sur le plasma oxalaté du lapin :

- Les staphylocoques à **coagulase positive** : *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyiucus*. On note pour l'espèce *S. aureus* la production d'un pigment caroténoïde jaune doré, d'où la dénomination de staphylocoque doré et la présence dans la paroi d'une protéine A antigénique.
- Les staphylocoques à **coagulase négative**. On distingue quelques espèces d'origine humaine différenciables par leur biotype et sérotype : *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. simulans*.

1.3. Habitat

S. aureus est un germe ubiquitaire habituellement retrouvé dans l'environnement et chez les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement. L'Homme représente l'une des niches écologiques les plus favorisées pour ces germes qui vivent à l'état commensal. Le site de colonisation préférentielle de *S. aureus* chez l'Homme est la muqueuse nasale. Il colonise les territoires cutanés, en particulier les zones humides (le périnée, le vagin et le pharynx) et les mains. La densité de colonisation est plus importante au niveau des zones humides comme la partie antérieure des narines, les creux axillaires et le périnée (**Durand, 2009**).

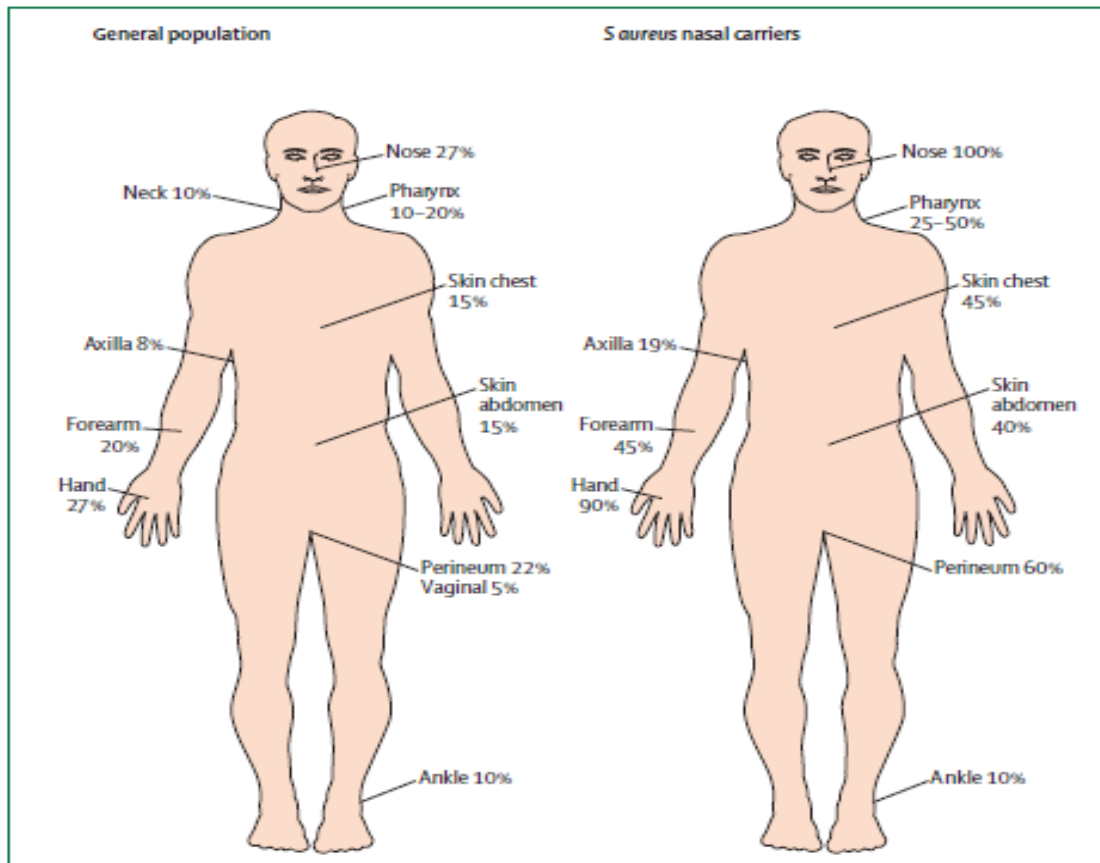


Figure 1 : Prévalence du portage à *S. aureus* selon les sites anatomiques (**Durand, 2009**).

1.4. Caractères bactériologiques

1.4.1. Morphologie

A l'examen microscopique, les staphylocoques se présentent sous l'aspect isolé ou groupé en diplocoque, en courtes chaînettes ou en amas, Ce sont des cocci à Gram positif ayant la forme de grappe de raisin, immobiles, non sporulés mais parfois encapsulés. Ils mesurent 0,8 à 1 µm de diamètre (**Chibi, 2015**).

1.4.2. Caractères cultureux.

Les staphylocoques sont peu exigeants sur le plan nutritif, aéro-anaérobies facultatifs, ils se développent en aérobiose et en anaérobiose à 37°C sur les milieux usuels simple, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à gram positif. Certaines souches nécessitent cependant une forte pression en CO₂ pour une croissance optimale à 37°C, et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5 (**Chibi, 2015**).

En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide.

Après culture de 24 heures sur gélose au sang, les colonies qui se produisent sont de plus grand diamètre que celles produites sur gélose nutritive, et l'hémolyse qui apparaisse autour des colonies peut être de type bêta (hémolyse totale), alpha (hémolyse partielle) ou gamma (absence d'hémolyse). Le milieu Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de NaCl (les staphylocoques). Ce milieu sélectif est rendu différentiel par l'addition de Mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol. Il permet d'isoler les souches de *S. aureus* par fermentation du mannitol et par la coloration jaune ou doré des colonies.

1.4.3. Caractères biochimiques.

L'étude des différents caractères biochimiques des souches de staphylocoques a permis le développement des galeries d'identification rapides et efficaces, permettant de définir les différents profils biochimiques des bactéries appartenant à une même espèce.

S. aureus a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Il est catalase positive, Il est toutefois capable de fermenter le glucose à la différence des microcoques. Il est habituellement capable de fermenter le mannitol ; ce caractère est souvent, mais pas obligatoirement, associé à la pathogénicité. Il est utilisé dans le milieu Chapman. La fermentation se traduit par le virage au jaune du milieu de culture.

2. Rôle de *S. aureus* dans les infections humaines

2.1. Mode de transmission

Chez l'Homme, le mode principale de transmission des staphylocoques est le contact direct : ils peuvent se transmettre d'un individu à l'autre notamment en cas d'infection de la peau et les muqueuses, mais aussi par contact indirect à partir des objets contaminés comme les serviettes, les taies des oreillettes et le téléphone, ce mode de transmission est aussi fréquent en milieu hospitalier notamment à partir du matériel médical, de la poussière, et de l'air.

La contagion peut également avoir lieu par absorption de toxine préformée dans les aliments contaminés par staphylocoque producteur d'entérotoxines.

2.2. Les différentes infections causées par *Staphylococcus aureus*

S. aureus continue à jouer un rôle important dans la pathologie infectieuse humaine et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections hospitalières et communautaires, sans oublier les intoxications alimentaires. Parmi ces infections nous citons :

- **Les infections cutané-muqueuses** : sont les atteintes des furoncles (folliculite), du panaris (doigt), d'anthrax (fusion), de cellulite, des sinusites et des otites. Il s'agit le plus souvent d'auto-infestation. Parmi les syndromes des infections cutané-muqueuses, on trouve le syndrome de Lyell (peau ébouillantée) : érythrodermie et décollement bulleux de l'épiderme.
- **Septicémies** : A partir d'un foyer infectieux primitif ou suite à une exploration instrumentale. Localisations secondaires possibles : os, poumons, méninges...
- **Endocardites infectieuses** : Essentiellement sur prothèse. Primitive ou suite à une hospitalisation.
- **Infections osseuses**
 - **Ostéomyélites** aiguës ou chroniques souvent sur prothèse articulaire ou fixateurs interne/externe
 - **Arthrites septiques** suite à des injections répétées (corticoïdes...)
- **Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)** : Ingestion d'aliments qui ont été en contact à la *Staphylocoque aureus* produisant les entérotoxines. Ces toxines sont donc retrouvées dans les aliments qu'ils soient crus ou cuits (ces entérotoxines sont thermostables).
- **Syndrome de choc toxique staphylococcique (SCTS)** : Comme le choc médié par l'endotoxine, le TSS est considéré comme un syndrome de fuite capillaire caractérisé par l'hypotension, l'hypoalbuminémie et l'œdème généralisé sans piqûres (**Gordon et Lowy, 2008**) .

3. Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* et leurs physiopathologies

Staphylococcus aureus produit de nombreux facteurs de virulence, la plupart d'entre eux agissent de manière synergique et coordonnée (**Joubert et al., 2006**). Le pouvoir pathogène de la bactérie est lié à l'expression de ces facteurs de virulence au cours des différentes phases de l'infection. La phase de colonisation fait intervenir la protéine A alors que les phases d'invasion et de dissémination font intervenir des exoprotéines comme les hémolysines, les protéases et les entérotoxines qui permettent *in vivo* l'extension du foyer infectieux (**Figure 2**).

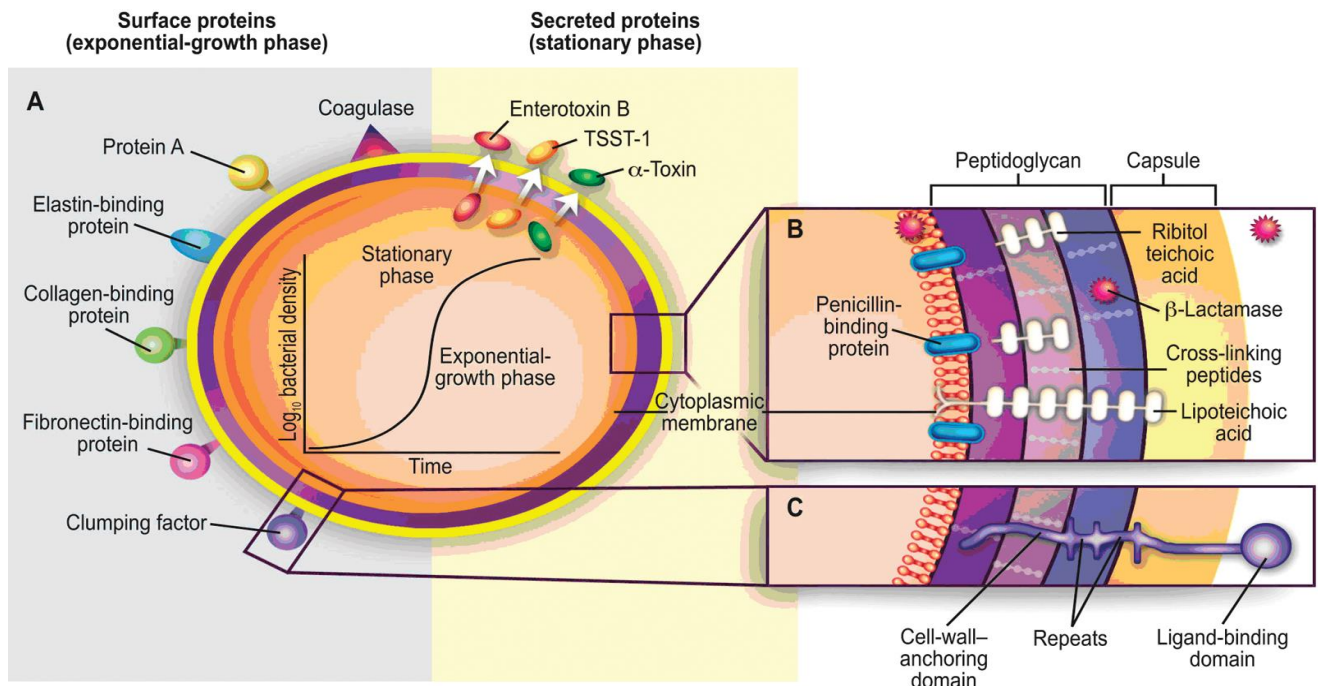


Figure 2 : Facteurs de virulence de *S. aureus* (Reiser et al., 1981).

3.1. Les substances élaborées par *S. aureus*

S. aureus libère des protéines diffusibles douées soit d'activité toxique, soit d'activité enzymatique.

3. 1.1. Les toxines

S. aureus sécrète de nombreuses toxines ayant pour objet de détourner ou de neutraliser la réponse immune de l'hôte infecté. Cinq principales toxines sont décrites :

- **Les enterotoxines** staphylococciques sont classées sur la base de leurs réactions avec des anticorps spécifiques (Sawai et al., 1997). Il existe 7 sérotypes différents : A, B, C1, C2, C3, D, F, ce sont des protéines thermostables, insensibles aux enzymes protéolytiques du sac digestif et ils sont responsables d'intoxications alimentaires (diarrhée, vomissements, douleurs abdominales).

- **L'exfoliatine** est une protéine thermostable responsable des lésions d'érythrodermie bulleuse et au cours de l'impetigo. Ces exfoliatines se fixent sur certaines protéines intracellulaires cutanées telles que le profilagrine et le filagrine. Elles provoquent une épidermolyse : décollement intra-épidermiques entre le stratum granulosum et le stratum spinosum (Figure 3). Il y a une rupture entre les cellules adjacentes suivie de celle des ponts inter-cytoplasmiques (desmosomes) ce qui entraîne des lésions bulleuses. La majorité des sujets adultes ont des anticorps protecteurs, seule les gens à immunité faible peuvent être sujet de l'infection.

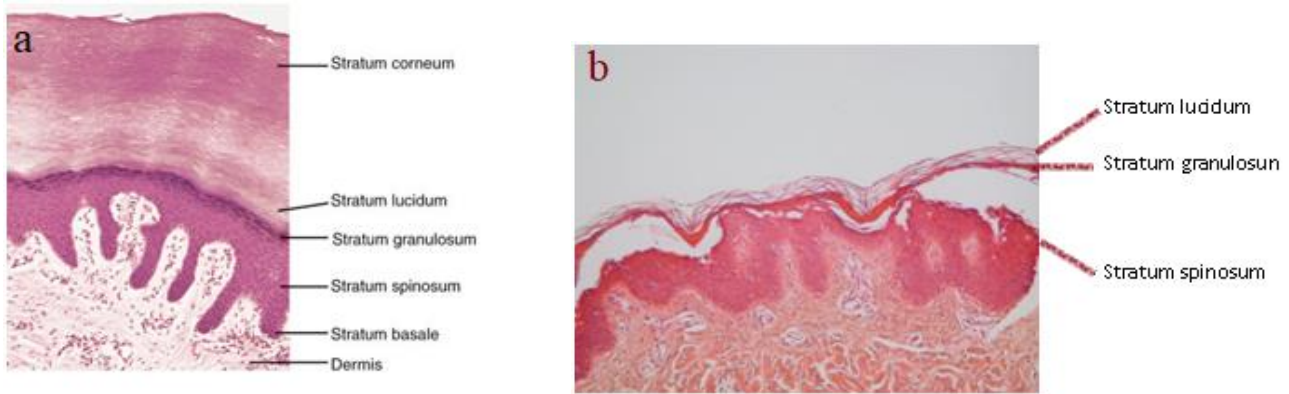


Figure 3 : Action des exfoliatines sur l'épiderme humain

a : avant l'action des exfoliatines sur la peau

b : après l'action des exfoliatines (Clivage entre le stratum granulosum et le stratum spinosum)

(<https://www.nku.edu/~dempseyd/SKIN.htm>)

- **La Leucocidine de Panton Valentine (LPV)**, cette toxine est formée de deux protéines différentes, une protéine de classe S (LukS-PV) et une protéine de classe F (LukF-PV) agissant en synergie, chacune des sous-unités se fixe sur la membrane de la cellule cible par liaison avec des récepteurs spécifiques (**Figure 4**). Elle cause la destruction des leucocyte par la formation de pores sur la membrane cellulaire (**Reiser et al., 1981**). Quand la concentration membranaire des pores est élevée, la cellule entre en apoptose via la voie mitochondriale. La PVL a un rôle dans la nécrose cutanée, pulmonaire et est impliquée comme facteur de virulence du staphylocoque.

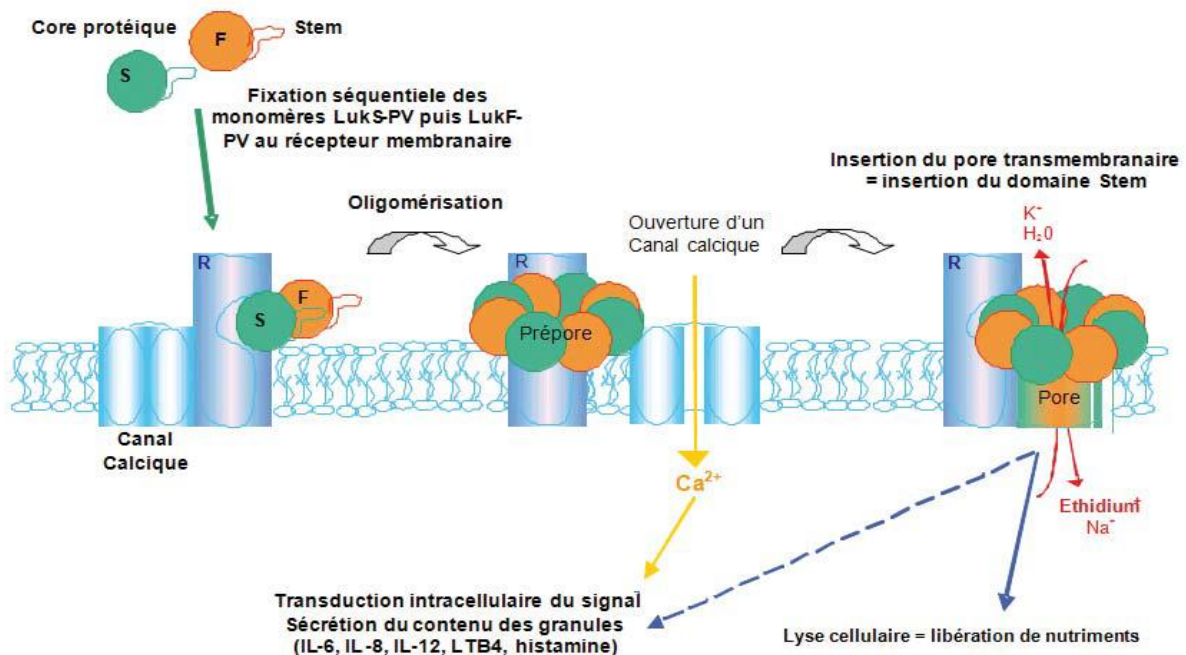


Figure 4 : Mode d'action des leucotoxines de *S. aureus*

(<http://www.hse.ie/eng/health/az/S/Staphylococcal-infections/>)

- **La toxine responsable du choc toxique staphylococcique (TSST-1)**, est une protéine antigénique déclenchant les mécanismes de l'immunité grâce à son activité super-antigénique, qui entraîne l'activation simultanée des sous populations lymphocytaires, ce qui induit la libération de plusieurs médiateurs de l'inflammation (**Faye, 1997**).

- **Les Hémolysines** ont une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes. Cette cytotoxicité est due à la destruction des hématies et des plaquettes à cause de la perméabilité membranaire en entraînant une fuite osmotique du contenu cellulaire aboutissant à la mort des cellules. la réaction inflammatoire engendre le choc septique des infections sévères à *S. aureus* par l'intermédiaire des cytokines et d'autres médiateurs de la réaction inflammatoire libérés suite à la cytolysse.

3.1.2. Les enzymes non toxiques :

Le staphylocoque est capable de produire de nombreuses enzymes comme les protéases, les lipases et les hyaluronidases, qui lysent les tissus et peuvent faciliter l'extension de l'infection aux tissus adjacents.

Coagulase libre : *S. aureus* fabrique une exo enzyme capable de coaguler en quelques heures le plasma humain (ou de lapin). La coagulase est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte et forme un complexe appelé staphylothrombine. La thrombine activée transforme donc le fibrinogène en fibrine. C'est un marqueur classique de l'identification de *S. aureus* (**Lowy, 1998**).

Fibrinolyse : C'est une enzyme qui active le plasminogène en plasmine. Elle agit sur le plasma de l'homme, du chien, du cobaye et du lapin. Cette substance thermolabile et antigénique, caractérise les souches pathogènes humaines, et est sécrétée par les germes ayant colonisé le caillot, elle contribue à sa dislocation et peut jouer un rôle dans la formation de micro embols suppurés responsables des métastases septiques.

catalase : Elle inhibe la bactéricidie intra leucocytaire en empêchant la formation, par les globules blancs, de radicaux oxygénés toxiques pour la bactérie (**Clarke et Foster, 2006**).

β -lactamases : Elles inactivent les β -lactamines et jouent un rôle important dans la résistance des souches de staphylocoques à ces antibiotiques.

3.2. Facteurs d'adhésion et d'invasion

S. aureus colonise l'hôte en adhérant aux cellules composantes de la matrice extracellulaire. L'adhésion bactérienne est également une étape indispensable pour l'infection en prévenant l'élimination de la bactérie par des phénomènes mécaniques et en permettant l'action ultérieure des toxines (**Toure, 1992**).

S. aureus se fixe aux cellules par l'intermédiaire des protéines de surface, les adhésines ou MSCRAMMs (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) qui sont ancrées dans la paroi cellulaire grâce aux **peptidoglycanes**, d'autres sont secrétées dans le milieu extracellulaire. Cinq protéines ont été caractérisées :

- **La protéine A** est un facteur de virulence pléiotropique, elle adhère au facteur de Von Willebrand (**Courvalin, 2008**). Elle intervient dans l'inhibition de l'opsonisation en fixant le fragment Fc.
- **La protéine de liaison au collagène** permet l'adhésion de *S. aureus* au cartilage.
- **La protéine de liaison à la fibronectine** permet l'adhésion de *S. aureus* aux caillots plasmatiques mais aussi aux biomatériaux comme les prothèses et les cathéters.
- **La protéine de liaison au fibrinogène** qui provoque l'agrégation de bactéries en présence de plasma permettant de transformer directement le fibrinogène en fibrine.
- **La protéine de liaison à l'élastine.**

3.3. Les composants de la paroi cellulaire

Les composants de la paroi cellulaire comme les peptidoglycanes, les acides téichoïques et lipoteichoïques possèdent des effets biologiques démontrés *in vitro*. Les peptidoglycanes stimulent la libération des cytokines par les macrophages, l'activation du système complément et l'agrégation des plaquettes (**Lowy., 1998**).

Les acides téichoïques sont les récepteurs des bactériophages « lysotypie des staphylocoques », ils donnent naissance à des anticorps que l'on retrouve dans le sérum du malade.

4. La résistance bactérienne aux antibiotiques

4.1. Définition

La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique se définit comme étant la capacité de cette souche à se développer dans un milieu où la concentration en antibiotique est notablement plus élevée que celle qui inhibe habituellement la plupart des souches de la même espèce (**Wertheim, 2005**).

A partir de là, on évoque deux types de résistance :

4.1.1. Résistance acquise

La résistance acquise ne se trouve que chez certaines souches de la même espèce bactérienne. Cette résistance est due à la modification du patrimoine génétique de la bactérie qui lui permet de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce.

4.1.2. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques. Par exemple, chez les bacilles à Gram négatif, la présence d'une membrane externe entraîne la résistance à diverses classes de molécules par imperméabilité (**Quincampoix, 2001**).

4.2. Les mécanismes de résistance

S. aureus possède un fort pouvoir adaptatif, il a pu développer différents mécanismes de résistance vis-à-vis à un grand nombre d'antibiotiques mis sur le marché (Figure 5).

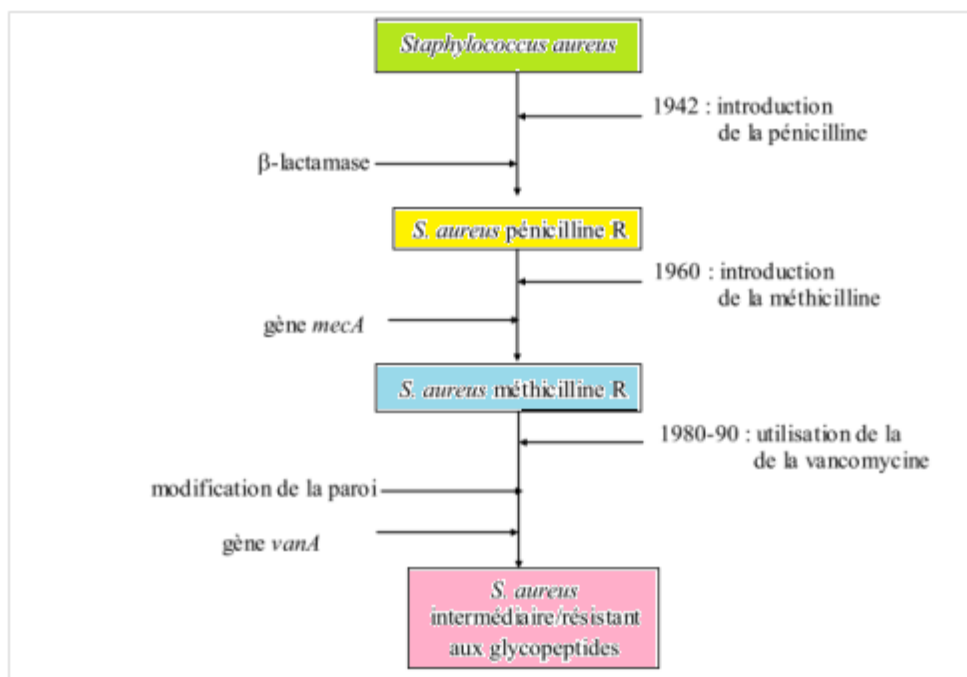
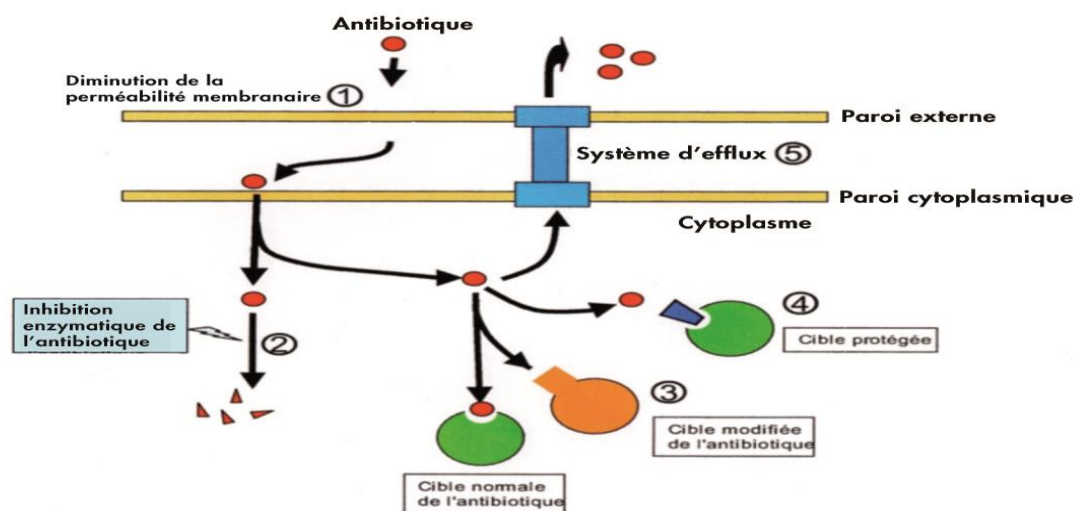


Figure 5 : Utilisation des antibiotiques et acquisition de résistance par *S. aureus* chez l'homme (Clarke et Foster, 2006).

Les mécanismes impliqués de la défense contre l'action des antibiotiques sont basés sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques). La figure suivante illustre les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries Gram positif.



- (1) Diminution de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie.
- (2) L'antibiotique peut être inactivé par l'action d'une enzyme.
- (3) La modification de la cible empêche la fixation de l'antibiotique.
- (4) La protection de la cible empêche la fixation de l'antibiotique.
- (5) Les systèmes d'efflux provoquent une élimination de l'antibiotique hors de la cellule.

Figure 6 : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries Gram positive

(<http://m.20-bal.com/other/11941/index.html>)

4.2.1. L'inactivation des enzymes de l'antibiotique

C'est le mécanisme le plus répandu de telle sorte que l'enzyme produite par les bactéries, inactivent les molécules antimicrobiennes en modifiant le noyau actif par clivage ou par addition d'un composant chimique qui inhibe la fixation de l'antibiotique sur la cible et provoque une perte de l'intégrité fonctionnelle du médicament. L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés.

On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones. *S. aureus* possède une enzyme appelée bêta-lactamase ou pénicillinase qui hydrolyse le cycle bêta-lactame des pénicillines, les rendant inactives. Ce mode de résistance est présent chez 90 % des isolats cliniques de *S. aureus* (Mainil et Muylaert, 2012).

4.2.2. Modification de la cible de l'antibiotique.

Ce mécanisme implique la capacité de la bactérie à modifier le site cible sur la bactérie de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus s'y fixer et exercer son activité au niveau de la bactérie, Ce mécanisme de résistance concerne presque tous les antibiotiques, il est particulièrement répandu pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives.

Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprim) et les bêtalactames dont les SARM.

Ce type de résistance résulte d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. C'est un phénomène rare, aléatoirement pouvant affecter un certain nombre de caractères bactériens. Une mutation peut être une délétion, une substitution ou une addition, on aura alors un décalage dans la lecture du code génétique. Cela donne un mutant qui résiste aux antibiotiques. Cette mutation peut se transmettre à d'autres bactéries. Elle se produit toutes les 10^5 à 10^{10} divisions mais comme il y a beaucoup de bactéries dans un milieu infectieux, il ne faut pas négliger la probabilité qu'une bactérie résistante se développe (**Wertheim, 2005**).

4.2.3. L'efflux actif

L'efflux actif, médié par des protéines transmembranaires connues sous le nom de pompes à efflux ou transporteurs actifs, est un mécanisme nécessitant de l'énergie et utilisé par les bactéries pour expulser à l'extérieur des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que les antibiotiques et d'autres médicaments. La résistance par efflux actif provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à son cible (**Bertrand, Costa et Pina, 2005**).

4.2.4. La réduction de la perméabilité membranaire

La bactérie "ferme" les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Ces pores sont normalement constitués par des protéines qui forment des canaux et que l'on appelle les porines. Les bactéries résistantes réduisent leur nombre de porines.

4.3. La résistance à la Méricilline

Dès 1961, les premières souches cliniques de SARM sont observées. Après plusieurs années de l'utilisation des antibiotiques, l'émergence et la dissémination de la résistance bactérienne ont constitué un problème de santé

publique (**Dumitrescu et al., 2010**). Pour cela deux hôpitaux universitaires à Rabat réalisent une étude prospective durant deux années (**Elhamzaoui et al., 2009**). Pour montrer que le taux de résistance de *S. aureus* à la méticilline était de 19,3 % au Maroc. Les premiers cas d'infection à SARM ont été rapportés il y a plus de trente ans et revêtaient un caractère nosocomial, l'acquisition de SARM étant liée à une hospitalisation récente ou à l'exposition prolongée et récurrente aux antibiotiques (**Mccormick et al., 2001**).

4.3.1. Support de la résistance à la méticilline : Le gène *mecA*

Le temps zéro de l'évolution des SARM est l'acquisition du gène *mecA*, fragment d'ADN de 2,1 kb, codant une protéine liant la pénicilline additionnelle (PLP2a), Cette transpeptidase PLP2a a moins d'affinité pour les bêtalactamines. Les souches de *S. aureus* possédant le gène *mecA* sont donc résistantes à toute la famille des bêtalactamines, notamment à la méticilline ou l'oxacilline (**Teruyoet Keiichi, 1998**).

Le gène *mecA* est inclus dans un élément génétique mobile : la cassette staphylococcique (SCCmec, staphylococcal cassette chromosome mec). La régulation du gène *mecA* est principalement sous la dépendance de deux gènes : le gène *mecI* (répresseur du gène *mecA*) et *mecR* (antirépresseur) (**Figure7**).

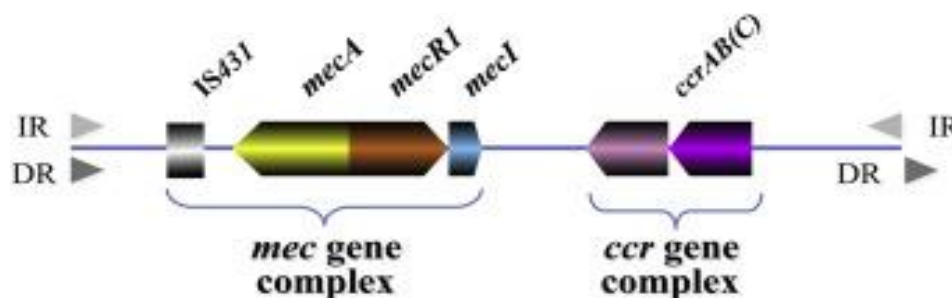


Figure 7 : La structure de SCCmec (**Hiramatsu K et al., 2014**)

Abréviations: IR, répétition inversée; DR, répétition directe.

4.3.2. Mécanisme

La méticilline, l'oxacilline et la cloxacilline, sont des pénicillines M non hydrolysés par les pénicillinases. La résistance à la méticilline est principalement due à la production d'une nouvelle PLP, la PLP2a ayant une affinité diminuée pour les bêtalactamines. Cette PLP2a est une transpeptidase qui peut catalyser à elle seule l'assemblage du peptidoglycane lorsque les autres PLP sont saturées par les bêtalactamines.

4.4. Relation entre la résistance à la méthicilline et la présence du gène *pvl*

La prévalence de la *pvl* parmi les isolats de SARM a été trouvée relativement élevée. La présence de ce gène chez les bactéries multi résistantes comme les SARM peuvent être impliquées dans la virulence, ce qui augmente les défis pour les cliniciens (**Bhatta et al., 2016**).

Cependant, des résultats suggèrent qu'une combinaison entre le PVL (qui code pour un facteur de virulence impliqué dans les infections primaires de la peau et la pneumonie) et le gène *mecA* (qui confère la résistance aux antibiotiques) peut conduire à l'apparition de souches hautement pathogènes. Les résultats de cette étude sont inquiétants, car toutes les souches de SARM isolées des patients ayant des infections acquises hébergeaient le gène *pvl* (**Dufour et al., 2002**).

Par contre, d'autres résultats montrent que la prévalence du gène *pvl* est faible pour les souches de SARM, et qu'il n'y a pas d'association entre la présence du gène *pvl* et le gène *mecA* (**Motamedi et al., 2015**).

5. Traitement pour lutter contre les infections des *S. aureus*

Certaines infections cutanées dues à des staphylocoques se traitent par une bonne hygiène locale, des antiseptiques ou des antibiotiques locaux.

Certaines infections cutanées nécessitent parfois un drainage. Le médecin insère une aiguille ou pratique une incision dans la plaie pour faire sortir le pus qui s'y est accumulé. Cela permet de réduire la quantité de bactéries et de toxines présentes, ce qui accélère la guérison.

Le traitement contre les staphylocoques se base sur la réalisation d'un antibiogramme qui permet d'adapter l'antibiothérapie suivant la résistance et la sensibilité de la souche. Les staphylocoques dorés les plus fréquemment rencontrés sont, en général, sensibles à la pénicilline M (méticilline, oxacilline), l'antibiotique de choix en première intention. Elles sont également le plus souvent sensibles aux macrolides, aminoglycosides, fluoroquinolones et synergistines.

Matériel & Méthodes

1. Prélèvement

Des prélèvements ont été réalisés à partir de différentes infections pour rechercher *S. aureus* et la présence du gène *pvl* dans les souches cliniques. Les analyses microbiologiques et moléculaires sont réalisées au laboratoire de Microbiologie et Biologie moléculaire au sein de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès.

2. Isolement

Les échantillons sont tout d'abord enrichis avec le BHI (Brain Heart Infusion) (annexe). Pour l'isolement des souches *S. aureus*, l'ensemencement a été réalisé sur des boîtes contenant le milieu Chapman (annexe) et qui ont été incubées à 37°C pendant 24h.

L'ensemencement a été également réalisé sur gélose au sang et puis les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Les colonies de *staphylococcus* sur gélose au sang ont un aspect jaunâtre présentant des colonies bêta-hémolytique (hémolyse totale).

3. Test d'identification

Ces tests permettent l'identification de caractères morphologiques et métaboliques et de déterminer le type des bactéries.

3.1. Coloration de Gram

- **Principe**

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries. Son avantage est de donner une information rapide. Elle permet ainsi, avec la reconnaissance de la morphologie et le mode de groupement des bactéries, de renseigner sur l'ordre dont fait partie les bactéries étudiées.

- **Protocole**

Réalisation de frottis :

Elle nécessite d'avoir un frottis fixé, classiquement en effectuant une fixation simple à l'eau : sur une lame, on dépose une goutte d'eau distillée, on ajoute à l'anse une colonie puis on étale en faisant des rotations, et finalement on fixe par la chaleur en passant la lame dans la flamme du bec Bunsen.

Réalisation de la coloration :

La coloration s'effectue selon la démarche suivante : on ajoute 2 à 3 gouttes du cristal violet, on laisse agir pendant 2 minutes et rincer à l'eau. Ensuite, on plonge la lame dans le lugol et on laisse agir 1 minute puis on rince par l'eau de robinet. On procède à une décoloration par l'alcool en versant deux gouttes sur la lame jusqu'à la décoloration (2 à 6 secondes). Enfin on colore par la fushine, on laisse agir

pendant 1 minute, on rince doucement à l'eau. Finalement, on sèche la lame et on observe avec une goutte d'huile à immersion.

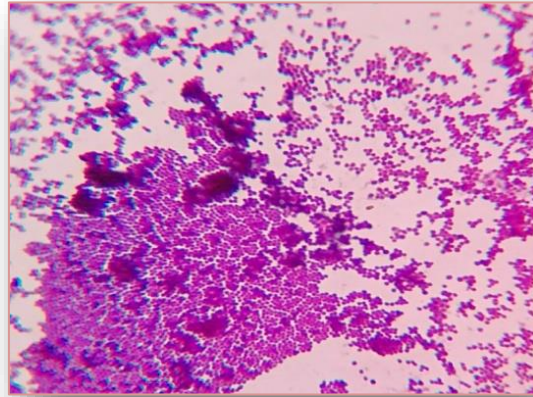


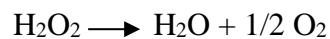
Figure 8 : Aspect du staphylocoque, grossissement (X100)

Après coloration de Gram, les staphylocoques sont des cocci à Gram positif. Ils peuvent être isolés, en diplocoques ou en amas. Les amas sont les plus caractéristiques du genre staphylocoque.

3.2. Test catalase.

- **Principe**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et $1/2 O_2$. Suivant la réaction :



La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif.

- **Protocole**

Sur une lame on ajoute une goutte d'eau oxygénée, on dépose ensuite à l'aide d'une anse, une colonie isolée de la souche à tester.

Le dégagement gazeux reflète la production d' O_2 provenant de la dégradation d' H_2O_2 : Souche catalase +.

L'absence de dégagement gazeux reflète l'absence de production d' O_2 provenant de la dégradation d' H_2O_2 : Souche catalase -.

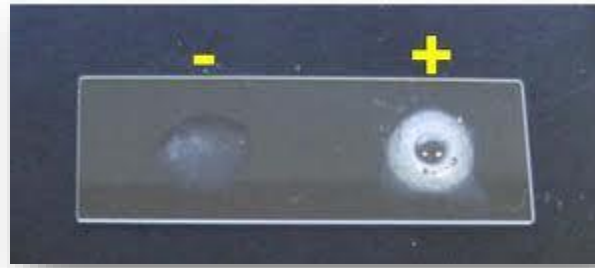


Figure 9 : Résultat test catalase (+ : positif, - : négatif)

3.3. Test coagulase

- **Principe**

La coagulase libre est une enzyme capable de coaguler le plasma de lapin. En effet seule l'espèce

S. aureus peut posséder cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie.

- **Protocole**

On ensemence quelques colonies dans 500 µl de bouillon BHI et puis on incube à 37°C pendant 24 h. Après 24 h, on ajoute 300 µl du plasma de lapin, et on incube à 37°C pendant 24 h. Si le fibrinogène, soluble dans le plasma, se transforme en fibrine solide, un caillot se formera au fond du tube (figure 10).



Figure 10 : coagulase négatif (-), coagulase (+)

3.4. Galerie API

Une galerie API est un ensemble de petits tubes prêts à l'emploi permettant l'identification de microorganismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. La galerie API STAPH a été utilisée pour identifier les Staphylocoques. Un inoculum a été préparé à partir d'une culture jeune (18-24 heures), puis il a été ensemencé sur la galerie selon les recommandations du fabricant. La

lecture a été effectuée après incubation de 24 heures à 37°C, puis le code obtenu a été déchiffré en se référant au catalogue (Figure 11).



Figure 11 : Api STAPH avant et après 24h d'incubation avec la suspension bactérienne.

4. L'antibiogramme

• Principe

Un antibiogramme est une technique de laboratoire permettant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence d'un ou plusieurs antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Petri.

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

• Protocole

Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture fraîche sur milieu TSA, on prépare une suspension en solution de l'eau physiologique stérile.

Dans des conditions stériles. On ajoute 4 ml de l'eau physiologique dans un tube à hémolyse.

On prélève des colonies pures et on les met en suspension jusqu'à obtenir une opacité de 0,5 sur le Mac Farland.

Ensemencement :

La solution est ensemencée en stries sur toute la surface d'une gélose Mueller-Hinton, et après on dépose des disques d'antibiotiques (Tableau 4) à l'aide d'une pince stérile, on appui doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu. Les centres des disques doivent être éloignés les uns aux autres d'au moins 30 mm pour empêcher le chevauchement des zones d'inhibition. La lecture est réalisée après une incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, selon les recommandations du CA-SFM 2018.

Tableau 1 : Tableau des antibiotiques utilisés

Liste standard		Liste complémentaire	
Antibiotiques	Abréviation	Antibiotiques	Abréviation
Pénicilline G	P	Spéramycine	SP
Céfoxitine	FOX	Teicoplanine	TEC
Gentamycine	CN	Chloramphénicol	CP
Erythromycine	E	Acide nalidixique	NA
Clindamycine	CLI	amikacine	AK
Quinupristine	Q	Ertapénème	ETP
Norfloxacin	NOR	Cotrimoxazole	SXT
Fluoroquinolones	Lev		
Acide Fusidique	FD		
Cotrimoxazole	COT		
Rifampicine	RD		

5. Etude géotypique

La PCR réalise une succession de réactions de réplication d'une matrice simple brin d'ADN. La séquence cible est multipliée par synthèses successives à l'aide d'amorces oligonucléotidiques et d'une ADN polymérase thermostable. Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes : dénaturation, hybridation des amorces et polymérisation. La séquence cible étant doublée à chaque cycle, le taux d'amplification (théorique) est de 2^n (n = nombre de cycles).

5.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN bactérien a été faite par la technique de choc thermique : à partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures à 37°C sur le gélose nutritive (TSA), quelques colonies sont mises en suspension dans 500 µl de l'eau distillée stérile (eau de biologie moléculaire, dépourvue de DNase et ARNase) et portées à 100°C pendant 10 min puis transférées directement dans la glace (0°C) pendant 2 min. 300 µl du surnageant sont ensuite récupérés après une centrifugation de 14000rpm pendant 10 min. Le surnageant contenant l'ADN a été conservé à -20 °C.

5.2. Amplification génique ou PCR

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume réactionnel d'amplification de 25 µl contenant 2µL de l'ADN des souches, des amorces sens et antisens, de l'eau ultra pure, des déoxynucléosides triphosphates (dTTP, dCTP, dGTP, dATP), de la Taq ADN polymérase, du MgCl₂ et du tampon de la réaction.

Tableau 2 : Les amorces utilisées pour la détection des gènes *luk-PV* (Terry Alli et al., 2012).

Gène	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille d'amorce	Taille fragment (pb)
<i>LukS/F-PV</i>	pvl-1	(ATC ATT AGG TAA AAT CGT TGG ACA TGA TCCA)	31N	433
	pvl-2	(GCA TCA AGT GTA GTA TTG AGC AAA AGC)	27N	

Pour confirmer les résultats de l'amplification génique, nous avons utilisé deux témoins :

Un témoin négatif qui est constitué de tous les composants de la réaction sauf l'ADN.

Un témoin positif qui contient, en plus des composants de la réaction, le gène *pvl*.

Après dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 minutes, l'ADN est amplifié grâce à 25 cycles. Chaque cycle est constitué des étapes suivantes :

- Incubation à 94°C pendant 1 minute
- Incubation à 53°C pendant 30 secondes
- Incubation à 72°C pendant 1 minute

Après, on réalise une extension finale à 72°C pendant 6 min. Les produits amplifiés ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%, coloré au bromure d'éthidium (BET).

5.3. Révélation du produit d'amplification par électrophorèse

5.3.1. Préparation du gel d'agarose

- Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, mélanger 1g de poudre d'agarose avec 100 ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 1X.
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.
- Laisser refroidir.

- Ajouter 1 μ l de la solution de BET et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support après avoir mis les peignes (figure12).
- Laisser refroidir jusqu'à la solidification de gel.

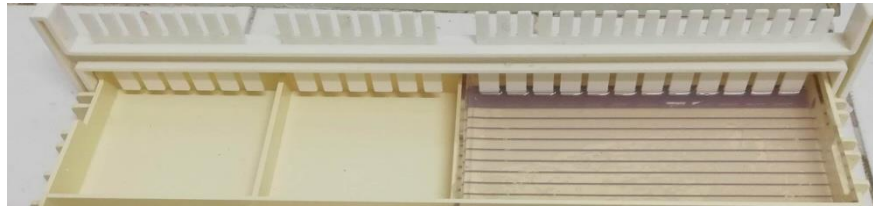


Figure 12: Le gel d'agarose dans le support de solidification

5.3.2. Migration sur gel d'agarose

L'électrophorèse des échantillons a été effectuée sur gel d'agarose de 1%. Le gel est déposé dans une cuve d'électrophorèse et branché à un générateur de courant électrique. La migration d'ADN se fait du pôle négatif au pôle positif. Le tampon de migration utilisé est le TBE (annexes).

Afin de suivre la migration, l'ADN est mélangé à une solution de charge avant de le déposer dans les puits du gel. Cette solution de charge contient un marqueur de mobilité (bleu de bromophénol) et un alourdisseur (glycérol ou saccharose) pour entraîner l'ADN au fond des puits.

Enfin, la visualisation des ADN sur le gel est réalisée grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'Ethidium (BET). Ce colorant a la capacité de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques.

La révélation se fait par exposition du gel d'agarose à des radiations UV. Les bandes d'ADN se présentent sous forme de bandes fluorescentes.

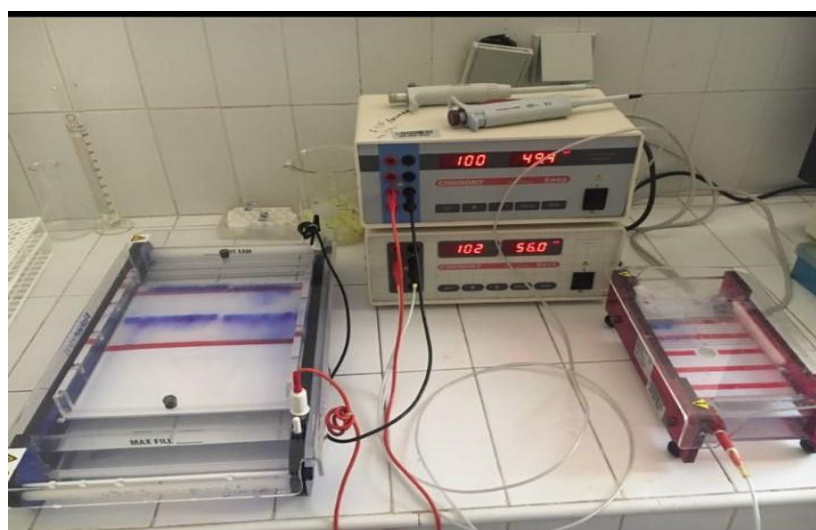


Figure 13 : Dispositif de l'électrophorèse

Résultat et discussion

1. Identification des isolats

Dans notre étude nous avons procédé à la recherche de *S. aureus* par différentes techniques de microbiologie. Les isolats qui étaient positifs pour la fermentation du mannitol, la coloration de Gram, le test catalase et le test coagulase ont été retenus comme *S. aureus*. Parmi 22 isolats d'origine clinique 17 ont été identifiés comme étant *S. aureus*.

2. Etude du profil de résistance des souches *S. aureus* d'origine clinique

Durant deux mois de stage, nous avons isolé et identifié à partir de 22 échantillons, 17 souches de *S. aureus*. L'antibiogramme effectué a permis d'étudier la résistance des souches identifiées.

Sur les isolats de *S. aureus* d'origine clinique, 94.11% ont été résistantes à au moins un antibiotique, les 10 antibiotiques pour lesquels aucune résistance n'a été observée sont : gentamycine (CN), clindamycine (CLI), norfloxacine (NOR), fluoroquinolones (Lev), cotrimoxazole (COT), rifampicine (RD), teicoplanine (TEC), amikacine (AK), cotrimoxazole (SXT), ertapénème (ETP).

Le tableau suivant représente le profil de résistance des souches étudiées.

Tableau 3 : Résistance des souches isolées aux antibiotiques étudiés

	Pénicilline G	Céfoxitine	Quinupristine	Chloramphénicol	Spéramycine	Erythromycine	Acide Fusidique	Acide nalidixique
S1	R	S	S	S	S	S	S	S
S2	R	S	S	S	S	S	S	R
S3	R	S	S	S	S	S	S	S
S4	R	S	R	S	S	S	S	S
S5	S	S	S	S	S	S	S	S
S6	R	S	S	S	S	S	S	S
S7	R	S	S	S	S	S	S	S
S8	R	S	S	R	S	S	S	S
S9	R	S	S	S	S	S	S	S
S10	R	S	S	S	R	R	R	S
S11	S	R	S	S	S	S	S	S
S12	R	S	S	S	S	S	S	S
S13	R	S	S	S	S	S	S	S
S14	R	S	S	S	S	S	S	S
S15	R	S	S	S	S	S	S	S
S16	R	S	S	S	S	S	S	S
S17	R	S	S	S	S	S	S	S

S1-S17 : Souches étudiées, **R** : Résistante, **S** : Sensible

Les souches (**S1. S3. S6. S7. S9. S12. S13. S14. S15. S16. S17**) sont résistantes uniquement à la Pénicilline G. La souche **S11** est résistante à la Céfoxitine (Méticilline). La souche **S4** est résistante à deux antibiotiques la pénicilline G et la quinupristine Tandis que la souche **S8** est résistante au chloramphénicol et la pénicilline G. La souche **S10** est résistante à quatre antibiotiques, la pénicilline G, la spéramycine, l'erythromycine et l'acide fusidique.

Le taux de résistance des souches de *S. aureus* vis-à-vis les antibiotiques utilisés est de 68.18% pour la Pénicilline G, 4.54% pour l'acide nalidixique, 4.54% pour le quinupristine, 4.54% pour l'erythromycine, 4.54% pour la spéramycine, 4.54% pour l'acide fusidique, 4.54% pour le chloramphénicol et 4.54% pour le céfoxitine (Figure13). Nous avons noté une seule résistance à la céfoxitine sur les 17 isolats de *S. aureus*, ce qui montre une prévalence faible des SARM parmi nos isolats cliniques. Dans une étude réalisée dans un hôpital à Dakar (**Faye, 1997**), le taux de résistance à la pénicilline était estimé à 61%, valeur proche de celle déterminée dans la présente étude.

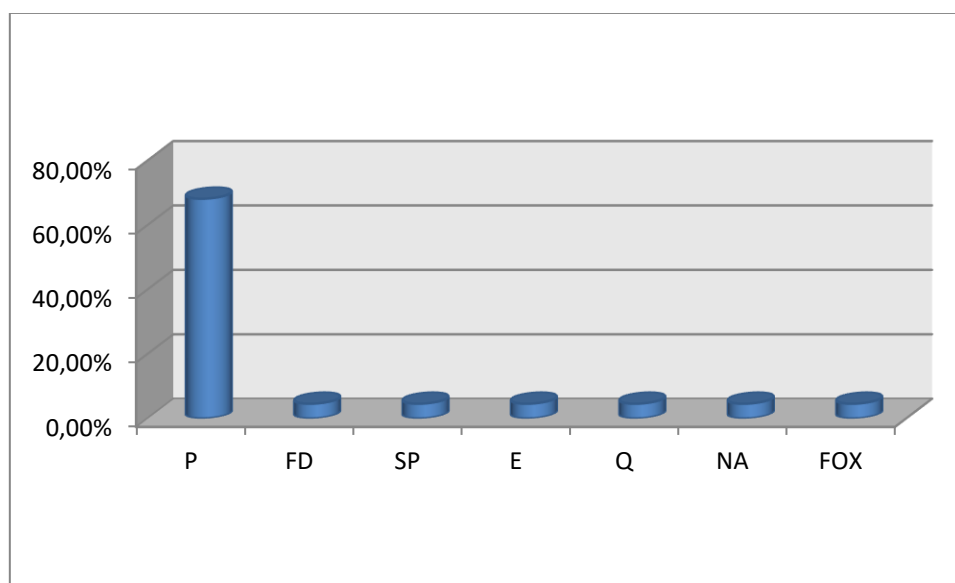


Figure 14 : Fréquence de la résistance des isolats de *S. aureus* d'origine clinique

P : pénicilline G, FD : acide fusidique, SP : spéramycine, E :erythromycine, Q : quinupristine, NA : acide nalidixique, FOX: cefoxitine.

3. Résultat de la recherche du gène *pvl* chez les souches de *S. aureus* isolées

Les 17 souches de *S. aureus* d'origine clinique, ont fait l'objet d'une étude moléculaire pour rechercher le gène *pvl*.

L'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification du gène *pvl* (433pb) a donné les profils suivants :

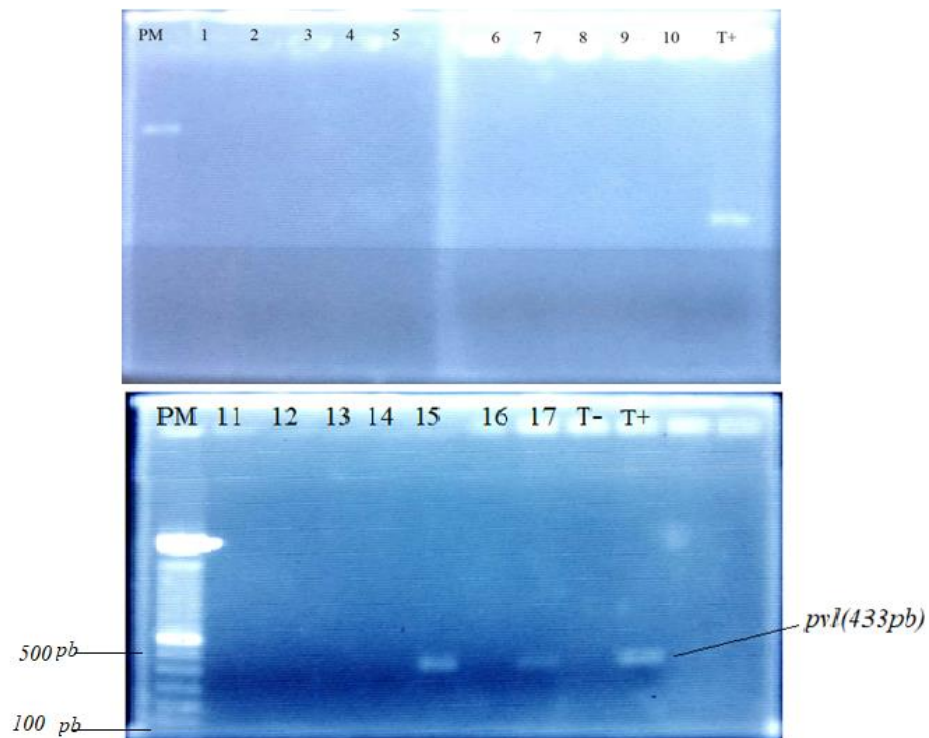


Figure 15 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose du produit d'amplification

PM : Marqueur de poids moléculaire, **T⁺** : Témoin positif, **T⁻** : Témoin négatif, **pvl** : Gène codant pour la Leucidine de Panton Valentine, 1, 2, 3.....17 : Souches étudiées.

Le résultat obtenu (figure 16) montre l'apparition d'une bande de 433 pb pour les souches 15 et 17, cette bande étant identique à celle observée pour le Témoin positif. Ce qui montre que ces deux souches possèdent le gène *pvl* alors que les autres souches étudiées en sont dépourvus. Par conséquent, le gène *pvl* est présent avec un taux de 11,76% (2/17).

D'après notre étude, les deux souches, possédant le gène *pvl*, ont été isolées à partir d'une infection ostéo-articulaire. Ce qui indique que la protéine PVL pourrait jouer un rôle important dans ce type d'infection.

En Afrique noire, 60 à 100 % des infections ostéo-articulaires à *S. aureus* sont *pvl* positif (**Breurec S et al.,2011**). Par ailleurs, en France ou en Nouvelle-Zélande, le gène *pvl* est retrouvé respectivement dans 23 % et 31 % des infections ostéo-articulaires (**Lina et al., 1991, Muttaiyah et al., 2010**).

Notre isolat de SARM n'a été pas trouvé positif pour le gène *pvl*. Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats d'Okon et al. (**Okon et al., 2009**) et Terry Alli et al. (**Terry Alli et al., 2012**) qui n'ont rapporté aucune souche positive de *pvl* parmi les souches de SARM testées.

Conclusion

Les infections causées par *S. aureus* constituent un problème majeur de santé public. En effet, ces infections atteignent des proportions dangereuses dans toutes les régions du monde (**de Silva, Lowy et Peacock, 2001**). Le facteur de virulence particulier qui influe de manière importante sur la physiopathologie de l'infection staphylococcique est la PVL, qui réduit les défenses innées de l'hôte et permet à la bactérie de survivre et de se multiplier plus rapidement.

Notre étude a été menée sur 17 souches de *S. aureus*, pour lesquelles nous avons réalisé des antibiogrammes et des recherches moléculaires concernant le gène *pvl*. Nous avons montré que le taux de résistance à la pénicilline G est de 68,18%, tandis que pour, le céfoxitine, l'acide fusidique, la spérAMYCINE, l'erythromycine, le quinuspristine et pour l'acide nalidixique, le taux de résistance est de 4,54%.

Les résultats obtenus montrent que la prévalence du gène *pvl* chez les souches étudiées est de 11,76%. Toutes les souches, isolées à partir d'une infection ostéo-articulaire, possèdent le gène *pvl*. Ce résultat suggère que ce gène pourrait avoir un rôle dans ce genre d'infection.

En perspective, nous proposons les aspects suivants :

Utilisation de la PCR pour le diagnostic de *S. aureus*

Utilisation de la PCR pour mettre en évidence la présence du gène *pvl*.

Estimation de la prévalence du gène *pvl* en utilisant plusieurs échantillons cliniques.

Détermination du rôle du gène *pvl* dans les infections causées par *S. aureus*.

Etude du déterminisme génétique de la résistance des souches de *S. aureus*.

Références bibliographiques

Bertrand X, Costa Y, Pina P (2005). Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les bactériémies: Données de l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) 1998-2003. *Med Mal Infect*, 35(6):329–34.

Bhatta DR, Cavaco LM, Nath G, Kumar K, Gaur A, Gokhale S, et al (2016). Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal : a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). *BMC Infect Dis*, 16(1): 1–6.

Breurec S, Fall C, Pouillot R, et al (2011). Epidemiology of methicillinsusceptible *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: high prevalence of Panton-Valentine leukocidin genes. *Clinical Microbiol Infect*, 17 : 633-9.

Chibi A (2015). Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Mémoire de master Algérie : Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, 79.

Clarke SR, Foster SJ (2006). Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in Microbial Physiology*, 51: 187-224 p.

Courvalin P(2008). La résistance des bactéries aux antibiotiques: Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull Acad Vet Fr*, 161(1): 7–12.

Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler, VG (2009). Staphylococci in human disease. In: John Wiley & Sons. Médecine Veteran's Administration Medical Centre, 623.

Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandensch F FD et al (2002). Community acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* infections in France. Emergence of a single clone that produces panton valentine leukocidin. *J Clin Infect dis*, 35:819–2

Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy M-élisabeth, Tristan A, Vandenesch F (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus*. *med sci*, 26(11), 943–949.

Durand G (2009). Caractérisation , épidémiologie et pathogénie d ' un clone de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST- 1). Thèse de Doctorat. Bernard LYON I:Univ Claude, 219p.

Elhamzaoui S, Benouda A, Allali F, Abouqual R (2009), Elouennass M. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans deux hôpitaux universitaires à Rabat, Maroc. *Med Mal Infect*, 39(12):891–5.

Faye I(1997).Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques de souches bactériennes isolées à Dakar. Intérêt de l'utilisation de la technique du E-testR et du programme Whonet III. Thèse Pharm, Dakar, n°07.

Fleurette J (1982). Staphylocoques et microcoques Bactériologie médicale Flam. *Med. Science*,20 : 6-15

Gordon RJ, Lowy FD (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis* , 46(S5):S350–9.

Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, et al (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *J Infect Chemother*, 20(10):593–601.

Joubert O, Viero G, Keller D, Martinez E, Colin DA, Monteil H, Mourey L, Dalla Serra M, Prévost G (2006). Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochemical J*, 396:381-9.

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al (1999). Involvement of PantoneValentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*, 29: 1128-32.

Lowy F (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(8):520–32

Mccormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens : An Update. *Ann Rev Microbiol*, 55:77–104.

Motamedi H, Abadi SSR, Moosavian SM, Torabi M (2015). The association of Pantone-Valentine leukocidin and *mecA* genes in methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolates from patients referred to educational hospitals in Ahvaz, Iran. *Jundishapur J Microbiol*, 8(8):4–8

Muttaiyah S, Coombs G, Pandey S, et al (2010). Incidence, risk factors and outcome of Panton-Valentine leukocidin positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections in Auckland, New Zealand. *J Clin Microbiol*, 48 : 3470-4.

Muylaert A, Mainil JG (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : Les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann Med Vet*, 156(2):109–23.

Okon KO, Basset P, Uba A, Lin J, Oyawoye B, Shittu AO, et al (2009). Cooccurrence of predominant Panton-Valentine leukocidin-positive sequence type (ST) 152 and multidrug-resistant ST 241 *Staphylococcus aureus* clones in Nigerian hospitals. *J Clin Microbiol*, 47(9):3000–3.

Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD (2001). What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus* ?. *Trends Microbiol*, 9:605-10.

Quincampoix J (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Elsevier*, 9(10):267–75.

Reiser RF, Crass BA, Robbins RN, Davis P (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *staphylococcus aureus* isolates. *The Lancet*, 317(8228): 1017–21.

Sawai T, Tomono K, Yanagihara K, Yamamoto Y, Kaku M, Hirakata Y, et al (1997). Role of coagulase in a murine model of hematogenous pulmonary infection induced by intravenous injection of *Staphylococcus aureus* enmeshed in agar beads. *Infect Immun*, 65(2):466–71.

Terry Alli OA, Ogbolu DO, Mustapha JO, Akinbami R, Ajayi AO (2012). The non-association of Panton-Valentine leukocidin and *mecA* genes in the genome of *Staphylococcus aureus* from hospitals in South Western Nigeria. *Indian J Med Microbiol*, 30(2):159–64.

Teruyo I, Keiichi H(1998). Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *yonsei medical journal*, 39(6): 526-533.

Toure A (1992). Etude prospective des souches de staphylocoques a coagulase negative isolees au chu de dakar. Thèse de doctorat: pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. Dakar : Universite Cheikh Anfa Diop de Dakar, Faculte de Medecine et Pharmacie, 125.

Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, et al (2007). Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 65(52) 105–109.

Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh H, et al (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, 5(12):751–62.

Annexes

○ La composition du TBE

Le tampon TBE (Tris, acide borique, EDTA) est une solution tampon de migration utilisée en électrophorèse sur gel d'agarose des acides nucléiques

Préparation

Pour la préparation d'un tampon TBE (1x) pH 8,0 peser :

108 g Trisbase

55 g Acide borique

9,3 g EDTA

Mettre dans une fiole jaugée et mettre la quantité suffisante pour 1000 ml d'eau distillée. Agiter, puis autoclaver pour la stérilisation.

○ La composition des milieux de culture

BHI (Brain Heart infusion) : Milieu nutritif tamponné utilisé pour la culture d'une très grande variété de micro-organismes aérobies ou anaérobies incluant levures et moisissures

protéose-peptone10,0

infusion de cervelle de veau12,5

infusion de coeur de boeuf.....5,0

glucose.....2,0

chlorure de sodium5,0

hydrogénophosphate de sodium 2,5

pH = 7,4

Chapman : Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes les bactéries du genre Staphylococcus.

Peptone :.....10,0 g

Extrait de viande de bœuf :.....1,0 g

Chlorure de sodium :.....75,0 g

Mannitol :.....10,0 g

Rouge de phénol :.....0,025 g

Agar-Agar :.....15,0 g

Eau distillée :.....qsp 1 Litre

pH = 7,4

TSA (gélose trypticase soja) : Milieu de base qui permet la culture des bactéries non exigeantes.

Peptone papaïnique de soja.....5
Peptone trypsique de caséine.....15
NaCl.....5
Agar.....15
pH final = 7,3

Gélose au Sang : Milieu riche qui permet la culture et l'isolement des bactéries exigeantes (sans besoin de facteurs particuliers). La lecture de l'hémolyse est un critère d'orientation

Mélange spécial de peptones.....23
Amidon.....1
NaCl.....5
Agar.....10
Sang de mouton.....5%
pH final = 7,3

MH (gélose Muller Hinton) : La gélose Mueller-Hinton permet la réalisation de l'antibiogramme standard (principale utilisation).

Infusion de viande de boeuf...300 ml
Peptone de caséine.....17,5
Amidon de maïs.....1,5
Agar.....17
pH final = 7,4

Diamètres d'inhibition acceptable des différents antibiotiques testés sur *S. aureus* Selon les recommandations du comité français de l'antibiogramme 2018)

Antibiotiques	Charge des disques En µg (microgrammes)	Diamètres d'inhibition (mm)
		Limites acceptables (en mm)
Pénicilline (P)	10	26
Erythromycine(E)	15	18-21
Gentamycine (GEN)	10	18
Céfoxitine (FOX)	30	22
Rifampicine (RD)	5	23-26
Acide Fusidique (FD)	10	24
Ciprofloxacine (CIF)	5	21
Tétracycline (TE)	5	19-22
Chloramphénicol (C)	30	18
Norfloxacine (NOR)	10	17
Levofloxacine (Q)	5	24
Quinupristine (Q)	15	18-21

