

---

## LISTE DES FIGURES :

---

N°	Titre	Page
1	Facteurs de virulence de S.Aureus	4
2	Les modes d'action des antibiotiques	7
3	Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques	11
4	Structure de la cassette SCCmec	14
5	Vue microscopique des cocci Gram +	17
6	Résultat du test catalase	18

7	Résultat du test coagulase	18
8	Séquences des amorces utilisées pour la PCR	22
9	Dispositif de l'électrophorèse	23
10	Exemple d'antibiogramme (souche SA11)	24
11	Taux de resistance des 3 isolats	25
12	% de résistance et sensibilité des 3 isolats	26
13	Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose	27

---

## LISTE DES TABLEAUX

---

N°	Titre	page
1	Mode d'action des antibiotiques	7-8
2	Liste des antibiotiques de S.aureus	20
3	Résultats des antibiogrammes des 3 souches isolées	28

---

## ANNEXES

---

N°	Titre	Page
1	la composition des milieux de culture	31-32
2	diamètres d'inhibition acceptables des différents antibiotiques testés sur S.Aureus	33

---

## LISTE DES ABREVIATIONS :

---

- **BHI** : Brain Heart Infusion
- **BMR** : Bactéries multirésistantes
- **BORSA** : *BORdeline S.aureus*
- **CMI** : concentration minimale inhibitrice
- **MH** : Muller Hinton
- **MLS** : Macrolides, Lincosamides, Streptogramines
- **MODSA** : MODified *S.aureus*
- **MSCRAMM** : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
- **PLP2a** : Protéine liant la pénicilline additionnelle
- **PVL** : Leucocidine de Panton-Valentine
- **S.aureus** : *Staphylococcus aureus*
- **SARM** : *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline
- **SASM** : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
- **SCCmec** : Cassette chromosomique mec staphylococcique
- **SCTS** : Syndrome de choc toxique staphylococcique
- **TIAC** : Toxi-infections alimentaires collectives
- **TSA** : Tryptic Soy Agar
- **TSST-1** : Toxic shock syndrom toxin 1

---

## Résumé :

---

L'augmentation de la résistance des *Staphylocoques dorés* aux antibiotiques est un sujet de préoccupation important dont les infections sont en augmentation régulière et posent des problèmes thérapeutiques vu l'émergence des souches multirésistantes.

Les tests *in vitro*, de sensibilité des germes aux antibiotiques sont une étape fondamentale, préalable à la mise en œuvre de toute antibiothérapie antistaphylococcique.

*Staphylococcus aureus* possède une grande capacité d'adaptation aux antibiotiques par la mise en jeu de mécanismes de résistance variés. Il est aujourd'hui admis que 80 à 90 % des souches de *Staphylococcus aureus* sont résistantes à la pénicilline G et que celles isolées en milieu hospitalier, responsables d'infections nosocomiales, se caractérisent par leur aptitude marquée à la multirésistance.

Malgré l'augmentation d'infections dues aux staphylocoques à coagulase négative, notamment en milieu hospitalier, *Staphylococcus aureus* demeure l'espèce la plus redoutable du genre *Staphylococcus*. En effet le *Staphylococcus aureus* est une bactérie pyogène et toxigène dont la pathogénicité est déterminée par la production d'un grand nombre de facteurs de surface et d'exoproteines. Les infections à *Staphylococcus aureus* sont la deuxième cause d'infections nosocomiales, en particulier ce germe est le premier agent responsable d'infections osseuses chez l'adulte. En plus certaines souches capables de produire une exotoxine sont responsables de toxiques infections alimentaires très souvent graves.

Nous nous sommes proposés dans cette étude de jauger le niveau de sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques antistaphylococciques classiques, et de déterminer, grâce à des approches moléculaires, le gène *mecA* véhiculant la résistance à la méticilline.

Ainsi la première partie de notre étude sera consacrée aux *Staphylocoques*, aux antibiotiques, et aux mécanismes de résistance bactérienne.

Dans la deuxième partie nous évoquerons le matériel et les méthodes utilisés pour évaluer le niveau de sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir du liquide des ponctions articulaires et du pus, et enfin, nous exposerons nos résultats et commentaires pour enfin les discuter selon les objectifs d'étude.

# Sommaire :

---

Introduction.....	1
<b><u>Revue bibliographique</u></b>	
I. Généralités sur S.aureus.....	2
1. Classification.....	2
2. Epidémiologie de S.aureus.....	2
2.1. Niche écologique.....	2
2.2. Transmission.....	2
3. Pouvoir pathogène.....	2
3.1. Généralités.....	3
3.2. Infections staphylococciques.....	3
4. Caractères intrinsèques.....	3
4.1. Facteurs de virulence.....	3
4.2. Génome.....	4
4.3. Facteurs d'invasion et d'adhésion.....	4
4.4. Substances élaborées par S.aureus.....	5
II. Notions générales sur les différentes familles d'antibiotiques.....	6
1. Antibiotiques : définition- historique.....	6
2. Classification des antibiotiques.....	6
3. Mode d'action des antibiotiques.....	7
III. La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	9
1. Définition de la résistance bactérienne.....	9
1.1. La résistance intrinsèque.....	9
1.2. La résistance acquise.....	9
2. Les mécanismes génétiques de la résistance acquise.....	9
2.1. Résistance chromosomique.....	10
2.2. Resistance plasmidique.....	10
3. Les mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques.....	10
3.1. Altération de la cible bactérienne de l'antibiotique.....	11
3.2. L'inactivation enzymatique.....	12
3.3. La réduction de la perméabilité membranaire.....	12
3.4. L'efflux actif.....	12
IV. La résistance aux antibiotiques chez S.aureus.....	13
1. Résistance à la Pénicilline G.....	13
2. Résistance aux aminosides.....	13
3. Résistance aux fluoroquinolones.....	14
4. Résistance aux autres antibiotiques.....	14
5. Résistance à la méticilline.....	14
5.1. Support de la résistance à la méticilline : le gène mecA.....	14
5.2. Mécanismes de la résistance à la méticilline.....	15

## **Matériel et méthodes**

1.	Prélèvement et isolement.....	16
2.	Tests d'identification.....	16
2.1.	Coloration de Gram.....	16
2.2.	Test catalase.....	17
2.3.	Test coagulase.....	18
3.	L'antibiogramme.....	19
4.	Etude génotypique.....	20
4.1.	Extraction d'ADN.....	21
4.2.	PCR multiplexe.....	22
4.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	22

<b><u>Résultats et discussion</u></b> .....	24
---------------------------------------------	----

<b><u>Conclusion</u></b> .....	29
--------------------------------	----

<b><u>Annexes</u></b> .....	31
-----------------------------	----

<b><u>Bibliographie</u></b> .....	34
-----------------------------------	----

---

# INTRODUCTION

---

*Staphylococcus aureus* est une bactérie ubiquitaire qui occupe aujourd’hui, à part sa virulence et sa résistance aux antibiotiques usuels, une grande importance en pathologie humaine dont la prévalence des infections augmente régulièrement.

Cette bactérie est armée pour annihiler un grand nombre de défenses que son hôte pourrait lui opposer. De surcroît, elle présente un arsenal de résistances vis-à-vis les antibiotiques et les antiseptiques ; d’où la difficulté de traitement.

En effet dès 1950, 10 ans après la découverte de la Pénicilline, les *Staphylocoques dorés* deviennent un problème thérapeutique majeur par l’acquisition de la résistance plasmidique à la Pénicilline. Peu après l’introduction d’un nouvel antibiotique, la Meticilline (découverte en 1959), apparaissent des souches de *S. aureus* résistantes appelées *S. aureus* résistants à la Meticilline (SARM).

En fait, les SARM sont résistants non seulement à la Meticilline, mais également à tous les autres antibiotiques de la même classe. Ces souches sont responsables de diverses infections et ont acquises des propriétés leur conférant un potentiel épidémique.

Les SARM ont actuellement une distribution mondiale, la dissémination d’un ou de plusieurs clones de SARM à l’échelle du même pays [1], entre les pays [2] et même entre les continents [3] a été rapportée.

*Staphylococcus aureus* est un pathogène redoutable qui a su développer des résistances à chaque nouvel antibiotique introduit depuis un demi-siècle. La **plasticité de son génome** lui confère la capacité de s’adapter à toutes les conditions environnementales, et notamment d’acquérir des **gènes de résistance** aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s’adapter à des concentrations croissantes d’antibiotiques.

Il apparaît que la caractérisation de ces souches nécessite non seulement une étude phénotypique mais aussi une identification du fond génétique (détermination de *SCCmec* véhiculant le gène *mecA*). L’objectif de ce travail est d’étudier la résistance de S.A sur les plans génotypique et phénotypique.

Rapport.Groupe.com

Revue Bibliographique

---

# **GENERALITES SUR *S.aureus* :**

---

## **1. Classification :**

Les *Staphylococcaceae* sont une famille de bactéries à coloration Gram positif, de l'ordre des *Bacillales* comprenant les genres : *Jeatgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomicoccus*, *Salinicoccus* et *Staphylococcus*.

Une vingtaine d'espèces de la famille des staphylocoques sont actuellement identifiées dont l'espèce principale est *S.aureus* qui est la plus pathogène du genre. [4]

## **2. Epidémiologie de *S. aureus* :**

### **2.1.Niche écologique :**

*S.aureus* est un germe ubiquitaire habituellement retrouvé dans le sol, les poussières, les eaux, et sur certains produits alimentaires (comme les laitages).

L'homme représente l'une des niches écologiques les plus importantes pour ces germes qui vivent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses.

*S. aureus* constitue l'une des espèces les plus couramment isolées en milieu hospitalier avec *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie est impliquée dans la survenue d'infections nosocomiales et représente le deuxième agent pathogène responsable de ce type d'infections après *E. coli*, mais son isolement en milieu communautaire est également de plus en plus fréquent. [5]

### **2.2.Transmission :**

Le mode de transmission principal des staphylocoques est le **contact direct** (infections cutanées ou muqueuses) ou **indirecte** (transmission par l'intermédiaire de l'environnement) qui est fréquent en milieu hospitalier notamment à partir des vêtements, de la literie, du matériel médical, de la poussière et de l'air.

Les corps étrangers comme les dispositifs intravasculaires (cathéters, valves) ou les prothèses orthopédiques constituent également des facteurs favorisants. [6]

En milieu hospitalier, la transmission manu portée par le soignant (de leurs propres souches ou de celles de patients infectés) constitue la principale cause de survenue d'infections nosocomiales à *S.aureus*.

## **3. Pouvoir pathogène :**

### **3.1.Généralités :**

Le Staphylocoque doré est la souche de *Staphylocoquela* plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Elle partage avec la bactérie *Escherichia coli* le triste

privilege d'être au premier rang des germes responsables d'**infections nosocomiales** (infections; contractées à l'hôpital). *S. aureus* est également au deuxième rang des bactéries responsables en France d'**intoxications alimentaires**, après les salmonelles [7].

La fréquence et la gravité des infections à staphylocoques sont liées à trois principaux facteurs : le caractère ubiquitaire du germe, l'abaissement des défenses locales et générales des malades soumis à des soins intensifs, des interventions chirurgicales graves, et la fréquente résistance aux antibiotiques du staphylocoque, notamment du staphylocoque hospitalier.

### **3.2.Infections staphylococciques :**

**Infections cutanées** : furoncles (folliculite), panaris (doigt), anthrax (fusion), cellulite infectieuse, syndrome de Lyell (peau ébouillantée) : érythrodermie et décollement bulleux de l'épiderme.

**Septicémies** : Localisations secondaires possibles /os, poumons, méninges...

**Endocardites infectieuses** : essentiellement sur prothèse (11 à 27%). Primitive ou suite à une hospitalisation.

**Infections osseuses** : Ostéomyélites aiguës ou chroniques souvent sur prothèse articulaire ou fixateurs interne/externe

**Infections ORL** : Sinusites, angines érythémateuses, (otites), Infections pulmonaires, Rares pneumopathies avec destruction parenchymateuse, sur terrains particuliers (atteinte post-virale, malades intubés-ventilés de réanimation...)

**Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)** : il s'agit de troubles digestifs provoqués par l'ingestion d'aliments contenant l'entérotoxine préformée, d'incubation très courte (une heure à six heures après le repas) et évoluant sans fièvre.

**Syndrome de choc toxique staphylococcique (SCTS)** associe hypotension, choc et fièvre à une érythrodermie généralisée desquamante. Il est occasionné par des staphylocoques producteurs de TSST. Sa survenue serait favorisée par l'utilisation de tampons périodiques.  
[9]

#### **4. Caractères intrinsèques de *S.aureus* :**

##### **4.1.Facteurs de virulence :**

La large gamme d'infections causées par *S. aureus* est liée à l'expression de plusieurs facteurs de virulence (*figure 1*). *S. aureus* a en effet la capacité de sécréter, après invasion, des facteurs d'adhésion, des toxines ou encore des enzymes.

Les *S.aureus* ont une protéine obligatoire de fibrinogène/fibrine qui permet la fixation aux caillots sanguins et aux tissus traumatisés. C'est la raison pour laquelle ce germe est capable de produire des infections de poteau-chirurgie et des infections au niveau des plaies.

Les facteurs de virulence du *Staphylocoque doré* comprennent des antigènes, des enzymes et des toxines. [9]

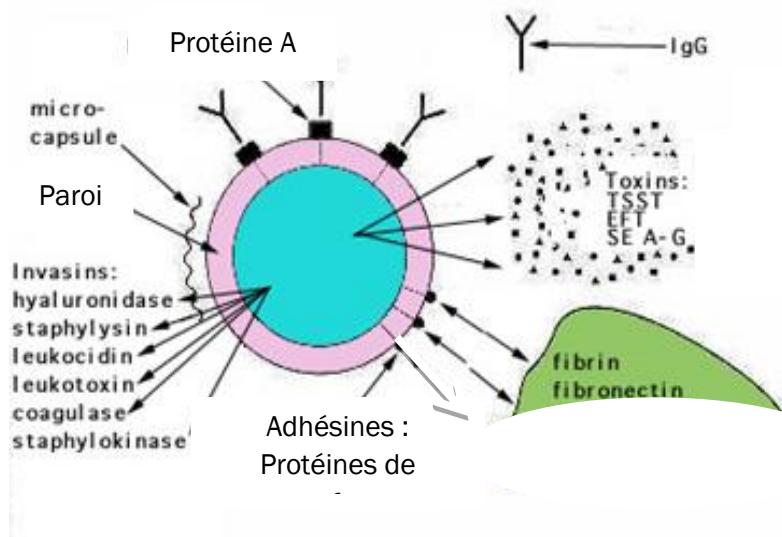


FIGURE 1 : FACTEURS DE VIRULENCE DE S.AUREUS[32]

##### **4.2.Génome :**

Le génome du staphylocoque est constitué d'un **chromosome circulaire** d'environ 2800 Kb.

Les travaux de séquençage du génome de *S. doré* initiés par les équipes de Baba et d'Hiramatsu ont permis de percer le secret du grand pouvoir d'adaptation de cette bactérie [10]. Le génome est formé de deux domaines fonctionnels distincts. La majeure partie du chromosome (75%) appelé « **core** » contient des gènes qui assurent le métabolisme de la bactérie. La deuxième partie de la bactérie (25% environ) est constituée d'éléments génétiques accessoires et mobiles comme les plasmides, transposons, prophages ou des îlots

de pathogénicité portant la plupart des gènes associés à des facteurs de virulence et à la résistance aux antibiotiques [11-12].

#### **4.3.Facteurs d'invasion et d'adhésion :**

*S.aureus* se fixe aux cellules par l'intermédiaire de protéines de surface dénommées adhésines qui appartiennent à la famille des **MSCRAMM** (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Ces protéines sont ancrées dans le peptidoglycane bactérien par des liaisons covalentes.

Cinq protéines ont été caractérisées : protéine A, protéine de liaison au collagène, protéine de liaison à la fibronectine, protéine de liaison au fibrinogène et protéine de liaison à l'élastine.

#### **4.4.Substances élaborées par *S.aureus* :**

**Les toxines** : protéine alpha (alpha toxine), Entérotoxine, TSST-1(Toxic Choc Syndrom Toxine 1), Exfoliatines et PVL (Leucidine de Panton Valentine).

**Les enzymes** : coagulase libre, fibrinolysine, désoxyribonucléase (DNase) et lipase.

---

# NOTIONS GENERALES SUR LES DIFFERENTES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES

---

## 1. Antibiotiques : définition-historique

Un **antibiotique** (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie »), d'après le Dictionnaire de Biologie de Jacques Berthet, est une molécule naturelle ou semi-synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique **bactéricide** et dans le second cas d'antibiotique **bactériostatique**. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée.

Certains antibiotiques provoquent, à partir d'une certaine concentration seuil, l'apparition d'une mortalité bactérienne. On appelle cela la **bactériocidie**

L'utilisation des antibiotiques pour le traitement des infections bactériennes est un des progrès majeurs de la médecine au XXe siècle : [13]

- **1877** : **Terme d'antibiose** -Pasteur et Joubert montrent l'action antagoniste entre microorganismes (**bacille du Charbon**)
- **1942** : production industrielle de la pénicilline qui sera utilisée et bénéfique pendant la 2ème guerre mondiale.

## 2. classification des antibiotiques :

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques. Les principales sont les bétalactamines (pénicillines et céphalosporines), les macrolides, les aminosides, les cyclines et les quinolones.

Ces grandes familles d'antibiotiques se différencient par : [14]

**Spectre d'activité**, c'est-à-dire l'ensemble des germes sensibles à chaque famille d'antibiotiques

**Origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi-synthétique)

**Mode d'action –cible** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques

**Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame). La classification selon la nature chimique permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.)

**Indications** : directement liées au spectre d'activité et à la diffusion de l'antibiotique dans les différents organes : par exemple, certains antibiotiques se concentrent dans les urines et sont particulièrement intéressants en cas d'infection urinaire.

### 3. Mode d'action des antibiotiques : (figure2) (tableau1)

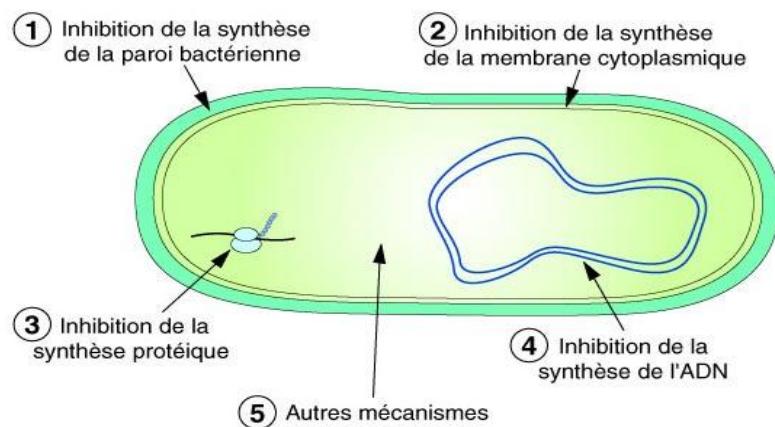


FIGURE 2: LES MODES D'ACTIONS DES ANTIBIOTIQUES[33]

TABLEAU 1: MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES

Cible	Action	Antibiotiques
<b>1. Sur la paroi</b> (cassent la paroi pour tuer la bactérie)	inhibition de la synthèse du peptidoglycane.	- $\beta$ -lactamines, - Glycopeptides - Fosfomycines.
<b>2. Sur la membrane plasmique</b> (caractère amphipathique) (agissent comme des détergents cationiques)	pénétration dans la cellule bactérienne et insertion parmi les phospholipides de la paroi et perturbation de perméabilité membranaire.	- La polymyxine B - Colistine
<b>3. Inhibition de synthèse protéique</b>	Ils empêchent ou gênent la traduction des ARNm donc	Tétracyclines, Aminosides, Chloramphénicol,

(fixent sur des constituants spécifiques du ribosome bactérien)	la formation de nouvelles protéines.	Macrolides, Acide Fusidique, Linézolide
<b>4. Inhibition de synthèse ou du fonctionnement des acides nucléiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inhibition de la réPLICATION de l'ADN</li> <li>- inhibition de la transcription / ARN polymérase</li> <li>- diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques</li> </ul>	Rifampicines, Sulfamides, Quinolones et Triméthoprimes
<b>5. Inhibition compétitive</b>	anti métabolites	Analogues de vitamines (sulfamides)

---

# LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES

---

## 1. Définition de la résistance bactérienne :

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre, cultivées dans les mêmes conditions.

Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle **survit** à la thérapie antibiotique mise en place. [15]

### 1.1. La résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque (ou naturelle ou insensibilité) est un caractère qui touche toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes). [16]

Elle confère une certaine tolérance, voir une insensibilité totale vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antimicrobiens

### 1.2. La résistance acquise :

Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien (dans certains cas, elle peut concerner la grande majorité de ces souches comme, par exemple, la production de pénicillinase chez le staphylocoque qui intéresse plus de 90 % des souches). [16]

La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce...

## 2. Les mécanismes génétiques de la résistance acquise

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué du chromosome et d'un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont

également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique.

### **2.1. Résistance chromosomique :**

Il s'agit de la mutation du génome visant à lui donner un autre statut. Phénomène

plutôt lent et rare qui est sporadique et ne se révèle que par la prise d'un antibiotique.

Elle est sur mode vertical, héréditaire modifiant la structure complète de la bactérie.

Elles se produisent 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. Ce mode de résistance ne représente que 20% de l'origine des bactéries

résistantes. [17]

### **2.2. Résistance extra chromosomique :**

Elle est essentiellement liée à l'activité plasmidique.

Les plasmides sont des structures extra chromosomiques constituées d'ADN bicaténaire

circulaire, se répliquant de façon autonome. Leur transmission, stable au cours des

générations, peut se faire entre des bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes.

L'une des conséquences de cette facilité de transmission intra et interspécifique est que la

résistance plasmidique peut intéresser plusieurs antibiotiques à la fois (BMR

multirésistance).

La résistance plasmidique est fréquente car est liée à une synthèse des protéines

additionnelles et non à une mutation et à l'inverse de la bactérie mutante, elle n'est pas

fragilisée. Aussi, elle est contagieuse elle se transmet horizontalement par conjugaison,

mobilisation, transduction et transformation.

## **3. Les mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques :**

Sur le plan biochimique, les bactéries ont développé quatre grands mécanismes

d'acquisition de la résistance afin de neutraliser l'action des agents antibactériens, les plus

répandus étant la modification de la cible, l'inactivation enzymatique, l'imperméabilité

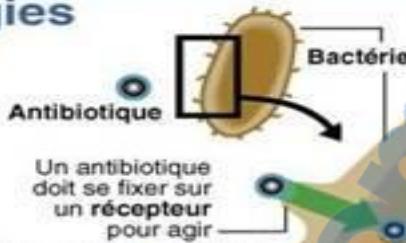
(diminution du diamètre des porines) et l'efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule

par des pompes énergie dépendantes. Le motif commun à ces différents mécanismes de

résistance est d'empêcher l'interaction de l'antibiotique avec sa cible. (figure3)

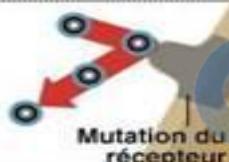
## Les quatre stratégies de résistance aux antibiotiques

Les bactéries sont des êtres vivants qui évoluent. De ce fait, elles sont capables de s'adapter et de résister aux antibiotiques.



### 1 Mutation du récepteur

Si le récepteur change, suite à une mutation, il empêche la liaison de l'antibiotique.



### 2 Modification de l'antibiotique

De nombreuses souches résistantes fabriquent une enzyme qui modifie la molécule antibiotique.



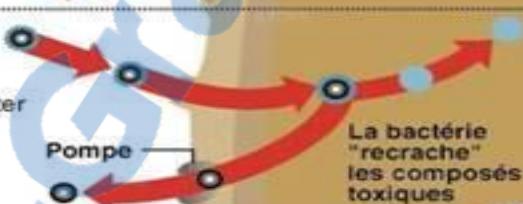
### 3 Imperméabilité de la bactérie

La bactérie ferme ses pores. L'antibiotique ne peut pas pénétrer.



### 4 Expulsion de l'antibiotique

Certaines bactéries sont capables de rejeter les antibiotiques par pompage hors de la cellule.



Source : Janssen - Cilag

APP

FIGURE 3: PRINCIPAUX MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.[34]

**1- modification de la cible**, qui entraîne une perte d'affinité de l'antibiotique pour cette dernière; **2- production d'une enzyme** qui va détoxifier l'antibiotique ; **3- imperméabilité**, notamment par diminution du diamètre des porines chez les bacilles à Gram négatif; **4- efflux** des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes

### 3.1. Altération de la cible bactérienne de l'antibiotique :

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie.

- La modification de la cible, mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS (macrolides, lincosamides,

streptogramines) 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 (triméthoprime) et les bétalactames dont *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) [18]

### **3.2. L'inactivation enzymatique :**

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bétalactames, des aminoglycosides et des phénicolés.

L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité grâce à sa capacité de détruire des liens chimiques nécessaires à l'intégrité fonctionnelle du médicament.

### **3.3. La réduction de la perméabilité membranaire :**

La membrane externe des Gram (-) peut constituer une barrière à la pénétration des antibiotiques. En effet, le passage de petites molécules hydrophiles n'est possible que grâce à la présence de **porines** qui forment des canaux aqueux à travers cette membrane. En revanche, des molécules trop volumineuses ou insuffisamment hydrophiles ne pourront emprunter cette voie d'accès et ne pénétreront que modestement dans les bactéries.

Toute mutation affectant une porine va perturber la pénétration de l'antibiotique dont elle permet l'entrée.

### **3.4. L'efflux actif :**

L'efflux actif, ( médié par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs) est un mécanisme qui repose sur une pompe insérée dans la membrane nécessitant de l'énergie qui permet d'expulser à l'extérieur (grâce à un canal) des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que des antibiotiques et d'autres médicaments et donc de diminuer leur concentration intracellulaire.[19]

---

# LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ *Staphylococcus aureus*

---

L'émergence de souches résistantes à la pénicilline en 1948 et à la méticilline en 1961 a eu lieu peu d'années après l'introduction de ces molécules sur le marché [20-21]. Depuis cette date, les souches de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ont largement diffusé et sont devenues endémiques dans de nombreux pays [22-23]. Par la suite, *S. aureus* est devenu résistant à la plupart des autres classes d'agents anti infectieux, incluant également les glycopeptides depuis 1997 [24], et la multirésistance chez *S. aureus* est devenue un problème majeur de santé publique. Puisque les isolats de SARMs sont le plus souvent résistants à d'autres classes d'antibiotiques, elles sont considérées comme des bactéries multirésistantes (BMR), et la résistance à la méticilline est depuis lors utilisée comme marqueur de multirésistance.

Les *Staphylocoques* peuvent être sensibles à divers antibiotiques mais se caractérisent par une aptitude remarquable à acquérir de multiples caractères de résistance.

## 1. Résistance à la Pénicilline G :

La sécrétion de pénicillinases est présente chez 70 à 90 % des *S. aureus*. Lorsque le laboratoire de bactériologie signale une résistance à la pénicilline (sans résistance à l'oxacilline), celle-ci implique aussi une résistance à l'**ampicilline**, l'**amoxicilline**, la **ticarcilline** et à la **pipéracilline**. En revanche, les pénicillines associées à un inhibiteur de pénicillinase (acide clavulanique, sulbactam ou tazobactam) ou les  $\beta$ -lactamines insensibles aux pénicillinases (céphalosporines, imipenem) restent actives. Fait important en pratique, les céphalosporines de troisième génération (**céfotaxime**, **ceftriaxone**) sont dix fois moins actives que l'**oxacilline** sur le staphylocoque, ce qui rend leur utilisation illogique en dehors des cas d'infections mixtes. [25]

## 2. Résistance aux aminosides :

L'**amikacine** est l'aminoside le plus fréquemment touché chez les SARM car plus de 90 % d'entre eux expriment une résistance à la **Kanamycine** et à la **tobramycine**. Cet antibiotique doit être a priori évité dans les infections à staphylocoques. En revanche, gentamicine et nétilmicine sont moins fréquemment touchées (chez environ 5-30 % des SARM) et sont les aminosides de choix en association. [25]

### **3. Résistance aux fluoroquinolones :**

Les résistances du staphylocoque aux fluoroquinolones sont liées à des mutations dans les cibles, qui sont l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV bactériennes, impliquées dans la synthèse de l'ADN bactérien.

La résistance est croisée entre les diverses fluoroquinolones actuellement disponibles (**péfloxacine, Ofloxacine, ciprofloxacine, lévofloxacine**).

### **4. Résistances aux autres antibiotiques :**

**Fosfomycine, acide Fusidique et Rifampicine** sont presque toujours actifs. Ils ne sont utilisés qu'en association pour éviter la sélection de mutants résistants.

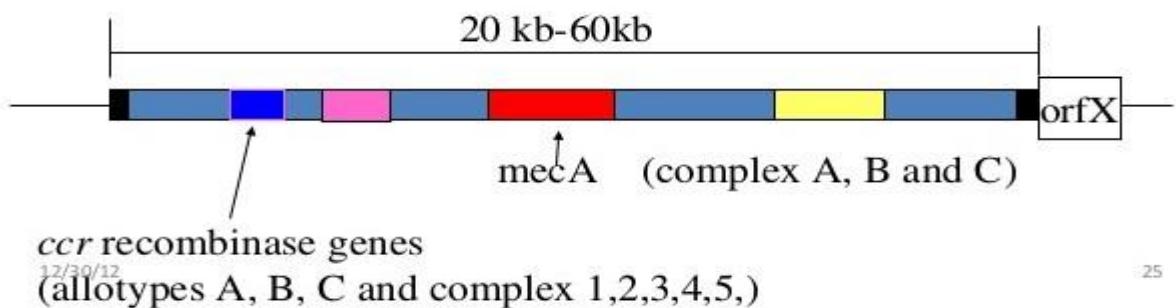
Les **glycopeptides** ne sont pas des bons antibiotiques qui malgré leur activité sur les souches multirésistantes, présentent plusieurs défauts : CMI élevée (1 à 2 mg·L<sup>-1</sup>), vitesse de bactéricidie lente (48 heures), et faible diffusion intracellulaire et tissulaire.

### **5. Résistance à la Meticilline**

#### **5.1. 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) qui présente une affinité réduite pour l'ensemble des bétalactamines et rend la bactérie résistante à la quasi-totalité de cette classe d'antibiotiques, notamment à la méticilline ou à l'oxacilline. [26]

Le gène *mecA* est inclus dans un élément génétique mobile : la cassette staphylococcique (*SCCmec*, *staphylococcal cassette chromosome mec*). Cette dernière comporte deux éléments essentiels : le complexe du gène *mecA* et un complexe de gènes codant des recombinases *ccr* (cassette chromosome recombinase) qui assurent la mobilité de la cassette (phénomènes d'intégration et d'excision de la cassette). [27]



**FIGURE 4: STRUCTURE DE LA CASSETTE SCCMEC[35]**

## **5.2. Mécanismes de la résistance à la méticilline :**

La cible des  $\beta$ -lactamines est un ensemble d'enzymes de la membrane cytoplasmique nécessaires à la formation du peptidoglycane de la paroi. Les  $\beta$ -lactamines se fixent d'une manière irréversible à l'une ou à l'autre de ces protéines appelées, pour cette raison, « protéine liant la pénicilline» (PLP). Le substrat normal de ces PLP est l'acétyl-Dalanyl-D alanine. La pénicilline et les autres  $\beta$ -lactamines agissent comme des analogues de substrats empêchant la synthèse de la paroi cellulaire [28]. Et donc, les bactéries auront de ce fait une paroi fragilisée et sont incapables de résister aux chocs osmotiques.

Il existe plusieurs mécanismes véhiculant à cette résistance :

**Modification de la cible:** la résistance est due à la présence de protéine de liaison à la **pénicilline additionnelle la PLP 2a**, qui a une très faible affinité pour l'ensemble des bétalactamines. La production de ces PLP anormales est codée par un **gène chromosomique *mecA***. Les gènes de régulation *mecR1* (Co-inducteur) et *mecI* (répresseur) inhibent la transcription du gène *mecA*. Certaines souches perdent complètement le gène *mecI* ce qui entraîne une production constitutive de la protéine PLP2a.

La résistance par acquisition du gène *mecA* représente 95 % des SARM. [27]

**Hyperproduction des bétalactamases :** ce sont les souches **BORSA** (=BORdeline *S. aureus*), qui sécrètent une quantité importante de bétalactamase, qui n'ont pas de résistance intrinsèque, c'est-à-dire ni PLP 2a, ni gène *mecA*. Ces souches restent sensibles aux céphalosporines, carbapénèmes...

**Modification des PLP:** ce sont les souches **MODSA** (MODified *S. aureus*), souches résistantes à bas niveau à l'oxacilline et non productrices de bétalactamase. Ces souches présentent une **modification d'affinité de leurs PLP**, vis-à-vis des bétalactamines. [29]

# Matériel Et Méthodes

Dans le cadre de préparation de mon projet de fin d'études (PFE) sur une période de deux mois (avril-mai/2017), ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire de la faculté de Médecine et de Pharmacie Fès.

### **1. Prélèvement et isolement :**

Différents prélèvements ont été réalisés au niveau du liquide des ponctions articulaires et du pus au service Traumato Ortho-pédiatrique et chirurgie réparatrice pédiatrique afin de détecter *S.aureus* et d'étudier sa résistance aux antibiotiques.

Les tubes sont identifiés (Nom, date, heure, site de prélèvement).

Les échantillons sont tout d'abord enrichis avec le **BHI**(Brain Heart Infusion)puisensemencés sur **gélose au sang** et incubés à 37°C pendant 24h. Les colonies suspectes de *Staphylococcus* sur gélose au sang sont des colonies jaunâtres présentant des colonies β-hémolytiques (hémolyse totale).

### **2. Tests d'identification :**

Les tests mis en jeu sont : coloration de Gram, test catalase et le test coagulase.

#### **2.1. Coloration de Gram :**

##### **a. Principe :**

La coloration de Gram est la **coloration de base** la plus utilisée en bactériologie. C'est une "coloration double", qui permet de différencier les bactéries d'après leur forme et leur affinité pour les colorants. Le processus permet de séparer la plupart des bactéries en 2 groupes par rapport à la proportion de peptidoglycane contenue dans les membranes :

- Les bactéries à Gram positif qui sont riches en peptidoglycane et pauvres en lipides
- Les bactéries à Gram négatif qui sont pauvres en peptidoglycane et plus riches en lipides

##### **b. Protocole :**

**On réalise un frottis** sur une lame de microscope en étalant une ou deux colonies en couche mince. On dépose ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage. On procède à la **fixation du frottis** en passant directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.

La **coloration** s'effectue selon la démarche suivante : Tout d'abord, la lame est plongée pendant 1 minute dans du **cristal violet** (colorant basique), ensuite, on étale le **lugol** (solution iodo-iodurée) et on laisse agir 30s. On procède à une décoloration à l'**alcool** en versant goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement jusqu'à la décoloration (5 à 10 secondes). Enfin, la Contre coloration s'effectue **avec de la Fuchsine** pendant 1 min.

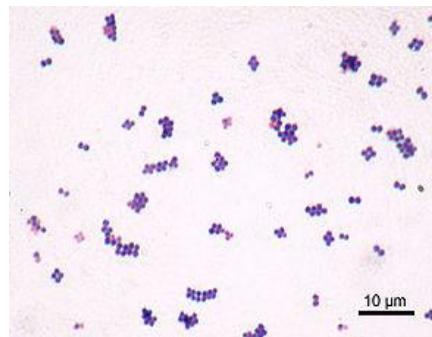


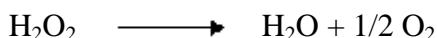
FIGURE 5: COCCI GRAM (+) EN AMAS (X100)

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

## 2.2.Test Catalase :

### a. 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  $1/2 O_2$ .



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

### b. Protocole :

Sur une lame dégraissée, on dépose une goutte d'eau oxygénée, et, à l'aide d'une pipette Pasteur boulée, on dépose **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 -

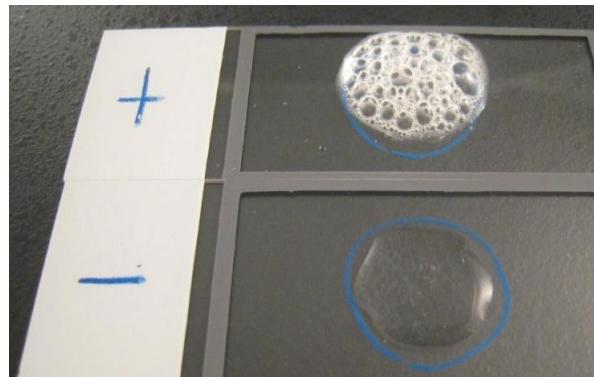


FIGURE6 : RESULTAT TEST CATALASE (+ : POSITIF, - : NEGATIF)

### **2.3.Test coagulase :**

La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, **seule l'espèce *Staphylococcus aureus* peut posséder cette enzyme** qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie.

Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma de lapin et de la souche à tester. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90°. Le test de la coagulase permet l'identification de 99% des souches de *S. aureus*



FIGURE7: RÉSULTAT TEST COAGULASE (+: POSITIF, -: NÉGATIF).

 prise en masse du contenu du tube -coagulation du plasma - souche coagulase libre + <b>Orientation vers <i>Staphylococcus Aureus</i></b>	 - le plasma reste liquide - absence de coagulation - souche coagulase - <b>Orientation vers <i>Staphylococcus non aureus</i></b>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### **3. L'antibiogramme :**

L'antibiogramme est un examen de laboratoire visant à déterminer la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques.

En mettant en contact des bactéries avec plusieurs antibiotiques, l'antibiogramme permet de voir quels sont les produits qui inhibent la croissance bactérienne et qui seront efficaces pour traiter l'**infection**.

Le test de sensibilité aux antibiotiques a été déterminé par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton Agar (Bio-Rad, France), selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (SFM – EUCAST).

#### **a. Préparation de l'inoculum :**

A partir d'une culture de 24 h sur milieu gélosé nutritive (TSA), on prépare une suspension en solution de l'eau physiologique stérile :

Mettre stérilement 1ml de l'eau physiologique dans un tube à hémolyse;

Prélever les colonies pures et les mettre en suspension jusqu'à obtenir la même opacité que l'étalement Mac Farland 0.5 (Si la suspension est trop trouble, ajuster l'opacité en ajoutant de l'eau physiologique).

### b. Ensemencement : (par écouvillonnage)

Afin d'éviter les chocs thermiques, les boites sont placés au moins 15 min à température ambiante avant ensemencement. Ces boites de Pétri contenant le milieu MH (Muller Hinton) doivent être séchées avant de procéder à l'ensemencement. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage, l'écouvillon stérile est bien imbibé en l'immergeant dans la suspension bactérienne et ajusté à la concentration recommandée, on essore soigneusement l'écouvillon contre la paroi du tube. La gélose Mueller Hinton est ensemencée en frottant en lignes parallèles et serrées l'écouvillon sur l'ensemble de la surface. La boite est ensemencée en stries sur toute la surface d'une gélose Mueller-Hinton à 3 reprises avec une rotation de 60° en respectant les mesures de sécurité nécessaires et, après séchage, les disques d'antibiotiques sont appliqués à la surface à l'aide d'une pince stérile ,et sont pressés légèrement afin d' assurer un contact uniforme avec le milieu, la boite est incubée à 37°C pendant 24h.

⇒ N.B : Les centres des disques doivent être éloignés les uns des autres d'au moins 30 mm pour empêcher le chevauchement des zones d'inhibition, et doivent être positionnés à au moins 10 mm du bord de la boite.

Les antibiotiques testés sont illustrés dans le tableau suivant :

**TABLEAU2: LISTE DES ANTIBIOTIQUES DE *S.aureus***

Liste standard			Liste Complémentaire		
Atb	Charge (ug)	abv	Atb	Charge (ug)	Abv
Pénicilline G	10	(P)	Chloramphénicol	30	(C)
Céfoxitine	30	(FOX)	Tobramycine	30	(TOB)
Gentamycine	10	(GEN)	Tétracycline	10	(TE)
Erythromycine	15	(E)	Ciprofloxacine	5	(CIF)
Clindamycine	2	(CM)/(CC)	Triméthoprime/ sulfaméthoxazole	1.25/23.3	(TS)
Norfloxacine	10	(NOR)	Daptomycine	2	(Da)
Acide Fusidique	10	(FA)			
Cotrimoxazole	25	(COT)			
Rifampicine	5	(RD)			
Fluoroquinolones	30	(F)			

**Atb** : antibiotique **Charge (ug)** : charge des disques en microgrammes **abv** : abréviation

### **c. Lecture des boîtes**

Après 18-24 h d'incubation à 35-37°C la lecture interprétative de l'antibiogramme est fondée sur la connaissance des phénotypes de résistance. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques d'antibiotiques sont mesurés et l'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par (EUCAST, 2016).

## **4. Etude génotypique :**

Pour s'assurer de la sensibilité des souches étudiées à la méticilline, une réaction en chaîne en polymérase multiplex (PCR multiplexe) ciblant les gènes *mecA* a été développée pour la détection de la résistance à la méticilline et l'identification de *Staphylococcus aureus*.

Cette étude s'est effectuée selon les étapes suivantes :

### **4.1 Extraction d'ADN :**

- Culture des souches à étudier pendant une nuit dans des boîtes à pétri contenant du TSA.
- Dans des eppendorfs, mettre 500 µL d'EDS (eau distillée stérile) + des colonies de la souche à étudier (5 ou 6 colonies).
- Chauffage (bain-marie) à 100 °C pendant 10min.
- Refroidissement rapide dans la glace pendant 2min (choc thermique pour empêcher le réappariement des brins écartés).
- Centrifugation à 14000 cpm (coup par minute) pendant 10min.
- Récupération du surnageant (300 µL).

### **4.2 PCR multiplexe :**

- **Principe :**

Le terme « PCR multiplexe » désigne la mise au point de la technique PCR autorisant, l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs segments d'ADN distincts.

Les couples d'amorces correspondants aux différents locus à analyser sont introduits dans le même tube réactionnel et en même temps

Le choix des conditions d'amplification résulte d'une mise au point poussée. En particulier, le choix des couples d'amorces qui doivent avoir des températures d'hybridation semblables, ce choix doit être précis pour pouvoir trouver un compromis entre les températures d'annelage et les durées d'elongation optimales de chacune des réactions PCR.

- **Protocole :**

Un volume de 2 µl d'ADN préparé a été ajouté à un volume final de 25 µL de mélange PCR contenant de l'EDS (eau distillée stérile), du tampon de PCR, du MgCl<sub>2</sub>, du dNTP, de la Taq ADN polymérase et les amorces sens et anti sens : PVL (Leucocidine de Panton Valentine), StaphA (staphylococcus Aureus) et meca.

Séquences des amorces utilisées pour la détection de la résistance à la méticilline		
Gène	amorce	séquence
<i>meca</i>	MecA-1	5'GTTGTAGTTGTCGGGTTGG3'
	MecA-C <sub>3</sub>	5'CTTCCACATACCATCTCTTAAC3'
<i>PVL</i>	SaPVL-1	5'ATCATTAGGTAAAATGTCGGACATGATCCA3'
	SaPVL-2	5'GCATCAA(GC)TGTATTGGATAGCAAAAGC3'
<i>StaphA</i>	Sa442-1	5'AATCTTG-TCGGTACACGATATTCTCACG3'
	Sa442-2	5'CGTAATGAGATTCAGTAGATAATACAACA3'

**FIGURE8 : SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES POUR L'ETUDE GENOTYPIQUE**

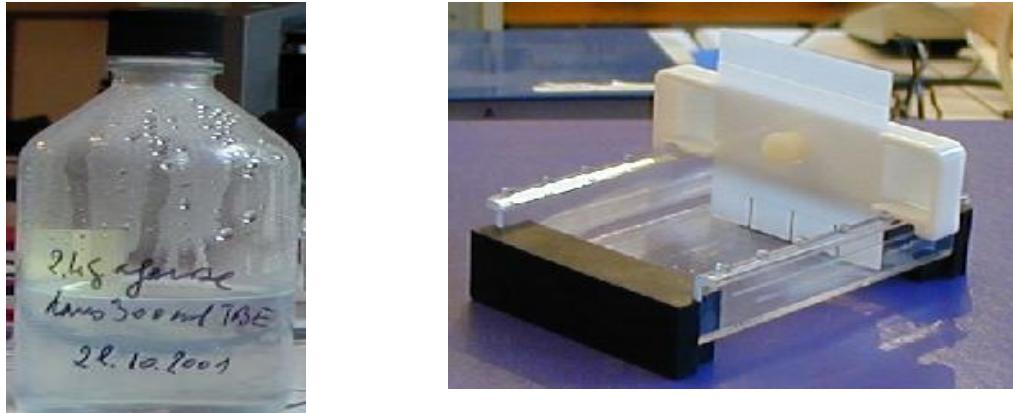
Le protocole de cyclage thermique pour la PCR était compris à 95 ° C pendant 3 min, suivi de 33 cycles de 94 ° C pendant 1 min, 53 ° C pendant 30 s et 72 ° C pendant 1 min, avec une extension finale à 72 ° C pour 6 min. Les produits amplifiés ont été visualisés par électrophorèse dans des gels d'agarose à 2% colorés au bromure d'éthidium.

#### **4.3.Electrophorèse sur gel d agarose (figure8)**

##### **4.3.1. Préparation du gel d'agarose :**

- Mélanger tampon TBE et agarose à raison de 0,8 g d'agarose pour 100 ml de tampon (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer).
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections ou au bain marie. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange.
- Laisser refroidir (environ 60 °C).
- Placer les joints fournis avec la cuve pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support. Régler le niveau pour que le support de gel soit horizontal.
- Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.

Laisser refroidir, enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.



**Gel d'agarose**  
(0,8 g/100 ml)

#### **4.3.2. Protocole :**

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.

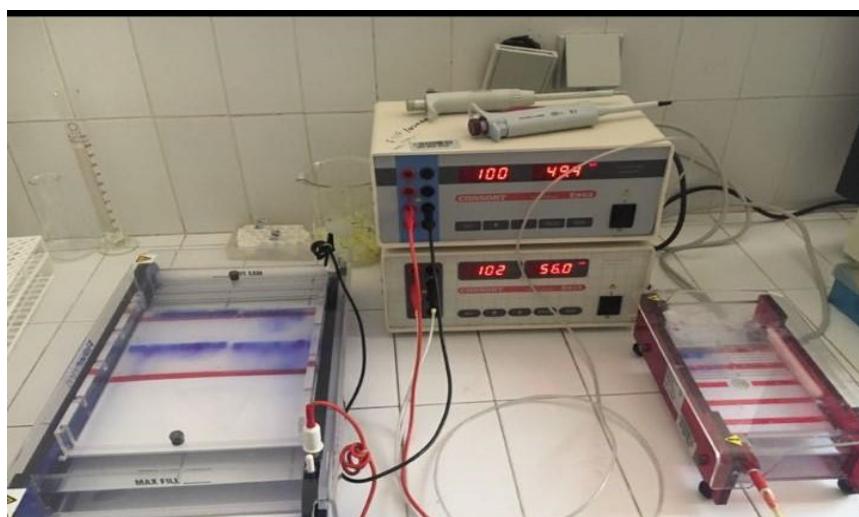
Le tampon de migration utilisé est le TBE (*voir composition-annexes*)

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)
- 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.



**FIGURE9: DISPOSITIF DE L'ELECTROPHORESE**



# Résultats et discussion

Durant la période de stage, on a isolé et identifié, à partir des 5 prélèvements ; 3 souches de *Staphylococcus Aureus*.

En mettant en contact les staphylocoques avec les 15 antibiotiques testés (antibiogramme)(l'antibiotique N°15 est testé dans une autre boîte), on a pu déterminer les différentes résistances de ces souches.

Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à un halo (absence de culture). (Voir tableau3).

On mesure donc le diamètre en millimètres (mm) du disque translucide autour de la pastille d'antibiotique, et on compare les valeurs obtenues avec les valeurs créées par le comité français de l'antibiogramme (voir annexe2).

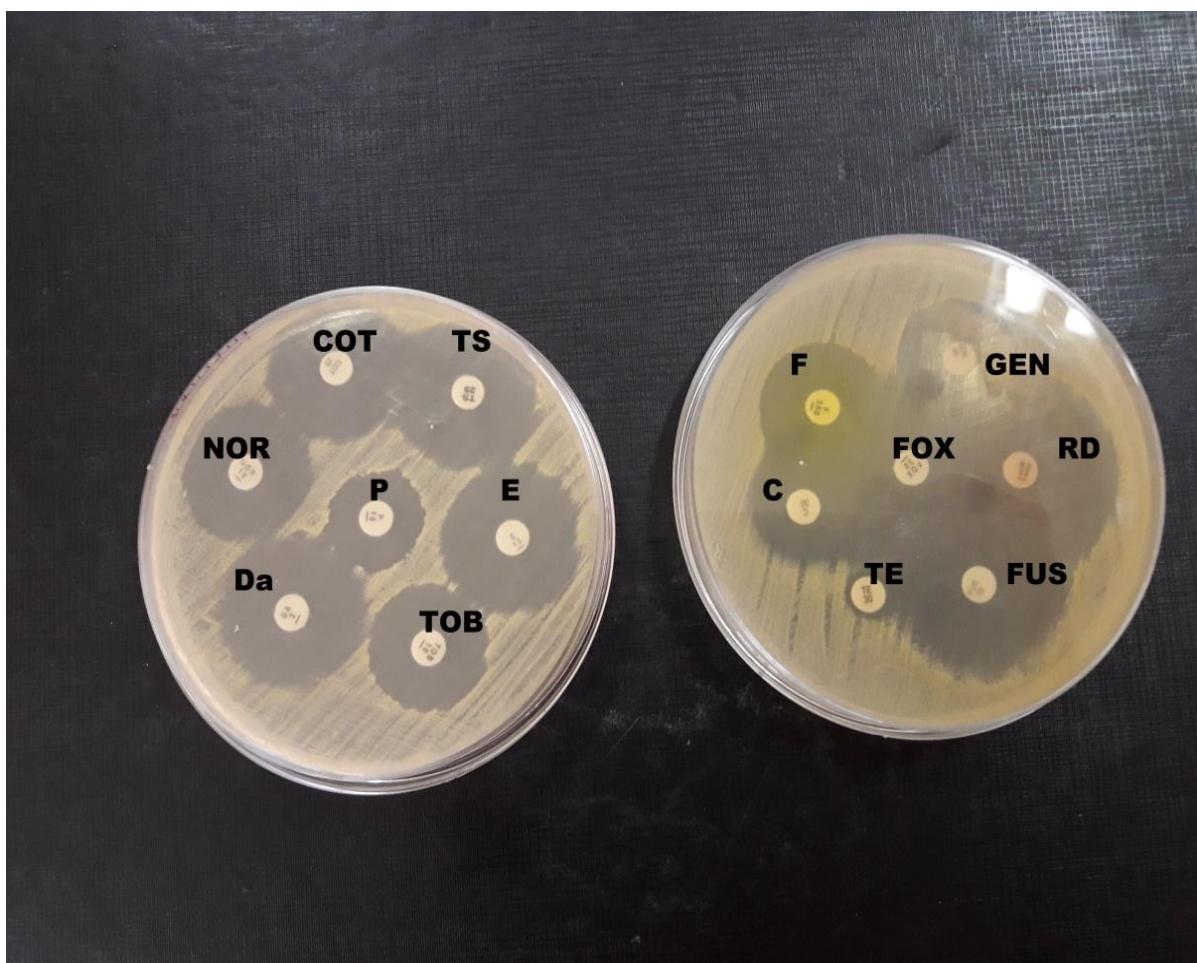


FIGURE10 : EXEMPLE D'ANTIBIOPGRAMME : ANTIBIOPGRAMME DE LA SOUCHE SA11

D'après les antibiogrammes réalisés, les 3 souches ont été résistantes à au moins un antibiotique.

Les antibiotiques pour lesquels des résistances ont été observées sont la Pénicilline G (P) **2/3(66.66%)**, la Tétracycline (TE) **1/3(33.33%)**, l'acide Fusidique (FD) **1/3(33.33%)** et le Ciprofloxacine (CIF) **1/3 (33.33%)**. (figure11)

Les antibiotiques pour lesquels aucune résistance n'a été observée sont :

Erythromycine (E), Gentamycine (GEN), Cotrimoxazole (COT), **Céfoxitine (FOX) (pas de résistance à la méticilline)**, Rifampicine (RD), Tobramycine (TOB), Triméthoprime Sulfaméthoxazole (TS), Chloramphénicol (C), Fluoroquinolones (F), Norfloxacine (NOR) et Daptomycine (Da).

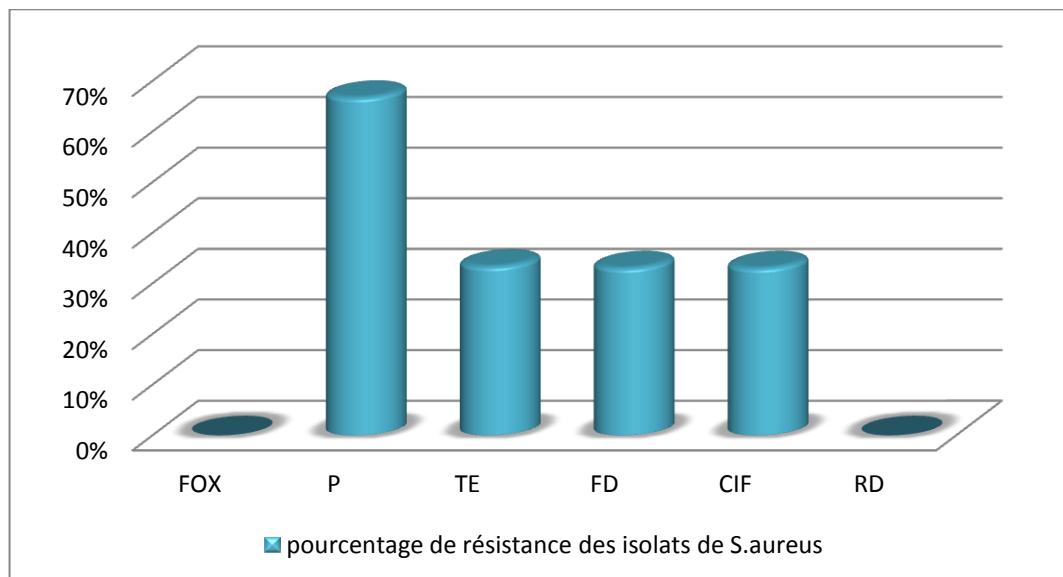


FIGURE11 : POURCENTAGE DE RESISTANCE DES 3 ISOLATS DE S.AUREUS

Parmi les 15 antibiotiques testés, la souche **10S.A** est résistante à la pénicilline G ( $1/15=6.66\%$ ) et au ciprofloxacine ( $1/15=6.66\%$ ) ( $2/15 = 13.32\%$  au total). Tandis que la souche **11S.A** présente aussi une résistance de  $2/15$  ( $13.33\%$ ) [Résistance à la pénicilline G ( $6.66\%$ ) + résistance à la tétracycline ( $6.66\%$ )]. La souche **13S.A** a une seule résistance à l'acide Fusidique ( $1/15=6.66\%$ ).

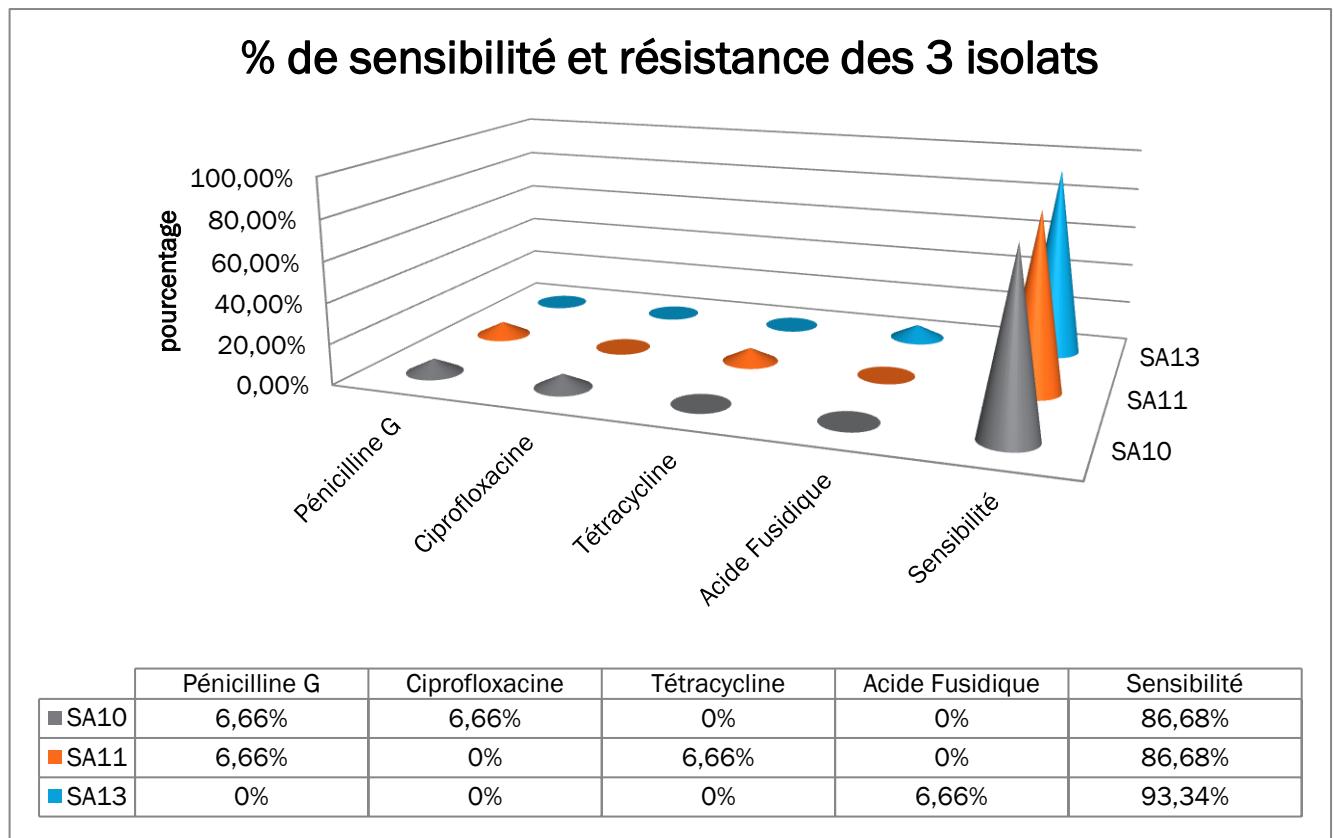
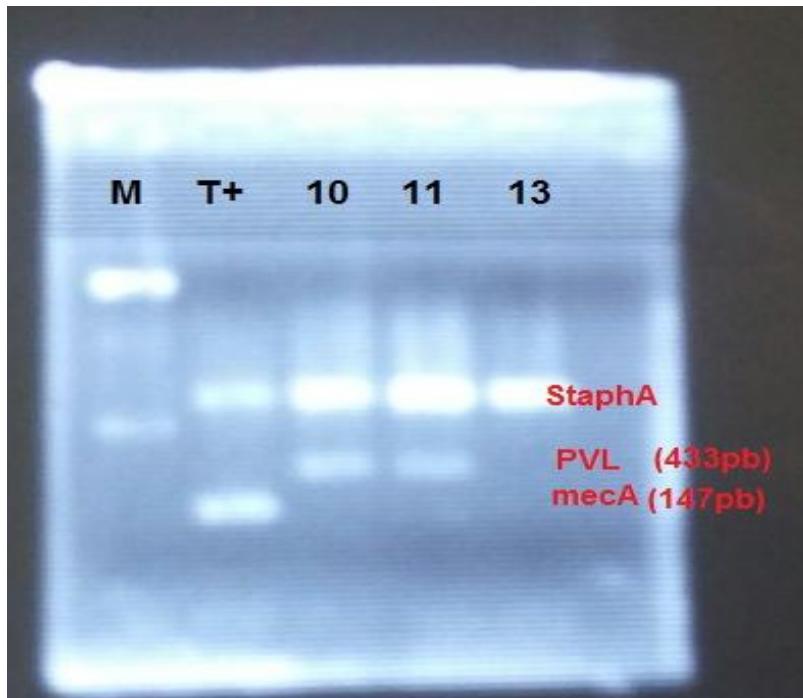


FIGURE12 : POURCENTAGES DE SENSIBILITE ET DE RESISTANCE DES SOUCHES SA10, SA11 ET SA13

- ➔ Aucune résistance à la Céfoxitine (FOX) (Méticilline) n'a été observée, ceci est confirmé grâce à l'étude génotypique réalisée (PCR et électrophorèse).

La figure 12 illustre le résultat obtenu :



**M** : marqueur de poids  
**T+** : témoin positif  
**PVL** : Leucidine de panton valentine,  
**StaphA** : staphylococcus aureus,  
**Pb** : paires de base  
**10-11-13** : les souches étudiées.

FIGURE13 : RESULTAT DE L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

#### Interprétation :

- L'apparition du gène StaphA confirme l'identification réalisée préalablement de *S.aureus*
- Le témoin positif (T+) met en évidence la présence du gène mecA (147Pb) véhiculant la résistance à la méticilline. Son absence dans les souches 10, 11 et 13 confirme les résultats obtenus dans les antibiogrammes (sensibles à la Céfoxitine). **Donc il s'agit des SASM** (*S.aureus* sensibles à la méticilline).

Conclusion : sur les 3souches SA étudiées, deux d'entre elles présentent une résistance de 66.66% (2/3) pour la Pénicilline G. Chaque souche est résistante à au moins un antibiotique. Aucune résistance à la méticilline n'a pu être décelée vu que les expériences réalisées (antibiogramme et PCR) sont négatives concernant la Céfoxitine et le gène mecA.

TABLEAU3 : RESULTATS DES ANTOBIOGRAMMES DES 3 SOUCHES ISOLEES.

S : sensible R : résistante CMI : concentration minimale inhibitrice (en mg/L)

antibiotiques	Diamètres d'inhibition (mm) des 3 antibiogrammes					
	Souches Isolées					
	SA10	R/S	SA11	R/S	SA13	R/S
Pénicilline (P)	14	<b>R</b>	20	<b>R</b>	40	S
Erythromycine(E)	26	S	28	S	25	S
Gentamycine (GEN)	26	S	22	S	24	S
Cotrimoxazole (COT)	24	S	28	S	29	S
<b>Céfoxitine (FOX)</b>	<b>31</b>	<b>S</b>	<b>26</b>	<b>S</b>	<b>31</b>	<b>S</b>
Rifampicine (RD)	33	S	36	S	37	S
Acide Fusidique (FD)	37	S	34	S	16	<b>R</b>
Tobramycine (TOB)	23	S	22	S	23	S
Ciprofloxacine (CIF)	17	<b>R</b>	22	S	24	S
Triméthoprime sulfaméthoxazole (TS)	32	S	30	S	30	S
Tétracycline (TE)	25	S	8	<b>R</b>	30	S
Chloramphénicol (C)	24	S	20	S	28	S
Fluoroquinolones (F)	24	S	26	S	28	S
Norfloxacine (NOR)	26	S	18	S	26	S
Daptomycine (Da)	26	S	26	S	28	S

---

## DISCUSSION :

---

La recherche de *S. aureus* a été réalisée en utilisant les techniques de microbiologie.

Sur 5 isolats, 3 isolats étaient positifs pour la coloration gram (cocci gram positif), le test catalase (+) et le test de coagulase (+).

Le taux de prévalence de notre étude est de **60%** (3 S.Aureus/5prélèvements) dans le service de Traumato Ortho-pédiatrique et chirurgie réparatrice pédiatrique.

Nos résultats sont difficiles à comparer à d'autres études vu que le nombre des souches étudiées est inférieur aux différentes études réalisées. Cependant, un taux de **62,8%**a été trouvé en Inde chez les patients en hémodialyse chronique (Sathisha et al, 2014). Aux Pays-Bas, Kalmeijer et al. (2000) ont trouvé un taux de **27%** en chirurgie orthopédique. Aux USA, Price et al. (2008) ont décrit un taux de **30%**pour les patients en attente d'une opération orthopédique. Le taux de **20,2%** a été décrit en orthopédie par Berthelot et al. (2010) en France.

Concernant les résistances aux antibiotiques :

- On a obtenu un taux de **66,66%** de souches sécrétrices de Pénicillinases. Ce qui est élevé et confirme que la sécrétion de ces enzymes est un des mécanismes de résistance les plus importants de *S. aureus* à la **Pénicilline G**. Ce taux avoisine celui trouvé dans une étude menée à l'hôpital A. Le Dantec, FAYE I. [30] ou on a trouvé un pourcentage de **61%**, résultat très proche de notre valeur.
- Aucune résistance à la **Céfoxitine** n'a été observée (SASM).
- **L'acide Fusidique** (FD), qui est un des antistaphylococciques majeurs, inhibe **33.33%** des souches (1/3), résultats très inférieurs de ceux de SY K. R. **93%.**[31]

---

## CONCLUSION :

---

Notre travail nous a permis de mettre nos connaissances théoriques en pratique. Nous avons ainsi pu isoler des souches de bactéries *Staphylococcus* à partir du pus et à partir du liquide des ponctions articulaires, et réaliser différents tests d'identification et des antibiogrammes sur les isolats identifiés.

Au Maroc, la fréquence d'isolement des *S. aureus* ainsi que la prévalence restent faibles par rapport à d'autres pays et régions. La multirésistance de *Staphylococcus aureus* reste un problème d'actualité et un sujet de préoccupation légitime. À cause de son changement potentiel, l'émergence de ces souches ne doit être ni sous-estimée ni surestimée.

La maîtrise des profils épidémiologiques des germes et leurs sensibilités aux antibiotiques est une donnée capitale pour la rationalisation de l'utilisation de ces produits et pour le contrôle du développement des bactéries multi résistantes. C'est pour cela, qu'un suivi régulier que ce soit au niveau local ou national demeure indispensable pour définir les politiques antibiotiques et d'hygiène hospitalière.

La mise au point de nouvelles thérapeutiques antibactériennes autre qu'antibiotique en s'appuyant sur les données de la biologie moléculaire, apparaît également nécessaire.

## ANNEXE 1 : LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Milieu	Composition(en g/L d'eau distillée)	Intérêt
<b>BHI (Brain Heart infusion)</b>	protéose-peptone .....10,0 infusion de cervelle de veau .....12,5 infusion de cœur de bœuf.....5,0 glucose.....2.0 chlorure de sodium .....5,0 hydrogénophosphate de sodium 2,5 pH = 7,4	Milieu nutritif tamponné utilisé pour la culture d'une très grande variété de micro-organismes aérobies ou anaérobies incluant levures et moisissures
<b>TSA (gélose trypticase soja)</b>	Peptone papaïnique de soja.....5 Peptone trypsique de caséine....15 NaCl.....5 Agar.....15 pH final = 7,3	Milieu de base qui permet la culture des bactéries non exigeantes.
<b>Gélose au Sang</b>	Mélange spécial de peptones.....23 Amidon.....1 NaCl.....5 Agar.....10 Sang de mouton.....5% pH final = 7,3	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
<b>MH (gélose Muller Hinton)</b>	Infusion de viande de bœuf....300 ml Peptone de caséine.....17,5 Amidon de maïs.....1,5 Agar.....17 pH final = 7,4	La gélose Mueller-Hinton permet la réalisation de l'antibiogramme standard (principale utilisation).

--	--	--

# 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

## **Concentration**

TBE 10x : Solution mère concentrée dix fois, à diluer pour obtenir la concentration désirée.

## **Préparation**

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

- 10,78 g (89 mM) TRIS
- 5,50 g (89 mM) Acide borique
- 0,58 g (2 mM) EDTA

Mettre dans une fiole jaugée et mettre la quantité suffisante pour 1000 ml d'eau distillée. Pour une concentration 10x, multiplier les quantités par 10.

## ANNEXE 2 : DIAMETRES D'INHIBITION ACCEPTABLE DES DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES TESTES SUR S.AUREUS

(Selon les recommandations du comité français de l'antibiogramme 2016)

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
<b>Céfoxitine (FOX)</b>	<b>30</b>	<b>22-25</b>
Rifampicine (RD)	5	23-26
Acide Fusidique (FD)	10	24
Tobramycine (TOB)	30	18
Ciprofloxacine (CIF)	5	20
Triméthoprime sulfaméthoxazole (TS)	1.25/23.3	14-17
Tétracycline (TE)	5	19-22
Chloramphénicol (C)	30	18
Norfloxacine (NOR)	10	17

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- [1] De Lencastre H, Severina E, Milch H, Konkoly T, Tomasz A. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3:289–96.
- [2] Santos Sanches I, Ramirez M, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, et al. Evidence of the geographic spread of a methicillinresistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J Clin Microbiol* 1995;33:1243–6.
- [3] Aires de Sousa M, Santod Sanches I, Ferro M, Vaz M, Saraiva Z, Tendeiro T, et al. Intercontinental spread of a multidrug resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol* 1998;36:2590–6.
- [4] : STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND STAPHYLOCOCCAL DISEASES\_TODAR 'S ONLINE TEXTBOOK OF BACTERIOLOGY.
- [5] Fanny Vincenota, Maher Saleha, Gilles Prévosta,les facteurs de virulence de staphylococcus Aureus.
- [6] Dohin, B., Y.Gillet, R. Kohler, G. Lina, F.Vandenesch, P. Vanhems, D. Floret, and J.Etienne. 2007. Pediatric bone and joint infections caused by panton-valentine leukocidin positif *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J* 26 :1042-1048.
- [7] les infections à staphyloques chez l'homme et l'animal. Disponible sur: [www.pasteur.fr](http://www.pasteur.fr)
- [8] voir : [bacterioweb.univ-fcomte.fr/cours\\_dcem1/staphylocoque.htm](http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/cours_dcem1/staphylocoque.htm)
- [9] Prévost G. Toxins in *Staphylococcus aureus* pathogenesis. In : Proft(Ed.), *Microbial toxins : molecular and cellular biology*, Horizon Bioscience, Norfolk, England, ISBN : 1-904933-08-04 (2004), pp : 243-284
- [10] Holtfleter, S., D. Grumann, M.Schmuide, H. T. Nguyen, P. Eichler, B. Strommenger, K. Kopron, J.Kolata, S.Giedrys-Kalemba, I. Steinmetz, W.Witte, and B. M. Broker. 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 45 :2669-2680
- [11] Issartel,B., A. Tristan, S. Lechevallier,F. Bruyere, G.Lina, B.Garin, F.Lacassin, M.Bes, F.Vandenesch, and J.Etienne.2005 frequent carriage of panton valentine leucocidin genes by *Staphylococcus aureus* isolates from surgically drained abscesses.*J Clin Microbiol* 43 :3203-3207
- [12] Juuti, K. M., B.Sinha, C.Werbick, G.Peters, and P.I. Kuusela. 2004. Reduced adherence and host cell invasion by Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* expressing the surface protein Pls. *J Infect Dis* 189 :1574-1584
- [13] [www.antibiotique.eu/deacuteftinition--histoire.html](http://www.antibiotique.eu/deacuteftinition--histoire.html)
- [14] En savoir plus sur  
<http://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/familles.html#VmXr2E7kgXiCHc7t.99>

- [15] Guardabassi L, Courvalin P. 2006. Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance, p 1-18. In Aarestrup F (ed), *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. ASM Press, Washington, DC. Doi: 10.1128/9781555817534.ch1
- [16] Patrice COURVALIN, BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE: COMBINATIONS OF BIOCHEMICAL AND GENETIC MECHANISMS Bull. Acad. Vét. France — 2008 - Tome 161 - N°1
- [17] Read more at <http://infectionsnosocomialestpe.e-monsite.com/pages/des-bacteries-responsables/des-bacteries-resistantes-et-leurs-origines.html#liy3sj4TKbPliZ2Y.99>
- [18] AARESTRUP F.M., SEYFARTH A.M., EMBORG H.D., PEDERSEN K, HENDRIKSEN R.S., BAGER F. Effect of abolition of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45, 2054-2059.
- [19] Bruce J, MacKenzie FM, Cookson B, Mollison J, Van der Meer JW, Krcmery V, Gould IM. ARPAC Steering Group. Antibiotic stewardship and consumption: findings from a pan-European hospital study. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(4): 853-860.
- [20] Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* 1948;1:641-4.
- [21] Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. *Br Med J* 1961;1:124-5.
- [22] Chaves F, García-Martínez J, de Miguel S, Sanz F, Otero JR. Epidemiology and clonality of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteremia in a tertiary-care hospital in Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26:150-6.
- [23] Zinn CS, Westh H, Rosdahl VT. Sarisa Study Group. An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. *Microb Drug Resist* 2004;10:160-8.
- [24] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135-6.
- [25] R. Leclercq. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques Ann Fr Anesth Réanim 2002 ; 21 : 375-83. 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
- [26] Jorgensen J. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;12:14-219.
- [27] Ito T, Okuma K, Ma XX, et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 2003 ; 6 : 41-52.
- [28] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9:486-93.
- [29] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001 ; 9 : 486-93.
- [30] FAYE I. 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, 1997, n°07.

[31] SY K. R. *Souches bactériennes et résistance aux antibiotiques*

*Données actuelles au CHU A. Le Dantec de Dakar Thèse Pharm,Dakar,1993,n°61.*

[32] voir : [www.textbookofbacteriology.net/staph\\_2.html](http://www.textbookofbacteriology.net/staph_2.html)

[33] voir : [www.123bio.net/cours/antibio/modedaction.html](http://www.123bio.net/cours/antibio/modedaction.html)

[34] voir : [www.tpe-resistance-antibiotique.e-monsite.com/pages/ii-bacteries-et-resistance.html](http://www.tpe-resistance-antibiotique.e-monsite.com/pages/ii-bacteries-et-resistance.html)

[35] voir : [www.slideshare.net/HafezAlSumairi/mrsa-seminar-final-draft-2642012](http://www.slideshare.net/HafezAlSumairi/mrsa-seminar-final-draft-2642012)