

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie et Microbiologie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Portage nasal des *Staphylococcus aureus* chez les veaux
et les vaches laitières , leur antibiorésistance et foration
de biofilms sur microplaques.

Présenté par :

- MALLEK Thinhinane
- MOKRANI Kahina
- RAHALI Siham

Soutenu le 12/07/2022 devant le jury composé de :

Présidente	- Mme MEGUENNI N.
Encadrant	- Mr TITOUCHE Y.
Examinatrice	- Mme AFIF CHAOUCHE T.

Promotion : 2021/2022

Remerciements

On remercie avant tous, Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant toutes les longues années d'études afin qu'on puisse arriver là.

On tien à remercier notre encadrant Mr TITOUCHE pour sa qualité d'encadrement, son aide, sa patience et ses conseils si précieux.

Nous remercions également les membres du jury, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Merci à tous nos enseignants, avec qui on a travaillé le long de notre cursus et tous les enseignants de notre département d'être toujours là pour nous apprendre, aider et écouter.

On voudrait remercier nos familles, nos amis et nos camarades qui ont fait de nos années d'études un plaisir infini.

Un grand merci pour tous les personnes qui nous ont aidé durant la période de travaux pratiques et de prélèvements.

Merci pour chaque personne qui a contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail ;

A toute ma famille grande et petite, spécialement mes parents qui ont toujours été présents pour moi avec tout amour et admiration, sans qui je ne pourrais jamais arriver ici aujourd'hui.

A tous mes amis qui m'ont comblé de joie tout au long de mes années d'études, spécialement les meilleures ; Lydia et Sarah, un grand merci pour vous.

A toute l'équipe de Laboratoire ; Siham, Kahina, Chanez, Ramzi et Younes, avec qui j'ai partagé des bons moments durant toute la période de stage.

A toutes les personnes que j'aime, et les bonnes personnes que j'ai rencontrées au cours de ma carrière d'étudiante et qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères.

Thinhinane.

Dédicace

Avant tout, nous remercions beaucoup le bon dieu de nous avoir donné le courage et la force pour terminer nos études et réaliser ce modeste projet.

Mes chers parents : Ma très chère mère, Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites, pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner, mon père, que je ne remercierais jamais assez pour les efforts et les sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et mon bien être, Ce travail est le fruit de vos sacrifices,

Que dieu vous garde pour moi.

A mes adorables sœurs :

Rachida, Karima, Nissa et leurs époux Ismail, Mohamed, Nouredine et mes petits Akli, Kamel, Imed, Ilyas, Yanis et Ilyan et mes deux princesses Sarah et Déhia.

A mes deux adorables frères : Omar et Boualem pour leurs précieux conseils, leurs amour et leurs soutien inconditionnel, Fatiha et Marieme et mes chouchou Said, Ahlem, Adel, Ibtissam, Hamza, Dania, Rassim et la petite Rania ;

À toute ma famille cousins et cousines, tentes et oncles, surtout ma grand-mère Sethi Rahma, que dieu la grade pour nous.

Une pensés particulière à mes grands-parents que dieu les accueils dans son vaste paradis.

A toutes mes chères copines sœurs Tina, Fatma, Manel, Cylia et Amina.

A mes amis Nadir et Mouloud pour qui je n'oublierais jamais vos soutiens et votre aide, un grand merci.

A toute l'équipe avec qui j'ai partagé de bons moments au Laboratoire ; Siham, Thinhinane, Chanez, Younes, Ramzi.

Affectueuse reconnaissance.

Kahina.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents

A mes frères et sœurs, mes neveux et mes nièces.

A ma très chère amie DYHIA

A mes amis avec qui j'ai partagés des moments inoubliables en réalisant ce travail : Kahina, Thinhinane, Younes, Ramzi et Chanez.

A toute ma famille et tous mes amis.

Siham.

Résumé

Staphylococcus aureus, un pathogène opportuniste, connu comme un germe commensal de la flore cutanéomuqueuse de l'homme et des animaux. Cette bactérie possède une grande capacité d'adaptation, grâce à ses facteurs de virulence et un pouvoir de résistance aux antibiotiques, responsable de plusieurs maladies humaines ou animales.

L'objectif de notre étude, est d'estimer la prévalence du portage nasal de *Staphylococcus aureus* chez des vaches et des veaux de quelques élevages laitiers et aussi tester la résistance des souches isolées aux antibiotiques et leur capacité à former des biofilms *in vitro*.

Sur les 111 prélèvements nasaux effectués, 10 (12.05%) prélèvements étaient contaminés chez les veaux et uniquement 5 (17.8%) chez les vaches. 37 souches de *S. aureus* ont été isolées. Le test de la résistance de ces souches aux antibiotiques a révélé un taux élevé de sensibilités vis-à-vis de toutes les molécules d'antibiotiques testées, à l'exception de la pénicilline pour laquelle un taux de résistance de 97% a été enregistré. Deux souches SARM ont été isolées.

Toutes les souches isolées avaient la capacité de former des biofilms sur des microplaques ELISA. La moitié des souches (50,5%) avaient une formation moyenne, 31% avaient une forte formation et 18% des souches avaient une faible formation.

Les résultats montrent le risque sanitaire lié à la présence des SARM dans les élevages laitiers. Pour cela, un protocole de biosécurité basé sur les bonnes pratiques d'hygiène et le dépistage continu du portage nasal est nécessaire pour limiter la propagation des SARM à travers la chaîne alimentaire.

Mots clés : *S. aureus*, portage nasal, résistance aux antibiotiques, SARM, vaches laitières, veaux.

Abstract

Staphylococcus aureus, an opportunistic pathogen, known as a commensal germ of the cutaneous-mucosal flora of humans and animals. This bacterium has a great capacity of adaptation, thanks to its virulence factors and a power of resistance to antibiotics, responsible for several human or animal diseases.

The main objective of our study is to estimate the prevalence of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in cows and calves from some dairy farms, and testing the resistance of the isolated strains to antibiotics, but also to test the capacity of the strains to form biofilms. Isolation of strains was performed on Baird Parker agar, followed by biochemical identification of isolates. Antibiotic resistance was tested by the disc diffusion method on Mueller Hinton agar. In vitro biofilm formation was done by the tissue culture plate method.

Of the 111 nasal swabs taken, 10 (12.05%) were contaminated in calves and only 5 (17.8%) in cows. 37 strains of *S. aureus* were isolated. Testing of these strains for antibiotic resistance revealed a high rate of sensitivity to all antibiotic molecules tested, with the exception of penicillin for which a 97% resistance rate was recorded. Two MRSA strains were isolated.

All isolated strains had the ability to form biofilms on ELISA microplates. However, the ability to form was variable. Half of the strains (50.5%) had medium formation, 31% had high formation and 18% of the strains had low formation.

Key words: *S. aureus*, nasal carriage, antibiotic resistance, MRSA, dairy cows, calves.

TABLE DES MATIERS

Résumé

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre I : Caractéristiques générales du *Staphylococcus aureus*

1. Aperçu général sur le <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2. Taxonomie et habitat.....	4
2.1. Taxonomie.....	4
2.2. Habitat.....	5
3. Critère d'identification.....	5
3.1. Caractères morphologiques.....	5
3.2. Caractères culturels.....	5
3.3. Caractères biochimiques.....	6
4. Pouvoir pathogène et mode de transmission.....	7
5. Epidémiologie.....	8

Chapitre II : Facteurs de virulence du *Staphylococcus aureus*

1. Facteurs de virulence chez <i>S. aureus</i>	10
1.1. Constituants de la paroi.....	10
1.1.1. Peptidoglycane.....	10
1.1.2. Acide teichoïque.....	10
1.1.3. Capsule.....	11
1.2. Protéines de surface.....	11
1.2.1. Adhésines de la paroi ou MSCRAM.....	11
1.2.2. Adhésines sécrétées ou SERAM.....	12
1.2.3. Protéines A.....	12
1.3. Substances sécrétées à l'extérieur de la cellule.....	13
1.3.1. Toxines.....	13
1.3.1.1. Les entérotoxines émétisantes.....	14

1.3.1.2. Les exfoliatines ou toxine épidermolytiques	14
1.3.1.3. La toxine TSST-1	14
1.3.1.4. Les hémolysines	14
• hémolysines alpha ou toxines alpha	14
• hémolysines beta	15
• hémolysines gamma	15
• hémolysines delta	15
3.1.5. La Leucocidine de Panton Valentine (LPV)	16
3.2. Enzymes	16
3.2.1. Coagulase libre	16
3.1.2. La catalase	17
3.1.3. Les lipases	17
3.1.4 Bêta-lactamases	17
3.1.5. Les protéases	17
3.1.6. Lysozyme	19
4. Formation de biofilm chez <i>S. aureus</i>	19

Chapitre III : L'antibiorésistance chez *Staphylococcus aureus*

1. Support génétique de la résistance chez <i>S. aureus</i>	23
1.1. Résistance naturelle	23
1.2. Résistance acquise	23
3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>S. aureus</i>	24
3.1. Résistance à la pénicilline	24
3.2. Résistance à la vancomycine	24
3.3. Résistance aux quinolones	25
3.4. Résistance aux aminoglycosides	25
3.5. Résistance aux sulfonamides	25
3.6. Résistance à la tetracycline	26
3.7. Résistance aux macrolides	26
3.8. Résistance au chloramphénicol	26
3.9. Résistance à la méticilline	27
4. Facteurs contribuant à la propagation de la résistance dans les élevages	28

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthode

1. Objectif de l'étude	29
2. Matériel.....	29
3. Méthodes	30
3.1. Durée et lieu de l'étude.....	30
3.2. Protocole expérimental.....	30
3.2.1. Collecte des échantillons	30
3.2.2. Origine et nombre d'échantillons	31
3.2.3. Analyse des échantillons au laboratoire	32
3.2.3.1. Enrichissement	32
3.2.3.2. Isolement	33
3.2.3.3. Purification	33
3.2.3.4. Identification biochimique des isolats	33
• Recherche de la catalase.....	33
• Recherche de l'ADNase	33
• Recherche de la coagulase.....	34
3.2.3.5. Résistance des souches de <i>S. aureus</i> isolées aux antibiotiques.....	34
3.2.3.6. Mise en évidence de la formation des biofilms sur microplaque	35
3.2.3.7. Conservation des souches analysées	37

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Résultats	39
1.1. Prévalence de <i>S. aureus</i> dans les élevages bovins	39
1.2. Résistance de <i>S. aureus</i>	41
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM)	41
1.4. Phénotype de multi-résistance.....	42
1.5. Formation de biofilm <i>in vitro</i>	43
2. Discussion.....	44

Conclusion.....	48
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ATB: Antibiotique.

BHI: Brain Heart Infusion.

BHIB: Brain Heart Infusion Broth.

BP: Baird Parker..

Clf: Protéines de liaison au fibrinogène.

CMI: Concentration minimal inhibitrice.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cna: Protéines de liaison au collagène..

Eap: Extracellular adherence protein.

Efb: Extracellular fibrinogen binding protein.

Emp: Extracellular matrix binding protein.

ES: Entérotoxine staphylococcique.

FAME: Fatty Acid Modifying Enzymes.

FnBPs: Protéines de liaison à la fibronectine de *Staphylococcus aureus*.

HA-MRSA : Healthcare-acquired MRSA.

Ig: Immunoglobulines.

LA-MRSA: Livestock-associated MRSA.

LTA: Acide lipoteichoïque.

LukF-PV: Fasteluted Panton Valentine.

LukS-PV: Slow elutedPanton Valentine.

MH: Muller Hinton.

MSCRAMMs : Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules.

NAG: N- acétylglucosamine.

NAM: N-acétylmuramique.

PAB: Acide para-aminobenzoïque.

PBS: Tampon phosphate salin.

pH: Potentiel hydrogen.

PLP: Protéines liant les pénicillines.

PLP2a: Protéine liant les pénicillines 2a.

PVL: Leucocidine de Panton-Valentine.

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline.

SCC: Staphylococcal chromosomal cassette.

SCN: *Staphylocoques* à coagulase négative.

SCP: *Staphylocoques* à coagulase positive.

SERAM : Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules.

SPA : Protéine A de surface.

TIAC: Toxi-infection alimentaire collective.

TSA: Gélose tryptone soja.

TSB: Bouillon tryptone soja.

TSST: Toxine du syndrome de choc toxique.

TSST1: Toxic shock syndrome toxine 1.

VISA: *Staphylococcus aureus* intermédiaire à la vancomycine.

VRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine.

Liste de figures

Figure 01 : Phénotype de <i>Staphylococcus aureus</i>	06
Figure 02 : Mécanisme d'action de la protéine A de <i>S. aureus</i>	13
Figure 03 : Mécanisme d'action de l'hémolysine alpha (ADAM est un récepteur cellulaire de l'hémolysine alpha).....	15
Figure 04 : Mécanisme d'assemblage des deux protéines lukF-PV et lukS-PV pour former un pore octaédrique	16
Figure 05 : Facteurs de virulences majeures produits par <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Figure 06 : Phénomène de la résistance acquise aux antimicrobiens.....	24
Figure 07 : Mécanisme de résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	28
Figure 08 : Technique de prélèvement à partir d'un veau	31
Figure 09 : Prélèvements nasaux dans le milieu Mueller Hinton + NaCl (Photo personnelle prise au laboratoire).....	32
Figure 10 : Schéma expliquant la méthode utilisée pour quantification biofilm	37
Figure 11 : Schéma récapitulatif de la recherche de <i>S. aureus</i> et de sa caractérisation phénotypique	38
Figure 12 : Aspect des colonies caractéristiques de <i>S. aureus</i> sur BP	40
Figure 13 : Colonies pures du <i>S. aureus</i> sur BHA	40
Figure 14 : Test de la catalase	40
Figure 15 : Test de l'ADNase	40
Figure 16 : Test de la coagulase	40
Figure 17 : Souche se <i>Staphylococcus aureus</i> multi-résistante.....	42
Figure 18 : Distribution des souches <i>S. aureus</i> isolées chez les veaux et les vaches laitières selon leur capacité à former des biofilms	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractères biochimiques des principales espèces de Staphylococcus isolées chez l'homme (Denis et al, 2016).....	07
Tableau 2 : Tableau résumant les différentes protéases chez l'espèce S. aureus.	18
Tableau 3 : tableau illustrant le matériel et les milieux de culture utilisés au cours de cette étude	29
Tableau 4 : informations concernant les prélèvements effectués	31
Tableau 5 : Liste des molécules d'antibiotiques testés sur les souches isolées	35
Tableau 6 : Classification de l'adhésion des Staphylocoque spp (ACHEK et al, 2020).....	36
Tableau 7 : Fréquence d'isolement de S. aureus.....	39
Tableau 8 : Taux de résistance des souches de S. aureus isolées, aux antibiotiques (n=37) ..	41
Tableau 9 : Informations concernant les souches SARM isolées	42
Tableau 10 : Phénotypes de multi-résistances	42

Introduction

Les micro-organismes représentent la première forme de vie apparue sur terre. Bien qu'ils soient invisibles à l'œil nu, ils sont omniprésents et colonisent toutes les surfaces vivantes et inertes.

Les maladies infectieuses sont la deuxième cause de mortalité humaine dans le monde. Le *Staphylococcus aureus* est un microorganisme pathogène humain très courant qui peut déclencher une variété de maladies telle que les infections de la peau et des tissus mous, l'endocardite, la bactériémie et la pneumonie mortelle (Guo *et al*, 2020).

Il se retrouve aussi bien dans les milieux communautaires qu'hospitaliers, il est au deuxième rang dans les infections nosocomiales derrière *Escherichia coli* et occupe la même position dans les intoxications alimentaires après les *Salmonelles*. De plus, il représente une des principales causes de la mammite chez les animaux (Agabou *et al*, 2017).

Staphylococcus aureus est l'un des principaux agents pathogènes en raison de la présence de nombreux facteurs de virulence, notamment des exotoxines, des enzymes, des protéines de surface, de la capacité de production de biofilms et de l'acquisition de la résistance à plusieurs antibiotiques (Manadhar *et al*, 2018).

Au cours des dernières décennies, l'utilisation généralisée d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire a accru l'émergence de souches multi-résistantes, leur éradication représente un défi majeur pour l'humanité. En tant qu'une espèce bactérienne à plasticité génomique et ayant une grande capacité d'adaptation, *S. aureus* peut s'adapter à des conditions environnementales variables et devenir rapidement résistante vis-à-vis pratiquement tous les antibiotiques (Mccallum *et al*, 2010), un contexte clinique dans lequel cette bactérie et sa résistance aux antibiotiques sont des problématiques pour les infections chroniques (Speck et Wormald, 2018). La première souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline d'origine animal a été isolée en Belgique en 1972, au cours d'une mammite bovine (Cuny *et al*, 2010). La résistance à la méthicilline est médiée par le gène *mecA*, qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline modifiée (PLP), appelée PLP2a ou PLP2, avec une affinité diminuée pour presque tous les antibiotiques β -lactames.

Staphylococcus aureus, incluant *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM), est le pathogène commun causant une large gamme de maladies dans les communautés et dans les hôpitaux (Chen et Huang, 2018). L'augmentation du nombre d'infections au SARM communautaire (CA-SARM) chez des individus en bonne santé avait conduit à des recherches

sur l'origine des souches et sur leurs facteurs de virulence (Ross Fitzgerald, 2012). *S. aureus* peut coloniser une gamme d'animaux, incluant les animaux domestiques (porc, vaches, volaille,...), les animaux de compagnie (chien, chat,...) et les animaux sauvages. L'émergence des souches SARM associées aux élevages (LA-SARM) parmi les espèces circulant dans les élevages est une question pertinente du point de vue de la santé humaine et de la santé animale (Locatelli *et al*, 2016). Des transmissions zoonotiques des souches d'élevages (LA-SARM) aux humains, avec des infections graves, ont été rapportées. Néanmoins, il a été démontré que les individus vivant et travaillant en contact étroit avec les animaux de la ferme sont particulièrement les plus exposés à la colonisation par des SARM, ce qui pourrait contribuer à la diffusion des souches de SARM dans la chaîne alimentaire.

Très peu d'études ont été réalisées en Algérie par rapport au portage nasal de *staphylococcus aureus* chez les veaux et les vaches laitières.

Le présent travail a pour but, d'isoler et identifier des souches de *Staphylococcus aureus*, prélevées au niveau de la cavité nasales des vaches laitières et des veaux, d'étudier leur profils d'antibiorésistance en testant une gamme d'antibiotiques, et ceci pour prévoir l'existence de souches SARM. Ensuite, un autre objectif est de détecter la capacité des isolats à former des biofilms in vitro.

Afin d'atteindre nos objectifs, notre travail est subdivisée en partie bibliographique qui comporte des généralités sur le *S. aureus*, ces facteurs de virulence, ses mécanismes de résistance aux antibiotiques et sa capacité de formation de biofilms. Une partie expérimentale sera ensuite consacrée à présenter la méthode du travail et les résultats obtenus, ainsi que leur discussion.

Chapitre 1

Caractéristiques générales du
Staphylococcus aureus

1. Aperçu général sur le *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positif. L'origine de son nom est due à sa forme en coque (kokos en latin), formant des grappes de raisin en se groupant en amas (staphyles). De plus, ce germe forme des colonies dorées lors de sa culture, d'où son nom « aureus » (en latin) qui signifie doré (Grace et Fetsch, 2018).

L'espèce *S. aureus*, est l'espèce la plus importante du genre *Staphylococcus*, grâce à son pouvoir pathogène, elle est responsable de plusieurs infections et intoxications alimentaires, mais aussi à cause de son aptitude à vivre et à se développer dans l'environnement et à coloniser la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux à sang chaud, ex : bovin, caprin, volaille, caprin....etc (Delarras, 2014).

2. Taxonomie et habitat

2.1. Taxonomie

D'un point de vue taxonomique, *S. aureus* appartient au phylum des fermicutes ; c'est-à-dire les bactéries à Gram positif, à la classe des bacilli, l'ordre des bacillales, et à la famille des *Staphylococcaceae* ; qui comprend en plus du genre *Staphylococcus*, quatre autres genres moins connus, à savoir : *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Selinococcus*. La classification du genre *Staphylococcus* au sein de la famille des *Micrococcaceae* à été revue et modifié à partir de 1990, grâce aux caractéristiques phylogénétiques de ce genre et l'événement de la biologie moléculaire, qui en raison de l'analyse de l'ARNr 16S et la comparaison des séquences, et l'analyse du génome entre les deux genres, tout en montrant que le contenu en G+C est de « 30 à 39 pour *Staphylococcus* et de 63 à 73 pour *Micrococcus* » ; le genre *staphylococcus* est actuellement classé au sein de la famille des *Staphylococcaceae* (Le Loir et Gautier, 2010).

Au sein du genre *Staphylococcus* ; seule 18 espèces sont retrouvées chez l'homme et l'animal ; ce genre est subdivisé en deux groupes ; notamment les staphylocoques à coagulase négatif (SCN), et staphylocoques à coagulase positif (SCP), à laquelle appartient l'espèce *S. aureus*, qui est en elle-même subdivisée en deux sous espèce ; *S. aureus subsp anaerobius* et *S. aureus subsp aureus* (Delarras, 2007).

Selon la liste des noms procaryotes ayant un statut dans la nomenclature (LPSN., 2020), la classification de *S. aureus* est comme suit :

Domaine : Eubactéria

Phylum XIII : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : *Staphylococaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus*

2.2. Habitat

Grace à son pouvoir d'adaptation et de résistance aux différents facteurs environnementaux, *S. aureus* est capable de vivre et de se multiplier dans différentes niches écologiques, il est donc retrouvé dans le sol, l'air et l'eau, il est dit ubiquiste, mais également commensale, en raison de sa capacité à coloniser la peau, les muqueuses, les fausses nasales, le tube digestif et le tractus uro-génital de l'homme et des animaux (Wertheim *et al*, 2005).

L'espèce est aussi connue par son caractère de pathogénicité, responsable ainsi d'intoxications alimentaire et d'infections diverses, en raison de contaminations dûs à un contact direct ou indirect avec un réservoir de *S. aureus*, cela résulte d'une source zoonotique ou par un manque d'hygiène (Dellaras, 2010).

3. Critère d'identification

3.1. Caractères morphologiques

Les *S. aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme arrondie avec un diamètre 0.5 à 1 micromètre. Ils sont immobiles et non sporulants. La majorité est capsulée mais après leur culture, ils perdent la capsule. On les retrouve seuls, regroupés en deux (diplocoques), ou par quatre (tétraèdre) ; le plus souvent ils sont regroupés en amas irréguliers (grappe), d'où dérive leur nom. En grec le mot « staphyl » signifie grappe de raisin (Grace et Fetsch, 2018).

3.2. Caractères culturels

Les *Staphylococcus aureus* sont des bactéries peu exigeantes, elles croissent sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif, ce sont des germes aéro-

Chapitre I : Caractéristiques générales de *Staphylococcus aureus*

anaérobies facultatifs qui peuvent croître en absence ou en présence de l'oxygène, (à l'exception d'une seule sous-espèce qui est anaérobies strict « *S.aureus subsp anaérobis* »). Leur température optimale de croissance est de 37°C, et leur pH optimal est 7,5. Sur la gélose au sang, les colonies de staphylocoques sont plus grandes par rapport aux colonies sur la gélose nutritive. Sur des géloses ordinaires, les colonies de *Staphylocoques* ont un diamètre de 1 à 3 mm, sont des colonies larges, circulaires, peu bombés, lisses et luisantes (brillantes), opaques et parfois colorées en pigment jaune à jaune orangé (Le Loir et Gautier, 2010).

Les *S. aureus* peuvent être cultivées sur des géloses sélectives, telles que le milieu Chapman qui est un milieu hyper salé. En bouillon, *S. aureus* forment un trouble abondant et parfois un dépôt et un voile en surface (Le Loir et Gautier, 2010).

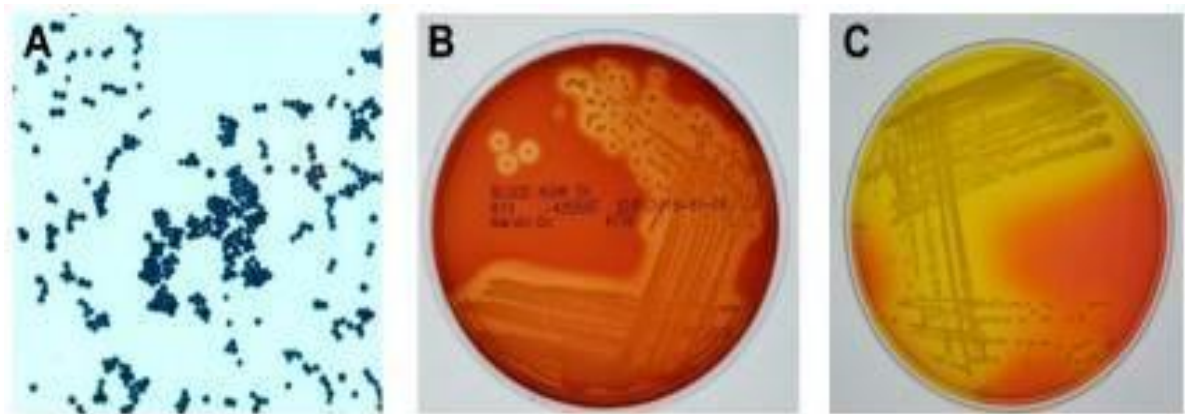


Figure 01: Phénotype de *Staphylococcus aureus*, A : coloration de Gram de *S.aureus* observé au grossissement 1000. B : *S. aureus* cultivé sur gélose au sang de mouton à 5% incubé pendant une nuit à 37°C, noté les zones Caractéristiques de bêta hémolyse autour des colonies. C : *S. aureus* cultivé sur la gélose au mannitol incubé pendant une nuit à 37°C, contrairement aux autres staphylocoques il fermente le mannitol ce qui entraîne la production d'acide et l'halo jaune classique sur la gélose (Astley *et al*, 2019).

3.3. Caractères biochimiques

L'identification biochimique permet de différencier les espèces staphylococciques, elle est basée sur l'hybridation des acides nucléiques. Les *S. aureus* ont ; une coagulase, une désoxyribonucléase (DNase), et une catalase positives. Ce sont des critères d'identification de cette espèce (Behme *et al*, 1996).

Tableau 1 : Caractères biochimiques des principales espèces de *Staphylococcus* isolées chez l'homme (Denis *et al.*, 2016).

	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Fermentation de glucose	+	+	+	+
Fermentation de xylitol	-	-	-	+
Fermentation du mannitol	+	V	-	+
Coagulase	+	-	-	-
D Nase	+	-	-	-
Phosphatase	+	-	+	-

+ : positif ; - : négatif ; V : variable

4. Pouvoir pathogène et mode de transmission

Les *Staphylocoques* sont des bactéries impliquées dans diverses pathologies, à des degrés de gravité différents. Ils sont les premiers agents responsables d'infections nosocomiales (infections contractées en milieu hospitalier), mais ils peuvent être contractés en dehors de l'hôpital (infections dites communautaires) (Grace et Fetsch, 2018)

Le genre *Staphylococcus* comprend actuellement plus de 50 espèces. Ces petites bactéries robustes sont des habitats normaux de la peau et des muqueuses de nombreuses espèces animales et humaines. Cependant, *S. aureus* est un agent pathogène important, c'est l'espèce la plus pathogène de la famille des *Staphylocoques*. En effet, il est généralement responsable d'infections cutanées et parfois de pneumonies, d'endocardites et d'ostéomyélites. Ils provoquent fréquemment la formation d'abcès. Certaines souches élaborent des toxines qui déclenchent une gastro entérite, un syndrome d'épidermolyse, et un syndrome de choc toxique (Grace et Fetsch, 2018).

Bien que *S. aureus* soit capable de survivre plusieurs mois dans l'environnement en état de dormance, la contamination par une source environnementale reste relativement rare, sauf en milieu hospitalier où elle est prévalente (Birembaux, 2017). En raison de sa localisation, c'est principalement le mode de transmission manuportée qui est à l'origine des infections

(Chabenat, 2017). Cette transmission peut être due soit à un portage direct par l'individu lui-même, soit par une contamination transitoire par un autre réservoir (Price *et al.*, 2016). De plus, *S. aureus* est l'une des principales causes de toxi-infections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés par des entérotoxines responsables d'intoxications alimentaires, et aussi la cause importante de mammites chez les animaux laitiers et de lésions osseuses et articulaires chez les volailles (Birembaux, 2017).

5. Epidémiologie

Comme définition, l'épidémiologie est l'étude de la fréquence des maladies dans une population, et les facteurs susceptibles d'exercer une influence sur cette fréquence. Étant donné que *S. aureus* est une bactérie commensale, qui fait partie de la flore de la peau humaine et des muqueuses et un pathogène responsable de divers infections ; que ce soit superficielle ou invasives, cette bactérie est considérée comme un facteur de risque pouvant influencer sur l'apparition de maladie humaine ou animale (Wertheim *et al.*, 2005).

L'implication du *S. aureus* dans les pathologies humaines est d'un impact remarquable, étant un pathogène opportuniste, doté de plusieurs facteurs de virulence ex : la formation de biofilms et la résistance aux antibiotiques (Albertini *et al.*, 2002). *S. aureus* est de plus responsable d'infections suppuratives, de furoncles, folliculites, d'impétigo, de sinusites et d'otites (Van belkum *et al.*, 2008 ; KiptooKiplagat, 2012), et non suppuratives, dues à l'ingestion d'une toxine néoformée dans l'aliment (Mendes, 2015) ; causant ainsi des intoxications alimentaires (Dellaras, 2003).

Les fréquences du portage chez l'animal varient selon les espèces considérées. Elle est de 90% chez les volailles (Nagase *et al.*, 2002). 29% chez les brebis (Vautor *et al.*, 2005) et entre 14% et 23% chez la vache (Roberson, 1994 ; Nagase *et al.*, 2002). Dans une étude de recherche menée en 2007 par l'Université du Witwatersrand et l'Hôpital universitaire de Genève, les agents de santé représentaient 93% des cas de transmission du SARM aux patients (Albrich and Harbath, 2008). Aux États-Unis une étude a permis de retrouver précisément 28,6% de portage nasal de SASM et 1,5% à SARM (Lowy, 2003). Dans des études similaires réalisées dans plusieurs pays du monde, ils ont pu obtenir un taux de portage nasal variable : France (Paris) 18%, Algérie (Tlemcen) 27%, Mali 22%, Moldavie 25%, et Cambodge 12% (Hartmann *et al.*, 1997).

Chapitre 2

Facteurs de virulence du
Staphylococcus aureus

Toute maladie liée à une infection bactérienne, est due à la capacité d'une souche bactérienne à coloniser et à se multiplier dans un organisme ; ce qui est appelé, pathogénicité. Pour qu'une infection s'exprime, l'agent infectieux doit d'abord s'adhérer et se fixer sur son hôte, ensuite il envahit les différents tissus de cet organisme pour qu'il y ait une colonisation proprement dite, et ce est également lié à la capacité de l'organisme lui-même à se défendre et à provoquer une réaction immunitaire. L'intensité de la maladie est donc liée à la réaction immunitaire de l'organisme et aux agents déployés par l'hôte, capable de lutter contre l'agent pathogène, et aux différents facteurs de virulence de l'agent causal (Rachel *et al*, 2008).

S. aureus, est armé d'un ensemble de facteurs de virulences, codés par des gènes, appelés gènes de virulences, qui lui confère un pouvoir pathogène important, responsable de plusieurs infections staphylococciques, et considérée comme l'une des causes mondiales les plus fréquentes de morbidité et de mortalité (Le Loir et Gautier, 2010).

1. Facteurs de virulence chez *S. aureus*

Les différents facteurs de virulence de *S. aureus* vont intervenir à différents stades au cours de l'infection afin de contourner les défenses de son hôte, et ce à travers des éléments structuraux ou solubles de la bactérie (Nehal *et al*, 2010).

1.1. Constituants de la paroi

1.1.1. Peptidoglycane

Le rôle exceptionnel de ce polymère et de sa structure particulière est vu lors du relargage de grandes quantités de peptidoglycanes au cours d'une infection locale, ce qui provoque un chimiotactisme des cellules phagocytaires et une libération de cytokines qui, en grande quantité, provoquent des lésions tissulaires (Chaby, 2010). Ceci, confère à la bactérie un pouvoir pathogène important, et une structure rigide capable de résister à la pression osmotique (Mattsson *et al*, 2002).

1.1.2. Acide teichoïque

L'acide teichoïque est un polymère linéaire du ribitol phosphate (Baggett *et al*, 2004). Il est situé à la surface externe de la couche du peptidoglycane et donc facilement accessible aux anticorps (Leclerc *et al*, 1995). Il est responsable de la résistance aux lysosomes et aux

peptides antimicrobiens, ainsi que l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte (Biljana *et al*, 2015).

Ils possèdent des fonctions cruciales en contrôlant la rigidité et la porosité de la paroi et en jouant un rôle dans la morphogenèse et la division cellulaire, ils contribuent aussi à l'homéostasie des cations, à l'interaction avec le système immunitaire, à la protection contre les peptides antimicrobiens et les antibiotiques, ce qui leur confère un rôle important dans la virulence (Julie, 2017). Comme ils contribuent à la colonisation nasale en se liant aux cellules épithéliales (Bhunja, 2008), ils sont aussi impliqués dans l'activation du complément (Tally, 1993).

1.1.3. Capsule

On appelle capsule l'enveloppe qui entoure la paroi de certaines espèces bactériennes, elle est de nature polysaccharidique, et contribue à l'amélioration de la virulence, en conférant à la bactérie une meilleure résistance face au système immunitaire de l'hôte, notamment en interférant avec la phagocytose (Nilsson *et al*, 1997 ; O'Riordan *et al*, 2004), et en empêchant les anticorps d'accéder aux épitopes de surface (Cunnion *et al*, 2003). La capsule facilite aussi l'adhérence de *S. aureus* aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes (Soell *et al*, 1995).

1.2. Protéines de surfaces

Avant de coloniser son hôte, la bactérie doit adhérer à la surface de ces cellules. En effet *S. aureus* possède plusieurs facteurs d'adhésion, considérés comme des facteurs de virulence, jouant un rôle dans la colonisation et l'invasion des cellules dans l'hôte (Stephan *et al*, 2006).

1.2.1. Adhésines de la paroi ou MSCRAM

MSCRAMM pour (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule), ce sont une famille de protéines fixées au peptidoglycane par des liaisons covalentes, et qui ont des caractéristiques communes, la plupart d'entre elles jouent un rôle dans la colonisation des tissus (Le Loir et Gautier, 2010 ; Boisset et Vandenesch, 2010).

Il existe plusieurs protéines MSCRAMM chez *S. aureus*, parmi lesquelles on trouve, des protéines de liaisons à la fibronectine (FnBPA, FnBPB), des protéines de liaisons au collagène (Cna), des protéines de liaisons au fibrinogène (ClfA, ClfB), responsable d'assurer l'adhésion aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire (Gordon et Lowy, 2008).

1.2.2. Adhésines secrétées ou SERAM

SERAM pour (Secretable Expended Repertoire Adhésive Molecules), dites les nouvelles adhésines. Ce sont un ensemble de protéines regroupées sous le terme de SERAM, et des adhésines excrétées dans le milieu extérieur de la bactérie. Ce groupe inclus ; la protéine Eap (extra cellular adherence protein), la protéine Emp (extra cellular matrix binding protein), la protéine Efp (extracellular fibrinogen binding protein) ainsi que la coagulase (Heilmann, 2011). Chez *S. aureus* les différentes protéines appelées SERAM, jouent un rôle dans l'adhésion, mais aussi possèdent des propriétés immunomodulatrices, impliquées dans la pathogénèse des maladies endo et extra vasculaires aiguës et chroniques (Le Loir et Gautier, 2010).

1.2.3. Protéines A

La protéine A ou « Spa » est l'une des protéines de surface (exoprotéine) majeure chez *S. aureus*, avec un PM de 42 KDa, constituée de cinq domaines homologues extracellulaires désignés E, D, A, B et C (Le Loir et Gautier, 2010).

Cette protéine est qualifiée de facteur de virulence pléiotropique, de part ses rôles multiples dans l'interaction avec l'hôte lors d'une infection. Elle peut être trouvée sous forme secrétée ou associée à la paroi de la cellule, et peut se fixer sur le fragment « Fc » des immunoglobulines G humaines IgG, pour provoquer une inhibition de la phagocytose. Elle peut aussi interférer avec le système immunitaire, et activer le complément par la voie classique pour déclencher la réaction de phagocytose (Schlievert *et al*, 2010).

La protéine A est aussi capable de se lier au facteur de Von Willebrand, une protéine essentielle de l'hémostase, ainsi qu'aux plaquettes sanguines. La fixation sur ces dernières favoriserait la colonisation des endothéliums par *S. aureus* et aurait un rôle important dans la pathogénie des endocardites dues à *S. aureus* chez l'homme (Gomez *et al*, 2006).

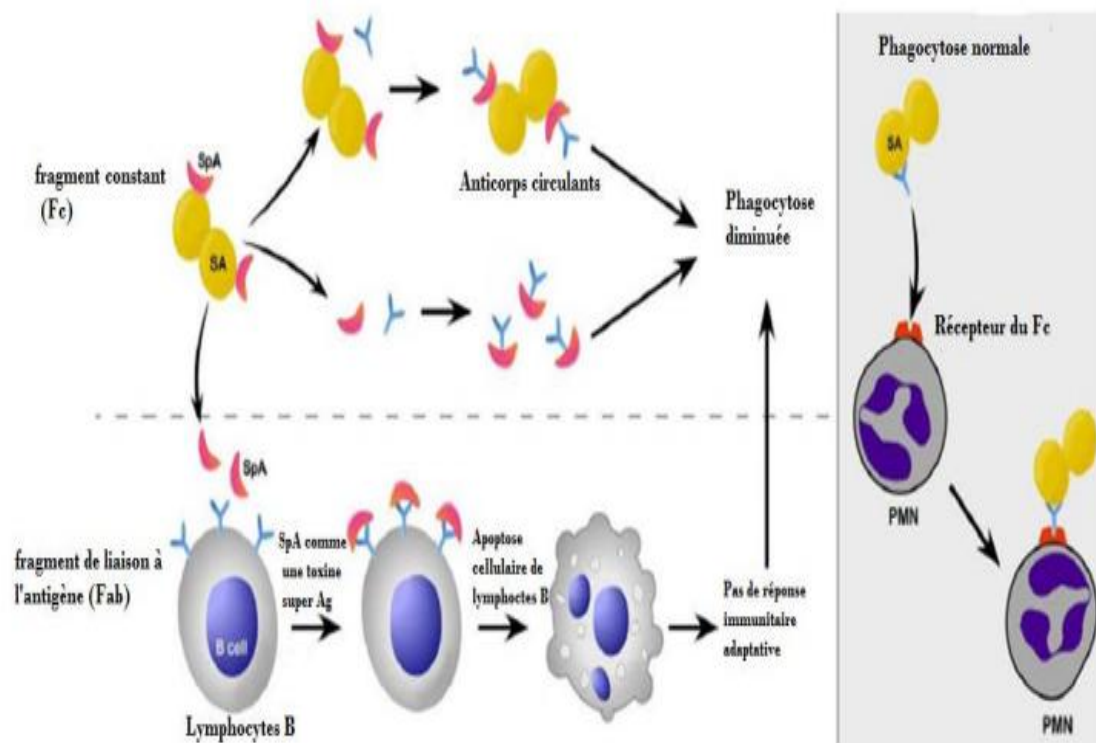


Figure 02 : Mécanisme d'action de la protéine A de *S. aureus* (Kobayashi *et al*, 2013).

1.3. Substances sécrétées à l'extérieur de la cellule

Pour assurer la persistance, les souches *S. aureus* doivent être capable de se multiplier, et ce à travers la production d'enzymes et de toxines capables d'assurer une protection contre les défenses de l'hôte, pour ensuite passer à l'étape de destruction des cellules et des tissus de l'hôte (Lin *et al*, 2010).

1.3.1. Toxines

S. aureus a la capacité de sécréter plusieurs toxines. Il y en a environ quinze, mais qui ne sont pas toutes responsables de pathologies (Floret et Lina, 2000).

Les toxines staphylococciques peuvent être réparties en deux groupes (Névine El Solh, 2000). Le premier groupe comporte les toxines provoquant des pathologies avec des symptômes définies et reproductibles après administration de la toxine :

1.3.1.1. Entérotoxines émétisantes

Sont responsables de toxi-infections alimentaires par l'ingestion des aliments contenant cette toxine qui a une courte incubation (1 à 6h après ingestion) et qui cause des diarrhées, vomissements, douleurs intestinales, et rarement un collapsus. Il y a plus de 30 enterotoxines staphylococciques décrites, parmi elles, seulement cinq sont détectables par des kits commerciaux : SEA, SEB, SEC, SED et SEE, la toxine SEA étant la plus fréquemment suspectée dans les TIAC (Schwendimann *et al*, 2021).

1.3.1.2 Exfoliatines ou toxine épidermolytiques

Les souches de *S. aureus* productrices d'exfoliatine sont généralement de groupe phagique, ce sont des SASM mais il y a quelques souches qui sont des SARM. Il y a deux types : l'exfoliatine A, à régulation chromosomique ; et l'exfoliatine B à commande plasmidique (Il a été décrits que sur l'épiderme de nouveau-né existe des récepteurs spécifiques à l'exfoliatine et qui sont absents chez l'adulte. Cette toxine cause des affections cutanées bulleuses chez le nourissant : syndrome épidermolytique de Ritter von Rittershain et cause aussi le syndrome de Lyell de la peau ébouillantée chez le jeune enfant : impétigo bulleux (action locale de la toxine). L'impétigo bulleux est caractérisé par la présence d'un nombre limité de bulles à contenu trouble contenant le *staphylocoque* sécréteur d'exfoliatine (Floret et Lina, 2000).

1.3.1.3. La toxine TSST-1

Elle est impliquée dans le syndrome du choc toxique staphylococcique. Ce dernier comporte une éruption scarlatiniforme, il est caractérisé par une hypotension artérielle, une forte fièvre, et une desquamation cutanée (Névine El Solh., 2000). Cette toxine est un superantigène provoquant une cascade inflammatoire systémique, favorisée par l'absence ou l'insuffisance d'anticorps anti-TSST-1 (Barataud *et al*, 2018).

Le deuxième groupe s'agit des toxines à activité membranaire, elles ont un rôle incertain dans les infections staphylococciques (Névine El Solh, 2000):

1.3.1.4. Les hémolysines

Presque toutes les souches de *S. aureus* secrètent un groupe de cytotoxines qui comprend quatre hémolysines :

- **Les hémolysines alpha ou toxines alpha**

Elle est sécrétée à la fin de la phase exponentielle de la croissance. Sa forme native est parfaitement soluble dans l'eau. Cette toxine est hémolytique, elle est capable de former des

pores au niveau de la paroi des cellules ainsi lyse les érythrocytes, ce qui endommage ces cellules (Tam et Torres, 2019).

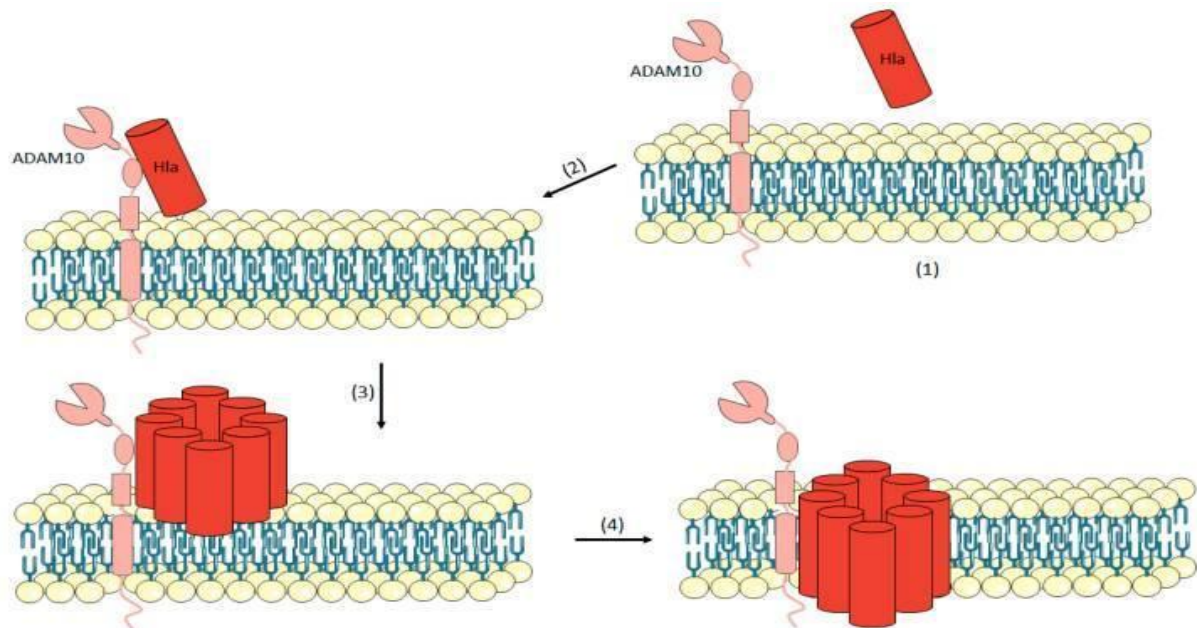


Figure 03 : Mécanisme d'action de l'hémolysine alpha (ADAM est un récepteur cellulaire de l'hémolysine alpha) (Oliveira *et al*, 2018).

- **Les hémolysines beta**

Une sphingomyélinase neutre qui est capable d'hydrolyser la sphingomyéline lipidique de la couche externe du phospholipide de la membrane cellulaire (Coelho *et al*, 2011). Elle est produite en phase post-exponentielle de la croissance (Dinges *et al*, 2000). Elle provoque une hémolyse partielle surgélose au sang (Le Loir et Gautier, 2010).

- **Les hémolysines gamma**

Cette toxine est produite par 30% des souches hospitalières de *S. aureus*. Elle est constituée de deux toxines porogènes bicomposantes HIgAB et HIgBC codées dans le noyau du génome. Elle est active contre les hétrérocytes et les leucocytes (Roger Astley., 2019). Gamma toxine a un large spectre d'activité sur les lymphocytes T, les macrophages et les monocytes (Prévost *et al*, 2004).

- **Les hémolysines delta**

C'est un petit peptide de 26 acides aminés qui se présente en une hélice alpha avec des domaines hydrophobes. Elle agit comme détergent sur la membrane biologique. Elle est thermostable et à une activité hémolytique (Fanny *et al*, 2008; Le Loir et Gautier, 2010).

1.3.1.5. La Leucocidine de Panton Valentine (LPV)

La LPV est une cytotoxine qui affecte les leucocytes (Oliveira *et al*, 2018). Elle est composée de deux protéines : la protéine LukS-PV dont la composante « S » lié à un récepteur de leucocytes et la protéine LukF-PV avec la composante F qui rend la membrane perméable (Kravitz *et al*, 2005). Cette toxine agit de manière synergique sur les membranes cellulaires, elle est impliquée dans les furonculoses chroniques et dans les pneumonies nécrosantes (Gillet *et al*, 2002). Le gène qui code la LPV est porté par un bactériophage qui se trouve chez 1 à 2% des souches cliniques de *S. aureus* (Bocchini *et al*, 2006). Elle induit la lyse de plusieurs types cellulaires comme les neutrophiles, les macrophages et les monocytes (Genestier *et al*, 2005).

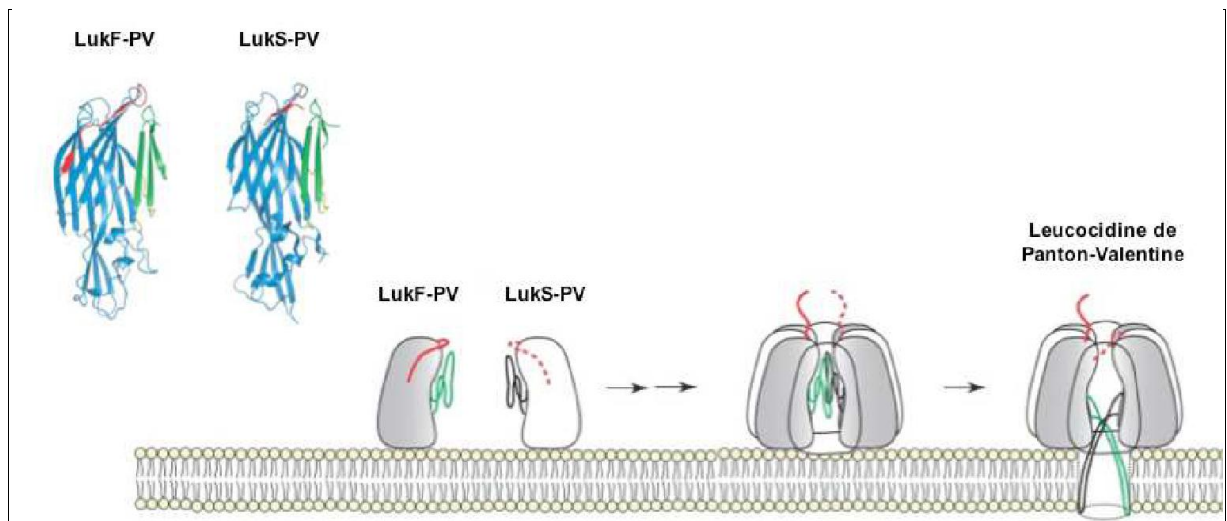


Figure 04 : Mécanisme d'assemblage des deux protéines lukF-PV et lukS-PV pour former un pore octaédrique (Miles *et al*, 2006).

1.3.2. Enzymes

1.3.2.1. Coagulase libre

C'est une protéine extracellulaire, thermostable, d'origine chromosomique et codée par le gène *coa*, capable de convertir le fibrinogène en fibrine, pour former le thrombus qui protège la bactérie contre la phagocytose, *in vivo*. *In vitro*, les souches à coagulase positive, comme *S. aureus* (SCP), sont capable de coaguler en quelques heures le plasma humain ou de lapin, la protéine est produite pendant la phase exponentielle de croissance, ce qui contribue à la pathogénicité du germe, même si son rôle dans la pathogénicité est encore incertain, car il

existe plusieurs souches à coagulase négatives SCN, autant pathogène que les SCP (Douiri *et al.*, 2016).

1.3.1.2. La catalase

Une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte, elle est capable de convertir le peroxyde d'hydrogène accumulé dans la cellule lors de la phagocytose en molécules d'eau et d'oxygène, ce qui est à l'origine d'empêcher la formation de radicaux oxygénés toxiques pour la bactérie (Bhatia et Zahoor, 2017).

2.1.3.1.3. Les lipases

La plupart des souches *S. aureus* produisent trois types d'enzymes qui dégradent des lipides ; des lipases, des estérases et des enzymes modifiant les acides gras bactéricides ou FAME pour (fatty acid modifying enzymes). Les lipases et les estérases jouent un rôle dans la dégradation des lipides de la peau, et aident à la multiplication des bactéries, les FAME par contre, interviennent secondairement, pour inactiver les acides gras. Ces enzymes non seulement ils aident à la pénétration de la bactérie à travers la barrière cutano-muqueuse, mais aussi ils contribuent à la neutralisation de l'effet antibactérien des acides gras cellulaires (Long *et al.*, 1992).

2.1.3.1.4 Bêta-lactamases

Ce sont des enzymes situés dans la membrane cytoplasmique, capables d'inactiver les β -lactamines, elles sont à l'origine de la résistance des *Staphylocoques*, y compris les *S. aureus* aux antibiotiques β -lactamine (Collomb, 2011).

2.1.3.1.5. Les protéases

Chez *S. aureus*, une variété de protéases sont produites, qui ont pour rôle d'hydrolyser des protéines, le tableau suivant résume le rôle de chacune des protéases existantes chez l'espèce *S. aureus* :

Tableau 2 : Tableau résumant les différentes protéases chez l'espèce *S. aureus*.

Les protéases	Rôle	Gène responsable	Références bibliographiques
Hyaluronidases	hydrolyse l'acide hyaluronique présent dans la matrice du tissu conjonctif, et donc permet l'invasion des <i>staphylocoques</i> dans les tissus, et la diffusion des toxines.	<i>hysA</i>	EL Kouri <i>et al</i> , 1998 ; Avril <i>et al</i> , 2003
Les nucléases et les désoxyribonucléases thermostables	-Les nucléases ce sont des enzymes capables d'hydrolyser l'ADN et l'ARN des cellules de l'hôte -La désoxyribonucléase thermostable est une enzyme thermostable responsable de l'hydrolyse de l'ADN de cellule de l'hôte, et qui est résistante aux températures élevées (100°C/15mn).	<i>nuc</i>	Bosgiraud, 2003 ; Guiraud et Rosec, 2004
Staphylokinases ou fibrinolysines	- Cette enzyme est capable de se lier aux α -défensines, peptides bactéricides sécrétés par les polynucléaires neutrophiles et d'inhiber leurs propriétés antimicrobiennes. - elle peut aussi se lier avec le plasminogène, donnant naissance à la plasmine active, une enzyme protéolytique à large spectre, responsable de la fragmentation des thrombus riches en bactéries et induit la formation de foyers septiques secondaires. -La plasmine active est une	<i>sak</i>	Foster., 2005 ; Bokarewa <i>et al</i> , 2006 ; Dubas, 2008

	puissante sérine protéase capable de cliver et d'inactiver l'immunoglobuline G et la fraction C3b humain qui vont se fixer à la paroi bactérienne, inhibant de ce fait, la phagocytose		
Serines protéases	Ce sont des protéases qui attaquent les chaînes lourdes des immunoglobulines G, cette activité peut affaiblir les défenses de l'hôte en bloquant les anticorps, et cause l'invasion et la destruction des tissus.	<i>htrA</i>	Vincenot <i>et al</i> , 2008
Cystéines protéases	Leur rôle n'est pas suffisamment déterminé, mais il est connu qu'elles ont une forte activité sur l'élastine.	<i>sspBC</i>	Pancholi, 2002
Zinc metalloproteinase (aureolysin)	Ils détruisent les inhibiteurs de protéases, participant ainsi à la formation du thrombus, et en modifiant les protéines bactériennes de surface, elles contribueraient au détachement bactérien à partir des biofilms ou des foyers septiques.	<i>aur</i>	Vincenot <i>et al</i> , 2008

2.1.3.1.6. Lysozymes

S. aureus produit un lysozyme capable de lyser la paroi des cellules bactériennes (Le Minor et Veron, 1990).

2.1.4. Formation de biofilm chez *S. aureus*

Le biofilm est une communauté multicellulaire de microorganismes adhérentes à une surface, et protégés par une matrice adhésive protectrice, lui conférant une meilleure résistance contre les agressions extérieures et les agents destructeurs notamment les antibiotiques (Watkins *et al*, 2012).

Après la colonisation, *S. aureus* peut persister sur des surfaces biotiques ou abiotiques grâce à sa capacité à former un biofilm. Cette structure protège la bactérie des défenses de l'hôte et de l'action des antimicrobiens (Otto, 2012). Cela commence dans les deux cas par l'adhérence des souches sur une surface, grâce à des protéines adhésives, notamment les MSCRAMMs, pour faciliter la colonisation des tissus, suivie d'une prolifération des autres bactéries, par une adhésion intercellulaire, qui va engendrer une accumulation de cellules les unes aux autres, qui vont pouvoir communiquer entre elles grâce à ce qui est appelé quorum-sensing (réseau de communication des bactéries entre elles grâce à des molécules signales au cours de formation de biofilm). Pour pouvoir s'étendre, les bactéries y adhérant vont falloir sécréter un ensemble de toxines, et produire une couche protectrice qui va assurer la protection des cellules contre les agents antimicrobiens (Gordon and Lowy, 2008 ; Watkins *et al*, 2012).

Une estimation a révélé que 80 % des infections dans le corps humain sont dues à des microbes impliqués dans la formation de biofilms (Høiby, 2017). Les biofilms provoquent des infections courantes et dangereuses, telles que la fibrose kystique (Kaplan, 2010).

Les biofilms peuvent poser un problème dans de nombreuses industries, dans l'industrie pétrolière par exemple, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable (Coester et Cloete, 2005). Dans l'industrie agro-alimentaire, les biofilms constitués d'organismes pathogènes représentent un problème sanitaire sérieux (Roux et Ghigo, 2006). En industrie alimentaire, *S. aureus* est capable de former des biofilms sur diverses surfaces : sur des surfaces dures (équipements de l'industrie agroalimentaire, surfaces de transport, de distribution et de stockage des aliments, sol, etc.) sur des structures biologiques telles que les légumes, la viande, les os, et les fruits (Flemming *et al*, 2016).

Une fois sur place, la formation de biofilms augmente la résistance de *S. aureus* aux stress agroalimentaires, tels que les agents antimicrobiens, les températures relativement élevées, les teneurs en sel élevées (Van-Houdt et Michiels, 2010 ; Bridier *et al*, 2011; Vazquez- Sanchez *et al*, 2013).

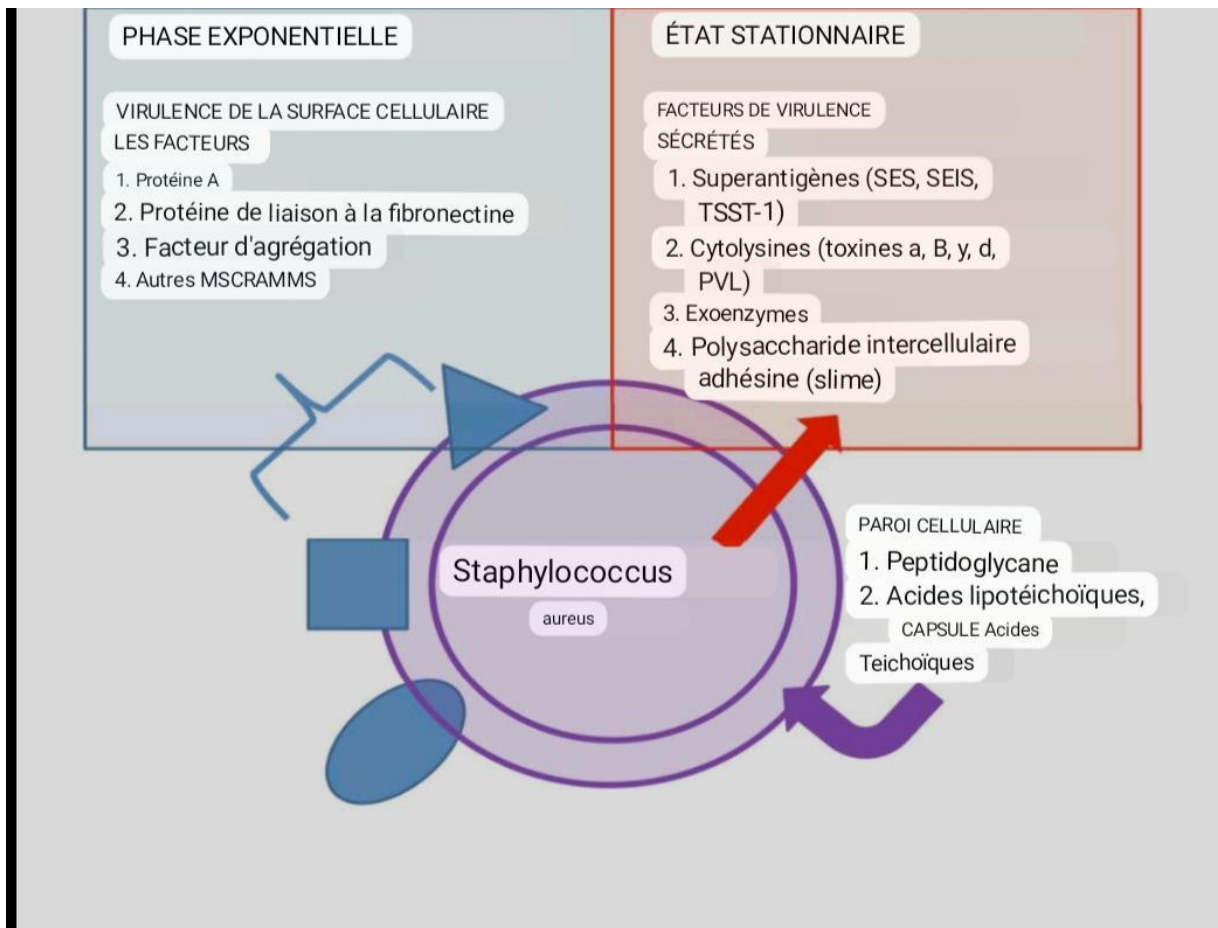


Figure 06 : Facteurs de virulences majeurs produit par *Staphylococcus aureus* (Schlievert *et al*, 2010).

Chapitre 3

L'antibiorésistance chez
Staphylococcus aureus

L'antibiotique est défini comme, une molécule naturelle, synthétique, ou semi synthétique, capable de détruire des microorganismes, par une action bactéricide qui vise à tuer, ou par une action bactériostatique qui vise à inhiber ou à ralentir la croissance des germes dans le milieu. L'utilisation de ce terme est actuellement restreinte aux seules substances à activité antibactérienne (Le loir et Gautier, 2010).

L'utilisation des antibiotiques comme traitement des maladies infectieuses est apparu avec la découverte de la pénicilline en 1942, c'est le premier antibiotique connu par son efficacité contre les bactéries, la chose qui a conduit pour la première fois l'émergence du phénomène de l'antibiorésistance deux ans après son utilisation. Des souches de *Staphylococcus aureus* ont développés des résistances à cet antibiotique. Ensuite, une succession de résistance à différents antibiotiques ont vu le jour, soit en 1961, après deux ans de l'introduction de la méticilline et en 2002 après l'introduction de la vancomycine, et plusieurs autres antibiotiques (Singleton, 2005).

1. Support génétique de la résistance chez *S. aureus*

Deux origines de la résistance aux antibiotiques ont été décrites :

1.1. Résistance naturelle

Décrite comme la capacité des souches appartenant à la même espèce de résister à un antibiotique donné, elle est d'origine chromosomique, stable, permanente et peut être transmise à la descendance (Carle, 2009).

1.2. Résistance acquise

Ce type de résistance est dit acquis, car il est dû soit à une mutation chromosomique spontanée, qui est très rare, soit à un apport extérieur de gènes de résistance, par transfert génétique du matériel génétique d'une espèce à l'autre. La résistance acquise ne touche que quelques souches d'une même espèce, exprimée par la capacité de cette souche à supporter des concentrations d'antibiotiques plus élevées que celles supportées par les autres souches (Prescott, 2000).

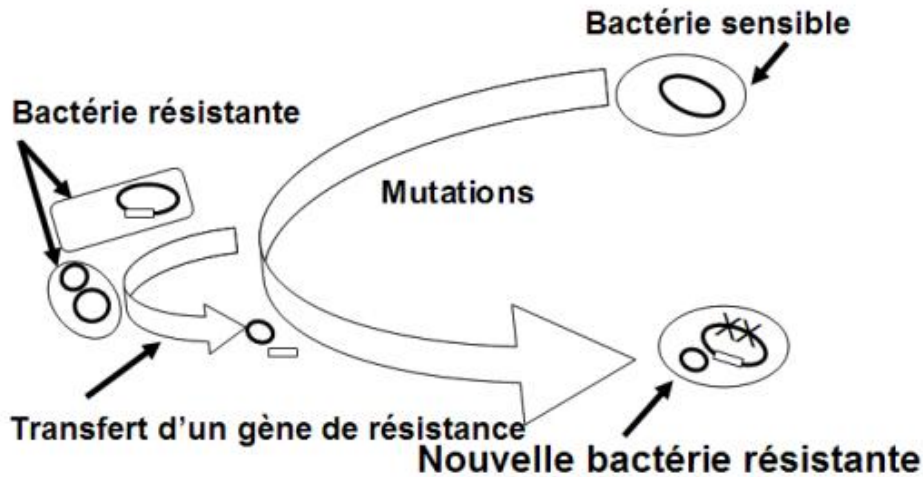


Figure 07 : Phénomène de la résistance acquise aux antimicrobiens (Carle, 2009).

2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*

2.1. Résistance à la pénicilline

La résistance de *S. aureus* à la pénicilline est observée pour la première fois en 1942, le mécanisme de résistance est expliqué par l'existence des enzymes appelées β -lactamases ou pénicillinases, principalement une protéine nommée *BlaZ*, qui se trouve sur la paroi externe de la cellule bactérienne, qui est sécrétée sous la forme soluble dans le milieu environnant, pour hydrolyser les antibiotiques β -lactamines notamment la pénicilline. Le gène de la protéine *BlaZ*, est porté par un transposon appelé (Tn532), qui se trouve soit sur un plasmide, ou sur le chromosome bactérien (Jensen et Lyon, 2009). Pour contourner l'action des enzymes β -lactamases, la pénicilline est utilisée en association avec les inhibiteurs de pénicillinases, soit ; l'acide clavulanique, sulbactam ou tazobactam (Eveillard, 2007).

2.2. Résistance à la vancomycine

La vancomycine, un antibiotique glycopeptidique qui inhibe la biosynthèse de la paroi cellulaire, reste un médicament de dernier choix pour le traitement des infections graves à SARM. Des souches de *S. aureus* présentant une résistance accrue à la vancomycine, connues sous le nom de *S. aureus* avec une résistance intermédiaire (VISA) (CMI = 4-8 $\mu\text{g/mL}$), ont été découverts dans les années 1990. La base moléculaire de la résistance chez les souches VISA, est polygénique, et implique des mutations progressives dans des gènes codant pour des molécules principalement impliquées dans la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire. Les

isolats de *S. aureus* présentant une résistance complète à la vancomycine (CMI \geq 16 $\mu\text{g/mL}$) sont appelés *S. aureus* résistant à la vancomycine (VRSA), qui ont été signalés pour la première fois aux États-Unis en 2002. La résistance de type VRSA est conférée par le gène *vanA*, qui est présent sur un plasmide. Bien que le traitement des infections à VRSA soit difficile, le nombre total d'infections humaines à VRSA à ce jour est limité (14 aux États-Unis). En comparaison, le fardeau de VISA est relativement élevé et les mécanismes moléculaires de résistance sont moins bien définis. Les VISA sont associés à des infections persistantes, à l'échec du traitement à la vancomycine, et à de mauvais résultats cliniques (McGulinness *et al*, 2017).

2.3. Résistance aux quinolones

Ces antibiotiques ont été utilisés pour le traitement des infections bactériennes à Gram négatif, connus par leur large spectre d'activité, c'est pour cela qu'ils ont été utilisés pour traiter les infections staphylococciques. C'est ainsi que la résistance aux quinolones est apparue parmi les isolats de SARM (Hooper, 2002). Les Quinolones inhibent la croissance bactérienne en arrêtant la synthèse de l'ADN, commençant par l'inhibition de deux topomérases ; l'ADN gyrase qui catalyse le superenroulement de l'ADN et l'ADN topomérase IV qui est responsable de la décaténation des chromosomes lors de la réplication. La résistance à cet antibiotique est due à des modifications de la cible (par mutations) ; soit de la topoisomérase IV, soit des sous-unités de la gyrase (McCallum *et al*, 2006).

2.4. Résistance aux aminoglycosides

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides, utilisés pour accélérer la vitesse de bactéricidie, apportée aux inhibiteurs de paroi tels que les β -lactamines (Tankovic *et al*, 1997). Ces aminosides inhibent la synthèse des protéines en se fixant sur la sous unité 30S du ribosome bactérien (Ramirez et Tolmasky, 2010).

La résistance acquise des souches de *S. aureus* face aux aminosides est due à l'acquisition des éléments génétiques mobiles qui codent pour la production d'enzymes modificatrices ; acetyl-transférase, phospho- transférase, et adényl- transférase (Foster, 2017).

2.5. Résistance aux sulfonamides

Les sulfonamides sont impliqués dans la synthèse des folates (processus important dans le métabolisme bactérien) (Courvalin *et al*, 2006). Ils sont des analogues de structure de l'acide

para-amino-benzoïque (PAB). Ils agissent sur la dihydroptéroate synthase (DHPS), qui est une enzyme indispensable à la formation de précurseur de certains acides aminés et bases azotés (Sköld, 2000). L'acide PAB est le substrat naturel de la DHPS, c'est donc de cette façon que les sulfonamides affectent le fonctionnement de cette dernière, par compétition avec son substrat naturel (Sköld, 2000). La résistance aux sulfamides est d'origine chromosomique, le chromosome bactérien contient des gènes qui provoquent des substitutions des acides aminés de la DHPS, ce qui diminue l'affinité avec l'antibiotique, et donc crée une résistance à ce dernier (Hampele *et al*, 1997).

2.6. Résistance à la tetracycline

Cet antibiotique fait partie d'un groupe homogène structurellement, il comporte quatre cycles dans sa structure moléculaire formant un noyau naphtacène. Il agit au niveau de la sous unité 30S de la bactérie, en inhibant la synthèse des protéines. Les antibiotiques tétracyclines ont une activité bactériostatique envers *S. aureus* (Jensen et Lyon, 2009) (Courvalin *et al*, 2006).

La résistance à cet antibiotique est due soit à un mécanisme d'efflux, par une protéine membranaire codée par les gènes *tetK* ou *tetL* d'origine plasmidique, ou à une protection de la cible ribosomale par une protéine codée par le gène transposable *tetM* (Ghernaout-benchouk, 2013).

2.7. Résistance aux macrolides

Les macrolides sont des inhibiteurs de synthèse des protéines, en stimulant la dissociation entre ribosome et ARN de transfert, en se fixant sur la sous unité 50S des ribosomes, ils exercent une activité bactériostatique vis-à-vis des staphylocoques notamment les *S. aureus* (Leclercq, 2000 ; Quincampoix et Mainardi, 2001).

2.8. Résistance au chloramphénicol

Actuellement, les chloramphénicol sont utilisés uniquement pour le traitement de la conjonctivité (Schwarz *et al*, 2016). Comme les macrolides, les chloramphénicol se fixent sur la sous unité 50S des ribosomes, et inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation, donc la réaction de transpeptidation est empêchée. Ils sont sujets aux mécanismes d'efflux multiple avec le gène « *norA* » qui augmente la CMI. Une autre résistance a été décrite, qui est due au gène « *cat* »

qui code pour une chloramphénicol acétyl transférase, qui neutralise l'antibiotique (Kasten, 1999).

2.9. Résistance à la méticilline

La méticilline est connue par sa capacité à bloquer les protéines liant la pénicilline PLP ou PBP (protein binding penicillin), des bactéries en phase de croissance, au cours de la synthèse de la paroi, et donc inhiber la transpeptidation en formant un complexe irréversible avec ces dernières (Giesbrecht *et al*, 1998). En revanche les souches SARM ont parvenues à synthétiser de nouvelles formes de PLP appelées PLP2a (MRSA PBP), ayant une faible affinité aux bêtalactamines (Lim et Strynadka, 2002). Les PLP2a sont codées par le gène *mecA* porté par un élément génétique appelé, cassette chromosomique staphylococcique SCC (Stewart et Rosenblum, 1980). Le SCC_{mec} est un fragment de 21-67 kb qui s'intègre dans un site unique proche de l'origine de réplication de chromosome de *S. aureus* (Hiramatsu *et al*, 2002).

D'après VanEperen et Segreti (2016), Il existe trois types de SARM, le premier type isolé est d'origine hospitalier appelé HA-MRSA, qui infecte les personnes hospitalisées, ou qui ont eu un séjour à l'hôpital pendant une période de leur vie, les souches appartenant à ce groupe, sont responsables de plusieurs infections invasives, pneumonies, et bactériémies (David et Daum, 2010). Les CA-MRSA pour (community associated MRSA), qui infectent les personnes jeunes et saines (David et Daum, 2010). Ce type de SARM est beaucoup plus virulent que les deux autres types, cela est dû à sa capacité à produire des PVL, et des α -toxines, mais il est peu sensible aux antibiotiques, à l'exception des β -lactamases (Kehrenberg *et al*, 2009). Les LA-MRSA pour livestock associated MRSA, sont trouvées dans les élevages d'animaux, exemple ; bovins, ovins, caprins, et plusieurs d'autres animaux de compagnie, qui à travers des recherches récentes, ont découvert l'implication du complexe clonal CC398, trouvé initialement chez les porcs, dans l'émergence des souches SARM dans les élevages (Verkade et Kluytmans, 2014 ; Hadjirin *et al*, 2015). Les souches appartenant au CC398 sont dites ST398, et sont qualifiées peu transmissibles à l'homme, ayant une faible virulence (Rhee *et al*, 2010).

Des études plus récentes ont découvert un gène *mecC* analogue au gène *mecA*, qui est responsable de la résistance des souches *S. aureus* à la céfoxitine et/ou à l'oxacilline, soulevant ainsi un sérieux problème de détection de ces souches en laboratoire (Paterson *et al*, 2014 ; Espinosa-Gongora *et al*, 2015).

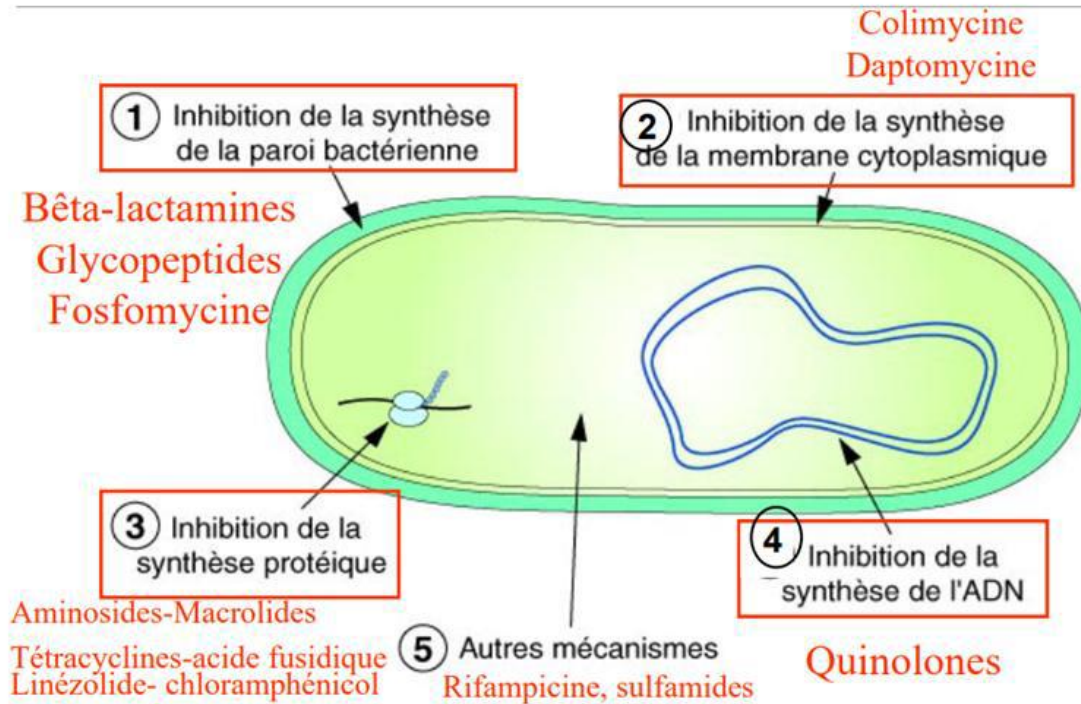


Figure 08: Mécanisme de résistance de *S. aureus* aux antibiotiques (Mainardi, 2015).

3. Facteurs contribuant à la propagation de la résistance dans les élevages

Les antibiotiques, ont joué un rôle majeur dans l'émergence des souches résistantes, à plusieurs types de molécules antibactériennes, et cela à travers différents mécanismes, influencés par des facteurs extérieurs, notamment dans les élevages d'animaux selon (Carle, 2009), cela est dû à :

L'usage abusif d'antibiotique, le traitement d'infections non confirmés par un diagnostic complet, et l'utilisation inadéquate d'antibiotiques, notamment dans les pays en voie de développement, sont parmi les causes majeures de l'émergence des souches résistantes, en milieu vétérinaire, mais aussi en agro-alimentaire, et en aquaculture. L'utilisation des pesticides, désinfectants, et autres antimicrobiens, dans les élevages d'animaux de rente sont aussi des facteurs qui peuvent jouer un rôle dans l'émergence des bactéries multirésistantes (Carle, 2009).

PARTIE
EXPERIMENTALE

1. Objectif de l'étude

Notre étude porte sur l'isolement des souches de *Staphylococcus aureus*, à partir des prélèvements nasaux effectués chez les veaux, et également chez quelques vaches laitières, ceci dans le but d'étudier la prévalence de cette bactérie dans les élevages laitiers, et d'évaluer la résistance de ces souches vis-à-vis de quelques molécules d'antibiotiques utilisées en médecine vétérinaire et humaine, dans le but de détecter des souches SARM.

2. Matériel

Tableau III : le matériel et les milieux de culture utilisés.

Appareillage et petit matériel	Milieux de culture et réactifs	Echantillons biologiques	Matériel de prélèvement
<ul style="list-style-type: none"> - Etuve microbiologique (Memmert, Allemagne) - Bec bunsen -Bain marie (Memmert, Germany) -Autoclave (pbi international, Italie) -Vortex (Heidolph, Allemagne) -Réfrigérateur -Spectrophotomètre -Boîtes de pétri -Anse à boucle -Pipette Pasteur - Micropipette - Embouts -Tubes à essai - Flacons - Pince biologique - Spatule - Ecouillons stériles 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu Mueller Hinton (MH) -Emulsion de jaune d'œufs - Gélose Baird Parker - Tellurite de potassium - Gélose BHA - Gélose TSA - Gélose à ADN - HCl 2N - Bouillon cœur cerveau (BHIB) -Plasma de lapin - Bouillon TSB + 1% de glucose -Bouillon MH + 6,5% de NaCl - Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) - Glycérol 	<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvements nasaux chez les veaux. - prélèvement nasaux chez les vaches. - Souche de référence <i>S. aureus</i> ATCC 25923. 	<ul style="list-style-type: none"> -Gants chirurgicaux. -Ecouillons -Glacière.

- Becher		- Crystal violet	
-Cuves	de	- Méthanol	
spectrophotomètre		- Ethanol	
- Microplaque		- PBS (solution de	
- Disques d'antibiotiques		lavage)	
- Papier aluminium			
- Papier film			
- Eppendorfs			
-Cryotubes			

3. Méthodes

3.1. Durée et lieu de l'étude

L'étude a été réalisée entre le mois de Février et Mai 2022, au niveau du Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. La collecte des échantillons a été faite à partir des différents élevages situés dans la wilaya de Tizi-Ouzou.

3.2. Protocol expérimental

3.2.1. Collecte des échantillons

Au total 111 échantillons ont été prélevés, à partir de 12 élevages situés dans 5 différentes régions de la wilaya de Tizi-Ouzou, à savoir Azazga, Freha, Hendou, Maâtkas et Ouagnoun. Les prélèvements ont été effectués par un écouvillonnage nasal, chez 83 veaux et 28 vaches, et acheminés ensuite dans une glacière jusqu'au laboratoire.

Après avoir bien expliqué au propriétaire de l'élevage la cause qui nous a poussé à solliciter et l'intérêt que porte notre étude, le prélèvement à été fait comme suite :

- Enfiler une paire de gants
- Préparer les écouvillons et les tubes à essai contenant le milieu de culture (bouillon Mueller Hinton + 6,5% de NaCl) et les marquer à l'aide des étiquettes
- Manutentionner l'animal avec l'éleveur ;

- Pénétrer l'écouvillon dans les deux narines de l'animal et faire des mouvements rotatoires, puis le mettre dans un tube à essai contenant le milieu de culture et le refermer.






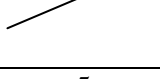
Figure 09 : Technique de prélèvement à partir d'un veau

3.2.2. Origine et nombre d'échantillons

L'ensemble des échantillons prélevés est détaillé dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV : informations concernant les prélèvements effectués.

Elevage	Nombre de prélèvement et âge des veaux	Nombre de prélèvements chez les vaches	Race des individus	Région
1	10	3	Limousine	Azazga
2	12 (2 à 8 mois)	5	Limousine	Freha
3	4 (8 à 10 mois)	/	-3 Montbéliardes - 1 Limousine	Maâtkas
4	4 (18 mois)	/	Charolais	Maâtkas
5	4 (11 à 12 mois)	/	Normande	Azazga
6	6 (15 jours à 12 mois)	10	- Normande - Montbéliarde	Hendou

7	3 (12 mois)		Limousine	Hendou
8	6 (7 à 10 mois)		Normande	Hendou
9	8 (4 jours à 3 mois)		Normande	Ouagnoun
10	5 (3, 6 mois et 16 mois)		- Normande - Montbéliarde	Azazga
11	5 (1 à 3 mois)	5	- Normande - Montbéliarde	Azazga
12	16 (8 à 12 mois)	5	- Normande - Montbéliarde	Azazga

3.2.3. Analyse des échantillons au laboratoire

3.2.3.1. Enrichissement

Consiste à mettre les prélèvements nasaux dans le bouillon Mueller Hinton + NaCl, ce qui favorise le développement de *S. aureus*. L'incubation est faite à 37°C pendant 24H.

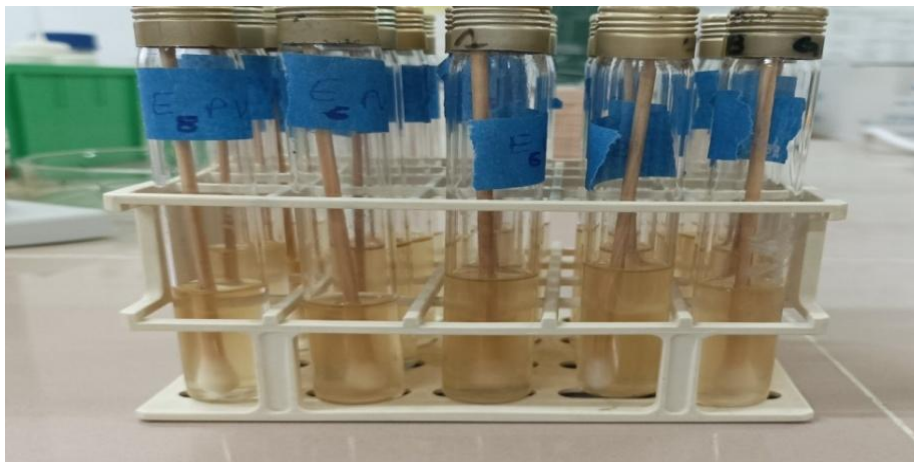


Figure 10 : Prélèvements nasaux dans le milieu Mueller Hinton + NaCl (Photo personnelle prise au laboratoire).

3.2.3.2. Isolement

Il a été fait sur la gélose Baird Parker, qui est un milieu sélectif pour les *Staphylococcus aureus*. Les tubes MH+NaCl ayant présentés un trouble bactérien ont fait l'objet d'un repiquage sur la gélose sélective de Baird Parker additionnée du jaune d'œuf et de tellurite de potassium, à raison de 50 µl/boîte. Les boîtesensemencées sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h.

3.2.3.3. Purification

Après incubation, des colonies caractéristiques des *S. aureus* (colonies noires avec un anneau transparent et un précipité blanchâtre, rondes, lisses et bombées) seront observables dans quelques boîtesensemencées, l'échantillon est donc dit positif.

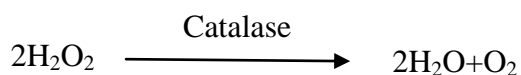
La purification consiste à prélever une colonie caractéristique de *S. aureus* à partir de chaque boîte positive et faire des ensemencements en stries sur la gélose BHA. L'incubation est réalisée à 37°C/24H.

3.2.3.4. Identification biochimique des isolats

- **Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation de peroxyde d'hydrogène H₂O₂, produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries y compris le *S. aureus*.

Cette enzyme dégrade le H₂O₂ en eau et oxygène.



Le test de la catalase est réalisé par le dépôt d'une colonie d'une souche à tester dans une goutte d'eau oxygéné. Ce test est présumé positif lorsqu'il y a dégagement de bulles de gaz (effervescence).

- **Recherche de l'ADNase**

De nombreuses bactéries possèdent des enzymes qui décomposent les acides nucléiques. Les bactéries peuvent ensuite utiliser les nucléotides résultants pour construire leurs propres acides nucléiques. L'ADNase est une enzyme qui hydrolyse l'ADN, la réaction catalysée est la suivante :



Pour la mise en évidence de cette enzyme chez *S. aureus*, on ensemence une colonie issue d'une culture sur la gélose BHA par une strie centrale sur une boîte Pétri contenant une gélose à ADN. Cette boîte est incubée à 37°C pendant 24 h.

Sur la gélose à ADN, l'hydrolyse de l'ADN est observée par un éclaircissement autour de la strie centrale après l'inondation de la boîte par un volume de HCl, l'acide précipite l'ADN non hydrolysé rendant le milieu opaque. Par conséquent, les colonies productrices de l'ADN ase hydrolysent l'ADN et produisent une zone claire autour de la strie.

- **Recherche de la coagulase**

Le test de la coagulase différencie les souches de *S. aureus* des autres espèces à coagulase négatives (SCN). La coagulase est une enzyme qui provoque la coagulation du plasma en convertissant le fibrinogène en fibrine.

Tout d'abord, des cultures sur le bouillon BHIB ont été préparées aussi bien pour la souche à tester et la souche de référence *S. aureus* ATCC25923.

Le test de la coagulase est réalisé en transférant 0.5 ml de la suspension bactérienne dans 0.5 ml du plasma du lapin. Un témoin positif est réalisé en utilisant la souche de référence *S. aureus* ATCC25923. Il est essentiel d'incuber le tube à 37°C pendant 1 à 4 h, puis observer en inclinant lentement le tube à 90° de la verticale. Tout degré de la coagulase représente un test positif (formation d'un caillot).

3.2.3.5. Résistance des souches de *S. aureus* isolées aux antibiotiques

Cette technique est consacrée à l'étude de l'antibiorésistance des souches vis-à-vis de quelques molécules d'antibiotiques réalisée selon la technique de diffusion des disques sur la gélose Mueller-Hinton.

Pour ce faire, des cultures jeunes, doivent être réalisées sur la gélose BHA, 18h avant l'ensemencement. Ensuite, une suspension est préparée à partir de ces cultures dans de l'eau physiologique, et ramenée à une densité optique comprise entre 0.08 et 0.1. L'antibiogramme est donc réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile, qui va être trempé dans la suspension préalablement préparée et déchargé sur les parois interne du tube, pour pouvoir réaliser un écouvillonnage sur toute la surface de la boîte. Des disques d'antibiotiques sont ensuite appliqués à l'aide d'une pince stérile. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 heures.

La lecture des zones d'inhibition, est réalisée pour pouvoir classer les souches en : souches sensibles, souches intermédiaires et souches résistantes, selon les recommandations du CLSI (2021).

Tableau V : Liste des molécules d'antibiotiques testés sur les souches isolées.

Familles	Antibiotiques	Abréviations	Charge (UI)	Marque
β-lactamines	Pénicilline	P	10	Biorad, France
	Céfoxime	FOX	30	Biorad, France
Aminoglycosides	Gentamicine	GM	10	Biorad, France
	Néomycine	N	30	Biorad, France
Macrolides	Erythromycine	ERY	15	Biorad, France
Tétracyclines	Tétracycline	TET	30	Biorad, France
quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	Biorad, France
Phénicol	Chloramphénicol	CHL	30	Biorad, France
Inhibiteurs de synthèse de l'acide folique	Triméthoprim- Sulfamethoxazole	SXT	25	Biorad, France

3.2.3.6. Mise en évidence de la formation des biofilms sur microplaque

La détermination quantitative de la formation de biofilms dans les microplaques à 96 puits est basée sur la mesure colorimétrique du cristal violet fixé par les cellules sessiles. Cette méthode a été réalisée selon le protocole décrit par Stepanovic *et al* (2007).

Brièvement, quelques colonies de *S. aureus* ont été inoculées dans 5 ml de TSB + 1% glucose, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h. Les suspensions bactériennes obtenues ont été ensuite diluées à 1/50 avec du bouillon TSB + 1% glucose. Ainsi, 200µl de la suspension bactérienne diluée ont été transférés dans un puit d'une microplaque en polystyrène à 96 puits (trois puits sont réservés pour chaque souche). Le TSB + 1% glucose a servi de contrôle négatif. Tandis que, la souche de *S. aureus* ATCC 25923 a servi de contrôle positif. La microplaque est recouverte puis incubée à 37°C pendant 24h.

Après l'incubation, le contenu des puits a été délicatement retiré et lavé avec 200µl du tampon phosphate salin (PBS). Les cellules bactériennes adhérentes ont été fixées avec du méthanol pendant 15 min et colorées avec du cristal violet à 0,1 % (150µl /puits) pendant 15 min. Trois lavages doux ont été appliqués pour éliminer l'excès du colorant. Le cristal violet fixé a été solubilisé en ajoutant dans chaque puit 150µl d'éthanol à 96 %. La microplaque est couverte et maintenue sans agitation pendant 30 min. La mesure de la densité optique (DO) a été réalisée à 560nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.

L'interprétation de la production de biofilm a été faite selon les critères décrits par Achek et al (2020), les souches ont été classées comme suit :

TableauVI : Classification de l'adhésion des *Staphylocoque spp* (ACHEK *et al*, 2020).

ValeurDO	Formation de biofilm
$OD_s < OD_c$	Non formatrice
$OD_c < OD_s < 2 OD_c$	Faible
$2 OD_c < OD_s < 4 OD_c$	Modérée
$OD_s > 4 OD_c$	Forte

ODs : la valeur moyenne de la densité optique pour chaque souche.

ODc : cut-off value, avec $OD_c = \text{valeur moyenne de la densité optique du control négatif} + 3 \text{ fois l'écart type du contrôle négatif}$.

OD negative control = la valeur moyenne de la densité optique pour chaque témoin négatif (cette valeur est calculée pour chaque microplaque lors de chaque essai).

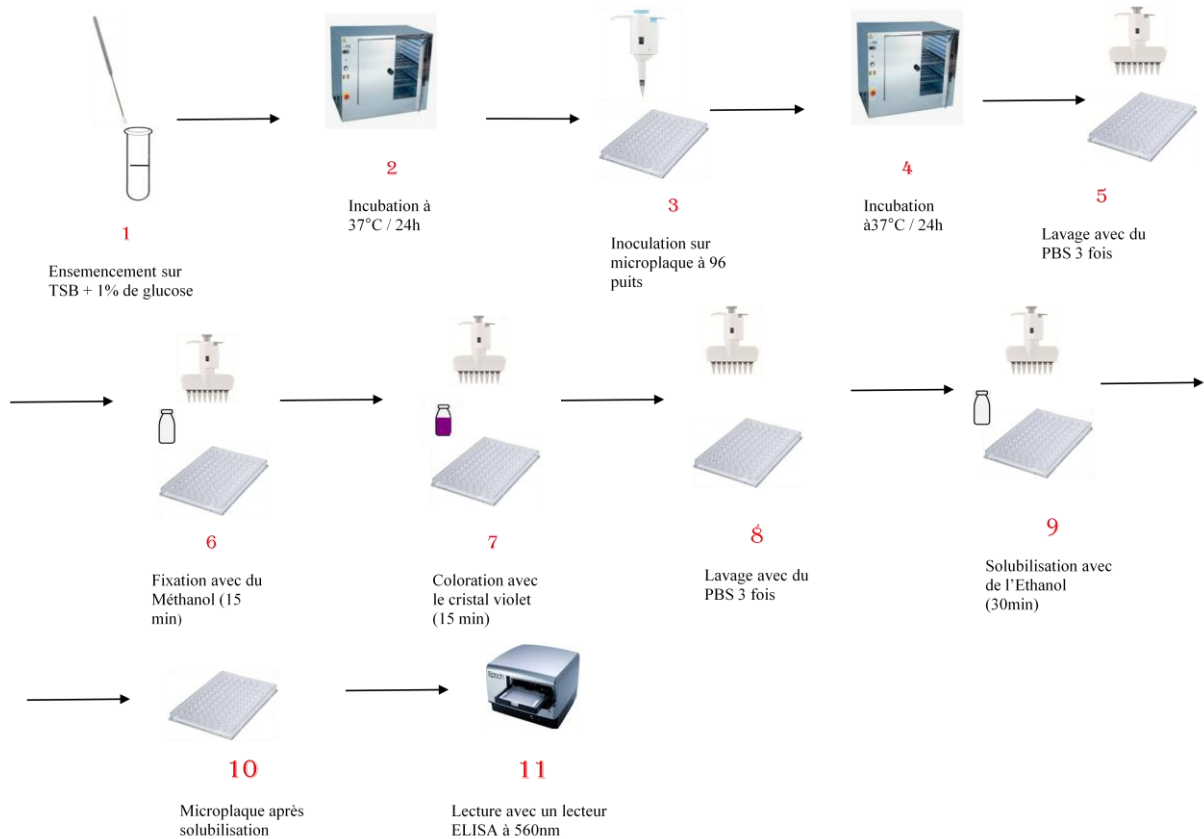


Figure 10 : Schéma expliquant la méthode utilisée pour quantification de biofilm.

3.2.3.7. Conservation des souches analysées

Après avoir identifié et codifié toutes les souches, ces dernières sont repiquées dans des bouillons BHIB puis incubées à 37°C pendant 24 h. La conservation de ces isolats est faite dans des cryotubes par l'ajout d'un volume de cette culture bactérienne à deux volumes de glycérol, ces tubes sont maintenus à -20°C. Les souches étudiées seront conservées, pour faire un soucier.

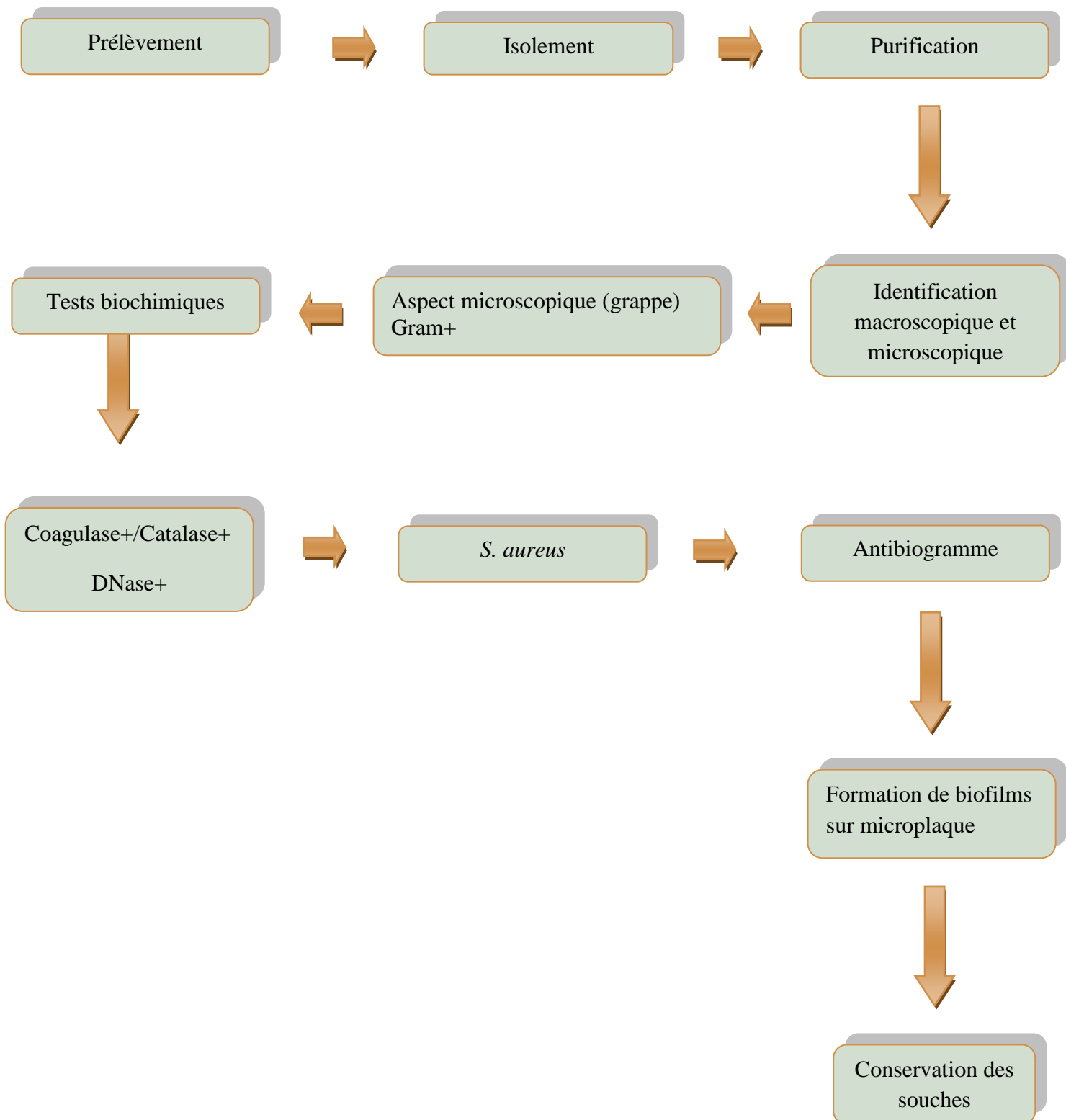


Figure 11 : Schéma récapitulatif de la recherche de *S. aureus* et de sa caractérisation phénotypique.

Résultats et Discussions

1. Résultats

1.1. Prévalence de *S. aureus* dans les élevages de bovins laitiers

Au cours de cette étude, 111 prélèvements nasaux, incluant 83 prélèvements des veaux et 28 prélèvements des vaches laitières, ont été collectés, à travers cinq élevages de bovins laitiers dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Sur ce nombre total de prélèvements, seules 63 prélèvements se sont révélés positifs sur le bouillon MH + 6,5% NaCl. Après des isolements sur la gélose sélective de Baird Parker (BP) (figure 01), nous avons pu isoler 68 colonies caractéristiques du *S. aureus*. Chaque colonie a subi une étape de purification sur la gélose BHA (Figure 02), et un ensemble de tests biochimiques (Figure 03, 04, 05), pour identifier 37 souches confirmées comme des *S. aureus*, dont 26 souches chez les veaux et 11 chez les vaches laitières, ce qui nous donne une prévalence total de 13,51%.

Tableau VII : Fréquence d'isolement de *S. aureus*

	Nombre de prélèvements	Nombre de prélèvements positifs sur BP	Nombre de souches isolées	Prévalence de <i>S. aureus</i> (%)
Portage nasal chez les veaux	83	10	26	12,05%
Portage nasal chez les vaches laitières	28	5	11	17,8%
Total	111	15	37	13,51%

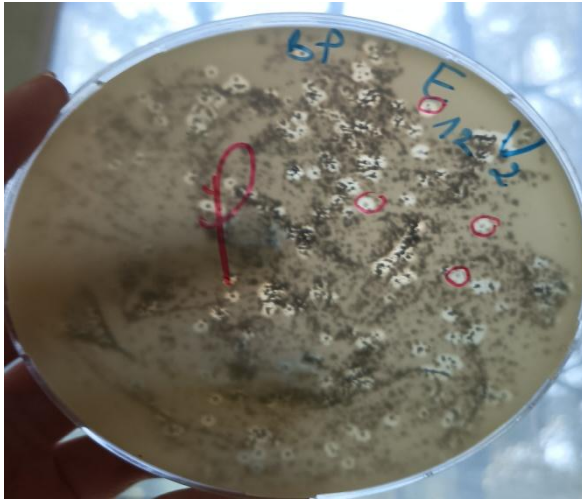


Figure 12 : Aspect des colonies caractéristiques de *S. aureus* sur BP (Photo personnelle prise au laboratoire)



Figure 13: Colonies pures du *S. aureus* sur BHA (Photo personnelle prise au laboratoire)



Figure 14 : Test de la catalase (Photo personnelle prise au laboratoire)

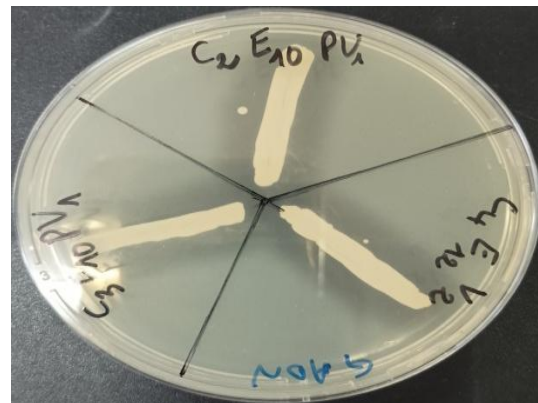


Figure 15 : Test de l'ADNase (Photo personnelle prise au laboratoire)

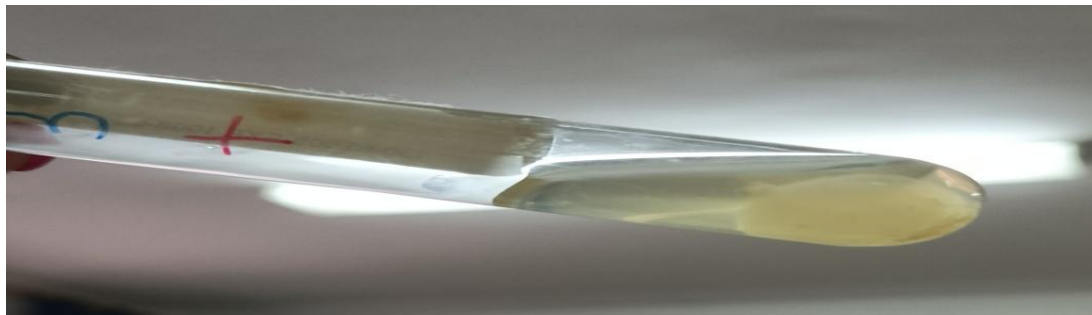


Figure 16 : Test de la coagulase (Photo personnelle prise au laboratoire)

1.2. Résistance des souches de *S. aureus* isolées aux antibiotiques

Les résultats obtenus, montrent l'efficacité de la plupart des antibiotiques, car un taux élevé de sensibilité a été observé vis-à-vis de presque toutes les molécules d'antibiotiques testées. En revanche un taux élevé de résistance vis-à-vis de la pénicilline a été enregistré, qui est de l'ordre de 97%.

Tableau VIII : Taux de résistance des souches de *S. aureus* isolées, aux antibiotiques (n=37).

Antibiotiques	Nombre de souche résistante (%)	Nombre de souches intermédiaire (%)	Nombre de souches sensible (%)
PEN	36 (97%)	0%	1 (2%)
FOX	2 (5%)	0%	35 (95%)
N	7 (18%)	0%	30 (81%)
GM	0%	0%	37 (100%)
ERY	0%	1 (2%)	36 (97%)
TE	2 (5%)	1 (2%)	34 (92%)
CIP	1 (2%)	0%	36 (97%)
CHL	0%	0%	37 (100%)
SXT	0%	0%	37 (100%)

PEN : Pénicilline, **FOX** : Céfoxitine, **N** : Néomycine, **GM** : Gentamicine, **ERY** : Erythromycine, **TE** : Tétracycline, **CIP** : Ciprofloxacine, **CHL** : Chloramphénicol, **SXT** : Triméthoprim-Sulfaméthoxazole.

1.3. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

Au cours de notre étude, deux souches SARM ont été isolées. La première a été isolée d'un prélèvement nasal chez un veau, tandis que la deuxième est isolée chez une vache laitière.

Tableau IX : Informations concernant les souches SARM isolées.

La souche	Origine de la souche	Numéro d'élevage	Profil de résistance aux antibiotiques
SS605	Portage nasal chez le veau	10	PEN/FOX
S606	Portage nasal chez la vache	12	FOX/PEN/TE/CIP

PEN : Pénicilline, FOX : Céfoxitine, TE : Tétracycline, CIP : Ciprofloxacine

1.4. Phénotype de multi-résistance

Uniquement une seule souche qui présente une multi-résistance. Celle-ci est un SARM (Tableau X).

Tableau X : Phénotypes de multi-résistances.

Phénotype de multi résistances	Nombre de souches
CIP/FOX/PEN/TE	1

CIP : Ciprofloxacine, FOX : Céfoxitine, PEN : Pénicilline, TE : Tétracycline

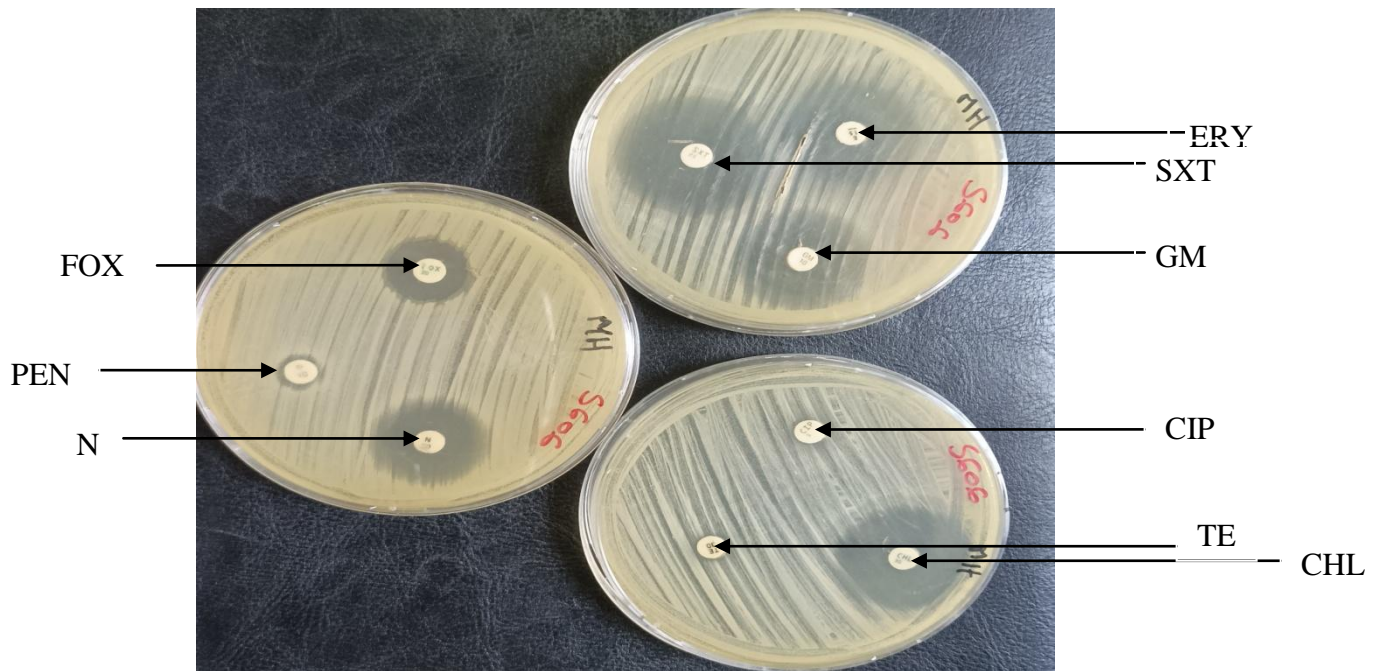


Figure 17 : Souche se *Staphylococcus aureus* multi-résistante.

1.5. Formation de biofilm *in vitro*

Au cours de cette présente étude, nous avons testé 34 souches (23 souches isolées des petits veaux et 11 souches isolées des vaches) sur leur aptitude à former des biofilms *in vitro*. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches de *S. aureus* isolées avaient la capacité de former des biofilms, quelque soit leur origine. En revanche, l'intensité de la formation de biofilm est variable selon les souches testées. Chez les veaux, plus de la moitié (56%) des souches avaient une formation moyenne, 35% avaient une forte formation. Tandis que, 9% des souches avaient une faible formation. Chez les vaches, 46% des souches isolées avaient une formation moyenne, 27% avaient une forte formation. Le reste des souches étaient faiblement formatrices (figure 8). La figure ci-dessous illustre les fréquences de formation de biofilm des souches de *S. aureus* isolées chez les veaux et les vaches laitières respectivement.

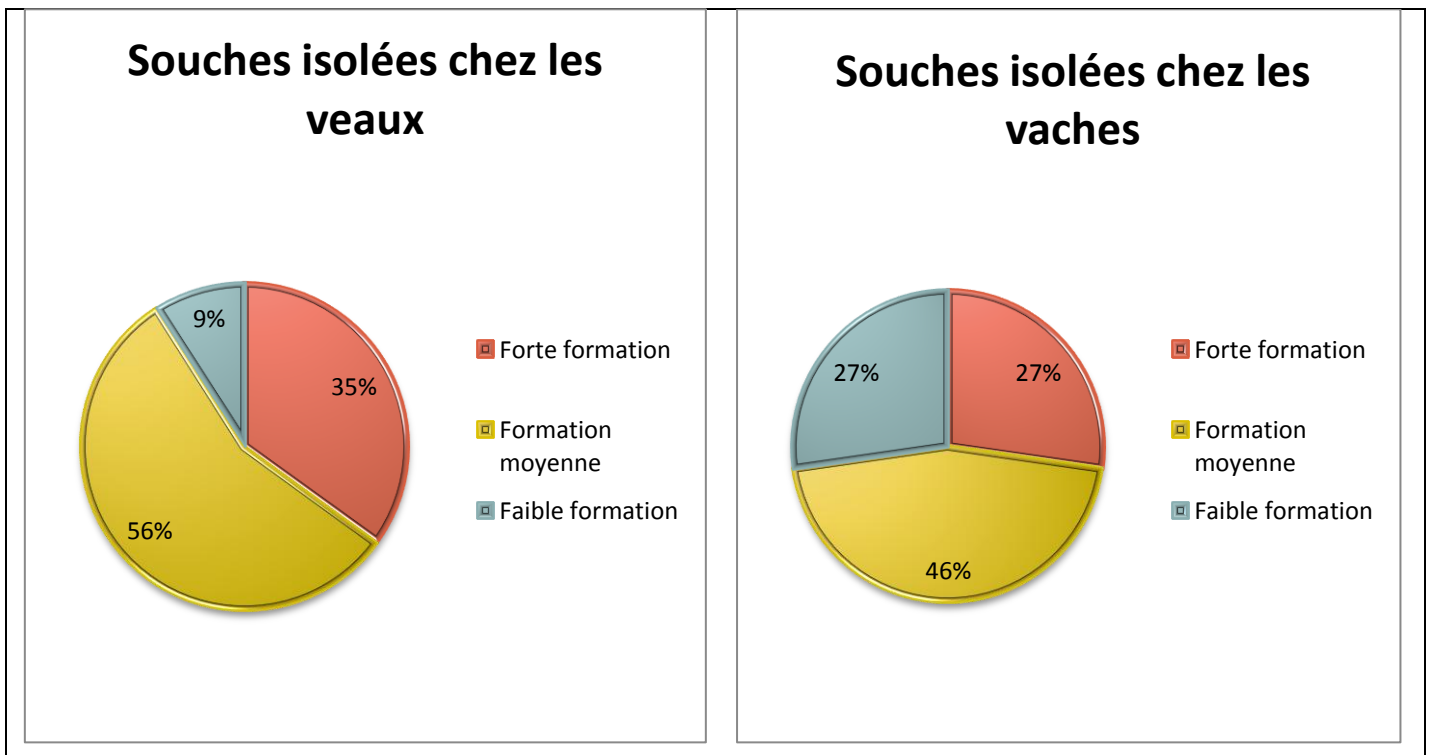


Figure 18 : Distribution des souches *S. aureus* isolées chez les veaux et les vaches laitières selon leur capacité à former des biofilms.

2. Discussion

S. aureus est connu comme un pathogène opportuniste chez les ruminants laitiers (Seyffert *et al*, 2012). Au cours de ces dernières années, cet organisme s'est imposé comme une bactérie multi-résistante commune aux antibiotiques (Boucher et Corey, 2008). En Algérie, peu d'études sont réalisées concernant le portage nasal de *S. aureus* chez les animaux de rente, particulièrement chez les veaux. De telles études pourraient fournir des informations importantes et utiles sur le plan épidémiologique. Dans notre étude, on s'intéresse à l'isolement et à la caractérisation phénotypique de *S. aureus* du portage nasal chez les veaux et les vaches laitières dans des régions distinctes de la wilaya de Tizi-Ouzou.

Au cours de notre étude, le taux de prévalence des souches *S. aureus* chez les veaux et les vaches laitières est de 13,51% dont 12,05% chez les veaux et 17,8% chez les vaches laitières sur un totale de 111 échantillons (83 veaux et 23 vaches laitières). Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs auteurs qui ont signalé de faibles fréquences d'isolement de *S. aureus* chez les vaches laitières et les veaux, notamment en Turquie, d'après (Garipcin et Seker, 2015 ; Rahimi *et al*, 2015 ; Mama *et al*, 2019 ; Abdel-Moein et Zaher, 2019 ; Silva *et al*, 2022). En revanche, Yadav *et al* (2018) et Conceição *et al* (2017) en Portugal, ont rapporté des taux relativement élevés du portage nasal du *S. aureus* chez le bovin, qui sont de 38,1% et 54,3% respectivement.

Nous avons testé la résistance de 37 souches isolées vis-à-vis de neuf molécules d'antibiotiques différentes, dans le but d'établir leurs profils d'antibiorésistance et de prévoir l'existence de souches multi-résistantes. Les résultats obtenus dévoilent la sensibilité de la plupart des souches vis-à-vis la majorité des molécules d'antibiotiques testées.

Nous avons enregistré un taux de résistance élevé à la pénicilline G de l'ordre de 97%, une valeur qui corrobore avec celles de plusieurs auteurs, en Tunisie (Khemiri *et al*, 2018 ; Yadav *et al*, 2018 ; Mairi *et al*, 2019). Le taux élevé de la résistance à la pénicilline est dû à l'utilisation massive de cet antibiotique en médecine humaine et vétérinaire (Tahorat *et al*, 2005 ; Aras *et al*, 2012). On a noté d'autres résistances, comme à la néomycine, à la céfoxitine, à la ciprofloxacine, et à la tétracycline avec des valeurs de 18%, 5%, 2% et 5% respectivement, nos résultats corroborent avec ceux de Zhou *et al* (2017), où ils ont signalés des taux de résistance inférieure à 20%. Des faibles résistances à l'encontre des autres molécules à savoir la néomycine (18%), la tétracycline (5%), la céfoxitine (5%) et la ciprofloxacine (2%). Nos résultats corroborent avec ceux obtenu par Silva *et al* (2022).

Dans cette étude, deux SARM ont été isolés, ce qui rejoint les résultats de plusieurs études qui ont montré la présence des SARM chez les vaches et les veaux (Nemeghaire *et al*, 2014 ; Garipcin et Seker, 2015 ; Yadav *et al*, 2018 ; Abdel-Moein et Zaher, 2019 ; Mairi *et al*, 2019 ; Schnitt *et al*, 2020). Plusieurs études ont montré le risque associé à la présence des SARM chez les animaux d'élevage, ce qui montre que les animaux d'élevage pourraient constituer un véhicule de transmission ou un réservoir potentiel d'infections aux humains (Ross Fitzgerald, 2012). La transmission zoonotique potentielle inclut le contact direct entre l'animal et l'éleveur, mais aussi le contact de l'éleveur avec l'environnement contaminé (Locatelli *et al*, 2017). Benito et al (2015) ont isolé un SARM portant le gène mecC dans une lésion de la peau d'un éleveur, ce dernier travaille dans un atelier de production de fromage au lait cru et en contact direct avec les animaux. Il est possible que le contact avec les animaux ou avec le lait cru puisse être à l'origine de cette souche. Le même constat a été rapporté par Carfora *et al* (2016) et Locatelli *et al* (2017), qui ont mis en évidence le transfert des SARM de bovins et des ovins vers des éleveurs. Plusieurs études ont identifié des hautes colonisations des SARM (CC398) chez des humains en contact avec les animaux, incluant les propriétaires des élevages, les ouvriers, les vétérinaires praticiens et les travailleurs impliqués dans la chaîne d'abattage (Aires-de-Sousa *et al*, 2017). Pour cela, l'adoption de mesures d'hygiène, telles que l'utilisation des équipements de protection personnelles (masques et gants) peut être cruciale (Locatelli *et al*, 2017).

En plus de la résistance antimicrobienne observée chez les isolats de *S. aureus*, leur capacité à former des biofilms joue un rôle important dans le maintien de l'infection. Les biofilms offrent une protection aux bactéries contre les défenses immunitaires de l'hôte, les désinfectants et les antibiotiques, ils sont responsables de jusqu'à 80% de toutes les infections humaines chroniques et récurrentes. Cependant, en médecine vétérinaire, seules quelques études rapportent le rôle du biofilm dans les infections animales. Dans l'une des infections animales les plus étudiées, il a déjà été démontré que la mammite bovine chronique et récurrente partage des caractéristiques similaires avec les infections humaines chroniques (Vanessa Silva *et al*, 2022).

Notre étude visait à étudier la capacité de formation de biofilm par des souches de *S. aureus* isolées à partir des prélèvements nasaux effectués chez les veaux, et également chez quelques vaches laitières. Nos résultats obtenus ont démontré que toutes les souches de *S. aureus* ont la

capacité de produire des biofilms, dont 50,5% de souches sont de formation moyenne, suivis des 31% de souches fortement formatrices, et seulement 18% de souches sont faiblement formatrices de biofilms.

Un total de 34 souches de *S. aureus* ont été testées pour leurs capacités à former des biofilms. A partir de l'analyse des résultats on remarque que toutes nos souches avaient une capacité variable à former un biofilm. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les recherches de Zmantar *et al* (2010) et Szweda *et al* (2012) qui indiquent que 57% de souches de *S. aureus* sont productrices de biofilms. Alors que l'étude de Bose *et al* (2009) a rapporté que 32,96% de *S. aureus* sont productrices de biofilms.

Il a été suggéré que chez nombreuses espèces bactériennes la sensibilité aux antimicrobiens pourrait être liée à la production de biofilms (Barakak et Nabil, 2016 ; Vuotto *et al*, 2017). En revanche, la relation exacte entre eux reste encore confuse. Pour *S. aureus*, plusieurs études ont suggéré que les souches formant un biofilm étaient plus multi-résistantes et que les SARM produisent un biofilm plus fort que les SASM (Cha *et al*, 2013 ; Yang *et al*, 2017). Cependant certaines souches fortement formatrices de biofilm ont été sensible vis-à-vis toutes les molécules d'antibiotiques, tandis qu'une souche faiblement formatrice a été multi-résistante. Ainsi, une souche SARM a une formation modérée, ce qui suggère qu'une souche avec une forte capacité de production de biofilm ne peut pas toujours montrer une résistance plus sévère et vice versa.

Conclusion

Durant notre étude, 111 prélèvements nasaux ont été effectués par la technique d'écouvillonnage chez des veaux et des vaches laitières répartis sur cinq élevages de bovins laitiers de la Wilaya de Tizi-Ouzou, les échantillons ont été soumis à la recherche des souches de *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus montrent un taux de prévalence de *S. aureus* de 12,05% chez les veaux et 17,8% chez les vaches laitières. Au total 37 souches de *S. aureus* ont été isolées, dont 35 souches été des SASM et deux souches été des SARM.

L'étude de la résistance de nos souches aux antibiotiques montre de faibles résistances vis-à-vis de la plupart des molécules d'antibiotiques utilisées, sauf dans le cas de la pénicilline où un taux de 97% à été signalé. Pour les SARM, la prévalence est faible mais ça reste un grand danger pour l'homme via sa transmission.

Concernant la formation de biofilm, toutes les souches avaient la capacité de former des biofilms sur des microplaques ELISA.

D'autres études complémentaires doivent être envisagées, en premier, une caractérisation des souches isolées sur le plan génotypique et l'étude de leur lien génétique, deuxièmement, une étude du portage nasal de *S. aureus* chez les personnes en contact étroit avec les animaux, doit être faite, dans le but de mettre en évidence des zoonoses.

Bibliographie

A

- Agabou A, Ouchenane Z, Ngba Essebe C, Khemissi S, Chehboub MTE, Chehboub IB, Sotto A, Dunyach-Remy C, Lavigne JP. (2017). Emergence of Nasal carriage of ST80 and ST152PVL+ *Staphylococcus aureus* isolates from livestock in Algeria. *Toxins*, 9, 303.
- Aires-De-Sousa M. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 23, 373-80.
- Akkou M, Antri K, Bachtarzi MA, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, Kaidi R, Meugnier H, Tazir M, Etienne J, Laurent F, et Ramdani-Bouguessa N. (2016). Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Bovine Mastitis and Nasal Carriage of Workers in Contact to Animals in Algeria. *Pakistan Veterinary Journal*. 36(2): 184-188.
- Albertini MT, Benoit C, Berardi L, Berrouane Y, Boisivon A, and Cahen P, et al. (2002). Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. *Journal of Hospital Infection*. 52 (2): 107-113.
- Aras Z, Aydin I, Kav K. (2012). Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from caprine mastitis cases. *Small Ruminant Research*. 102, 68-73.
- Astley R, Miller FC, Mursalin MdH, Coburn PS et Callegan MC. (2019). An Eye on *Staphylococcus aureus* Toxins: Roles in Ocular Damage and Inflammation. *Toxins*, 11, 356.
- Avril JL, Dabe MH, Denis F, Monteil H. (2003). *Bactériologie clinique*. 3^{ème} édition. Ellipses, Paris. 28. 8-28.

B

- Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K. (2004). Community-onset methicillin-resistant. *Infection Control Hospital Epidemiology*. 24 (6): 397-402.
- Barakat GI, Nabil YM. (2016). Correlation of mupirocin resistance with biofilm production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from surgical site infections in a tertiary centre, Egypt. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 4, 16-20.
- Barber M. (1961). Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 14, 385-393.

Références Bibliographiques

- Benito D, Gómeza P, Aspiroz C, Zarazaga M, Lozano C, Torres C.(2016). Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Humans Related to a Livestock Farm in Spain, With Detection of MRSA-CC130 Carrying *mecC* Gene: A Zoonotic Case. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.34(5), 280-285.
- Bhunia AK.(2008). *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*, Springer, New York.
- BiljanaMS, Dinic M, Orlovic J, Babic T.(2015). *Staphylococcus aureus*: immunopathogenesis and human immunity. *Acta facultatis Medicae Naissensis*.32(4) ,243-257.
- Birembaux J. (2017). *Conseils à l'officine : prévention des infections alimentaires chez les populations à risque*. Thèse de doctorat en pharmacie. Lille : université de Lille2. 66p.
- Boisset S, Vandenesch F.(2010). *Les facteurs de virulence autres que les entérotoxines, in Staphylococcus aureus*. TEC et DOC, Paris. France.
- Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A.(2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 38 (4), 504-509.
- Bose S, Khodke M, Basak S, Mallick SK. (2009). *Detection of Biofilm Producing Staphylococci: Need Of The Hour*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 1915 Dec; (3):1915-1920.
- Bosgiraud C, (2003). *Microbiologie général et santé, association des enseignants de microbiologie et d'immunologie des facultés de pharmacie, édition ESKA*. p277-292, p412-404.

C

- Cha JO, Yoo JI, Yoo JS, Chung HS, Park SH, Kim HS, et al.(2013). Investigation of biofilm formation and its association with the molecular and clinical characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 4(5), 225-232.
- Callegan MC, Lee SE, Hill JM, James MH, O'Callaghan RJ. (1994). *Corneal Virulence of Staphylococcus aureus: Roles of Alpha-Toxin and Protein A in Pathogenesis*. *Infection and immunity*, vol.62 p. 2478-2482.
- Carfora. V, Giacinti. G, Sagrafoli. D, Marri. N, Giangolini. G, Alba. P, Feltrin. F, Sorbara. L, Amoroso. R, Caprioli. A, Amatiste. S, Battisti. A, (2016). *Staphylococcus aureus* résistant

Références Bibliographiques

à la pénicilline et sensible à la pénicilline chez les ovins laitiers et les humains en contact : une étude intra-exploitation. [Journal de la science laitière](#). Vol 99, num 6 , p 4251-4258.

- Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*. Vol 42, Supplément 2.
- Chabenat H. (2017). Potentialité in vitro de 10 huiles essentielles, seules ou en association dans les traitements des infections bactériennes cutanées. Thèse de doctorat en pharmacie. Limoges : Université de Limoges. 137p.
- Chaby R.(2010). des endotoxines au lipopolysaccharides : structure, activité cellulaires et effets physiopathologiques, édition Lavoisier, Paris. France.
- CLSI 2021. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-First Informational Supplement M100-S21. Wayne (PA) : Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coelho SMO, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, et Souza MM. S. (2011). Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of dairy science*.94 :3305–3310.
- Collomb, A. (2011). Caractérisation de la différence de sensibilité à l'infection par *Staphylococcus aureus* de deux lignées de souris. Thèse de doctorat. Université Paul-Bâtier de Toulouse. France.
- Courvalin P.(2006). Glycopeptides et entérocoques. In : Courvalin P, Lecercq R, Bingen E. *Antibiogramme*. ESKA, Paris, 289-298
- Cunnion KM, Zhang HM, Crawford S, Frank MM.(2003). Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* interact with Membrane Complement Receptors Influences Efficiency of phagocytosis. *Infection and Immunity*. 71: 656-662.
- CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie. (2018). Résistance naturelle aux antibiotiques des principales espèces bactériennes d'intérêt médical. In : Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie /European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Edition Société Française de Microbiologie. 25-118p.

D

- David MZ, Daum RS. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*. 23, 616–687.
- Delarras C. (2007) Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier TEC & DOC. p385.
- Denis F, Cattoir V, Martin CH, Ploy M, Poyart M. (2016). Bactériologie médicale : techniques usuelles. Elsevier health science, France.
- Dinges MM, Orwin PM, et Schlievert PM. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, Vol. 13, p. 16–34.
- Douiri N, Hansmann Y, Lefebvre N, Riegel P, Martin M, Baldeyrou M, Christmann D, Prevost G, Argemi X. (2016). *Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections. *Clinical Microbiology and Infections*. 22 (8), 747e748.
- Dubas. M, (2008). virulence de *Staphylococcus aureus* et des *Listeria*, Association des anciens élèves de l'institut Pasteur, 50 ème année, num 195.

E

- EL Kouri D, Pottier MA, Trewick D, Le Gallon F, Baron D, Potel G. (1998). Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *Encyclopedie Médecine* (Elsevier, Paris), Maladies Infectieuses. 8. 7-8.
- Elmonir W, Essa H, El-Tras WF.(2019). Ecology of *Staphylococcus aureus* and its antibiotic resistance genes in dairy farms: contributing factors and public health implications. *Slov Vet Res*, 56 (Suppl 22): 747–54.
- Espinosa-Gongora C, Harrison EM, Moodley A, Guardabassi L et Holmes MA. (2015). MRSA carrying *mecC* in captive mara. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 70, 1622–1624.
- Eveillard M. Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat en biologie cellulaire. Université d'Angers, France. pp : 123.

F

- Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*. 3 (12) :948-958.
- Foster, T.J., Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 6 (12). 484-488.

G

- Garipcin M, Seker E. (2015). Nasal Carriage Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Cattle And Farm Workers In Turkey. *Veterinarski Arhiv*. 85 (2), 117-129.
- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J.(1998). Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (4), 1371e1414.
- Gomez MI, O'Seaghda M, Magargee M, Foster TJ, Prince AS.(2006). *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, pp. 20190-20196.
- Gordon RJ, Lowy FD. (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*. Vol 46.P.350-359.
- Grace D, Fetsch A.(2018). *Staphylococcus aureus* A foodborne pathogen: Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: An overview, in: Fetsch, A. (ed.), *Staphylococcus aureus*. Academic Press. Cambridge, MA, pp. 3-10.
- Guiraud JP, Rosec JP. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Edition AFNOR, Paris. p 168-178.
- Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. volume 10, article 107.

H

- Hadjirin NF, Lay EM, Paterson GK, Harrison E.M, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA.(2015). Detection of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in retail pork, United Kingdom, February 2015. *Eurosurveillance*. 20, 21156.
- Haran KP, Godden SM, Boxrud D, Jawahir S, Bender JB, Sreevatsan S. (2012). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant

Staphylococcus aureus, isolated from bullk tank milk from Minnesota dairy farms. Journal of Clinical Microbiology. 50, 688-695.

- Heilmann C. (2011). Adhesion Mechanisms of *Staphylococci*. Medicine and Biology. 715, 105-123.
- Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H. (2002). Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology. 292, 600-604.

J

- Julie B. (2017). Rôles coopératifs du peptidoglycane et des acides teichoïques dans le remodelage de la paroi et la division cellulaire de *Streptococcus pneumoniae*. Sciences agricoles. Université Grenoble Alpes.
- Jensen SO, Lyon BR. (2009). Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. Future Microbiology. 4 (5), 565-582.

K

- Kasten MJ. (1999). Clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol. Mayo Clinic Proceedings. 74. 825-33
- Kehrenberg C, Cuny C, Strommenger B, Schwarz S, Witte W. (2009). Methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 53(2): 779-81.
- Kiptoo Kiplagat V. (2012). Profil de sensibilité aux antibiotiques des isolats de *Staphylococcus aureus* des hémocultures, cathéters et des prélèvements de pus à l'Hôpital Militaire d'instruction Mohammed V-Rabat. Thèse de doctorat en pharmacie. Maroc: Université Mohammed V, 37p.

L

- Leclerc H, Gaillard JL, Simonet M. (1995). Microbiologie générale. Ed. DOIN. Paris. France.
- Leclercq R. (2002). Résistance des staphylocoques aux antibiotiques, club d'infectiologie, éditions scientifiques et médicales. Ed. Elsevier SAS ; 21, p375-383.
- Le Loir Y et Gautier M, (2010). « Monographie de la microbiologie : *Staphylococcus aureus* ». TEC et DOC, Lavoisier, Paris.

- Le Minor L, Veron M. (1990). Bactériologie Médicale«*Staphylococcus et Micrococcus*» J. Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. 3. 773- 794.
- Lim D, Strynadka NC.(2002). Structural basis for the b lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nature Structural and Molecular Biology. 9 (11), 870.
- Lin YC, Peterson ML.(2010). New insights into the prevention of staphylococcal infections and toxic shock syndrome.Expert Review of Clinical Pharmacology.3, p753-767.
- Locatelli C, Cremonesi P, Caprioli A, Carfora V, Ianzano A, Barberio A, Morandi S, Casula A, Castiglioni B, Bronzo V, Moroni P.(2017). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herd. Journal of DairyScience. 100:1–12
- Long JP, Hart J, Albers W,Karpal FA. (2010). « Les Facteurs de Virulence Autres que les Entérotoxines », in « *Staphylococcus aureus* ».Tec et Doc, Paris.
- LPSN, List of Prokaryoticnameswith Standing in Nomenclature - Genus, *Staphylococcus* (2017) [en ligne], Disponiblesur: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>

M

- McCallum N, Berger-Bächi B, Senn MM. (2010) Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of MedicalMicrobiology. 300(2-3):118–129.
- Mainardi JL. (2015). « Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques/ session interactive autour de l'antibiogramme». Unité Mobile de Microbiologie Clinique, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges pompidou et faculté de medecine paris rené descartes.
- Mairi A, Touati A, Pantel A, Zenati K, Martinez AY, Dunyach-Remy C, SottoA, LavigneJP. (2019). Distribution of Toxinogenic Methicillin Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* from Different Ecological Niches in Algeria. Toxins (Basel). 11(9), 500.
- Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. (2018). Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by Staphylococcal clinical isolates. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3820-9>.
- Mattsson E, Heiko H, Lars B, Arne E. (2002). Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces tissue factor expression and procoagulant activity in human monocytes. Infection Immunity. 70(6). 3033-9.

- Mendes S. (2005). Etude des variants métaboliques dans le genre *Staphylococcus*, caractérisation in vitro et étude prospective in vivo. Thèse de doctorat en Médecine. Nantes : Université de Nantes. 112p.

N

- Nehal M, Zuel-Fakkar MD, Mona H, El-Shokry MD. (2010). Study of Erythroderma and Psoriasis Exacerbation by Staphylococcal Superantigen. *Journal of Egyptian Women's Dermatologic Society*. 7,113-117.

O

- O'riordan K, Lee JC, (2004). *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*. 17 :218-234.
- Otto M. (2012) MRSA virulence and spread. *Cellular Microbiology*. 14, 1513-1521.
- Otto M. (2018). Staphylococcal biofilms. *Microbiology Spectrum*. 6.

P

- Pancholi, V. (2002). « Staphylococcal Extracellular / Surface Enzymatic Activity », in « *Staphylococcus aureus* Infection and Disease », Kluwer Academic Publishers, New York
- Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, Kotzamanidis C, Zdragas A, Papa A, Filioussis G, Sergelidis D. (2018). Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece. *International Journal of Food Microbiology*. 291:35–41.
- Parisi A, Caruso M, Normano G, Latorre L, Sottili R, Miccolupo A, Fraccalvieri R, Santagada G. (2016). Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from Southern Italy. *Food Microbiology*. 58, 36-42.
- Paterson GK, Morgan FJE, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA. (2014). Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69, 598–602.

- Prescott JF, Baggot JD, Walker RD. (2000). Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In: Iowa State University Press. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Edition. Pp27-49.
- Prescott LM, Harley JP, Klein D, Bacq-calberg CM, DusartJ.(2002).« Microbiologie », 5 ème édition, De Boeck.
- Prevost, G. (2004). Toxins in *staphylococcus aureus* pathogenesis .proft (Ed), Microbial toxins: molecular and cellular biology, Horizon bioscience. 243-284.
- Price JR, Cole K, Bexley A, Kostiou V, Eyre DW, Golubchik T, Wilson D, Crook DW, Walker S, Timothy E, John P, Llewelyn MJ. (2016). Transmission of *Staphylococcus aureus* between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing. The Lancet Infectious Diseases.17(2). 207-214.

Q

- Quincampoix JC, Mainardi J L.(2001).Mécanismes de résistance des cocci à gram positif. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. 10, 267-275

R

- Rachel J, Lowy G et Lowy FD.(2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection.Clinical Infectious Diseases.46,S350–9.
- Rhee CH, Woo GJ. (2010). Emergence and characterization of foodborne methicilline resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. Journal of Food Protection. 73: 2285-90.
- Ross Fitzgerald, J. (2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. Trends in Microbiology. 20(4), 192-198.

S

- Schlievert PM, Kristi L, Strandberg Ying-Chi Lin, Marnie L, Peterson, Pharm D, Donald YM, Leung MD.(2010). Secreted virulence factor comparaison between methicillin resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. Journal of Allergy ClinicalImmunology. 125,9-49.

Références Bibliographiques

- Schwarz S, Chaslus-dancla E.(2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Journal Veterinary Research*. 32,201-25.
- Seyffert N, Le Marechal C, Jardin J, McCulloch JA, Rosado FR, Miyoshi A, Even S, Jan G, Berkova N, Vautor E, Thiery R, Azevedo V, Le Loir Y. (2012). *Staphylococcus aureus* proteins differentially recognized by the ovine immune response in mastitis or nasal carriage. *Veterinary Microbiology*. 157:439–447.
- Speck PG, Wormald PJ. (2018). Is phage therapy suitable for treating chronic sinusitis *Staphylococcus aureus* infection. *Future microbiology*,13(6), 605-608.
- Singleton P. (2005). *Bactériologie pour la médecine, la Biologie et les biotechnologies*, 6ème Ed. Dunod, Paris.
- Sköld O.(2000). Sulfonamide Resistance: Mechanisms and Trends, *Drug Resistance Update*. 3, 155-160
- Soell M, Diab M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Herbelin C, Poutrel B.(1995). Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines *Infection Immun*. 63: 13801386.
- Stewart GC, Rosenblum ED.(1980). Genetic behavior of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 144 (3), 1200e1202.
- Stephan H, Gillespie, Hawkey PM. (2006). *Principles and Practice of clinical Bacteriology*. 2^{ème} Ed. Wiley office, England. pp 586.

T

- Tally FP.(1993).Les Staphylocoques : Abcès et Autres Maladies, in *Microbiologies et Pathologies Infectieuses*, DeBoeck, Paris.
- Tam K et Torres VJ. (2019). *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins & Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr*. 7(2).
- Tankovic J, Aubry-Damon H, Leclercq R. (1997). Résistance aux antibiotiques autres que les béta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. *Médecin Maladie Infectieuse*. 27, Spécial. 207-16.
- Titouche Y, Hakem A, Houali K, Meheut T, Vingadassalon N, Ruiz-Ripa L, Salmi D, Chergui A, Chenouf N, Hennekinne JA, Torres C, et Auvray F. (2019). Emergence of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) ST80 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. *Journal of dairy science*.102: 6876-6884.

V

- VanEperen AS, Segreti J.(2016). Empirical therapy in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an up-to-date approach. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 22, 351–359.
- Van Belkum A, Damian CM, Jan N, Willem B, Van Leeuwen, Willem VW, Margreet C, Vos, Heiman FL, Wertheim 1, Verbrugh HA. (2008). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*.9(1), 32-47.
- Verkade E, Kluytmans J.(2014). Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. *Infection Genetic and Evolution*. 21, 523–530.
- Vieu G. (2014). Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Étude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse iii – Paul Sabatier. Faculté des sciences pharmaceutiques.
- Vincenot F, Saleh M, Prevost G. (2008).« Les Facteurs de Virulence de *Staphylococcus aureus* », *Revue Francophone des Laboratoires*. 407, 61-69.
- Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, et al.(2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*. 123(4), 1003-18.

W Y Z

- Watkins RR, David MZ, Salata RA. (2012). Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.*Journal in Medical Microbiology*. 61, 1179-93.
- Wertheim HFL, Melles DC, VosM C, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HV, Nouwen JL. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*. 5, 751–62.
- Yang X, Qian S, Yao K, Wang L, Liu Y, Dong F,et al.(2017). Multiresistant ST59-SCCmec IV-t437 clone with strong biofilm-forming capacity was identified predominantly in MRSA isolated from Chinese children. *BMC Infectious Diseases*. 17(1), 733.

Références Bibliographiques

- Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. (2010). A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New microbiologica*. 33:137-145.

ANNEXES

Annexes 1 : Milieux de culture utilisés et leur composition

Gélose de Baird-Parker

Peptone pancréatique de caséine	10 g
Extrait de levure	1g
Extrait de viande.....	5g
Pyruvate de sodium	10g
Chlorure de lithium	5g
Glycine	12g
Gélose.....	15g
Eau distillée	1000ml

ph = 6,8. Stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

Utiliser des œufs frais de poule dont la coquille est intacte.

- Nettoyer les œufs avec une brosse et un détergent liquide, puis rincer à l'eau courante.
- Désinfecter l'œuf en le plongeant dans une solution d'éthanol à 70% pendant 30s, puis en les laissant sécher à l'air libre ou réaliser un flambage.
- Aseptiquement, casser chaque œuf et séparer le blanc du jaune par transferts répétés de demi-coquille à l'autre.
- Recueillir les jaunes d'œufs dans un récipient stérile et compléter avec quatre fois leur volume d'eau distillée stérile. Homogénéiser vigoureusement.
- Chauffer le mélange à 47°C pendant 2h. - Entreposer à 3°C ± 2°C pendant 18 à 24h, le temps nécessaire pour la formation d'un précipité.
- Recueillir stérilement dans un flacon le surnageant constituant l'émulsion (Durée de conservation est au maximum 72h à 3°C ± 2°C).

Composition du milieu complet

Milieu de base (Baird- Parker)	100ml
Solution de tellurite de potassium	1ml
Émulsion de jaune d'œuf.....	5ml

Bouillon Coeur cervelle (BHIB)

Extrait cœur- cervelle	17g
Peptone pancréatique de gélatine	10g
NaCl	5g
Phosphate disodique.....	2,5g
Glucose.....	2g

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.
Pour l'obtention du milieu solide BHI,

Gélose BHA (Brain Heart Infusion Agar)

Composition en g/l

Peptone pancréatique de gélatine	10
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique.....	2,5
Glucose.....	2
Agar.....	15

PH du milieu prêt à l'emploi 7.4 +/- 0.2 à 25°C

Préparation : mettre en solution 37g de milieu BHI déshydraté dans 1l d'eau distillée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète, répartir le milieu dans des flacons puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minute à 120°C.

Gélose à ADN

Hydrolysats tryptique de caséine.....	20 g
AND	2g
NaCl	5g
Gélose.....	1,2g
Eau D.....	1000ml

Préparation : 39 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.

Muller Hinton

Hydrolysats acide de caséine	17,5g
Infusion de viande	2g
Amidon soluble	1,7g
Agar bactériologique	17g

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.

Bouillon TSB (Bouillon Tryptone Soja)

Composition

Peptone de caséine	17g
Peptone de soja.....	3g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate dipotassique	2,5g
Glucose monohydraté.....	2,5g

pH 7.3 ± 0.2

Préparation

30 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C, 15 min

Cristal violet (0.5%) (Biochem Chemopharma, Nièvre, France)

Cristal violet0,5g

Eau distillée100ml

Tampon PBS (Phosphate Buffered Saline)Na₂HPO₄7mMNaH₂PO₄3mM

NaCl130mM

pH= 7.4

Annexe 2 : Résultats de l'identification biochimique des colonies caractéristiques.

Tests souches	Catalase	ADNase	Coagulase	Code
C2 E3 PV3	+	+	+	S578
C1 E3 PV2	+	+	+	S579
C1 E3 PV4	+	+	+	S580
C2 E3 PV2	+	+	+	S581
C3 E3 PV2	+	+	+	S582
C3 E3 PV3	+	+	+	S583
C2 E3 PV4	+	+	+	S584

Suite Annexe 2

C1 E2 V4	+	+	+	S585
C1 E2 V1	+	+	+	S586
C3 E2 V1	+	+	+	S587
C3 E3 PV4	+	+	+	S588
C2 E2 V1	+	+	+	S589
C4 E3 PV4	+	+	+	S590
C2 E2 V4	+	+	+	S591

C3 E6 V2	+	+	+	S592
C3 E6 PV4	+	+	+	S593
C3 E6 PV2	+	+	+	S594
C2 E7 PV2	+	+	+	S595
C2 E6 PV5	+	+	+	S596
C3 E7 PV2	+	+	+	S597
C3 E6 PV5	+	+	+	S598
C2 E6 PV4	+	+	+	S599
C3 E6 PV3	+	+	+	S600
C1 E6 PV4	+	+	+	S601
C1 E6 PV3	+	+	+	S602
C2 E6 PV3	+	+	+	S603
C2 E10 PV1	+	+	+	S604
C3 E10 PV1	+	+	+	S605
C4 E12 V1	+	+	+	S606
C1 E12 V2	+	+	+	S607
C2 E12 V2	+	+	+	S608
C3 E12 V2	+	+	+	S609
C4 E12 V2	+	+	+	S610
C1 E10 PV1	+	+	+	S611
C1 E10 PV2	+	+	+	S612
C2 E10 PV2	+	+	+	S613
C3 E10 PV2	+	+	+	S614

+ : Positif ; C : Colonie ; E : Elevage ; E2 : Freha, E3 : Maâtkas , E6 : Hendou ; E7 : Hendou, E10 : Azazga , E12 : Azazga ; PV : Petit veau ; V : Vache.

Annexe 3 : résultats de l'antibiogramme des souches de *S. aureus* isolées.

ATB Souches	P	FOX	N	GM	ERY	TET	CIP	CHL	SXT
S578	17 ^R	26 ^S	18 ^S	22 ^S	30 ^S	34 ^S	31 ^S	30 ^S	30 ^S
S579	14 ^R	24 ^S	17 ^R	24 ^S	34 ^S	34 ^S	29 ^S	26 ^S	32 ^S
S580	18 ^R	28 ^S	24 ^S	29 ^S	36 ^S	37 ^S	34 ^S	34 ^S	39 ^S

Annexes

S581	15 ^R	28 ^S	17 ^R	20 ^S	29 ^S	35 ^S	30 ^S	28 ^S	28 ^S
S582	12 ^R	28 ^S	22 ^S	22 ^S	35 ^S	35 ^S	28 ^S	33 ^S	30 ^S
S583	15 ^R	29 ^S	16 ^R	21 ^S	30 ^S	36 ^S	29 ^S	31 ^S	29 ^S
S584	15 ^R	28 ^S	17 ^R	20 ^S	29 ^S	35 ^S	30 ^S	30 ^S	28 ^S
S585	44 ^S	28 ^S	28 ^S	28 ^S	29 ^S	34 ^S	37 ^S	30 ^S	32 ^S
S586	14 ^R	28 ^S	9 ^R	23 ^S	28 ^S	33 ^S	23 ^S	30 ^S	33 ^S
S587	18 ^R	27 ^S	11 ^R	25 ^S	32 ^S	32 ^S	31 ^S	29 ^S	30 ^S
S588	15 ^R	27 ^S	19 ^S	26 ^S	35 ^S	30 ^S	29 ^S	31 ^S	31 ^S
S589	11 ^R	23 ^S	11 ^R	27 ^S	31 ^S	32 ^S	31 ^S	28 ^S	30 ^S
S590	11 ^R	29 ^S	21 ^S	24 ^S	35 ^S	34 ^S	31 ^S	32 ^S	32 ^S
S591	24 ^R	39 ^S	23 ^S	27 ^S	32 ^S	36 ^S	36 ^S	32 ^S	26 ^S
S592	15 ^R	26 ^S	23 ^S	25 ^S	33 ^S	24 ^S	34 ^S	31 ^S	34 ^S
S593	17 ^R	24 ^S	25 ^S	26 ^S	34 ^S	36 ^S	36 ^S	35 ^S	41 ^S
S594	12 ^R	30 ^S	24 ^S	27 ^S	32 ^S	31 ^S	36 ^S	33 ^S	39 ^S
S595	11 ^R	30 ^S	24 ^S	28 ^S	29 ^S	27 ^S	35 ^S	27 ^S	36 ^S
S596	11 ^S	28 ^S	25 ^S	28 ^S	30 ^S	28 ^S	33 ^S	32 ^S	36 ^S
S597	12 ^R	30 ^S	25 ^S	26 ^S	17 ^L	30 ^S	35 ^S	29 ^S	34 ^S
S598	12 ^R	28 ^S	26 ^S	26 ^S	36 ^S	29 ^S	32 ^S	30 ^S	38 ^S
S599	11 ^R	27 ^S	25 ^S	28 ^S	32 ^S	30 ^S	37 ^S	34 ^S	37 ^S
S600	13 ^R	29 ^S	25 ^S	21 ^S	35 ^S	29 ^S	35 ^S	27 ^S	31 ^S
S601	13 ^R	28 ^S	19 ^S	21 ^S	27 ^S	29 ^S	34 ^S	30 ^S	29 ^S
S602	14 ^R	32 ^S	19 ^S	23 ^S	30 ^S	31 ^S	35 ^S	30 ^S	32 ^S

Suite Annexe 3

S603	14 ^R	30 ^S	22 ^S	28 ^S	29 ^S	29 ^S	35 ^S	28 ^S	29 ^S
S604	7 ^S	23 ^S	18 ^S	19 ^S	27 ^S	26 ^S	31 ^S	30 ^S	29 ^S
S605	11 ^R	21 ^R	20 ^S	23 ^S	25 ^S	26 ^S	31 ^S	27 ^S	30 ^S
S606	9 ^R	19 ^R	25 ^S	28 ^S	29 ^S	6 ^R	6 ^R	30 ^S	32 ^S
S607	15 ^R	27 ^S	22 ^S	25 ^S	26 ^S	7 ^R	34 ^S	29 ^S	30 ^S
S608	9 ^R	27 ^S	19 ^S	22 ^S	26 ^S	26 ^S	27 ^S	25 ^S	27 ^S
S609	14 ^R	23 ^S	21 ^S	24 ^S	27 ^S	27 ^S	31 ^S	27 ^S	30 ^S

S610	11 ^R	29 ^S	22 ^S	23 ^S	25 ^S	27 ^S	31 ^S	26 ^S	28 ^S
S611	10 ^R	28 ^S	25 ^S	28 ^S	30 ^S	20 ^S	32 ^S	25 ^S	29 ^S
S612	12 ^R	28 ^S	23 ^S	23 ^S	26 ^S	22 ^S	30 ^S	28 ^S	26 ^S
S613	11 ^R	27 ^S	24 ^S	26 ^S	29 ^S	16 ^I	28 ^S	25 ^S	25 ^S
S614	13 ^R	30 ^S	25 ^S	24 ^S	30 ^S	19 ^S	29 ^S	29 ^S	33 ^S

S : sensible ; **R** : résistante ; **I** : intermédiaire.

Annexe 4 : Valeurs des diamètres de zone d'inhibition selon le CLSI et la CASFM.

Famille	Antibiotiques	Diamètre critique			Références
		Sensible	Intermédiaire	Résistant	
β-lactamines	Pénicilline G	≥29	-	≤28	CLSI02021
	Céfoxitine	≥22	-	≤21	CLSI02021
Aminoglycoside	Gentamycine	≥15	13-14	≤12	CLSI02021
	Néomycine	≥18	-	<18	CASFM 2018
Macrolides	Erythromycine	≥23	14-22	≤13	CLSI02021
Tétracyclines	Tétracycline	≥19	15-18	≤14	CLSI02021
Quinolones	Ciprofloxacine	≥21	16-20	≤15	CLSI02021
Phénicol	Chloramphénicol	≥18	13-17	≤12	CLSI02021
Inhibiteurs de synthèse de l'acide folique	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	≥16	11-15	≤10	CLSI02021

Annexe 5: Résultats du test de la formation de biofilm *in vitro*.

Souches	Valeurs de DO			Moyenne des DO
	1 ^{er} puits	2 ^{eme} puits	3 ^{eme} puits	
S578	1,490	1,593	1,618	1,567
S581	1,447	1,379	1,471	1,469
S583	1,293	1,602	2,528	2,065
S584	2,398	2,623	1,782	2,545
S585	0,728	0,755	2,112	0,741
S586	2,277	2,756	2,324	2,452
S587	2,167	1,497	0,891	1,832

Annexes

S588	1,665	1,461	1,482	1,536
S589	2,903	1,211	1,136	1,173
S590	1,437	1,570	1,551	1,519
S591	1,585	1,554	1,950	1,696
S592	0,318	0,546	0,322	0,320
S593	0,485	0,393	0,457	0,471
S594	0,302	0,374	0,389	0,355
S595	0,781	0,741	0,751	0,575
S596	0,397	0,424	0,400	0,412
S597	0,651	0,682	0,639	0,657
S598	0,456	0,385	0,332	0,421
S599	0,464	0,405	0,493	0,479
S600	0,557	0,421	0,561	0,559
S601	0,376	0,307	0,252	0,311
S602	0,457	0,439	0,402	0,432
S603	0,457	0,411	0,489	0,452
S604	0,125	0,158	0,233	0,196
S605	0,294	0,293	0,307	0,298
S606	0,384	0,574	0,433	0,503
S607	0,199	0,175	0,195	0,197
S608	0,394	0,303	0,307	0,305
S609	0,270	0,362	0,247	0,293
S610	0,311	0,335	0,344	0,330

Suite Annexe 5

S611	0,876	0,963	0,624	0,920
S612	1,092	1,163	1,097	1,118
S613	1,297	1,224	1,236	1,252
S614	0,512	0,652	0,553	0,572