

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Agronomiques et des Sciences Biologiques
Département de Biochimie et Microbiologie

Mémoire :

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

Prévalence et antibiorésistance des souches de
***Staphylococcus aureus* résistantes à la**
méthicilline (SARM) dans le lait cru et les
produits laitiers

Présenté par :

HABERA Dalila
BAHMED Hayat

Soutenu le 17/09/2017 devant le jury :

Présidente : M^{me} HELLAL Z.

Encadreur : Mr TITOUCHE. Y., MAA à l'UMMTO

Examinatrice : M^{elle} DERMECHE S.

Examinatrice : M^{elle} ASMAMI K.

Promotion : 2016/2017

Remerciements

Nous tenons à présenter notre profond respect et notre reconnaissance à notre promoteur monsieur TITOUCHE YACINE, maitre assistant à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi Ouzou, pour son encadrement fructueux, sa générosité, son suivi au cours de notre travail. Et pour les précieuses informations, conseils et moyenne qu'il a mis a notre disposition.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements aux membres de jurys pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail.

A tout personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, accepte nos grands et sincères remerciements.

Dédicace

Avec un énorme plaisir et un cœur ouvert que je dédie ce travail

- Spécialement à mes grands parents.
- A ma mère et mon père.
- A mes frères et sœurs et toute la famille.
- A tout mes amis spécialement fatima et dihia et hayat.
- Ainsi a toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.

HABERA Dalila

Dédicace

Tout au début, je tiens a remercier le bon dieu de m'avoir donné du courage et de la patience afin de réaliser ce travail que je dédié ;

- A mes chers parents
- Mes frères et sœurs
- Mes amies et aussi à ma binôme Dalila.

Hayat BAHMED

Résumé

Le but de cette étude est d'isoler des souches de *S. aureus* du lait cru et de produits laitiers, puis l'étude de leurs résistances aux antibiotiques. Pour cela, 52 échantillons ont été collectés et soumis à la recherche de *S. aureus*. L'isolement a été effectué sur gélose Baird Parker, suivi d'une identification biochimique des isolats. L'étude de la résistance aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller Hinton, selon les recommandations du CLSI (2016).

La prévalence totale de *S. aureus* dans nos échantillons était faible (48.08%), sur un nombre total de 52 échantillons et 55 souches ont été isolées. Une forte résistance vis-à-vis de la pénicilline G (94.54 %). Des résistances relativement faibles ont été observées vis-à-vis de la tétracycline, la tobramycine et la néomycine, avec des pourcentages de 18.18%, 10.90% et 10.90% respectivement. Aucune résistance vis-à-vis de la vancomycine, le triméthoprime/sulfaméthoxazole, l'ofloxacine, la clindamycine, et la lincomycine. Une seule souche SARM (1.88%) a été isolée.

Les résultats de cette étude révèlent que la consommation du lait cru et de produits laitiers traditionnels peut présenter un risque potentiel pour la santé des consommateurs. Pour cela, l'application de bonnes pratiques d'hygiène et de production sont nécessaires pour améliorer la qualité des denrées alimentaires.

Mots clés: *S. aureus*, lait cru, produits laitiers, antibiotiques, SARM

Abstract

The aim of this study is to isolate *S. aureus* strains from raw milk and dairy products and to study their resistance to antibiotic molecules. For this, 52 samples were collected and submitted to the search of *S. aureus*. The isolation of strains was performed in Baird Parker media. Resistance to antibiotics was realized by discs diffusion on Mueller Hinton agar according to the guidelines of CLSI (2016).

The total prevalence of *S. aureus* in our samples was low (48.08%), out of 52 samples and 53 strains were isolated. A highest resistance was observed against penicillin G (94.54%). A slight resistances were observed to tetracyclin (18.18%), tobramycin (10.90%) and neomycin (10.90%). No resistance to vancomycin, trimethoprim/sulfamethoxazol, ofloxacin, clindamycin and lincomycin was observed. Only one MRSA strain was isolated.

The results of this study revealed that consumption of raw milk and dairy products may be present a public health hazards for consumers. For these, application of good hygienic practices and a good manufacturing practice are necessary to improve the quality of foods.

Keywords: *S. aureus*, raw milk, dairy products, antibiotics, MRSA

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو عزل سلالات المكورات العنقودية الذهبية من الحليب الخام ومنتجات الألبان ودراسة مقاومتها للمضادات الحيوية. لهذا الغرض، تم جمع 52 عينة واختبار وجود هذه البكتريا الذهبية. تم عزلها باستخدام وسط بيرد باركر متنوعة بالتعرف الكيميائي الحيوي للعزلات. وقد أجريت دراسة مقاومة المضادات الحيوية باستخدام الوسط أجار مولر هينتون، على النحو الموصى به من قبل CLSI (2016).

وكان معدل الانتشار الكلي ل S. أوربوس في عيناتنا منخفضة (48.08%)، من أصل 52 عينة و 55 سلالة تم عزلها. وجدنا مقاومة قوية بالنسبة للبنسلين (94.54) %. وقد لوحظت مقاومات منخفضة نسبيا لتترايسكلين والتوبراميسين والنيوميسين، وبنسب مئوية 18.18% و 10.90% و 10.90% على التوالي. لا مقاومة للفانكوميسين، تريمتوبريم / سلفاميثوكسازول، أوفلوكساسين، كلينداميسين، و لينكوميسين. تم عزل سلالة واحدة فقط مقاومة للمتيسيلين (1.88%).

وتبين نتائج هذه الدراسة أن استهلاك الحليب الخام ومنتجات الألبان التقليدية قد يشكل خطرا صحيا محتملا على المستهلكين. ويتطلب ذلك تطبيق ممارسات صحية جيدة لتحسين نوعية المواد الغذائية.

الكلمات المفتاحية: S. أوربوس، الحليب الخام، منتجات الألبان، المضادات الحيوية، SARM

Sommaire

Remerciements

Résumé

Liste des abréviationsi

Liste des tableaux et figures ii

Introduction 1

Chapitre I: Généralité sur les *Staphylococcus aureus* 2

1. Historique..... 2

2. Habitat..... 2

3. Classification..... 2

4. L'espèce de *Staphylococcus aureus*..... 3

4.1 Caractères morphologiques..... 3

4.2 Caractères culturels..... 3

4.3 Caractères biochimiques 3

5. Facteurs de virulence..... 4

5.1 Composants de surface..... 4

5.1.1 Peptidoglycane 5

5.1.2 Acides teichoïques..... 5

5.1.3 Exopolysaccharides capsulaires 6

5.2 Facteurs d'invasion et d'adhésion..... 6

5.2.1 Protéine A (Spa) 7

5.2.2 Protéine de liaison au collagène (Cna)..... 7

5.2.3 Protéine de liaison au fibrinogène (ClfA et ClfB) 7

5.2.4 Protéine de liaison au fibronectine (FnBA et FnBB) 7

5.3 Substances élaborées par *S.aureus*..... 7

5.3.1 Enzymes 7

5.3.2 Toxines 8

Chapitre II : Résistance de *S.aureus* aux antibiotiques..... 12

1. Historique.....	12
2. Définition	12
3. Critère de classification des antibiotiques	12
Origine.....	12
3.2 Spectre d'activité.....	12
3.3 Mode d'action	12
4. Mode d'action des antibiotiques	13
4.1 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.....	13
4.1.1 Mode d'action des bêtalactamines	13
4.1.2 Mode d'action des glycopeptides.....	14
4.1.3 Mode d'action des fosfomycines.....	14
4.2 Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines	14
4.2.1 Mode d'action des aminosides	14
4.2.2 Mode d'action des macrolides, des lincosamines et des streptogramines ...	14
4.2.3 Mode d'action des tétracyclines.....	15
4.2.4 Mode d'action des rifampicines	15
4.3 Mode d'action des antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'acide désoxyribonucléiques	15
4.3.1 Mode d'action des quinolones.....	15
4.3.2 Mode d'action des imidazolés.....	15
4.3.3 Mode d'action de l'association de sulfamides triméthoprimes.....	16
4.4 Les antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique.....	16
4.1.1 Mode d'action des Polymixines	16
5. Résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques.....	16
5.1 Définition de la résistance bactérienne	16
5.2 Support génétique de la résistance bactérienne.....	16
5.2.1 Naturelle.....	16
5.2.2 Acquise.....	16

5.3 Principaux modes de résistances des bactéries	17
5.3.1 Phénomène d'imperméabilité.....	17
5.3.2 Phénomène d'efflux	17
5.3.3 Défaut d'affinité	17
5.3.4 Résistance par modification enzymatique.....	17
5.4 Mécanismes de résistance de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques.....	17
5.4.1 Résistance aux bêtalactames	17
5.4.2 Résistance aux aminosides	18
5.4.3 Résistance aux quinolones	18
5.4.4 Résistance aux glycopeptides.....	18
5.4.5 Résistance aux tétracyclines.....	19
5.4.6 Résistance aux macrolides, lincosamines et streptogramines.....	19
5.4.7 Résistance aux acides fusidiques.....	19
5.4.8 Résistance aux rifampicines	19
5.4.9 Résistance aux sulfamides triméthoprimes	19
Partie expérimentale	20
Chapitre I: Matériels et méthodes	20
1. Matériels.....	20
2. Milieux de culture et réactifs.....	20
3. Méthodes	20
3.1 Objectif.....	20
3.2 Durée et lieu d'étude	21
3.3 Nature des échantillons et leurs sites de prélèvements	21
3.4 Transport et conservation des échantillons	21
3.5 Recherche de <i>S .aureus</i>	21
3.5.1 Isolement	21
3.5.2 Purification des souches isolées	21

3.5.3 Aspect microscopique des colonies (coloration de Gram)	22
3.5.4 Identification biochimique des isolats.....	22
4. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	23
5. Test du screening à l'Oxacilline.....	25
6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide vis-à-vis de l'Oxacilline	26
7. Conservation des souches	26
Chapitre II: Résultats et discussion.....	28
1. Résultats	28
1.1 Prévalence de <i>S.aureus</i>	28
1.2 Résistance des souches de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques	28
2. Discussion	32
Conclusion.....	37
Bibliographie	
Annexes	

Liste des abréviations

LPS lipopolysaccharides

NAM Nacéthymuramique

NAG Nacéthylglucosamine

Cna Collagen binding protein

PLV Leucocidine de Panton et Valentin

Fbp Proteïne liant la fibronectine

CMH Complexe majeur d'histocompatibilité

LT4 lymphocytes T4

SE Entérotoxines staphylococciques

SCT Syndrome du choc toxique

TSST1 toxine de syndrome choc toxique

ETs exfoliatine

Cap capsule

PLP Protéine liant les pénicillines

CMI Concentration minimale inhibitrice

SARM *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline

Ig Immunoglobuline

BP Baird-Parker

BHI Brain Heart Infusion

BHIB Brain Heart Infusion Broth

MH Muller-Hinton

Liste des tableaux et figures

Tableaux

Tableau I : Principaux caractères permettant de différencier les espèces de <i>Staphylococcus</i> ..	4
Tableau II: Les facteurs de virulence des <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Tableau III : Liste des antibiotiques testés.....	24
Tableau IV: Incidence de <i>S.aureus</i> selon le type de produit.....	28
Tableau V: Incidence de <i>S.aureus</i> selon l'origine des échantillons.....	28
Tableau VI: Résistance des souches de <i>S. aureus</i> (n=55) aux antibiotiques testés.....	29
Tableau VII : Phénotypes de résistance des souches de <i>S. aureus</i> isolées.....	30

Figures

Figure1 : observation de <i>S.aureus</i> sous microscope électronique à balayage au G x34000....	3
Figure2 : Pouvoir pathogène de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Figure3 : Les étapes de formations de biofilm chez les <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Figure 4 : Mécanisme d'action des superantigènes des Staphylococciques	9
Figure 5 : mode d'action des antibiotiques.....	13
Figure 6: Screening à l'oxacilline.....	26
Figure 7 : Schéma récapitulatif de la méthodologie suivie pour la recherche et l'identification de <i>S.aureus</i>	27
Figure8 : Screening à l'oxacilline de <i>S. aureus</i>	31
Figure 9: Profil de résistance de la souche de <i>S.aureus</i> S201	32
Figure 10: Concentration minimale inhibitrice de la souche S201 en milieu solide.....	32

Introduction

Staphylococcus aureus est une cocci à Gram positif, aéro-anaérobie facultatif. Il s'agit d'un agent pathogène universel d'humains et d'animaux et provoque une grande variété de maladies allant de légères infections cutanées à des maladies plus sévères telles que la pneumonie et la septicémie (THAMMAVONGSA et al, 2015). Cette large gamme de syndromes cliniques que *S. aureus* peut causer résulte de la présence d'une variété importante de composants extracellulaires, comprenant les protéines de surfaces, la capsule, les enzymes, et les toxines (PETINAKI ET SPILIOPOULOU, 2012).

La présence permanente de cette bactérie est liée au fait que c'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des mammifères. En milieu vétérinaire, *S.aureus* est très couramment isolé, car il provoque des infections de la glande mammaire (mammites), qui posent des problèmes majeurs et des pertes économiques pour l'éleveur (BOULANGER et al, 2006).

De nos jours, le traitement et le contrôle des infections bactériennes s'effectue principalement par une antibiothérapie. Ces agents antimicrobiens sont utilisés non seulement en médecine humaine et vétérinaire, mais aussi en élevage des animaux et au niveau de certaines activités agricoles. Ils sont administrés aux animaux de rente pour inhiber les diverses infections bactériennes et accélérer leur croissance. L'utilisation non modérée et irrationnelle de ces antibiotiques a mené vers l'émergence de souches résistantes, un problème de grande ampleur notamment pour les pays développés. Parmi ces souches, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), qui constitue un problème de grande importance en termes de morbidité, de mortalité, de l'échec thérapeutique et des coûts qu'il peut causer. La résistance à la méthicilline est conférée par la présence du gène *mecA* qui code pour la production d'une protéine altérée liant la pénicilline (PLP2a), qui à son tour possède une moindre affinité à tous les antibiotiques appartenant à la famille des bêtalactamines. Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) sont reconnus d'être des agents importants de mammites chez le bétail. Au niveau des mammites subcliniques, les SARM peuvent se retrouver dans le lait, sans aucune altération de ses caractéristiques sensorielles et par conséquent se propager à travers la chaîne alimentaire. Plusieurs rapports ont décrit la prévalence des SARM dans le lait et leur transmission entre des personnes travaillant dans des fermes laitières (KREASUKON et al, 2012 ; KAMAL et al, 2013 ; CORTIMIGLIA et al, 2015 ; ROLA et al, 2015a ; BASANISI et al, 2015 ; CARFORA et al, 2015 ; PARISI et al, 2016). L'émergence de la colonisation des SARM et son lien direct avec les infections humaines ont un impact non seulement sur la production alimentaire, mais aussi sur la santé des personnes qui sont en contact direct avec les animaux. Pour cela, la surveillance et le contrôle des SARM chez l'humain et les produits d'origine animale sont recommandés.

En Algérie, peu de données sont disponibles concernant la prévalence et la sensibilité des souches de *S. aureus* d'origine alimentaire. Des investigations dans ce contexte peuvent fournir beaucoup d'informations, qui peuvent mûrir à traiter les diverses pathologies avec plus d'efficacité et par conséquent réduire l'usage des agents antimicrobiens en thérapeutique vétérinaire. L'objectif de ce travail est d'isoler des souches de *S. aureus* à partir du lait cru et de produits laitiers, puis l'étude de leurs résistances à quelques molécules d'antibiotiques dans le but de prévoir l'existence des SARM.

Chapitre I: Généralités sur les *Staphylococcus aureus*

1. Historique :

Le staphylocoque fut découvert à la fin de XIX^{ème} siècle, observé par Robert Koch en 1878. Ce dernier l'avait isolé à partir de pus de furoncle. D'après ces études, ces germes sont regroupés en amas. Deux ans plus tard, ce germe fut reconnu par Louis Pasteur comme étant un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis en double, rarement par quatre et très fréquemment associés en petits amas (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

Ce n'est qu'en 1882, que le nom *Staphylocoque* a été attribué par le chirurgien Ogston, afin de décrire ces grains regroupés en grappe de raisin. Puis, en 1884 Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries et il a divisé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon la couleur formée par les colonies. C'est à ce moment, que le nom de l'espèce « *aureus* » (or en latin), a été donné pour décrire les colonies jaune dorée obtenues (CHAKRABORTY et al, 2012)

2. Habitat :

Les *Staphylocoques* font partie des bactéries pathogènes les plus résistantes et sont difficiles à éliminer de l'environnement humain. *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal (ASSOUS et al, 1999). Habituellement commensal, mais il peut provoquer des infections (abcès cutanés, mammites). La contamination du lait peut survenir par l'intermédiaire de porteurs sains ou infectés, ou par l'environnement. Chez les bovins, *S. aureus* est isolé dans les narines. On le retrouve dans de petites lésions cutanées et dans les manchons des machines à traire. La colonisation des trayons peut entraîner l'infection de la mamelle (BRISABOI et al, 2003).

3. Classification

De point de vue taxonomique, *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes* (bactéries à Gram positif) et à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Bacillales*. Ce genre est classé au sein de groupe des *Micrococaceae* avec notamment le genre *Micrococcus*, *Planococcus* et *Stomatococcus* (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

Les membres de cette famille partagent certains caractères généraux : ce sont des cocci à Gram positif de 0,5 à 2,5µm de diamètre, qui se divisent dans des plans défectueux et de ce fait, forment très souvent des amas cellulaires irréguliers, ils sont immobiles (à l'exception de *Planococcus*) et non sporulés. Le genre *Staphylococcus* peut être différencié des autres genres de cocci à Gram positif, éventuellement rencontrés dans les aliments, par des caractéristiques moléculaires (composition chimique de la paroi et le pourcentage des bases azotées G + C) et par les caractères morphologiques et biochimiques (FEDEREGHI, 2005).

D'après LE LOIR et GAUTIER (2010), cinquante espèces et sous espèces ont été identifiées au sein du genre *Staphylococcus* et qui peuvent être classées en fonction de leur capacité à coaguler le plasma de lapin.

4. L'espèce *Staphylococcus aureus*

4.1. Caractères morphologiques

Staphylococcus aureus sont des coques, Gram positif, d'environ 0.8 à 1 μm de diamètre, immobiles, dépourvus de spores, isolés ou groupés en diplocoques mais le plus souvent ils apparaissent en amas dits en grappes de raisin ou en chaînes (LICOIS, 2010). La plupart des souches de *Staphylococcus aureus* sont capsulées, mais peuvent perdre leur capsule après culture (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

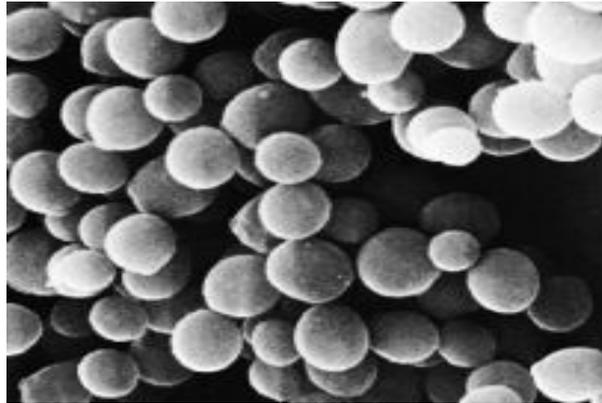


Figure1 : Observation de *S. aureus* sous microscope électronique à balayage au GX34000 (VINCENOT et al, 2008).

4.2. Caractères cultureux

Les *staphylococcus aureus* poussent aisément sur les milieux usuels (ordinaires) en présence ou en absence d'oxygène (milieux aérobies et anaérobies). En milieu liquide, il donne un trouble homogène et abondant, avec un dépôt et un voile en surface. Sur milieux solides, ils forment des colonies rondes, d'un diamètre de 1 à 3 mm, bombées, lisses, luisantes (brillantes), plus ou moins pigmentées en jaune doré d'où l'appellation de staphylocoque doré « *aureus* » (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

Staphylococcus aureus n'a pas d'exigences particulières et tolère de grandes variations de conditions de croissance ou des conditions hostiles. Les conditions idéales étant une température de 37° C et un pH de 7 (GUIRAUD et ROSEC, 2004).). L'isolement de *S. aureus* se fait sur des milieux hyper-salés comme le milieu Chapman (7.5% de NaCl), ou des milieux contenant de puissants inhibiteurs, comme le milieu Baird Parker ou le milieu plasma de lapin au fibrinogène (JOFFIN C. et JOFFIN J-N., 2010).

4.3. Caractères biochimiques :

S.aureus possède de nombreuses enzymes capables de catalyser de nombreux substrats.

Tableau I : Principaux caractères permettant de différencier les espèces de *Staphylococcus* (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

Caractères	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>
Taille de colonies 6mm	+	+	+
Pigmentation de la colonie	+	-	-
Croissance en anaérobie	+	+	+
Croissance en aérobie	+	+	+
Thermonucléase	+	+	-
Hémolyse	+	-	+
Catalase	+	+	+
Uréase	d	d	+
Production de l'acétoïne	+	-	-
Réduction de nitrate	-	+	+
Clumping factor	+	-	d

Symbole +, concerne 90 % ou plus de souches, - : 90 % des souches ou plus sont négatifs, **d**, 11 à 89 % des souches sont positifs

5. Facteurs de virulence

La virulence des souches de *Staphylococcus aureus* impliquées dans les infections humaines ou animales est liée à la production d'une grande variété de composés. Sa pathogénicité est principalement liée aux composés de la paroi bactérienne, sa capacité invasive et à la sécrétion des toxines et des enzymes dans l'environnement de la bactérie (KURKDJIAN et BINGEN, 2003; CARFORA et al, 2015).

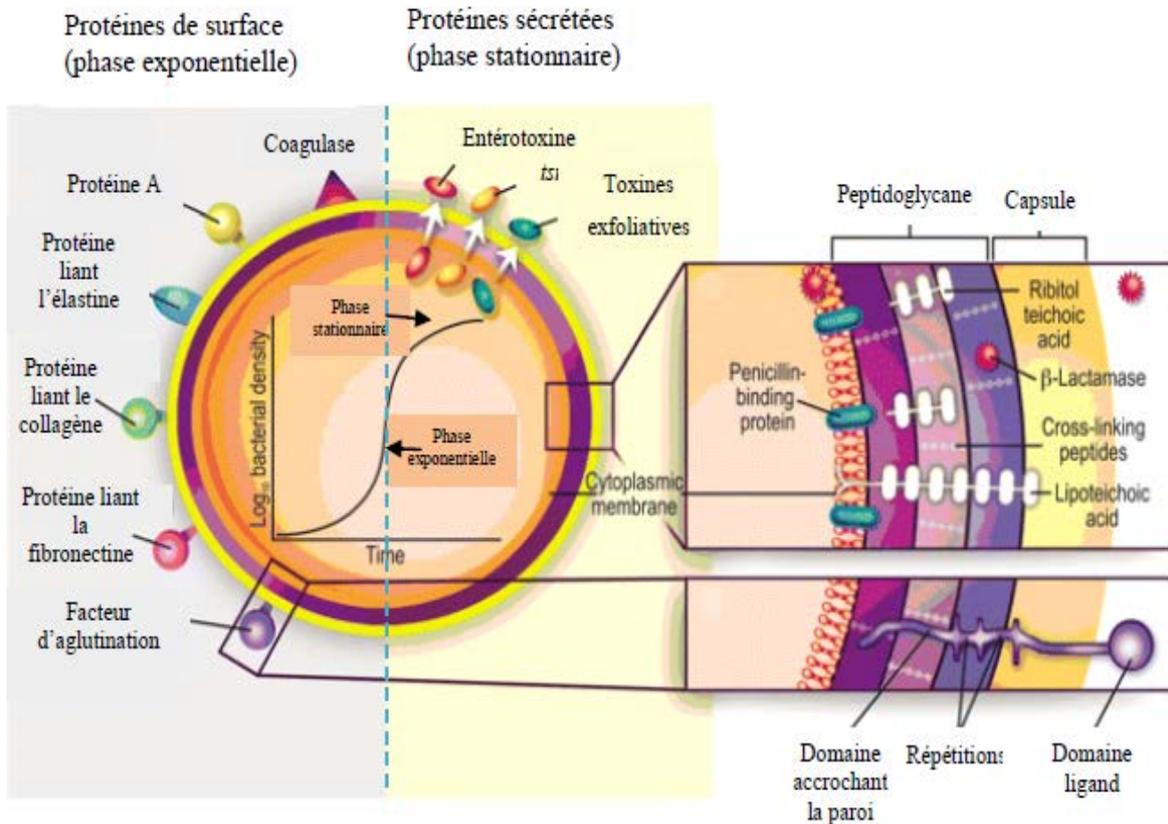


Figure2 : Pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* (LOWY et M, 1998).

5.1. Composants de surface

S. aureus exprime un certain nombre de facteurs qui ont le potentiel d'interférer avec le mécanisme de l'hôte. Cela comprend des éléments à la fois structuraux et solubles de la bactérie.

5.1.1. Peptidoglycane

Le peptidoglycane de *S. aureus* est formé de chaînes linéaires de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) réunis par des liaisons $\beta(1-4)$ et $\beta(1-6)$. Sur l'acide N-acétylmuramique (NAM) se fixe un térapeptide ; des ponts penta ou hexa-glycines unissent la lysine d'un térapeptide à l'alanine du suivant (BOSGIRAUD, 2003). Chez *S. aureus*, le relargage de grandes quantités de peptidoglycane lors d'infection locale provoque un chimiotactisme des cellules phagocytaires et une libération de cytokines qui, en grandes quantités, provoquent des lésions tissulaires (CHABY, 2010).

5.1.2. Acides teïchoïques

Ce sont des polymères linéaires de ribitol ou de glycérol, représentant environ 40% du poids de la paroi bactérienne. Unis par des liaisons phosphodiester et substitués selon les cas par de la N-acétylgalactosamine. La position des liaisons détermine l'existence des anomères

α ou β . Les Acides teichoïques sont impliqués dans l'activation du complément et l'adhésion aux surfaces muqueuses et favorisent ainsi la colonisation (BOSGIRAUD, 2003).

5.1.3. Exopolysaccharides capsulaires

La production bactérienne de biofilm est un élément majeur de virulence, permettant une adhésion accrue aux surfaces (notamment polymériques) des dispositifs médicaux implantables. *S. aureus* synthétise des exopolysaccharides, ou glycocalix, à l'origine de ce biofilm. Ces polysaccharides capsulaires sont retrouvés dans 90% des souches cliniques. Onze sérotypes ont été décrits, ceux de type 5 et 8 étant, de loin, les plus fréquents parmi les isolats humains (80% des cas). Leur rôle dans la virulence est cependant controversé (rôle d'adhésines), car elles constituent également une cible pour des anticorps protecteurs (ROUX et GHIGO, 2006; DUBAS, 2008).

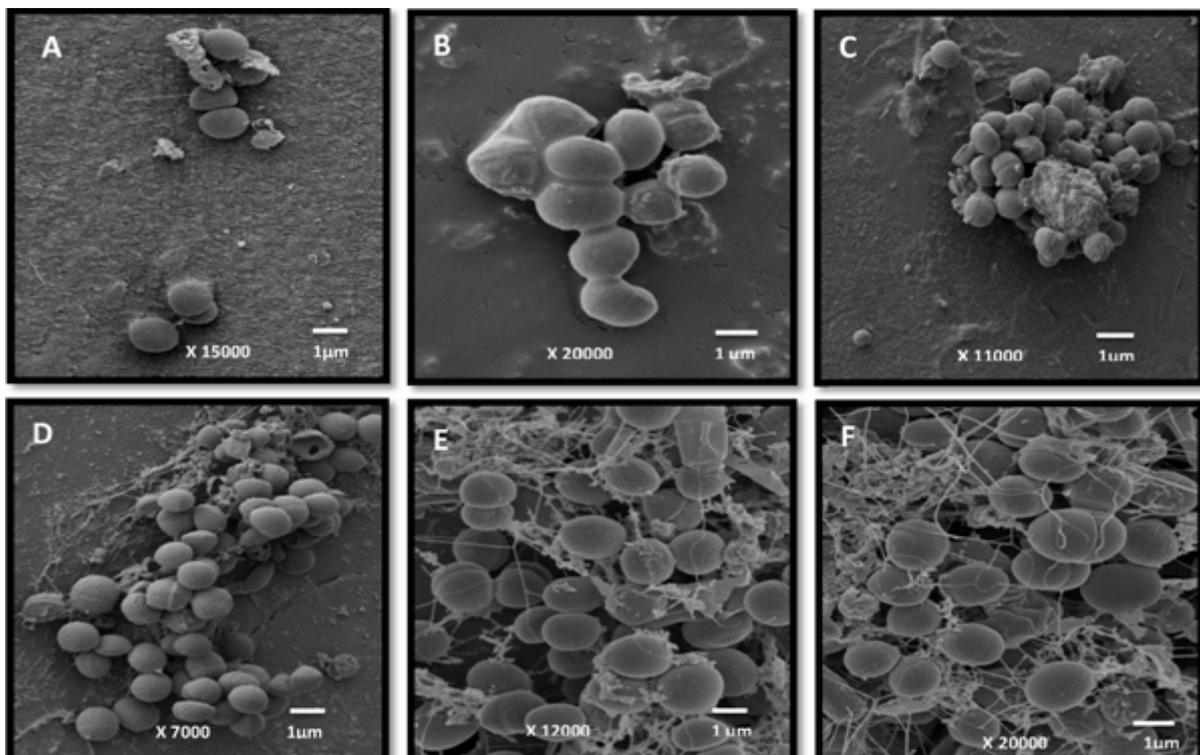


Figure 3 : Les étapes de formations de biofilm chez les *Staphylococcus aureus*

A : adhésion des cellules sur une surface. **B** : Regroupement des cellules en structure tridimensionnelle. **C** : Synthèse visible de la matière polysaccharidique. **D** : Réticulation entre les différentes cellules par la matière polysaccharidique. **E et F** : Maturation du biofilm (REBIAHI et al, 2014).

5.2. Facteurs d'invasion et d'adhésion

S. aureus colonise la surface des tissus-hôtes grâce à la présence de nombreuses protéines de surface présentant une affinité élevée pour certains composants de la matrice extracellulaire (BOULANGER et al, 2005).

5.2.1. Protéine A (*Spa*)

C'est une protéine caractéristique de *S.aureus* de PM de 58 KDa, située sur la paroi de la bactérie. Cette protéine se fixe sur les immunoglobulines G (IgG) par leurs extrémités FC et inhibe l'opsonophagocytose (stratégie d'échappement au système immunitaire). Elle permet aussi d'adhérer partout où il y'a une brèche de l'endothélium, donc c'est un facteur primordial à l'établissement des infections endovasculaires (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

5.2.2. Protéine de liaison au collagène (*Cna*)

La protéine *Cna* de *S. aureus* permet l'adhésion aux tissus contenant du collagène, comme le cartilage. L'inactivation de gène *Cna* entraîne une diminution de la virulence des souches mutées dans un modèle expérimental d'arthrite chez la souris (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

5.2.3. Protéine de liaison au fibrinogène (*ClfA* et *ClfB*)

Ce sont des protéines de surface qui paraient être fixées au corps bactérien. La protéine *ClfA* est présente à tous les stades de croissance, contrairement au *ClfB*, qui est seulement présente à la surface des cellules en phase exponentielle de croissance. Elles provoquent l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Elles constituent un facteur de virulence pour les plaies et les infections sur les corps étrangers (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

5.2.4. Protéine de liaison au fibronectine (*FnBA* et *FnBB*)

La fibronectine est une glycoprotéine dimérique qui sert notamment à ancrer les cellules des tissus dans la matrice extracellulaire. Les récepteurs pour la fibronectine contribuent à l'adhérence de *S.aureus* aux caillots plasmidiques et aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang (BOULANGER et al, 2005).

5.3. Substances élaborées par *S. aureus*

S. aureus sécrète plusieurs enzymes et toxines dont le rôle serait orienté vers la lutte contre les phagocytoses

5.3.1. Enzymes :

Coagulase libre

Active la coagulation de la fibrine et conduit à la formation du trambus. La coagulation induite par la coagulase entraîne l'accumulation de fibrine autour de la bactérie, la rendant inaccessible au système de défense de l'hôte, ce qui empêche la phagocytose (MADIGAN et MARTINK, 2007).

Fibronolysine ou Staphylokinase

La staphylokinase, protéine de 136 acides aminés, possède deux grandes propriétés. Sur le plan immunitaire, elle est capable de lier les α -défensines, peptides bactéricides sécrétés par les polynucléaires neutrophiles, et d'inhiber leurs propriétés, contribuant à la lutte staphylococcique contre l'immunité innée. Sur le plan hémostatique, elle réalise un complexe

avec le plasminogène, donnant naissance à la plasmine active, enzyme protéolytique à large spectre, responsable de la fragmentation des caillots (DUBAS, 2008).

Desoxynucléase thermostable

C'est une enzyme thermostable responsable de l'hydrolyse de l'ADN de cellule de l'hôte. La thermonucléase est produite par toutes les souches de *S. aureus*. Cette nucléase intervient dans la formation des lésions (BOSGIRAUD, 2003).

Catalase

Enzyme associée à la paroi bactérienne, capable de décomposer le H_2O_2 en H_2O et O_2 , et pourrait contribuer à inhiber l'action destructrice des polynucléaires neutrophiles qui produisent des radicaux libre d'oxygène qui sont toxique pour la bactérie (BERCHE et al, 1988; MADIGAN et MARTINKO, 2007).

Protéases

Elles hydrolysent certaines protéines, telle que la staphylokinase, et contribuent à la destruction du caillot et à la formation de microembolies bactériens, responsables de métastases septiques (MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2003).

Hyaluronidases

Est une enzyme thermolabile, qui hydrolyse la matrice du tissu conjonctif et favorise la diffusion le long des plans de clivage tissulaire (BERCHE et al, 1988).

Lipase

Elle permet la persistance des souches dans les sécrétions lipidiques cutanées. Elle interfère avec la pinocytose des polynucléaires neutrophiles et intervient dans la formation des biofilms bactériens (DUBAS, 2008).

5.3.2. Toxines

Cytotoxine

Il s'agit de toxines à activités membranaires

Les hemolysines

Les *Staphylococcus* peuvent produire au moins quatre différentes hémolysines, soit l'alpha, la bêta, le gamma et le delta. Pour ce qui est des *S. aureus*, la plupart des souches sécrètent les hémolysines (toxines) alpha, bêta et delta (PIEMONT, 2003).

L'alpha toxine est une exotoxine cytotoxique protéique (34 kDa), ciblant les membranes de globules rouges qui les détruisent. Elle conduit à la formation d'un pore central (1 à 2 nm de diamètre) (GALMICHE et BOQUET, 2001). La formation de ces pores sur les membranes cellulaires hôtes déclenche des altérations dans les gradients ioniques, la perte de l'intégrité de la membrane et la mort de la cellule. La toxine α est sécrétée sous la forme d'un monomère soluble dans l'eau, elle possède des fonctions biologiques supplémentaires telles que la liaison à un récepteur de glycoprotéines putatif sur les cellules hôtes (BIEN et al, 2011).

La bêta toxine C'est une hémolysine magnésium dépendante, de 37kDa, ciblant les membranes riches en lipides. Elle provoque une lyse des érythrocytes et des cellules mononuclées, et également une importante réponse inflammatoire responsable de la pathogénicité (DUBAS, 2008).

Le delta toxine, constituée d'un peptide de 26 acides aminés, est exprimé par la majorité des souches de *S. aureus* (DUBAS, 2008).

✚ **Leucotoxines de Panton Valentine (LPV)**

Issue de la famille des « pore-forming toxins », la PVL est formée de deux sous-unités, S et F (slow et fast), elles agissent de façon synergique pour lyser la membrane cellulaire des leucocytes. La libération d'enzymes et de médiateurs de l'inflammation contribue à la mort cellulaire par le dysfonctionnement de l'activité cellulaire normale. Les gènes de la PVL sont portés par un bactériophage et sont présents chez 2 % des souches de *S. aureus* (DUMITRESCU, 2012 ; NHAN et al, 2012).

✚ **Toxine pyogéniques (superantigène)**

Les superantigènes sont des toxines bactériennes qui interagissent avec les immunorécepteurs, le récepteur des lymphocytes T (TCR) et le complexe majeur d'histocompatibilité CMH classe II. Ils induisent une libération massive de cytokines, ce qui peut entraîner des maladies telles que l'intoxication alimentaire et le syndrome de choc toxique (JARRAUD et al, 2002 ; SALINE et al, 2010).

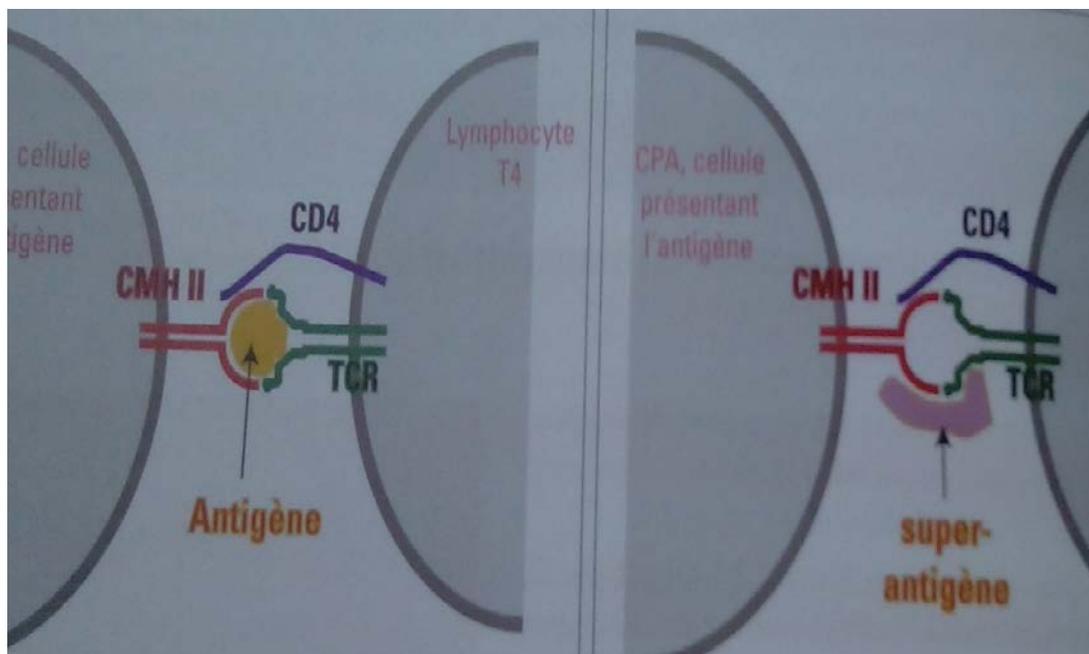


Figure 4: Mécanisme d'action des superantigènes des Staphylocoques (à gauche fonctionnement normal, à droite fonctionnement avec superantigène) (JOFFIN et JOFFIN, 2010).

Les entérotoxines Staphylococciques :

Les Entérotoxines Staphylococciques (SE) appartiennent à la famille des exoprotéines pyrogéniques produites par certaines souches de *S. aureus*. Cette famille présente des propriétés communes ; pyrogénicité, activation des lymphocytes T, mais les SE sont avant tout, impliquées dans les toxi-infections alimentaires (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

Sont des toxines thermostables libérées dans les aliments pendant la phase exponentielle de croissance (JOFFIN et JOFFIN, 2010). Elles ne sont pas hydrolysables par les protéases digestives (pepsine et trypsine). Un traitement thermique de type pasteurisation (60°C pendant 30 min) permettant de détruire les microorganismes (*S. aureus*) et incapable de détruire les toxines Staphylococciques, qui peuvent résister à cette température pendant plusieurs heures (LEYRAL et VIERLING, 2007).

Toxine du syndrome du choc toxique TSST1

Sont des protéines de faible poids moléculaire, présente chez 14% des souches humaines. Elle provoque la libération massive de cytokines (PIEMOT, 2003). Elle provoque aussi une activation polyclonale des lymphocytes T, suivie d'une réponse inflammatoire caractéristiques de l'activité superantigène (MADIGAN et MARTINKO, 2007). Elle est responsable des syndromes de choc toxique (SCT). Ces syndromes associent : une fièvre supérieure à 39 °C, une hypotension artérielle et une érythrodermie scarlatiniforme généralisée, suivie de 7 à 14 jours plus tard d'une desquamation intense et d'une atteinte multi-viscérale (VINCENOT et *al*, 2008).

Toxines d'exfoliatines ou épidermolysines (Ets)

Les Ets sont des sérine-protéases, agissant comme de véritables ciseaux moléculaires. Elles ont pour cible la desmogléine-1, protéine des jonctions cellulaires du stratum granulosum de l'épiderme. La perte d'adhérence cellulaire favorise l'invasion bactérienne percutanée et explique le décollement bulleux intra-épidermique observé lors des syndromes exfoliatifs. Quatre exfoliatines ont été décrites, ETA à ETD. ETA et ETB sont les deux principales toxines rencontrées en pathologie humaine (LE LOIR et GAUTIER, 2010; NHAN et *al* 2012).

Tableau II : Les facteurs de virulence des *Staphylococcus aureus* (GORDON et LOWY, 2008).

Facteurs de virulence	Gènes	Rôle
Coagulase	<i>coa</i>	Réagit avec la prothrombine pour former un complexe qui peut cliver le fibrinogène et causer la formation d'un caillot de fibrine
Protéine A	<i>spa</i>	Liaison au fragment Fc de l'immunoglobuline G et inhibition de la phagocytose
Protéinases	<i>ssp</i>	Hydrolysent les protéines
Entérotoxines (A, B, C, D, E et F....)	<i>ent</i>	Neurotoxine ayant une activité superantigène sur les lymphocytes T
Hémolysines (alpha, beta, delta et gamma)	<i>hla, hlb, hld et hlg</i>	Lyse les érythrocytes
Exfoliatines A et B	<i>eta, etb</i>	Toxine causant la perte des couches superficielles de la peau dans le syndrome de la peau ébouillantée
Lipases et phospholipases	<i>plc</i>	Activité enzymatique sur les lipides et les phospholipides
Déoxyribonucléase	Déoxyribonucléase	Enzyme hydrolysant l'ADN
Staphylokinase	<i>sak</i>	Liaison au plasminogène et transformation en plasmine qui a une activité fibrinolytique et protéolytique. Aide à la dissémination
Toxine-1 du syndrome de choc (TSST-1)	<i>tst</i>	Activité superantigène
Facteur d'agglutination	<i>clfA</i>	Liaison aux fibrinogènes
Leucocidine (PVL)	<i>lukR, lukF et lukS</i>	Inhibe la phagocytose par les granulocytes et les macrophages tout en les détruisant
Protéines de surface	<i>fnbA, fnbB, cna</i>	Liaison à la fibronectine, au collagène, etc.
Capsule	<i>cap</i>	Inhibe la phagocytose et l'adhérence aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes

Chapitre II: Résistance de *S. aureus* aux antibiotiques

1. Historique

En 1928, Alexander Fleming découvrait que la croissance bactérienne pouvait être inhibée par la présence d'un champignon filamenteux, du genre *Penicillium*. Mais, cette découverte de Fleming serai tombée dans l'oubli, jusqu'à l'arrivait de deux chercheur britannique, Florey et Chain en 1939 qui avaient utilisés la pénicilline en thérapeutique. Le terme antibiotique a été proposé par R. Dubos. A la fin de la seconde guerre mondiale, la pénicilline fut employée plus largement pour le traitement des infections bactériennes, mais malheureusement l'usage intensif et non réfléchi de ces molécules d'antibiotiques permet aux bactéries de développer une résistance vis-à-vis de ces molécules. La résistance des staphylocoques à la pénicilline est apparue 15 ans après l'introduction de celle-ci (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

2. Définition

Sont des substances naturelles biologiques élaborées par un microorganisme (champignons/ bactéries) ou substances chimiques produites par synthèse ou substances semi-synthétiques, obtenues par modification d'une molécule de base naturelle, capable de tuer (effet bactéricide) ou d'inhiber (effet bactériostatique) la multiplication d'autre microorganisme à faible concentration et possédant une toxicité sélective c'est-à-dire n'affecte pas l'hôte infecté (MUYLAERT ET MAINIL, 2012; CARUBA ET JACCOULET, 2015).

3. Critères de classification des antibiotiques

3.1. Origine

Naturel : l'antibiotique est produit par des micro-organismes soit des champignons (pénicilline, céphalosporine) ou bien des bactéries (streptomycines, chloramphénicol)

Synthétique : des produit obtenu par voie chimique (sulfamides acide nalidixique)

Semi-synthétique : obtenu par un radical chimique qui a été greffé sur une fraction moléculaire naturel (méthicilline).

3.2. Spectre d'activité :

Les antibiotiques à large spectre : actif sur la majorité des bactéries Gram positif et Gram négatif.

Les antibiotiques à spectre limité : actif sur les bactéries Gram positif et quelque Gram négatif.

Les antibiotiques étroits : actifs uniquement sur certaines bactéries Gram positif ou certaines à Gram négatif.

3.3. Mode d'action

Les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes précises. Certains inhibent la formation de leur paroi et désorganisent leur membrane, d'autre inhibent les différentes étapes de la synthèse protéique ou d'acide nucléiques. L'antibiotique exerce deux types d'action soit :

Bactériostatique : inhibition de la croissance bactérienne.

Bactéricide : provoque la mort de la bactérie (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

4. Mode d'action des antibiotiques

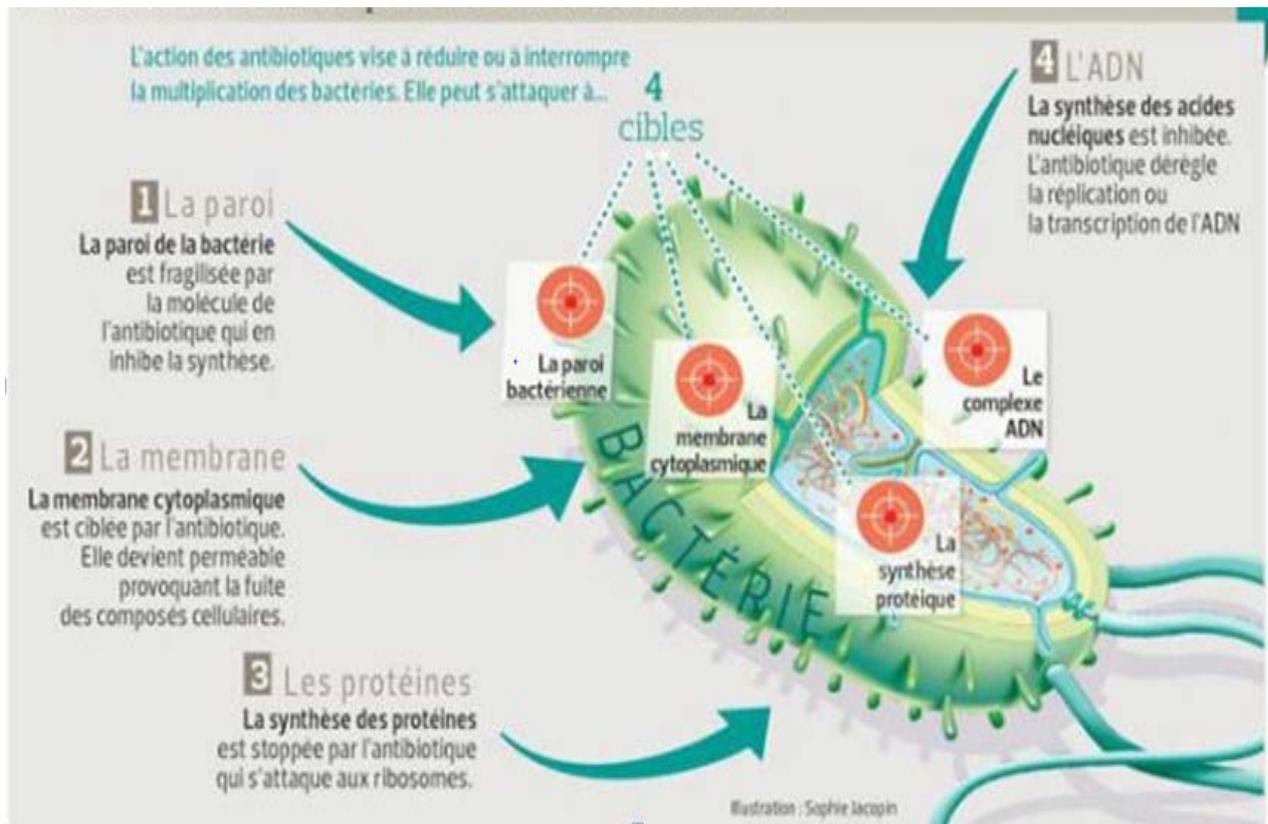


Figure 05: Mode d'action des antibiotiques (CHAKRABORTY et al, 2012)

4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

4.1.1. Mode d'action des bêtalactamines

La famille des bêtalactamines se compose de quatre groupes de molécules, les pénèmes, les pénèmes, les céphèmes et les monolactames. Sa structure de base est le noyau azetidnone qui contient la structure **carbonylactame**, laquelle est indispensable pour l'activité des molécules. Cette famille comprend plusieurs classes d'antibiotiques parmi elles, se trouvent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames,... (BRYSKIER, 1999; SINGLETON, 2005).

Les bêtalactamines se fixent sur des protéines de la membrane cytoplasmique, les protéines liant les penicillines (PLP) (CHARLIER et al, 1998). Ce sont les cibles des b-lactamines. Ces PLP sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane: les tranpeptidases, les carboxypeptidases et les trasglycosylases. Les bêtalactamines présentent une analogie structurale avec un constituant du peptidoglycane en formation, le dipeptides D-ala-D-ala qui est le substrat naturel de ces enzymes. Elles agissent en "substrat suicide" et bloque le fonctionnement de ces enzymes, inhibant ainsi la formation du peptidoglycane. Les bêtalactamines exercent un effet bactériostatique en empêchant les bactéries de se multiplier. Le blocage de multiplication est suivi d'une lyse bactérienne. Le peptidoglycane est dégradé

sous l'action d'autolysine, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

4.1.2. Mode d'action des glycopeptides

La vancomycine et la teicoplanine ont un poids moléculaire élevé et une structure complexe qui les empêchent de traverser toute membrane cellulaire. Elles sont donc exclusivement actives sur les Gram positifs. Ces antibiotiques ont la propriété de former des complexes avec les extrémités peptidiques D-ala-D-ala des unités disaccharide-pentapeptide portées par le transporteur lipidique, et prêtes à entrer dans les processus de transglycosylation et de transpeptidation. Il y a épuisement en transporteur lipidique, inhibition des transglycosylases-transpeptidases par encombrement stérique, et arrêt de la synthèse du peptidoglycane. Les glycopeptides sont lentement bactéricides (BOSGIRAUD, 2003).

4.1.3. Mode d'action des fosfomycines

Antibiotique naturel produit par *Streptomyces fradiae*, la fosfomycine est un antibiotique bactéricide vis-à-vis de *S. aureus* par inhibition des étapes cytoplasmiques précoces de la synthèse du peptidoglycane. Elle doit donc pénétrer, quel que soit le type de bactérie, dans le cytoplasme bactérien. Son passage à travers la membrane cytoplasmique se fait par transport actif. Une fois dans le cytoplasme, la fosfomycine inhibe les premières étapes de la formation du peptidoglycane, en se fixant sur la pyruvyltransférase, qui est une enzyme impliquée dans la formation d'un précurseur du peptidoglycane, il y aura arrêt de la synthèse de la paroi bactérienne et mort de la bactérie (GAUDY et BUXERAUD, 2005; LE LOIR et GAUDY, 2010).

4.2. Antibiotiques inhibent la synthèse des protéines

4.2.1. Mode d'action des aminosides

Sont des antibiotiques bactéricides (QUINCAMPOIX et MAINARDI, 2001). Leur transport à l'intérieur de la bactérie est indispensable à leur action. Les aminosides pénètrent chez *S. aureus* selon un processus actif qui requiert de l'énergie, ce processus comprendrait 2 phases; la première est lente EDPI (energy dependant phase I), qui est dépendante du gradient transmembranaire de potentiel électrique. Les premières molécules d'aminosides rentrent et se fixent sur l'ARN ribosomal 16S, de la sous unité 30S de ribosome, qui cause l'altération de la traduction de l'ARNm ainsi que des erreurs de lecture et donc une production d'une protéine anormale. L'incorporation de ces protéines dans la membrane cytoplasmique entraîne une altération membranaire. C'est alors que débute la seconde phase (EDPII) du passage membranaire des aminosides, les molécules rentrent massivement et rapidement à travers la membrane lysée, se fixent un grand nombre sur les ribosomes et bloquent la synthèse des protéines (GAUDY et BUXERAUD, 2004).

4.2.2 Mode d'action des macrolides, les lincosamines et les streptogramines

Les macrolides, les lincosamines et les streptogramines (MLS) appartiennent au même groupe, du fait d'un mode d'action proche (DAUREL et LECLERCQ, 2008).

Les MLS ont un haut poids moléculaire et un caractère hydrophobe qui les empêchent de franchir la membrane externe. Ils sont donc essentiellement actifs sur les Gram positif. Les MLS se fixent sur la sous unités 50S, au niveau de l'ARNr 23S. Les MLS_B ont un site de

fixation proche voire identique: ils s'insèrent dans le tunnel où coulisse du peptide en formation, au voisinage du site P, entraînant un affaiblissement de l'interaction ribosome-peptide, une association et un relargage prématuré du peptide-ARNt au moment de la translocation, et la libération de protéines incomplètes. L'action des lincosamines s'effectuerait à un stade plus précoce : il y aurait inhibition de la fixation des aminoacyl-ARNt au site accepteur, et de la formation de la liaison peptidique. Les macrolides et les lincosamides sont bactériostatiques, tandis que les streptogramines sont bactéricides (BOSGIRAUD, 2003).

4.2.3. Mode d'action des Tétracyclines

Sont bactériostatiques à large spectre, elles inhibent la synthèse des protéines en se liant à la sous unités 30 S du ribosome et en inhibant la fixation des aminoacyl-ARNt au site A. Les tétracyclines sont des molécules amphotères, propriété qui leur confère la possibilité de former des complexes avec de nombreux ions, la formation de ces complexes et un gradient de pH transmembranaire expliqueraient le passage à travers la membrane cytoplasmiques des tétracyclines et leur accumulation intracytoplasmique. Dans le cytoplasme, les tétracyclines se fixent de façon irréversible sur la sous unité 30 S du ribosome, empêchant la fixation de nouveau aminoacyl-ARNt (GAUDY et BUXERAUD, 2003).

4.2.4. Mode d'action des Rifampicines

La rifampicine inhibe l'ARN polymérase, bloquant ainsi la transcription. Elle est bactéricide (DAUREL et LECLERCQ, 2008). Ces molécules se lient de façon spécifique à la sous unité B de l'ARN polymérase-ADN dépendante. Ces composés agissent sur l'enzyme libre, non engagée dans l'élongation d'un ARN messager (LE LOIR et GAUDY, 2010).

4.3. Mode d'action des antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'acide désoxyribonucléiques

4.3.1. Mode d'action des Quinolones

Les quinolones ont pour cible des enzymes essentielles à la survie bactérienne, les topoisomérases de type II incluant la gyrase (composée de deux sous unités, GyrA et GyrB) et la topoisomérase IV (composée de deux sous unités, ParC et ParE). Ces enzymes sont responsables du surenroulement de la molécule d'ADN (gyrase), nécessaire à son stockage sous forme compacte ou, inversement, au désenchevêtrement s'opérant lors de la traduction en ARNm (topoisomérase IV). La liaison des quinolones à leurs cibles entraîne l'arrêt de la réplication et de la transcription de l'ADN bactérien. Les fluoroquinolones sont rapidement bactéricides (DAURELA et LECLERCQA, 2008).

4.3.2. Mode d'action des imidazolés

La diffusion intracellulaire est facilitée par leurs faible poids moléculaire. Dans le cytoplasme, les nitro-imidazolés se lient à des protéines réductrices, entraînant la libération de radicaux libres toxiques capables d'oxyder l'ADN bactérien et de le couper, seuls les bactéries anaérobies strictes sont concernées par ce mécanisme (GAUDY et BUXERAUD, 2003).

4.3.3 Mode d'action de l'association de sulfamides triméthoprime

Ces deux molécules interfèrent avec la synthèse des folates, processus clé du métabolisme cellulaire, perturbant ainsi la synthèse des acides nucléiques et des protéines (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

4.4. Les antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique

4.4.1. Polymixines

Elles se fixent sur les membranes bactériennes et les désorganisent, elles n'agissent que sur les bactéries à Gram négatif (SINGLETON, 2005).

5 Résistance de *S. aureus* aux antibiotiques

5.1 Définition de la résistance bactérienne

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un microorganisme à résister aux effets des antibiotiques. Cette résistance aux agents antimicrobiens est due soit à la modification de l'information génétique (endogène) par mutation chromosomique, soit à l'acquisition de matériel génétique (exogène) tels que les plasmides et/ou les transposons (COURVALIN, 2008).

5.2 Support génétique de la résistance bactérienne

5.2.1. Naturelle

C'est une caractéristique propre à une espèce bactérienne, qui est partagée par toutes les souches de cette espèce. On dit sensible ou sauvage. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique (faible affinité), ou à l'absence de la cible. Cette résistance est permanente et transmissible à la descendance lors de la division cellulaire (transmission verticale).

5.2.2. Acquise

C'est une caractéristique de certaines souches au sein de l'espèce considérée. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation ou par acquisition du matériel génétique étranger. La reconnaissance de ces résistances acquises définit les phénotypes de résistance. Elle est le résultat de :

Mutation chromosomique

Erreurs survenant pendant la réplication de l'ADN, c'est une mutation avec une faible fréquence. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie.

Acquisition de gène de résistance (horizontale)

Les gènes de résistance se trouvent à l'extérieur de l'ADN chromosomique, porté sur des éléments mobiles comme les plasmides. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à une autre de la même espèce, et même à des bactéries d'espèce différentes voisines. Trois types de transmission sont décrits :

La transformation

La transduction

La conjugaison (GAUDY et BUXERAUD, 2003; COURVALIN, 2008).

5. 3. Principaux mode de résistances des bactéries

5.3.1. Phénomène d'imperméabilité

Pour qu'un antibiotique soit actif (pénètre jusqu'à sa cible), il doit traverser les divers obstacles mis sur sa route par la bactérie. Ces obstacles potentiels varient selon la localisation de la cible et selon le type bactérien: Gram positif ou Gram négatif et son comme suites.

La capsule.

La membrane externe.

L'espace périplasmique.

Le peptidoglycane.

La membrane cytoplasmique.

5.3.2. Phénomène d'efflux

L'antibiotique rentre dans la bactérie, mais avant qu'il puisse se fixer sur sa cible, il est pris en charge par des protéines membranaires et excrété vers l'extérieur de la bactérie.

5.3.3. Défaut d'affinité

Après la pénétration cellulaire de l'antibiotique, il existe une étape de reconnaissance de la cible. C'est à ce niveau qu'intervient ce type de résistance. Il s'agit :

Soit d'une résistance naturelle avec la mauvaise affinité de certain antibiotique pour les cibles.

Soit d'une résistance acquise avec modification de cible et perte d'affinité de l'antibiotique pour ces cibles.

5.3.4. Résistance par modification enzymatique

Ce type de mécanisme est le plus important. Il touche toutes les espèces bactériennes. Pour être actif, l'antibiotique doit arriver intacte à sa cible. Lorsqu'il y a modification de l'antibiotique par des enzymes présents dans la bactérie à quelque niveau que ce soit, la forme modifiée de la molécule antibiotique est le plus souvent inactive (BOSGIRAUD, 2003).

5.4. Mécanismes de résistance de *S.aureus* aux antibiotiques

5.4.1. Résistance aux Bétalactames

La résistance aux Bétalactamines chez les *Staphylocoques* repose sur deux types de mécanismes qui sont identiques pour les *S. aureus* et pour les *Staphylocoque* à coagulase négatif :

a-Production des Bétalactamases

Une bétalactamase est une enzyme qui hydrolyse le cycle bétalactame des pénicillines. Ce mode de résistance est présent chez 90 % des isolats cliniques de *S. aureus*. Le gène *blaZ* codant pour les pénicillinases de *staphylocoque* peut être porté soit par un transposon, soit être chromosomique. La production de bétalactamase peut être constitutive ou, le plus souvent, inductible (QUINCAMPOIX et MAINARDI, 2001).

b-Modification de cible

Cette résistance est observée chez *S. aureus* et chez les *staphylocoques* à coagulase négative et qui est due à la production d'une PLP additionnelle, la PLP2a, qui se surajoute aux PLP normales de *S. aureus*. En présence de béta-lactamines (penicillines, céphalosporines,

carbapenemes), Les PLP sont inhibées, sauf la PLP2a. Cette protéine est codée par le gène d'expression inductible *mecA*. Ce gène est porté par un élément génétique mobile particulier, une cassette chromosomique appelée *SCCmec* insérée dans un locus spécifique. L'expression de la résistance est variable en fonction des souches (DAUREL et LECLERCQ, 2008).

5.4.2. Résistance aux aminosides

Les enzymes inactivant les aminosides sont codées par des transposons ou des plasmides transférables, ayant un fort potentiel de dissémination. Les enzymes sont divisées en trois classes selon la réaction catalysée :

Aminoside *N*-acétyltransférase (AAC) : acétylation d'un groupement -NH₂ ;

Aminoside *O*-phosphotransférase (APH) : phosphorylation d'un groupement -OH ;

Aminoside nucléotidyltransférase (ANT) : nucléotidylation d'un groupement -OH (QUINCAMPOIX et MAINARDI, 2001; DAUREL et LECLERCQ, 2008).

5.4.3. Résistance aux Quinolones

a-Modification de cible

Le principal mécanisme de résistance est dû à l'apparition de mutations ponctuelles dans les cibles des quinolones (gyrase et topoisomérase IV). Ces mutations siègent le plus souvent dans une courte région conservée appelée QRDR (quinolone resistance determining region). Chez *S. aureus*, une première mutation sur une cible (en général ParC) va conférer un niveau de résistance de bas niveau. Dans un deuxième temps, une deuxième mutation sur la deuxième cible (ParC, ParE ou GyrA) va conférer une résistance de haut niveau. Les souches de haut niveau auront alors une résistance croisée à la pefloxacin, à la ciprofloxacine, à la levofloxacine et à la moxifloxacine (DAUREL et LECLERCQ, 2008).

b-Efflux

Des pompes vont diminuer la concentration intracytoplasmique de certaines quinolones spécifiques : la ciprofloxacine et la norfloxacine. La surexpression d'une pompe inductible de la famille major facilitator super family entraîne la résistance, qui est alors associée à la résistance au chloramphénicol. L'efflux peut s'associer au mécanisme précédent (DAUREL et LECLERCQ, 2008).

5.4.4. Résistance aux glycopeptides

Il s'agit d'un mode de résistance hétérogène, c'est-à-dire concernant une fraction seulement de la population bactérienne. Le mécanisme implique très probablement une altération de la liaison des molécules de l'antibiotique à la paroi de la bactérie et une perturbation de la synthèse de certains de ses composés (DUMITRESCU et al, 2010). Cette résistance pourrait être due au fait que ces souches ont une paroi épaisse résultant d'une réorganisation complexe du métabolisme du peptidoglycane liée probablement à des mutations dans de multiples gènes. Ces réorganisations pourraient empêcher l'accès de la vancomycine à sa cible (DAUREL et LECLERCQ, 2008).

5.4.5. Résistance aux Tétracyclines

La résistance aux tétracyclines est maintenant apparue dans de nombreuses bactéries commensales et pathogènes en raison de l'acquisition génétique des gènes *Tet*. Vingt-neuf gènes de résistance à la tétracycline différents ont été caractérisés (CHOPRA et ROBERTS, 2001). Les mécanismes de résistance à la tétracycline se répartissent en trois catégories, les

pompes à efflux dépendant de l'énergie, les protéines de protection ribosomale ou l'inactivation enzymatique (VAN HOEK et *al*, 2011; TRZCINSKI et *al*, 2000).

5.4.6. Résistance aux Macrolides, Lincosamines et Streptogramines

Le mode le plus fréquent des résistances aux macrolides et aux lincosamides résulte de la production d'une enzyme d'origine plasmidique qui modifie la cible ribosomale par méthylation. La résistance est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B (pristinamycine I et quinupristine), d'où son nom de MLSB, car ces antibiotiques ont des sites de fixation communs. La résistance MLSB est dite inducible quand la méthylase est produite seulement en présence de macrolide inducteur, ou constitutive, lorsque la production est permanente, indépendante de l'antibiotique (LECLERCQ, 2002).

5.4.7. Résistance aux acides fusidiques

Cette résistance est surtout due à des mutations survenues à haute fréquence, ce qui justifie l'emploi de cet antibiotique en association. Ces mutations sont : chromosomiques au niveau de gène *fusA*, diminuant l'affinité du facteur pour l'antibiotique ou à une résistance plasmidique entraînant un défaut de pénétration dans la cellule bactérienne (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

5.4.8. Résistance aux rifampicines

La rifampicine inhibe l'ARN polymérase, bloquant ainsi la transcription. Elle est bactéricide. Des mutations au sein du gène *rpoB* codant la chaîne beta de l'ARN polymérase sont responsables du phénotype de résistance à cet antibiotique (DAUREL et LECLERCQ, 2008). Les mutations sont sélectionnées en présence de rifampicine à un taux d'environ $1/10^{-8}$ (CAMBAU et GUILLARD, 2012).

5.4.9. Résistance aux sulfamides triméthoprim

Chez *S. aureus*, la résistance aux sulfamides est fréquente, souvent par modification de la cible. La résistance au triméthoprim est elle aussi due à une modification de la cible (DAUREL et LECLERCQ, 2008).

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

1. Matériels

Verrerie et outils : boîtes de Pétri, tubes à essai, pipettes Pasteur, écouvillons, tubes à hémolyse, anse à boucle, micropipette, embouts (0.1 et 1mL), spatules, cuves de spectrophotomètre, lames pour microscope, flacons en verre.

Etuve microbiologique (Mettler, Allemagne)

Vortex (Heidolph, Allemagne)

Bec Bunsen

Autoclave (PBI International, Italie)

Balance électronique (Denver Instrument, États-Unis)

Spectrophotomètre (Medline, Grande-Bretagne)

Microscope optique (Ceti, Royaume-Uni)

Réfrigérateur (Maxipower, Algérie)

Bain-Marie (Mettler, Allemagne)

2. Milieux de culture et réactifs

Gélose Baird Parker (Biokar diagnostics, France)

Tellurite de potassium (Institut Pasteur d'Alger)

Emulsion de jaune d'œuf

Eau peptonée tamponnée (CondaPronadisa, Espagne)

Bouillon nitraté (CondaPronadisa, Espagne)

Bouillon Clark et Lubs (Institut Pasteur d'Alger)

Gélose Muller-Hinton (Biokar diagnostics, France)

Bouillon cœur-cerveau (Biokardiagnostics, France)

Gélose à ADN (CondaPronadisa, Espagne)

Agar bactériologique (Biokar diagnostics, France)

Plasma de lapin (BioMérieux SA, France)

Nitrate réductase 1 (NR1) et 2 (NR2) (Institut Pasteur d'Alger)

Voges Proskauer I (VPI) et II (VPII) (Institut Pasteur d'Alger)

Poudre de zinc

Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Scharlau, Espagne)

Eau physiologique stérile

Eau distillée stérile

Violet de Gentiane

Lugol, alcool, fushine

Poudre d'oxacilline sous forme injectable (Saïdal, Algérie)

La composition et la préparation des milieux de culture sont détaillées dans l'annexe 01.

3. Méthode

3.1. Objectifs

L'objectif de cette étude est l'isolement de souches de *Staphylococcus aureus* à partir du lait cru et de produits laitiers dans le but d'étudier la prévalence de ce germe dans ce produit alimentaire à large consommation. Le second objectif est la détermination de la résistance des

souches isolées vis-à-vis quelque molécule d'antibiotique, utilisées en médecine humaine et vétérinaire, afin de suivre la résistance des souches d'origine alimentaire aux antibiotiques et de prévoir l'existence de souches multirésistantes telles que les SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline).

3.2. Durée et lieu d'étude

Notre étude a été réalisée entre la période de février et mai 2017 au niveau du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) de l'université MOULOUD MAMMERI, Tizi-Ouzou.

3.3. Nature des échantillons et leurs sites de prélèvement

Durant cette période, 52 échantillons ont été prélevés et soumis à la recherche et l'identification de *S. aureus* et sont répartis comme suit :

Prélèvement 01: 06 échantillons du lait acidifié et un échantillon du lait cru prélevés au niveau de 06 points de vente différents de la ville de Tizi-Ouzou.

Prélèvement 02: 19 échantillons du lait cru et un échantillon du lait acidifié prélevés de différentes fermes au niveau de la région de Makouda.

Prélèvement 03: 24 échantillons du lait cru et 02 échantillon du lait acidifié et du lait caillé prélevés à partir de différentes fermes situées dans la région d'Imaloussen.

3.4. Transport et conservation des échantillons

Une fois prélevés dans des petits flacons stériles en plastique, les échantillons sont placés dans une glacière et sont acheminés vers le laboratoire où s'effectuent les différentes analyses.

3.5. Recherche des *S. aureus*

3.5.1 Isolement

La recherche de *S. aureus* dans les différents prélèvements a été effectuée selon la norme ISO 6888-1 relative à l'isolement et le dénombrement des staphylocoques à coagulase positives, adaptée aux moyens disponibles.

L'isolement a été effectué sur gélose Baird Parker (BP), qui est un milieu sélectif pour les staphylocoques à couagulase positive.

Mode opératoire :

A partir de chaque suspension mère (lait acidifié, lait cru ou lait caillé), 0.1ml sont prélevés aseptiquement à l'aide d'une micropipette, puis ensemencés sur boîte de Pétri contenant du milieu Baird Parker additionné de jaune d'œuf et de téllurite de potassium. Un étalement de la suspension mère est alors réalisé. Les Boîtes de Pétri sont ainsi incubées à 37°C pendant 24 à 48heures.

Une à cinq colonies caractéristiques de *S. aureus* (colonies rondes à bords réguliers, lisses, bombées, d'un diamètre de 1 à 3mm, noires et ayant un halo claire), sont prélevées de chaque boîte de milieu BP positive.

3.5.2 Purification des souches isolées

La purification des souches *S. aureus* a été effectuée sur gélose BHI. Ainsi, des repiquages successifs ont été réalisés jusqu'à avoir une culture pure.

3.5.3 Aspect microscopiques des colonies (coloration de Gram) :

La coloration permet de confirmer la pureté des isolats et d'identifier le genre *Staphylococcus aureus*.

Mode opératoire

Préparation d'un frotti bactérien ;

Coloration par le violet de Gentiane pendant une minute.

Ajouter le lugol et laisser agir 45 secondes deux fois.

Décolorer avec l'éthanol à 96% pendant 15 secondes.

Ajouter la fuchsine dans le but de la recoloration.

Rinçage puis séchage.

Lecture : se fait à l'aide d'un microscope optique au grossissement 10×100. Les bactéries du genre *Staphylococcus* apparaissent sous forme de cocci Gram+, agencées en grappes de raisin.

3.5.4 Identification biochimique des isolats

Test de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage



Mode opératoire :

Sur une lame port objet, une goutte d'eau oxygénée est déposée. Ensuite, une colonie pure, prélevée à partir du milieu BHI, est mise en contact avec cette goutte. Le test positif se traduit par un dégagement de bulles de gaz.

Test de la coagulase

La coagulase est une protéine extracellulaire permet la différenciation des espèces du *Staphylococcus*. En effet, seul quelques espèces de *staphylococcus* (dont *S. aureus*) ont cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie.

- **Technique**

Prélever, à l'aide d'une pipette Pasteur quelques colonies pures sur milieu BHI, et les ensemercer dans un tube de bouillon coeur-cerveau, puis incubé à 37°C durant 24 heures.

Dans un tube à hémolyse stérile, mélanger quelques gouttes de suspension bactérienne préalablement préparée avec le même volume du plasma du lapin. La lecture est faite après une incubation de 1 à 4 heures à 37°C.

Un témoin négatif est préparé en mélangeant le bouillon nutritif, non ensemercé, au plasma de lapin. Le témoin positif est réalisé en utilisant la souche de référence MU 50.

Le test est considéré comme positif lorsqu'il y a une prise de masse du plasma (formation d'un caillot).

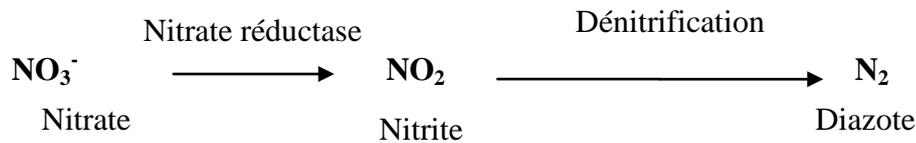
Recherche de la nitrate-réductase(NR)

La nitrate réductase capable de réduire le nitrate au nitrite. Le nitrite pourra ensuite être réduit en azote.

Technique

Ensemencer chaque tube de bouillon nitraté par une souche à tester. L'incubation est faite à 37°C pendant 48h. Deux réactifs, nitrate réductase 1 (acide sulfanilique) et nitrate réductase 2(α-naphtylamine), sont rajoutés au bouillon nitraté préalablement ensemercé par la souche à tester. La présence de nitrate réductase se traduit par un virage de couleur (apparition d'une couleur rouge). Si il n'y aura pas de virage de couleur, ça donne deux possibilités, soit absence de l'enzyme, soit il y a une réduction totale des nitrates en azote (N₂). Pour la

confirmation, on ajoute le Zinc, s'il y a un changement du couleur en rouge, le test est considéré négatif, car le Zinc qui a réduit le nitrate en nitrite. Dans le cas contraire, si le milieu garde sa couleur le test est positif (il y a réduction complète de nitrate en azote).



Test de Vogtsproskauer

C'est un test qui permet la mise en évidence de la production d'acétoïne au cours de la fermentation butylène glycolique, l'acétoïne est mise en évidence par une coloration rouge obtenu par une action de la créatine sur le diacétyl formé par oxydation.

- **Technique**

Ensemencer le milieu Clark et lubs d'un volume de 5ml, par une souche à tester. L'incubation dure 48 heures à 37 °C.

Ajouter 15 gouttes du réactifVP1 (α -Naphtol à 6%) et 15 gouttes du VP2 (NaOH 16%).

Le test positif se traduit par l'apparition d'une couleur rouge après 15 à 20 minutes.

Test de la désoxyribonucléase (ADNase)

- **Technique**

Les boites à ADN sont coulées et séchées une journée avant.

Prélever quelques colonies à partir du milieu BHI, à l'aide d'une pipette Pasteur, et les ensemencer sur milieu à ADN, sous forme d'un trait épais. L'incubation des boites est faite à une température de 37°C durant 24 heures. La mise en évidence de la présence de l'ADNase est faite par ajout du HCl à 2N. Le test est présumé positif lorsqu'il y a présence d'une zone claire autour des traits ensemencés.

4 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Les souches de *S.aureus* isolées ont été soumises à un panel de molécules d'antibiotiques (Tableau III), selon la méthode de diffusion des disques sur gélose Muller-Hinton, en suivant les recommandations du CLSI (2015). L'interprétation des résultats, a été faite selon le manuel du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM) et les recommandations du CLSI (2015).

Tableau III : Liste des antibiotiques testés.

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Marque
β-lactamines	Pénicilline G	P	10	Liofilchem, Italie
	Oxacilline	OXC	1	Bio-rad, France
	Céfoxitine	FOX	30	Bio-rad, France
Glycopeptide	Vancomycine	VA	30	Liofilchem, Italie
Aminoglycoside	Gentamycine	CN	10	Liofilchem, Italie
	Néomycine	N	30	Liofilchem, Italie
	Tobramycine	TMN	10	Liofilchem, Italie
Macrolides	Erythromycine	ERY	15	Bio-rad, France
	Spiramycine	SP	100	Liofilchem, Italie
Lincosamides	Lincomycine	MY	15	Liofilchem, Italie
	Clindamycine	CMN	2	Bio-rad, France
Tétracyclines	Tétracycline	TET	30	Bio-rad, France
Quinolones	Ofloxacine	OFX	5	Bio-rad, France
Phénicol	Chloramphénicol	CHL	30	Liofilchem, Italie
Inhibiteurs de synthèse de l'acide folique	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	SXT	25	Liofilchem, Italie

- **Technique de l'antibiogramme**

1^{er} jour :

Préparer le milieu Muller-Hinton et le répartir dans des boîtes de Pétri stériles. Sécher les dans l'étuve à 37°C.

Repiquer les souches isolées de *S. aureus* sur milieu BHI et les incuber à 37°C pour une durée n'excédant pas 18 heures (pour avoir des cultures jeunes)

2^{eme} jour :

Préparation de la suspension bactérienne : prélever quelques colonies bactériennes jeunes à partir du milieu BHI et les faire suspendre dans de l'eau physiologique. Homogénéiser bien la suspension à l'aide d'un vortex électrique, et l'ajuster jusqu'à atteindre une opacité équivalente à une densité optique(D.O) de 0.08 à 0.1 (mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625nm).

Tremper l'écouvillon dans la suspension, puis enlever l'excès d'inoculum par pression sur les bords du tube. Ecouvillonner régulièrement la gélose en tournant la plaque de 60° jusqu'à l'ensemencement de la totalité de la surface, sans oublier les bords de la boîte.

Laisser sécher les boîtes 3 à 5 minutes. Déposer à l'aide d'une pince stérile les disques d'antibiotiques (3 à 4 disques différents par boîte de Pétri) sur milieu Muller-Hinton.

3^{ème} jour :

La lecture de l'antibiogramme se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne, qui a été formée autour des disques d'antibiotique. Après lecture des zones d'inhibition, les souches sont classées en : souches sensibles, souches intermédiaires et souches résistantes.

Recherche de souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM)

Test de diffusion du disque de céfoxitine

La résistance de *S. aureus* aux isoxazolyl pénicillines (oxacilline) est recherchée à l'aide du disque de céfoxitine (30 µg), en plus du disque d'oxacilline (1µg) dans des conditions standards. Devant tout problème d'interprétation, un test de confirmation par la technique de screening à l'oxacilline est réalisé.

5 Test du Screening à l'Oxacilline

Le dépistage des souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) a été réalisé sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 4% de NaCl et contenant une concentration finale de 6µg/ml d'oxacilline selon les lignes directrices du CLSI (2014).

Mode opératoire

1^{er} jour :

Mélanger 6 mg d'Oxacilline (sous forme d'une poudre) avec 10ml d'eau distillée stérile, puis réaliser une dilution à un dixième avec de l'eau distillée. Dans chaque boîte de Pétri, déposer 2 ml de cette dilution et 18 ml de gélose Mueller-Hinton + 4% de NaCl. Mélanger bien le milieu de culture en réalisant des mouvements de rotation sous forme d'un 8. Sécher et garder les boîtes dans l'étuve.

2^{ème} jour :

Chaque boîte de Pétri est divisée en quatre quadrants, le premier cadran est ensemencé par la souche à tester, le deuxième par une souche de référence sensible à l'Oxacilline (*S.aureus* ATCC 25923) et le troisième quadrant par une souche de *S.aureus* résistante à l'Oxacilline (*S. aureus* ATCC 43300 ou bien par la souche MU 50). Tandis que, le quatrième quadrant est non ensemencé.

Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 heures.

3^{ème} jour :

Lecture des boîtes : la présence des colonies indique une résistance à l'Oxacilline.

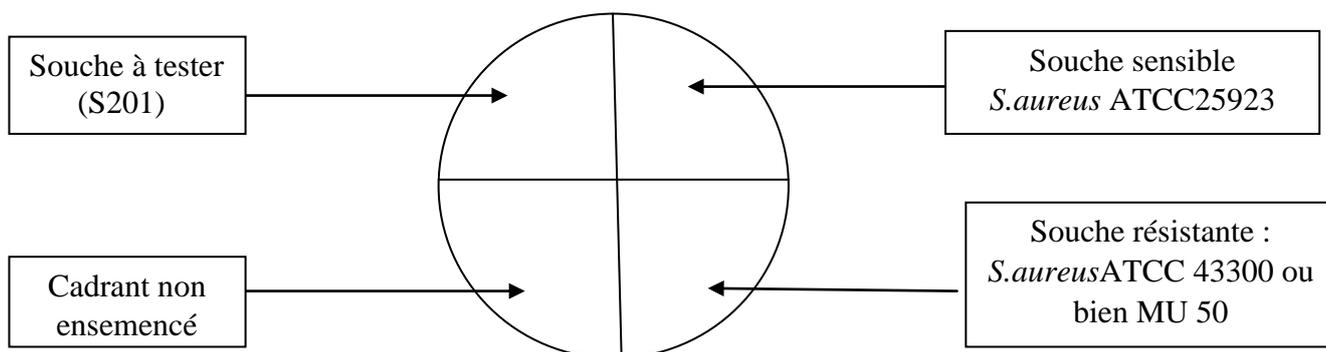


Figure 6: Screening à l'oxacilline

6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide vis-à-vis de l'oxacilline

Ce test est effectué pour la souche *S.aureus* (S201), qui présente une résistance à l'oxacilline.

Technique

1^{er} jour :

Préparer une solution mère de l'antibiotique oxacilline à 1600µg/ml (16mg de poudre d'oxacilline diluée dans 10ml d'eau distillée).

Préparer une série de dilution pour cette solution. Prélever 2ml de chaque dilution et les mettre dans des boîtes de Pétri stériles, puis ajouter 18 ml de milieu Muller-Hinton+2% NaCl. Mélanger bien en utilisant des mouvements circulaires sous forme d'un 8, et laisser solidifier à une température ambiante.

Repiquer la souche isolée (S201) résistante à l'Oxacilline sur milieu BHI en stries et les incubent 18 heures à 37°C pour avoir une culture jeune.

2^{eme} jour :

Préparer une suspension bactérienne d'une densité optique comprise entre 0.08 et 0.1.

Prélever avec l'anse une goutte de l'inoculum et l'ensemencer sur les boîtes (sous forme de spot), en commençant par la boîte témoin sans antibiotique et en allant du faible vers la plus forte concentration. L'incubation se fait à 37°C durant 18 à 24 heures.

3^{eme} jour :

Lecture du CMI : c'est la concentration d'antibiotique la plus faible en mg/l pour laquelle il n'y a pas de culture visible.

7 Conservation des souches

La conservation de souches identifiées a été réalisée à -20°C dans un bouillon cœur cerveau (BHIB) (CondaPronadisa, Espagne) + glycérol (BiochemChemopharma, France), à raison de 30% (V/V).

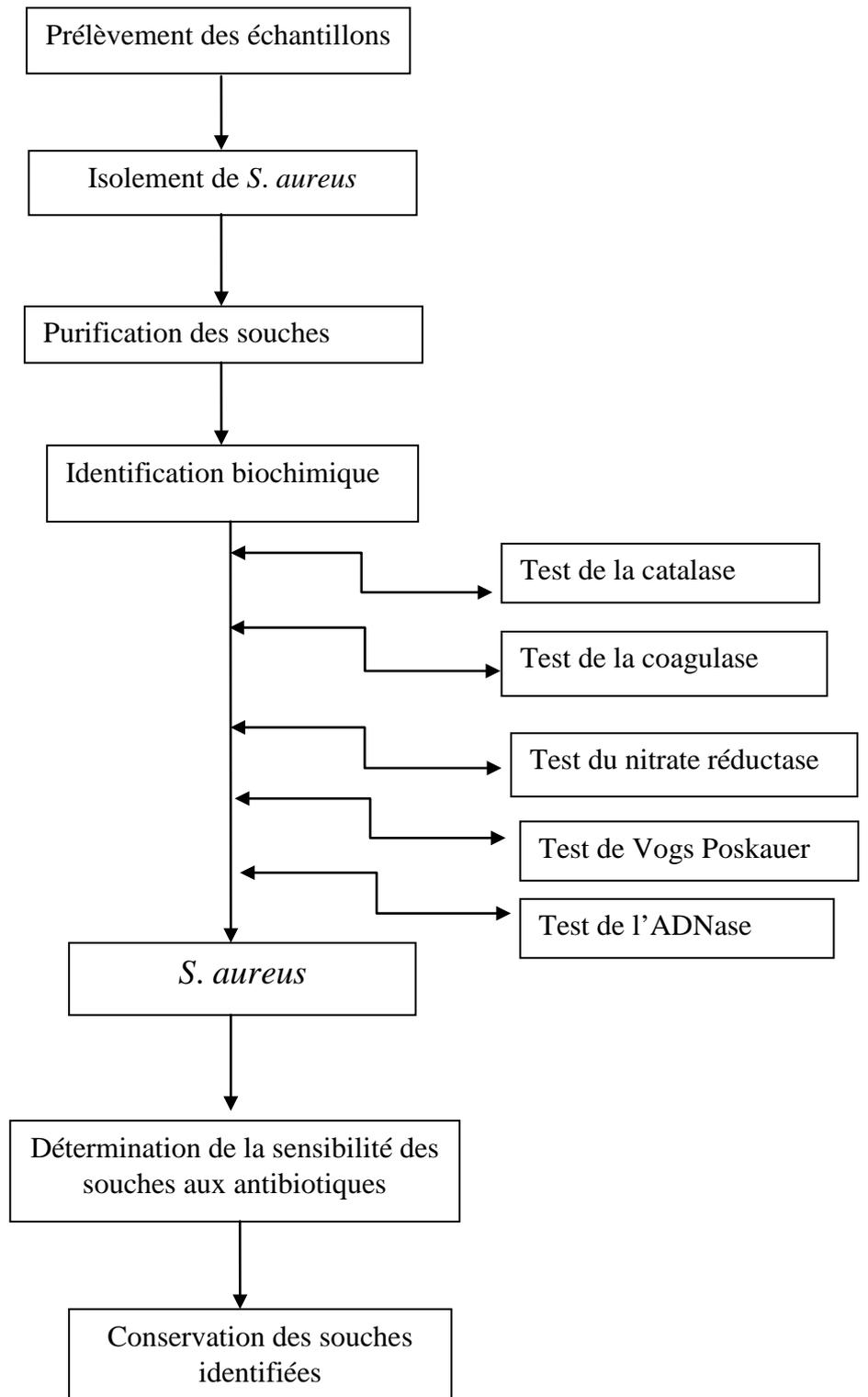


Figure 7: Schéma récapitulatif de la méthodologie suivie pour la recherche et l'identification de *S. aureus*

Chapitre II: Résultats et discussion

1. Résultats

1.1.Prévalence de *S.aureus*

Au cours de la période d'étude qui s'étalait de mi-février à la mi-mai, 52 échantillons du lait et de produits laitiers (petit lait et lait caillé) ont été prélevés et soumis à un isolement de souches de *S. aureus*. Sur la totalité des échantillons analysés, 25 se sont révélés positifs, soit une fréquence de l'ordre de 48.08%. 72 colonies caractéristiques du genre *Staphylococcus* ont été purifiées, puis soumises aux différents tests biochimiques. Ces derniers ont pu confirmer 55 souches de *S.aureus*.

La prévalence *S.aureus* est variable non seulement en fonction du type de produit, mais aussi en fonction du point de prélèvement. Elle est de l'ordre de 75% au niveau des points de vente et 43.18% au niveau des fermes (Tableau V).

Tableau IV: Incidence de *S.aureus* selon le type de produit

Nature de produit	Nombre d'échantillons analysé	Nombre d'échantillons positifs	Nombre des souches <i>S.aureus</i>	Prévalence
Petit lait	6	4	15	66.66%
Lait cru	44	19	38	43.18%
Lait caillé	2	2	2	100%
Total	52	25	55	48.08%

Tableau V: Incidence de *S.aureus* selon l'origine des échantillons.

Origine	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs	Nombre de souches <i>S.aureus</i>	Prévalence
Ferme	44	19	38	43.18%
Points de vente	8	6	17	75%
Total	52	25	55	48.08%

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

Les 55 souches isolées de *S.aureus* ont été soumises à 15 molécules d'antibiotiques, utilisées en thérapeutique humaine et en médecine vétérinaire, selon la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton. Les résultats obtenus montrent bien l'existence de résistances selon les différentes familles visées. En effet, une forte résistance a été enregistrée pour la pénicilline G, avec une fréquence de 94.54 %. Des résistances relativement faibles ont

été observées vis-à-vis de la tétracycline, la tobramycine et la néomycine, avec des pourcentages de 18.18%, 10.90% et 10.90% respectivement. Aucune résistance vis-à-vis de la vancomycine, le triméthoprime/sulfaméthoxazole, l'ofloxacine, la clindamycine, et la lincomycine (Tableau VI).

Tableau VI: Résistance des souches de *S. aureus* (n=55) aux antibiotiques testés.

Antibiotiques	Résistantes	intermédiaires	Sensibles
	Nombres (%)	Nombre (%)	Nombre (%)
P	52 (94.54%)	0 (0%)	3 (5.45%)
FOX	1 (1.81%)	0 (0%)	54 (98.18%)
OXC	1 (1.81%)	1 (1.81%)	53 (96.36%)
CN	1 (1.81%)	0 (0%)	54 (98.18%)
TOB	6 (10.90%)	0 (0%)	49 (89.09%)
N	6 (10.90%)	0 (0%)	49 (89.09%)
SP	0 (0%)	44 (80%)	11 (20%)
ERY	1 (1.81%)	0 (0%)	54 (98.18%)
MY	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)
CMN	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)
OFX	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)
SXT	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)
CHL	1 (1.81%)	0 (0%)	54 (98.18%)
VA	0 (0%)	0 (0%)	55 (100%)
TET	10 (18.18%)	0 (0%)	45 (81.82%)

Cinq phénotypes de multi-résistance ont été observés. Trois souches portent le phénotype P-TOB-N-TET, une souche porte le phénotype P-TOB-N-CHL, une souche porte phénotype : P-OXC-FOX-TOB-N-E-TET et une autre porte le phénotype : P-CN-TOB-N (Tableau IIV).

Tableau VII: Phénotypes de résistance des souches de *S. aureus* isolées

Souche	Profil de résistance	Souche	Profil de résistance
S131	P	S164	P
S132	P	S165	P
S133	P	S166	P
S134	P	S167	P
S140	P	S168	P
S141	P	S169	P
S142	P	S170	P
S143	P –TOB- N –TET	S171	P
S144	P-TOB- N –TET	S172	P-TOB-N-TET
S145	P	S173	P
S146	P	S174	P
S147	P –TET	S197	P
S149	P	S198	P
S150	P –TET	S199	P
S151	P –TET	S200	/
S152	P	S201	P –OXC- FOX- TOB- N- ERY- TET
S153	P	S202	/
S154	P- TET	S203	/
S155	P	S204	P
S156	P –TOB- N –CHL	S205	P –CN- TOB- N
S157	P	S206	P
S158	P	S207	P
S159	P –TET	S208	P
S160	P	S209	P
S161	P- TET	S210	P
S162	P	S211	P
S163	P	S212	P

Dans cette étude, une souche a été qualifiée comme étant un *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Le dépistage de cette souche a été réalisé grâce au test de diffusion du disque de céfoxitine sur gélose Mueller Hinton. Cette souche a présenté une résistance vis-à-vis cet antibiotique (zone d'inhibition inférieure à 21mm). En plus de cette résistance, une résistance vis-à-vis de l'oxacilline a été observée. Un screening à l'oxacilline a été réalisé dans le but de confirmer cette la résistance vis-à-vis de l'oxacilline (Figure8). De plus, la résistance vis-à-vis de l'oxacilline a été confirmée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice vis-à-vis de l'oxacilline par la méthode de micro-dilution de l'antibiotique en milieu solide. En effet, cette souche a exprimé une CMI supérieure à 16µg/ml (Figure10)

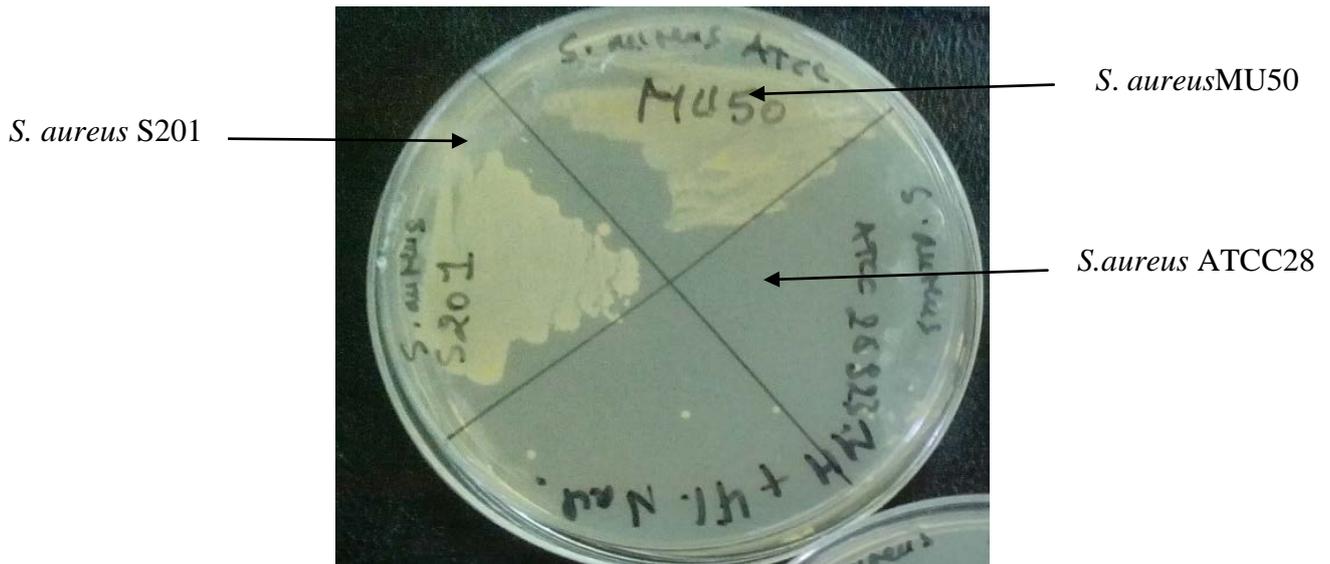


Figure8 : Screening à l'oxacilline de *S. aureus*

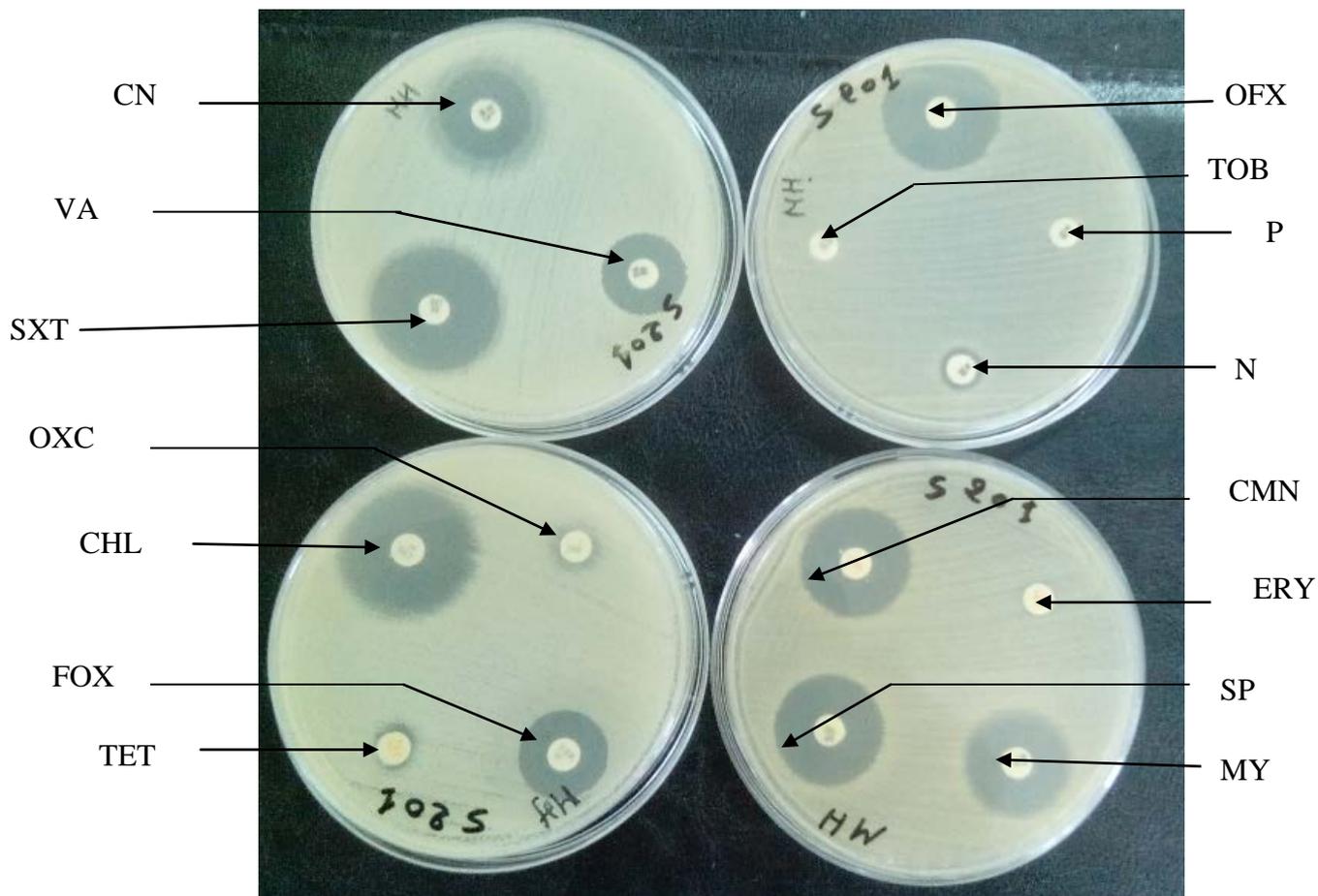


Figure 9: Profil de résistance de la souche de *S. aureus* S 201

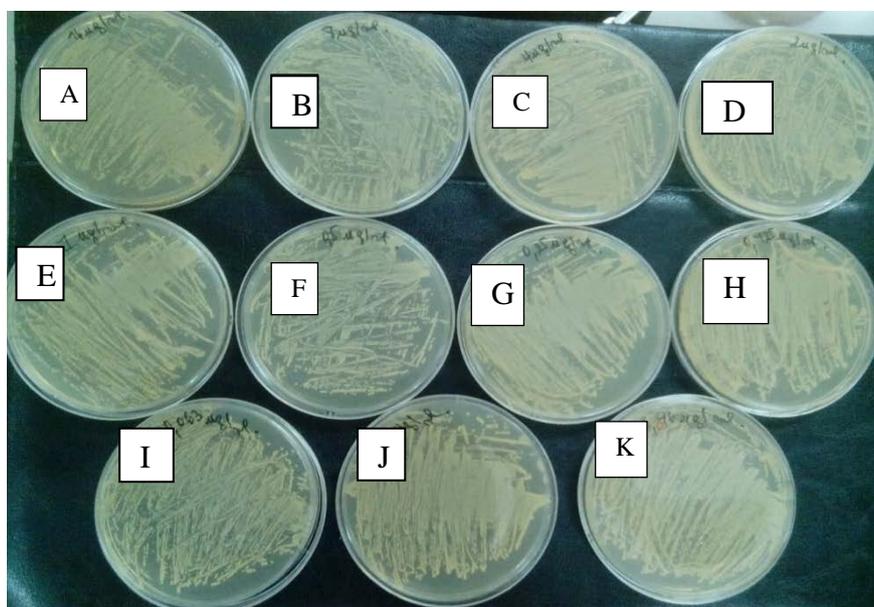


Figure 10: Concentration minimale inhibitrice de la souche S201 en milieu solide

A : 16 μ g/l ; **B :** 8 μ g/l ; **C :** 4 μ g/ml ; **D :** 2 μ g/ml ; **E :** 1 μ g/ml ; **F :** 0.5 μ g/ml ; **G :** 0.025 μ g/ml ;
H : 0.125 μ g/ml ; **I :** 0.062 μ g/ml ; **J :** 0.032 μ g/ml ; **K :** 0.016 μ g/ml

2. Discussion

Les résultats de ce travail révèlent que la prévalence de *S.aureus* est de 48.08%, sur un total de 55 échantillons du lait cru et de produits laitiers. Nos résultats ne concordent pas avec ceux de ADJLANE-KAOUCHE et al (2014), qui ont annoncé une fréquence d'isolement de *S. aureus* dans le lait cru, de l'ordre 33.3% et 56.7% au niveau des élevages et des unités de transformation respectivement. Cette fréquence semble moins importante aussi que celle rapportée par AGGAD et al (2009) et GHAZI et NIAR (2011), qui ont annoncé des taux de contaminations du lait cru l'ordre de 54.28% et 82% respectivement dans l'ouest algérien. De nombreuses études réalisées à travers plusieurs pays ont montré l'importance de contamination du lait cru et de produits laitiers par *S. aureus*. En Malaisie, sur un total de 2650 échantillons du lait et de produits laitiers traditionnels, 328 (12.4%) échantillons se sont révélés positifs, incluant 162 (15.7%) échantillons du lait bovin et 86 (9.6%) échantillons du lait ovin (JAMALI et al., 2015). En Pologne, une étude concernant la prévalence de gènes d'entérotoxines et la résistance de *S. aureus* isolé du lait cru montre un taux de contamination de 62% sur un total de 115 échantillons du lait (ROLA et al., 2015a). Les mêmes auteurs ont annoncé une prévalence de 86.1% sur un nombre total de 223 échantillons du lait caprin (ROLA et al, 2015). ANTONIOS et al (2015) ont rapporté une prévalence de 23.09% sur un total de 342 échantillons du lait ovin, dans une étude concernant la prévalence, la diversité génétique et le profil de résistance aux agents antimicrobiens de *S. aureus* isolé du lait ovin en Grèce.

Ces données concernant la prévalence de *S. aureus* dans le lait cru reflètent l'importance que tient ce germe dans la contamination microbienne de cette denrée alimentaire. En effet, *S. aureus* est la cause majeure des mammites cliniques et sub-cliniques et par conséquent, la raison principale pour les traitements antimicrobiens chez les vaches laitières. Plusieurs sources de contamination du lait par *S. aureus* à la ferme ont été soulignées, incluant les conditions d'hygiène inappropriées durant la traite et le stockage (JAMALI et al, 2015).

Dans cette étude, la fréquence d'isolement de *S. aureus* est plus importante aux points de vente, contrairement aux élevages, ce qui reflète qu'en plus de mammites qui constituent la source principale de contamination du lait cru à la ferme, d'autres sources peuvent aussi exister. En effet, le portage nasal de *S. aureus* chez les humains et les animaux de compagnie constitue le réservoir principal de ce germe, ce qui pourrait expliquer la contamination de denrées alimentaires à travers les différentes étapes de production. VISCIANO et al (2014) ont montré la présence de *S. aureus* aussi bien dans le lait que dans la matrice humaine. 16 écouvillons de la partie nasale se sont révélés positifs sur un total de 30, soit une fréquence de 53.33%. En Egypte, KAMAL et al (2013) ont montré que 20 ouvriers impliqués dans la fabrication de produits laitiers traditionnels hébergent *S. aureus* dans leurs mains. Le même constat a été rapporté par CASTRO et al (2016), dans une étude concernant les sources de dissémination de souches virulentes de *S. aureus* où ils ont annoncé une prévalence de 19.8 % de *S. aureus* dans les narines et 11.1% dans les mains des ouvriers de compagnies alimentaires. TAN et al (2014) ont signalé une haute prévalence de *S. aureus* dans les mains des ouvriers impliqués dans la préparation de produits prêts à manger, qui est de l'ordre de 65.88% à 74.12% et avec une charge de $0.3 \pm 0.5 \log_{10} \text{cfu/cm}^2$ et $0.5 \pm 0.7 \log_{10} \text{cfu/cm}^2$. Ces données n'écartent pas la possibilité de transmissions mutuelles de *S. aureus* entre l'homme, l'animal et la matrice alimentaire.

En plus des manipulateurs de denrées alimentaires qui sont considérés comme la source principale de contamination dans les empoisonnements alimentaires, les équipements et les surfaces environnementales peuvent être aussi considérées comme des sources de contamination non négligeables par *S. aureus*. Pour cela, l'installation de bonnes pratiques de fabrication (BPF) et des consignes du système HACCP s'avère un moyen efficace pour améliorer la sécurité et la qualité des aliments (CASTRO et al, 2016).

A propos de l'antibiorésistance, une forte résistance a été observée à l'encontre de la pénicilline G. Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs auteurs, qui ont signalé de fortes résistances vis-à-vis cette molécule (VISCIANO et al, 2014 ; TAN et al, 2014; JAMALI et al, 2015 ; CASTRO et al, 2016). En revanche, de faibles résistances vis-à-vis la pénicilline ont été rapportées par d'autres auteurs contre des souches de *S. aureus* isolées des hamburgers et du lait cru (SHAHRAZ et al, 2012 ; ROLA et al, 2015a).

Cette forte résistance de nos souches vis-à-vis de la pénicilline est due probablement à la production de β -lactamases, enzymes inactivant la pénicilline et autres molécules d'antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines (MORONI et al, 2006). WATTS et SALMON (1997) ont testé des souches de *S. aureus* isolées de bovins atteints de mammites et ils ont déterminé que la pénicilline et l'ampicilline étaient les agents antimicrobiens les plus touchés par l'activité des β -lactamases. En plus, les β -lactames est la famille la plus utilisée pour le traitement des mammites bovines, ovines et caprines. Cette famille comprend une variété large de molécules, incluant la pénicilline, l'ampicilline, l'amoxicilline et autres, qui sont largement utilisées pour le traitement des diverses infections (DE OLIVEIRA et al, 2000).

Une résistance relativement faible a été enregistrée vis-à-vis de la tétracycline. Ce résultat rejoint ceux annoncés par ROLA et al (2015a) et ROLA et al (2015b), qui ont annoncé de faibles taux de résistance (4% et 6.3%) de souches de *S. aureus* d'origine bovine et ovine vis-à-vis de la tétracycline. En revanche, une forte résistance a été rapportée par JAMALI et al (2015).

De faibles résistances ont été observées vis-à-vis les aminoglycosides (gentamicine, tobramycine et néomycine). Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs auteurs. De faibles taux de résistance vis-à-vis de la gentamicine, avec des valeurs de 1.9%, 1.2% et 4.1% concernant des souches isolées du lait bovin, ovin et des fromages traditionnels ont été rapportés par JAMALI et al (2015). Les mêmes auteurs ont signalé un taux de résistance de 0% vis-à-vis de la tobramycine. PENGGOV et CERU (2003) ont annoncé une sensibilité vis-à-vis de la kanamycine, qui est de l'ordre de 92.1% contre des souches isolées de glandes mammaires bovines et ovines.

Une résistance de l'ordre de 1.81 % a été observée aussi bien vis-à-vis le chloramphénicol et l'érythromycine. Des résistances à l'encontre de chloramphénicol ont été rapportées par plusieurs auteurs dans plusieurs pays, ce qui confirme que les praticiens vétérinaires ont recours à cet antibiotique pour le traitement des diverses pathologies. ROLA et al (2015a, b) ont rapporté des taux de résistance de 4% et 0.5% vis-à-vis des souches bovines et ovines. Des faibles résistances ont été annoncées par CASTRO et al (2016), PEREIRA et al (2009) et TAN et al (2014), qui sont de 2%, 1.4% et 1.35%. Cet antibiotique est interdit dans les élevages des animaux de rente dans l'union européenne et réservé uniquement pour la consommation humaine. Bien que, des résidus de chloramphénicol ont été

détectés dans les tissus animaux en Pologne, ce qui suggère son utilisation en pratique vétérinaire (EFSA, 2014). JAMALI *et al* (2015) ont annoncé des résistances vis-à-vis de l'érythromycine de 6.2%, 4.7% et 16.3% concernant des souches isolées du lait bovin, ovin et des fromages traditionnels.

Aucune de nos souches n'est résistante vis-à-vis de la vancomycine, la spiramycine, la lincomycine, la clindamycine, l'ofloxacine, et le triméthoprimésulfaméthoxazole. Ces résultats corroborent avec ceux de TAN *et al* (2014), JAMALI *et al* (2015), CASTRO *et al* (2015) et SHAHRAZ *et al* (2012).

Dans cette étude, la fréquence d'isolement de souches SARM semble faible. En effet, une seule souche (1.81%), sur un total de 55 souches, a été confirmée comme étant un SARM. Peu de données sont disponibles sur la fréquence des SARM dans les denrées alimentaires en Algérie. Une première étude concernant la prévalence et la résistance des SARM dans le lait et la viande bovine révèle un taux de 3.5%, sur un nombre total de 57 souches (CHAALAL *et al*, 2014). AKKOU *et al* (2015) ont pu isoler des souches SARM à partir des ouvriers en contact avec des bovins laitiers. De faibles fréquences ont été aussi rapportées en Malaisie, en Egypte et en Turkey (JAMALI *et al*, 2015 ; KAMAL *et al*, 2013 ; ARAS *et al*, 2012 ; YESIM CAN *et HALUKCELIK*, 2012). En Italie, plusieurs études ont été réalisées concernant la présence des souches SARM dans le lait et autres produits alimentaires destinés à la consommation à l'état cru ou cuit. Néanmoins, les taux enregistrés diffèrent d'une étude à une autre. NORMANO *et al* (2007b) ont isolé six souches SARM (0.4%) à partir de 1634 échantillons du lait et des fromages. TRAVERSA *et al* (2015), PARISI *et al* (2016), CARUSO *et al* (2016), BASANISI *et al* (2015), CARFORA *et al* (2015) et CORTIMIGLIA *et al* (2015) ont observé des prévalences nettement faibles dans le lait bovin, caprin et ovin, qui sont de 0%, 2.5%, 1.23%, 2.7%, 1.3% et 2% respectivement. Cette différence entre ces données pourrait s'expliquer par la diversité et le non homogénéité des méthodes appliquées pour la détection des SARM.

Il est clair que plusieurs études ont montré le risque associé à la présence des SARM dans les denrées alimentaires. Tel qu'il est mentionné, le risque majeur est le développement des intoxications alimentaires, liées à la multiplication de ces souches. Le second, est le développement de maladies invasives suite à la consommation de denrées alimentaires contaminées. Le troisième risque, est la possibilité que les personnes impliquées dans les différents processus technologiques soient colonisées par des SARM. Tous ces risques dépendent des mesures d'hygiène, de la quantité des SARM et de la capacité de ces souches à coloniser l'hôte (KLUYTMANS, 2009).

Une attention particulière doit être portée à notre souche SARM isolée. En effet, cette dernière résiste vis-à-vis sept antibiotiques, à savoir la pénicilline, l'oxacilline, la céfoxitine, la tobramycine, l'érythromycine, la néomycine et la tétracycline. Il est très connu que la sensibilité des SARM, isolés des humains et des sources environnementales, aux antibiotiques est variable et ceci constitue un souci en thérapie humaine et vétérinaire. Cependant, les souches SARM sont fréquemment multi-résistantes (PARISI *et al*, 2016). Nos résultats concordent avec ceux de plusieurs auteurs qui signalent la diffusion large des souches SARM bovines multi-résistantes à travers le monde. CARUSO *et al* (2016) ont isolé 5 souches SARM à partir du lait de chèvre, de brebis et des écouvillons nasaux. Quatre de ces souches étaient résistantes à 10 antibiotiques (Augmentin, céfotaxime, céfoxitine, clindamycine,

doxycycline, érythromycine, oxacilline, pénicilline et tétracycline). Tandis que, la dernière souche, en plus de ces molécules citées précédemment, résiste vis-à-vis de la kanamycine. PARISI et *al* (2016) ont isolé 12 SARM à partir du lait bovin. Toutes les souches étaient résistantes vis-à-vis 6 à 11 antibiotiques, révélant un taux variable de résistance vis-à-vis de l'ampicilline, de la céfotaxime, de la pénicilline, de l'augmentin, de l'oxacilline, de la tétracycline, de la clindamycine, de la doxycycline, de l'érythromycine, de la kanamycine, de la streptomycine, de sulfaméthoxazole et de l'enrofloxacin. Aucune de ces souches n'était résistante vis-à-vis la céphalotine, la gentamicine, le triméthoprime/sulfaméthoxazole, la tobramycine et la vancomycine.

Néanmoins, la sensibilité de cette souche SARM isolée vis-à-vis de la vancomycine et autres molécules utilisées pour le traitement des infections à SARM, laisse supposer que la survenue d'infections sévères chez l'homme n'est pas probable et plusieurs options pour le traitement de ces infections aux SARM par des antibiotiques existent.

Les souches SARM semble émerger chez les animaux et par conséquence chez les humains (PARISI et *al*, 2016). Le premier rapport concernant des SARM causant des mammites a été publié à la fin des années 1970, quand cette bactérie a été isolée dans le lait des vaches atteintes de mammites en Belgique. Récemment, un autre groupe de souches de SARM ont été isolées chez l'humain et le troupeau laitier en Europe. Ce groupe inclut plusieurs clones (ST130, ST425 et ST1943) qui sont suggérés qu'ils s'agissent de clones associés aux bovins, mais qui sont retrouvés actuellement chez des porteurs sains et chez des cas cliniques. En plus, un nouveau déterminant du *mecA*, nommé le *mecA*_{LGA251} (*mecC*), a été identifié parmi les souches SARM associées à l'animal et à l'homme. Ces résultats confirment l'évolution continue de *S. aureus* (VERKADE et KLUYTMANS, 2014).

Conclusion

Dans cette étude, il a été démontré que le rôle de *S. aureus* comme un agent pathogène d'origine alimentaire ne doit pas être écarté. En effet, sur 52 échantillons analysés, 25se sont révélés positifs, soit une fréquence de l'ordre de 48.08%.

L'étude de la résistance des souches isolées vis-à-vis quelques molécules d'antibiotiques montre l'existence de résistances avec des taux variables, selon les familles considérées. Une forte résistance a été enregistrée vis-à-vis la pénicilline G. Ce travail a mis en évidence l'existence de souches de *S. aureus* multi-résistantes. En effet, une souche SARM a été isolée. Cette dernière résiste vis-à-vis sept molécules d'antibiotiques, ce qui renforce le risque sanitaire associé à la consommation de ce type de produit à l'état cru.

La dissémination progressive de la multirésistance doit être considérée comme une menace majeure pour l'homme, en absence d'une politique claire et restrictive visant à réduire l'usage des agents antimicrobiens, non seulement chez l'homme, mais aussi chez l'animal. Aujourd'hui, la prévention de la contamination des aliments par *S. aureus* repose sur l'instauration de bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication, sur l'application des règles dictées par le système HACCP et le contrôles de toutes les procédures post-production.

Pour finir il faut dire que l'actualisation des données locales sur le profil épidémiologique de ce germe pourra jouer un rôle important dans la rationalisation de l'utilisation des antibiotiques et dans la détermination d'une stratégie efficace pour le contrôle de toute contamination d'origine microbienne.

Cette étude ouvre plusieurs perspectives, à savoir :

Etudier la capacité des souches à former des biofilms ;

Caractériser les souches isolées sur le plan moléculaire, en recherchant les gènes codants pour les entérotoxines staphylococciques, les gènes codants pour quelques résistances aux antibiotiques et quelques facteurs de virulence ;

Isoler d'autres souches de *S. aureus* à partir des autres matrices alimentaires et comparer entre les différents isolats.

Bibliographie

ADJLANE-KAOUICHE, S., BENHACINE, R., GHOZLANE, F., MATI, A. 2014. Nutritional and Hygienic Quality of Raw Milk in the Mid-Northern Region of Algeria: Correlations and Risk Factors. *The Scientific World Journal*. Volume 2014, Article ID 131593, 7 pages.

AGGAD, H., MAHOUZ, F., AHMEDAMMAR, Y., KIHAL, M. 2009. Évaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Revue Médecine-Vétérinaire*. Volume 160, p590-595.

AKKOU, M., ANTRI, K., BACHTARZI, M., A., BES, M., TRISTAN, A., DAUWALDER, O., KAIDI, R., MEUGNIER, H., TAZIR, M., ETIENNE, J., LAURENT, F., RAMDANI-BOUGUessa, N. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis and nasal carriage of workers in contact to animals in Algeria. *Pakistan Vet. J.*36, p184-188.

ANTONIOS, Z., THEOFILOS, P., IOANNIS, M., GEORGIOS, S., GEORGIOS, V., EVRIDIKI, B., LOUKIA, E., KYRIAKI, M., ATHANASIOS, A., VASILIKI, L. 2015. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk from Greek traditional ovine farms. *Small Ruminant Research* 125, p120-126.

ARAS, Z., AYDIN, I., KAV, K. 2012. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from caprine mastitis cases. *Small Rum. Res.* 102, p68-73.

ASSOUS, M., BASSE-GUERINEAU, A., BOURHY, H., DHOTE, R et PAUGAM, A, 1999. Microbiologie et pathologies infectieuses, de Boeck université. 2^{ème} édition, p186-192.

BASANISI, M., NOBILI, G., LA BELLA, G., RUSSO, R., SPANO, G., NORMANNO, G., LA SALANDRA, G. 2015. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in Southern Italy. *Small Rum. Res.* 135, p17-19.

BERCHE, P., GAILLARD, J.L et SIMONET, M. 1988. Bactériologie: les bactéries des infections humaines, Flammarion médecine science, p268-274.

BIEN, J., SOKOLOVA, O., BOZKO, P. 2011. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Pro-inflammatory Response, *Journal of Pathogens*, Volume 2011. Article ID 601905, 13 pages.

BOSGIRAUD, C. 2003. Microbiologie général et santé, association des enseignants de microbiologie et d'immunologie des facultés de pharmacie, édition ESKA. p277-292, p412-414.

BOULANGER, D., BUREAU, F., LEKEUX, P. 2005. Invasion intracellulaire des cellules non phagocytaires par *S. aureus*, *Ann, Med, Vet.* numéro150, p28-32.

BRISABOIS, A., LAFARGE, V., BROUILLAUD, A., BUYSER, M., COLLETTE, C1., GARIN-BASTUJI, B., THORE, M. 2003. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, numéro 16, Paris, p457-459.

BRYSKIER, A. 1999. Antibiotiques agent antimicrobiens et antifongiques. Ellipses édition, France.

CAMBAU, E., GUILLARD, T. 2012. Antimicrobiens agissant sur la synthèse et la confirmation des acides nucléiques, REV. SCI. TECH, volume 31, numéro 1, p73.

CARFORA, V., CAPRIOLI, A., MARRI, N., SAGRAFOLI, D., BOSELLI, C., GIACINITI, G., GIANGOLINI, G., SORBARA, L., DOTTARELLI, S., BATTISTI, A., AMATISE, S. 2015. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. Int. Dairy J. 42, p12-15.

CARUBA, T., ACCOULET, E. 2015. Pharmacologie et thérapeutique, 2ème édition, ISBN 9782 294 74634-5

CASTRO, A., SANTOS, C., MEIRELES, H., SILVA, J., TEIXEIRA, P. 2016. Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. Journal of Infection and Public Health, 9, p153-160.

CHAALAL, W., AGGAD, H., SAIDI, N., KIHAL, M. 2014. Prevalence and antimicrobial resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat and milk in Algeria. Advances in Environmental Biology. 8 (1), p1-5.

CHABY, R. 2010. des endotoxines au lipopolysaccharides: structure, activité cellulaires et effets physiopathologiques, Lavoisier, Paris.

CHAKRABORTY, S., PRAMANIK, P., ROY, S. 2012. A review on- emergence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* and role of chitosan nanoparticle in drug delivery, Pharmaceutical Sciences, Vol 2 numéro1, p96-106.

CHARLIER, P., JACQUES, C., DOMINIQUE, D., GEORGES, D., COLETTE, D., JEAN, D., ÉVELINE, F., CLAUDINE, F., JEAN-MARIE, F., MORENO, G., COLETTE, G., BERNARD, J., JOSETTE, L., MARTINE, N. 1997. Résistance bactérienne aux Bétalactamines, médecine/sciences, volume 14 numéro 5, p545.

CHOPRA, L., ROBERTS, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, application, molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance, Microbiology and Molecular BIOLOGY REVIEWS, volume 65, numéro 2, p235.

CORTIMIGLIA, C., BIANCHINI, V., FRANCO, A., CAPRIOLI, A., BATTISTI, A., COLOMBO, L., STRADIOTTO, K., VEZZOLI, F., LUINI, M. 2015. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from dairy goat farms in Northern Italy. J. Dairy Sci. 98, p2307-2311.

COURVALIN, P. 2008. La résistance des bactéries aux antibiotiques; combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques, Bull-acad-vét-France, tome 161, numéro1.

DAUREL, C., LECLERCQ, R. 2008. L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES, numéro 407, p81- 85.

DE OLVEIRA, A, P., WATTS, J, I., SALMON, S, A., AARESTRUP, F, M. 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United states. Journal of Dairy Science 83, p855-862.

DUBAS, M. 2008. virulence de *Staphylococcus aureus* et des *Listeria*, Association des anciens élèves de l'institut Pasteur, 50^{ème} année, numéro195

DUMITRESCU, O., DAWALDER, O., BOISSET, S., REVERDY, M., TRISTAN, A., VANDENESCH, F. 2010. Résistance aux antibiotiques chez *S.aureus*, médecine science. Volume 26, numéro 11, Paris.

DUMITRESCU, O. 2012. *S.aureus* et maladies toxiques, Revue Francophone des laboratoires numéro 439, p44-46.

EFSA. 2014. Report for 2012 on the results from the monitoring of veterinary medicinal products residues and other substances in live and animal products. EFSA supporting publication 2014: EN-540, p65.

FEDEREGHI, M. 2005. Bactériologie alimentaire: Compendium d'hygiène des aliments, 2^{ème} édition, Economica, Paris, p25-36.

GALMICHE, A., BOQUET, P .2001. Toxines bactériennes : facteurs de virulence et outil de biologie cellulaire. Médecine sciences. Numéro 6-7, P92.

GAUDY, C., BUXERAUD, J. 2005. Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique, ELSEVIER CAMPUS MEDECINE, p15-20.

GHAZI, K., NIAR, A. 2011. Qualité hygiénique du lait cru de vaches dans les différents élevages de la wilaya de Tiaret. Tropicultura, 29, 4, p193 – 196.

GORDON, R., LOWY, F. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, and Department of Pathology, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, New York, MRSA Pathogenesis, p350-356.

GUIRAUD, J et ROSEC, J. 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire, édition AFNOR, p163-168.

JAMALI, H., PAYDAR, M., RADMEHR, B., ISMAIL, S, DADRASNIA, A. 2015. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. Food Control 54, p383-388.

JARRAUD, S., LINA, G., VANDENESCH, F., ÉTIENNE, J. 2002. Épidémiologie des infections toxémiques à staphylocoque doré, Club d'infectiologie, numéro 21.

JOFFIN, C et JOFFIN, J. 2010. Microbiologie alimentaire, 6ème édition. P40.

KAMAL, R, M., BAYOUMI , M, A., ABD EL AAL, S, F, A. 2013. MRSA detection in raw milk; some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. Food Control 33, p49-53.

KLUYTMANS, J, A, J, W. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency?. Clinical Microbiology and Infectious Diseases 16, p11-15.

KREASUKON, K., FETSCH, A., KRAUSHAAR, B., ALT, K., MULLER, K., KROMKER, V., ZESSIN, K, H., KASBOHRER, A., TENHAGEN, B, A. 2012. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. J. Dairy Sci. 95, p4382-4388.

KURKDJIAN, P., BINGEN, E.2003. Bactéries pathogènes dans la mucoviscidose. Archives de pédiatrie. Numéro 02. Paris, p344-345.

LECLERCQ, R. 2002. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques, Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.

LE LOIR, Y et GAUTIER, M., 2010. *Staphylococcus aureus*, édition TEC & DOC, Eminter, Lavoisier, France.

LEYRAL, G et VIERLING, E. 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments, hygiène et sécurité alimentaire, 4ème édition, Paris, p108.

LICOIS, D. 2010. Pathologie d'origine bactérienne et parasitaire chez le Lapin: Apports de la dernière décennie, Pathologie bactérienne et parasitaire, CUNICULTURE Magazine, 2010, vol.37. Nouzilly, France, p38.

LOWY, F et M, D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections, The New England Journal of Medicine, Volume 339 Numéro 8, p351.

MADIGAN, M et MARTINKO, J. 2007. Brock biologie des microorganismes, PEARSON EDUCATION, 11ème édition, p854-856.

MARIANI-KURKEDJIAN, J et BINGEN, E. 2003. Bactérie pathogènes dans la mucoviscidose, archives de pédiatrie, numéro 2, Paris.

MORONI, P., PISONI, G., ANTONINI, M., VILLA, R., BOETTCHER, P., CARLI, S. 2006. Short communication: Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. J. Dairy Sci. 89, p2973-2976.

MUYLAERT, A et MAINIL, G. 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques: le mécanisme, faculté de médecine et vétérinaire, 156, p110.

NHAN, T.X., GILLET, Y., VANDENESCH, F. 2012. Diagnostic et traitement des infections toxiques à *S.aureus*, journal des anti-infectieux numéro 14, p122-124.

NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A.L., VIRGILIO, S., CELANO, G.V. 2007b. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int. J. Food Microbiol. 117, p219-222.

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, p36-42.

PENGOV, A et CERU, S. 2003. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. J. Dairy. Science, 86, p3157-3163.

PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P, TEIXEIRA, P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiology 26, p278-282.

PETINAKI, E et SPILIOPOULOU, I. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. Clinical Microbiology and Infection. numéro 18, p626.

PIEMONT, Y. 2003. Actualités sur les toxines de *Staphylococcus aureus*, La Lettre de l'Infectiologue - Tome XIV - numero 1, p8-13.

QUINCAMPOIX, J et MAINARDI, J. 2001. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif, Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, numéro10, p75.

REBIAHI, A., RAHMOUN, M., SEDDIKI, K., KADI, F., BELHADJI, N., CHABNIC, D. 2014. Infections nosocomiales causées par *Staphylococcus aureus* producteur de biofilm dans l'unité de néonatalogie de l'établissement hospitalier spécialisé mère-enfant de Tlemcen, Journal de pédiatrie et de puériculture, p8.

ROLA, J, G., KORPYSA-DZIRBA, W., CZUBKOWSKA, A., OSEK, J. 2015a. Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from cow milk. Journal of Dairy Science 98, p4273-4278.

ROLA, J., SOSNOWSKI, M., OSTOROWSKA, M., OSEK, J. 2015b. Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci isolated from raw goat milk. Small Ruminant Research 123, p124-128.

ROUX, A et GHIGO, J. 2006. Les biofilms bactériens : *Bacterial biofilms*, Bull. Acad. Vét. Tome 159 - N°3, France. p262-266.

SALINE, M., RÖDSTRÖM, K., FISCHER, G., VLADISLAV, Y., OREKHOV, G., KARIN, P. 2010. The structure of superantigen complexed with TCR and MHC reveals novel insights into superantigenic T cell activation, nature communication, DOI: 10.1038/ncomms1117.

SHAHRAZ, F., DADKHAH, H., KHAKSAR, R., MAHMOUDZADEDH, M., HOSSEINI, H., KAMRAN, M., BOURKE, P. 2012. Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. Meat Science 90, p759-763.

SINGLETON, P. 2005. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, 6ème édition, Paris, p454-467.

TAN, S, L., LEE, H, Y., MAHYUDIN, N, A. 2014. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. Food Control 44, p203-207.

THAMMAVONGSA, V., KEUN KIM, H., MISSIAKAS, D., SCHNEEWIND, O.2015. Staphylococcal manipulation of host immune responses. Nat Rev Microbiol. 13, p529.

TRAVERSA, A., GARIANO, G.R., GALLINA, S., BIANCHI, D.M., ORUSA, R., DOMENIS, L., CAVALLERIO, P., FOSSATI, L., SERRA, R., DECASTELLI, L., 2015. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and wild animal carcasses in Italy. Food Microbiol. 52, p154-158.

TRZCINSKI, K., COOPER, B. S., HRYNIEWICZ, W., DOWSON, C. G. 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45, p764.

VAN HOEK, A., MERVIUS, D., GUERRA, B., MULLARRY, P., AARTS, H. 2011. Acquired antibiotic resistance gene: an overview, *Frontiers in Microbiology*, volume 2, numéro 203.

VERKADE, E., KLUYTMANS, J. 2013. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398 : animal reservoirs and human infections. *Infect. Genet. Evolu*, 21, p523-530.

VINCENOT, F., SALEH, M., PREVOST, G. 2008. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Infection à Pneumocoque et Staphylococcus aureus*. Revue Francophone des Laboratoires N 407, p61-67.

VISCIANO, P., POMILIO, F., TOFALO, R., SACCHINI, L., SALETTI, M, A., TIERI, E., SCHIRONE, M., SUZZI, G. 2014. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cow farms. Food Control. 46, p532-538

WATTS, J, L., SALMON, S, A. 1997. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce beta-lactamase. J. Dairy Sci. 80, p788-791.

YESIN CAN, H., HALUKCELİK, T. 2012. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses. Food Control 24, p100-103.

Annexes

Annexes 01 : Milieux de culture utilisés et leur composition

Gélose de Baird-Parker

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

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

Muller Hinton

Hydrolysate 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.

Eau peptonée tamponnée

bacto peptone.....20 g
NaCl.....5 g
Na₂ HPO₄.....9 g
K H₂ PO₄.....1,5 g
Eau D.....1000 ml
pH = 7,2

Préparation : 20g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.

Gélose à ADN

Hydrolysats tryptique de caséine.....20 g
ADN.....2 g
NaCl.....5 g
Gélose.....12 g
Eau D.....1000 ml

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

Bouillon cœur-cervelle

Extrait cœur- cervelle.....17g
Peptone pancréatique de gélatine.....10g
Na Cl.....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, 20g d'agar bactériologique ont été additionnés à 1L de bouillon BHIB lors de sa préparation.

Annexe 2: Résultats des tests biochimiques sur l'ensemble des colonies caractéristiques.

Echantillon	Acétoine	Catalase	Nitrate réductase	ADNase	Coagulase	Code
E1 PV1 C1	+	+	+	+	+	S156
E1 PV1 C2	+	+	+	+	+	S172
E1 PV1 C3	+	+	+	+	+	S142
E1 PV1 C4	+	+	+	+	+	S143
E1 PV1 C5	+	+	+	+	+	S144
E1PV1 C6	+	+	+	+	+	S157
E2 PV2 C1	+	+	+	+	+	S152
E2 PV2 C2	+	+	+	+	+	S131
E4 PV3 C1	+	+	+	+	+	S151
E5 PV4 C1	+	+	+	+	+	S133
E5 PV4 C2	+	+	+	+	+	S149
E5 PV4 C3	+	+	+	+	+	S134
E5 PV4 C4	+	+	+	+	+	S147
E6 PV5 C1	+	+	+	+	+	S132
E6 PV5 C2	+	+	+	+	+	S146
E6 PV5 C3	+	+	+	+	+	S154
E18 F11 C2	+	+	+	+	+	S167
E26 F19 C3	+	+	+	-	+	-
E20 F13 C3	+	+	+	+	+	S164
E11 F4 C2	+	+	+	+	+	S169
E23 F16 C1	+	+	-	+	+	-
E24 F17 C2	+	+	+	+	+	S171
E9 F2 C2	+	+	+	+	+	S174
E12 F5 C2	+	+	+	+	+	S140
E17 F10 C1	+	+	+	+	+	S162
E19 F12 C1	+	+	+	+	+	S159
E19 F12 C2	+	+	+	+	+	S150
E12 F5 C1	+	+	+	+	+	S165

E9 F2 C3	+	+	+	+	+	S173
E20 F13 C2	+	+	+	+	+	S153
E22 F15 C2	+	+	+	+	+	S163
E22 F15 C3	+	+	+	+	-	-
E8 F1 C2	+	+	+	+	+	S148
E24 F17 C1	+	+	+	+	+	S145
E17 F10 C2	+	+	+	+	+	S160
E8 F1 C3	+	+	+	+	+	S170
E15 F8 C2	+	+	+	+	+	S161
E9 F2 C1	+	+	+	+	+	S141
E12 F5 C3	+	+	+	+	+	S158
E17 F10 C3	+	+	+	+	+	S155
E24 F17 C3	+	+	+	+	+	S168
E20 F13 C1	+	+	+	+	+	S166
E50 F43 C2	+	+	+	+	+	S201
E32 F25 C2	+	+	+	+	-	-
E33 F26 C1	+	+	+	+	-	-
E50 F43 C1	+	+	+	+	+	S204
E49 F24 C1	+	+	+	+	-	-
E39 F32 C2	+	+	+	+	+	S200
E38 F31 C2	+	+	+	+	+	S197
E46 F39 C2	+	+	+	+	-	-
E34 F27 C1	+	+	+	+	-	-
E38 F31 C1	+	+	+	+	+	S198
E47 F40 C2	+	+	+	+	+	S199
E39 F32 C1	+	+	+	+	+	S203
E29 F22 C1	+	+	+	-	+	-
E48 F41 C1	+	+	+	+	-	-
E41 F34 C1	+	+	+	+	+	S202
E46 F39 C1	+	+	-	NT	NT	-
E33 F26 C2	+	+	-	NT	NT	-

Annexe 3: Valeurs des diamètres de zone d'inhibition

antibiotiques	Diamètre critique			Référence
	S	I	R	
Pénicilline	≥29	-	≤28	CLSI 2016
Oxacilline	≥13	11-12	≤10	CLSI2006
Céfoxitine	≥22	-	≤21	CASFM2017
Gentamicine	≥15	13-14	≤12	CLSI 2016
Tobramycine	≥15	13-14	≤12	CASFM2017
Néomycine	≥17	-	<15	CAFSM 2017
Spiramycine	≥24	-	<19	CAFSM 2017
Erythromycine	≥23	14-22	≤13	CLSI 2016
Lincomycine	≥21	-	<17	CAFSM2017
Clandamycine	≥21	15-20	≤14	CLSI 2016
Ofloxacin	≥18	15-17	≤14	CLSI 2016
Trimétoprim-Sulfaméthoxazole	≥16	11-15	≤10	CLSI 2016
Chloramphénicol	≥18	13-17	≤12	CASFM2017
Vancomycine	≥15	-	-	CLSI 2006
Tétracycline	≥19	15-18	≤14	CASFM2017

Annexe 4 : Tests Biochimiques



Colonies caractéristiques de *S. aureus* sur milieu Baird Parker



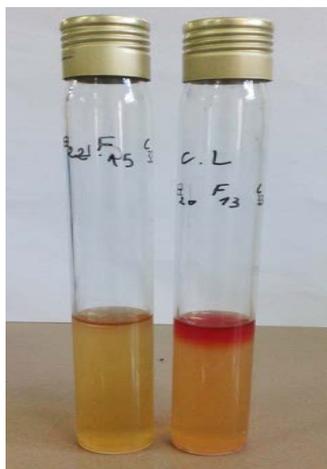
Colonies de *S. aureus* sur milieu BHI



Test de la coagulase



Test de l'ADNase



Test de Voges Proskower



Test du nitrate réductase

Annexe 5: Résultats de la résistance des souches de *S. aureus* isolées aux antibiotiques

souche	P	OX	FOX	CN	TOB	N	SP	E	MY	CMN	OFX	TXT	CHL	VA	TE
S131	06	19	32	20	23	19	22	28	32	30	28	24	28	18	31
S132	06	22	35	20	23	19	25	29	32	30	27	27	28	18	33
S133	06	22	32	21	22	19	23	28	33	34	26	26	29	17	32
S134	06	23	34	20	21	19	22	26	33	30	27	29	29	17	31
S140	06	19	32	19	22	18	21	25	30	28	27	25	29	17	30
S141	06	15	33	20	20	18	22	26	30	26	23	27	26	17	16
S142	06	22	36	20	22	19	22	26	30	26	26	28	27	17	30
S143	06	15	38	22	09	13	24	29	22	27	25	30	29	20	14
S144	06	15	31	20	07	11	20	25	19	24	25	22	26	17	09
S145	06	18	34	20	24	21	22	27	32	28	25	29	30	17	28
S146	08	25	34	21	23	21	22	25	30	29	23	28	25	16	27
S147	06	21	32	21	23	22	23	27	33	29	24	30	28	19	06
S148	06	15	29	19	24	18	20	25	30	26	22	26	22	16	27
S149	08	22	33	22	23	19	28	34	40	37	25	28	33	17	30
S150	06	16	39	23	27	22	24	29	33	28	27	26	30	18	07
S151	06	20	33	19	23	19	22	26	29	27	27	23	26	16	08
S152	06	19	31	19	23	22	21	26	29	27	26	27	25	18	31
S153	06	16	31	20	20	18	21	26	30	27	26	28	24	17	31
S154	06	21	34	20	24	20	25	28	33	29	22	25	28	17	11
S155	06	17	31	21	24	21	22	27	32	29	18	29	26	17	30
S156	06	14	30	19	07	10	21	26	17	23	25	24	08	17	26
S157	10	23	34	21	24	21	23	28	32	29	25	30	26	18	31
S158	06	18	29	18	20	17	23	27	30	28	23	23	25	16	27
S159	06	17	36	20	23	20	21	25	30	27	23	28	29	17	10
S160	06	17	34	20	21	19	21	26	30	27	23	27	28	18	28
S161	06	20	33	23	25	22	24	27	30	26	24	30	27	18	10
S162	06	16	33	20	22	19	20	25	29	27	22	28	26	16	28
S163	06	18	36	23	24	22	23	27	31	27	26	21	30	17	28

S164	06	18	36	19	22	20	22	26	31	26	22	30	29	17	28
S165	06	14	30	20	20	18	21	25	28	26	24	26	24	17	28
S166	06	18	32	21	22	21	22	27	29	26	27	29	26	18	27
S167	06	18	33	20	23	21	23	27	30	28	24	30	28	17	33
S168	06	13	29	18	20	18	20	26	28	26	22	22	23	17	26
S169	06	12	28	19	21	17	21	27	29	27	23	27	18	17	25
S170	06	18	29	20	21	19	22	26	31	27	25	30	24	17	27
S171	06	12	29	18	20	17	20	24	28	24	20	22	23	16	26
S172	06	13	30	19	07	11	20	26	19	24	26	25	25	18	07
S173	06	14	30	20	23	20	21	27	30	28	22	26	26	17	25
S174	06	14	30	20	22	19	22	27	30	29	23	25	27	16	29
S197	18	24	36	21	21	20	23	30	33	30	26	31	28	20	31
S198	19	21	35	21	22	21	24	29	35	30	25	33	27	19	35
S199	13	18	33	24	25	23	23	28	32	29	27	30	29	12	32
S200	46	25	40	26	28	27	26	30	38	30	28	27	32	20	34
S201	07	06	16	21	06	09	22	06	21	24	26	29	26	17	06
S202	41	28	34	22	27	21	23	26	30	30	23	30	29	19	32
S203	45	26	37	20	23	21	24	29	34	31	28	30	30	19	31
S204	06	15	31	20	25	21	25	29	34	31	28	28	27	19	31
S205	14	16	33	10	10	12	23	30	30	30	23	30	26	19	33
S206	12	18	33	28	23	22	22	27	31	28	28	30	30	20	33
S207	16	21	33	22	22	20	22	27	31	27	23	30	25	19	26
S208	25	16	33	28	25	22	23	29	32	30	27	30	27	19	31
S209	06	20	33	25	27	21	27	30	38	30	30	24	28	20	33
S210	14	17	33	22	22	21	21	28	31	29	25	30	29	19	30
S211	15	19	34	20	22	20	23	28	33	27	25	30	26	18	30

S212	18	21	35	22	24	22	25	29	33	30	25	30	28	20	24
MU 50	06	12	21	21	24	21	23	27	31	30	06	30	28	18	12