

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 de fin d'étude

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

Isolement de *Staphylococcus aureus* chez le bovin laitier et résistance des isolats aux antibiotiques

Présenté par :

M^{elle} CHIKH Yasmine

M^{elle} MOHAMMEDI Nora

Soutenu le 24 /12 /2020 devant le jury :

Président : <i>Mr HOUALI. K.</i>	<i>PROFESSEUR</i>	<i>UMMTO</i>
Encadrant : <i>Mr TITOUCHE. Y.</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>
Examinatrice : <i>M^{elle} OUSSAID. S.</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>

Promotion : 2019/2020

*****Remerciements*****

Nous tenons à exprimer nos vifs respects et nos forts remerciements pour notre encadrant Mr TITOUCHE YACINE qui nous a soutenu, orienté, accompagné durant tout au long de notre étude, on le remercie également pour, sa disponibilité ainsi que le temps qu'il a consacré à nous apporter les outils indispensables à la conduite de notre mémoire.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les membres du jury Mr Houali K. et Mlle Oussaid S. de nous avoir accordé l'honneur d'examiner notre travail, de le juger et de l'enrichir.

A la fin, nous remercions chaleureusement nos familles pour leurs soutiens et sacrifice.

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

BAP: Biofilm associated proteins

BHI: Brain Heart Infusion

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

BP : Baird Parker

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

Eap : Extracellular adherence protein

Efb: Extracellular fibrinogen binding protein

Emp : Extracellular matrix binding protein

ES : Entérotoxine staphylococcique

ET: exfoliative toxin

LTA: Acide lipoteichoïque

MSCRAMMs : Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

PBP: protein binding penicillin

PIA: Polysaccharide intercellular adhesin

PLP: protéine liant la pénicilline

PSM: phenol soluble moduline

PVL: panton Valentine leukocidin

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline

Liste des abréviations

SCN: Staphylocoques à coagulase négative

SCP: Staphylocoques à coagulase positive

SERAM : Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules

SFP: staphylococcal food poisoning

SSSS: staphylococcal scalded skin syndrome

TSST : Toxic Shock Syndrome Toxin

Liste des figures

Figure 1 : Phénotype de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la toxine alpha.	12
Figure 3 : Mécanisme d'action de la toxine alpha	12
Figure 4 : Mécanisme d'action des leucotoxines	14
Figure 5 : Modèle de mécanisme de formation des pores par les PSM de <i>S. aureus</i>	15
Figure 6 : Diagramme tridimensionnel en ruban de la structure de la toxine exfoliante ETA	14
Figure 7 : Diagramme tridimensionnel de la toxine SEC3	17
Figure 8 : Diagramme tridimensionnel de la toxine TSST-1	18
Figure 9 : Schématisation de quelques facteurs de virulence	18
Figure 10 : Stades de formation des biofilms staphylococciques	19
Figure 11 : Principales infections associées à la présence de biofilm.....	20
Figure 12 : Syndrome de la peau échaudée chez un sujet de 77 ans.....	21
Figure 13 : Identification des prélèvements à analyser	31
Figure 14 : Souche de <i>Staphylococcus</i> à ADNase positive.....	37
Figure 15 : Profil de résistance d'une souche de <i>S. aureus</i> résistante à la méticilline SARM	39

Liste des tableaux

Tableau I : Position taxonomique du <i>S. aureus</i>	3
Tableau II : Caractères biochimiques distinctifs des principales espèces de <i>S. aureus</i> isolées chez l'homme.	5
Tableau III : Les sous unités protéiques S et F des leucotoxines	14
Tableau IV : Informations concernant les prélèvements effectués.	32
Tableau V : Fréquences d'isolement de <i>S. aureus</i>	36
Tableau VI : Taux de résistance et de sensibilité aux antibiotiques des souches <i>S. aureus</i> isolées	38
Tableau VII : Informations concernant les souches SARM isolées	39

Sommaire

Liste des abréviations	(i)
Liste des figures	(iii)
Liste des tableaux	(iv)
Introduction	1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Aperçu général sur le *Staphylococcus aureus*

1. Historique de la découverte de <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2. Classification phylogénétique	3
3. Caractéristiques microbiologiques	4
3.1. Morphologie cellulaire	4
3.2. Identification biochimique	4
3.3. Croissance sur milieu de culture	5
4. Réservoir naturel de <i>S. aureus</i>	6
5. Transmission de <i>S. aureus</i>	7

Chapitre 2 : Pathogénicité et virulence du *Staphylococcus aureus*

1. Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	8
1.1. Constituants de la paroi bactérienne.....	8
1.2. Facteurs d'adhésion.....	9
1.3. Les exoenzymes	10

Sommaire

1.4. Les toxines.....	11
1.5. Le biofilm à <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2. Les infections à <i>Staphylococcus aureus</i>	21

Chapitre 3 : L'antibiorésistance chez le *Staphylococcus aureus*

1. Historique des antibiotiques	23
2. Définition des antibiotiques	23
3. Classification des antibiotiques	23
4. Résistance aux antibiotiques	24
4.1. Principaux modes de résistance.....	24
4.2. La résistance bactérienne staphylococcique aux antibiotiques	25

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Objectif de l'étude	29
1. Matériels	29
1.1. Matériels de laboratoire.....	29
1.2. Échantillons biologiques	30
1.3. Réactifs et milieux de culture utilisés	30
1.4. Matériels de prélèvement	30
2. Méthodes	31
2.1. Lieu et période d'étude.....	31
2.2. Protocole expérimental	32

Sommaire

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Résultat.....	36
1.1. Prévalence de <i>S. aureus</i>	36
2.2. Résistance du <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	37
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM).....	38
2.2.2. Phénotypes de multirésistance	40
2. Discussion	40
Conclusion	43

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Les maladies infectieuses sont la deuxième cause de mortalité humaine dans le monde. Le *S. aureus* est un micro-organisme pathogène humain très courant, qui peut déclencher une variété de maladies telles que les infections de la peau et des tissus mous (Guo *et al*, 2020). Il est la troisième étiologie des maladies d'origine alimentaire la plus répertoriée, et l'une des principales causes de la mammite chez les animaux (El Mounir *et al*, 2019). Chez les humains, les éleveurs de bovins sont plus colonisés par cette bactérie (Agabou *et al*, 2017).

Le *S. aureus* produit et sécrète de nombreuses protéines dont la coagulase, la protéine A, la toxine alpha, la toxine gamma, et les leucocidines qui pourraient toutes contribuer à sa virulence dans l'organisme (Callegan *et al*, 1994). La découverte de la pénicilline par Fleming a été le pionnier de l'ère des antibiotiques pour le traitement des infections (Guo *et al*, 2020). En revanche, l'utilisation intensive et inappropriée des antibiotiques a exercé une pression sélective sur les bactéries, menant vers l'apparition des résistances vis-à-vis les antimicrobiens. Ce pathogène opportuniste est connu pour sa résistance à une large variété d'antibiotiques, un cadre clinique dans lequel cette bactérie et sa résistance aux antibiotiques sont des problématiques pour les infections chroniques (Speck et Wormald, 2018). Dans la dernière décennie, l'évolution de la prévalence de souches multi-résistantes a pris une attention particulière. Parmi ces souches, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) qui constitue un grand problème en termes de morbidité, de mortalité, de l'échec thérapeutique et des coûts qu'il peut causer (Castro *et al*, 2016). Le SARM peut se retrouver dans le lait, sans aucune altération de ses qualités sensorielles et par conséquent pourrait se propager à travers toute la chaîne alimentaire. Plusieurs rapports ont décrit la prévalence des SARM dans le lait et leur transmission à 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).

Au cours des dernières années, la résistance de *S. aureus* a augmenté progressivement, et le taux d'infection par le SARM est en hausse dans le monde, de plus en plus de preuves ont démontré que les mécanismes de résistance de cette bactérie sont très complexes et le traitement clinique du SARM est devenu plus difficile. (Guo *et al*, 2020). Le premier rapport d'infections à SARM chez les animaux était un cas de mammite bovine en Belgique au début des années 1970 (Aires-De-Sousa, 2016). Cette résistance est due à un gène *mecA* codant pour une protéine de liaison à la pénicilline PBP2' ou PBP2a qui a été introduit dans l'élément chromosomique *SCCmec* du *S. aureus* sensible à la méticilline (Guo *et al*, 2020). En Algérie,

Introduction

La fréquence des infections à SARM est en recrudescence, elle a atteint 42% en 2007 (Akkou *et al*, 2016).

Ainsi, l'objectif de cette étude est d'isoler des souches de *S. aureus* au niveau de la cavité nasale de bovins laitiers, d'étudier leur résistance aux antibiotique, et ceci pour prévoir l'existence de souches SARM.

Afin d'atteindre nos buts, notre étude est subdivisée en partie bibliographique qui comporte des généralités du *S. aureus*, ces facteurs de virulence et ses mécanismes de résistance aux antibiotiques et une partie expérimentale qui présente la méthode de travail et les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Chapitre 1 : Aperçu général sur le *Staphylococcus aureus*

1. Historique de la découverte de *Staphylococcus aureus*

Le *S. aureus* a été isolé pour la première fois en 1880 par l'écossais Alexandre Ogston à partir d'un pus humain sous forme de grappes d'où il a tiré le nom de staphyle qui veut dire grappe. Et c'est en 1886, qu'a lieu l'officialisation de la nomenclature de *Staphylococcus aureus* par l'allemand Anton J. Rosenbach qu'il l'a isolé sur milieu solide grâce à la couleur jaune des colonies et leurs morphologies (Grace et Fetsch, 2018).

2. Classification phylogénique

Les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* ont été pour longtemps classés dans la même famille, celle des *Micrococaceae*. Par la suite, les deux genres ont été séparés vu l'hétérogénéité de *Micrococcus* dans la branche des actinomycètes, tandis que le genre *Staphylococcus* appartient à l'ordre des bacillales et la classe des bacilli (Brisabois *et al*, 1997).

Tableau I : Position taxonomique du *S. aureus*

Règne	Bacteria
Phylum	Fermicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

Les espèces de *Staphylococcus* sont divisées en deux groupes basées sur leur pouvoir de synthèse d'une coagulase libre, on distingue alors les staphylocoques à coagulase positive

Chapitre 1 : Aperçu général sur le Staphylococcus aureus

SCP (*S. aureus*) et les staphylocoques à coagulase négative SCN (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*) (Pebret, 2003 ; Le Loir et Gautier, 2010).

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN), longtemps considérés comme peu ou pas pathogènes, sont maintenant reconnus comme des bactéries pathogènes opportunistes, notamment les espèces : *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. saprophyticus*. En 2015, le genre *Staphylococcus* comptait 50 espèces dont une vingtaine sont isolées chez l'homme (Denis *et al*, 2016).

Le *S. aureus* est l'espèce principale, d'origine humaine, animale (volaille, bovin, ovin, caprin), environnementale ou non spécifique. Elle comporte deux sous espèces avec sub sp. *aureus* et *S. aureus* sub sp *anaerobius* (catalase négative, pathogène pour les animaux) (Dellaras, 2014).

3. Caractéristiques microbiologiques

3.1. Morphologie cellulaire

Les staphylocoques sont des bactéries à Gram positif, l'espèce majeure est le *S.aureus* Il se présente sous forme de cocci sphériques de 0.5 à 1 µm de diamètre organisé en amas ayant un aspect de grappes sous microscope optique (Dellaras, 2014).

Les cellules de *S.aureus* se trouvent généralement isolées ou en paires, bactéries non motrices et non sporulées (Castro *et al*, 2018). La grande majorité des souches de *S. aureus* sont capsulées, mais peuvent perdre leurs capsules après culture (Le Loir et Gautier, 2010).

Les staphylocoques sont des bactéries pyogènes fréquemment rencontrées (Schaechter *et al*, 1999). Ils sécrètent ou non un pigment jaune permettant de distinguer le staphylocoque blanc (*Staphylococcus albus*) qui est saprophyte et le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*).

3.2. Identification biochimique

S. aureus a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Cette bactérie possède une activité catalase, coagulase, phosphatase, ainsi qu'une nucléase thermostable mais pas d'oxydase (Behme *et al*, 1996 ; Nandy *et al*, 2013). Il est hémolytique, a la capacité de liquéfier la gélatine et de fermenter de nombreux sucres comme le glucose, le saccharose, le lactose et le mannitol (Behme *et al*, 1996). Le diagnostic permettant de distinguer *S. aureus*

Chapitre 1 : Aperçu général sur le *Staphylococcus aureus*

des autres espèces est basé sur des tests réalisés tels que le test de présence d'une coagulase, des hémolysines et de la désoxyribonucléase thermostable ou thermonucléase (Brown, 2005).

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

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulase	+	-	-	-
Clumping factors	+	-	-	-
Fermentation du glucose	+	+	+	+
Fermentation du mannitol	+	-	V	+
Fermentation du xylitol	-	-	-	+
Phosphatase	+	+	-	-
DNase	+	-	-	-
Novobiocine*(5ug)	S	S	S	R

V : variable, + : 90% ou plus de souches sont positives, - : 90%des souches ou plus sont négatives

* : le disque est déposé sur milieu Mueller Hinton ensemencé comme un antibiogramme, S : sensible si le diamètre supérieur ou égal à 16 mm et R : résistant si le diamètre est inférieur à 16 mm.

3.3. Croissance sur milieux de culture

Les staphylocoques sont des bactéries peu exigeantes et peuvent être isolées en bouillon ou sur milieux solides simples tels que les géloses ordinaires ou la gélose au sang (Denis *et al*, 2016). En effet, ils sont suffisamment résistants à la dessiccation et au refroidissement pour qu'il n'y ait pas de condition particulières de prélèvement et de transport (Denis *et al*, 2016).

Chapitre 1 : Aperçu général sur le *Staphylococcus aureus*

Le *S. aureus* se développe rapidement sur les milieux usuels, s'accommode à de grandes variations de pH (4,8-9,4) et de températures de croissance (10-45°C). Il est capable de croître en milieu hyper salé (permettant l'utilisation de milieux sélectifs). Il est identifié au laboratoire d'après ses caractères métaboliques et physiologiques (Flandrois, 1997). Sur gélose ordinaire, les colonies de *S. aureus* sont lisses, rondes d'un diamètre de 1 à 3 mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune orangé pour *S. aureus*).

En gélose profonde, la croissance est observée sur toute la hauteur du tube (signant le caractère aéro-anaérobie). Une seule sous-espèce est anaérobie stricte (*S. aureus* sub sp *anaerobius*). En bouillon, la culture de *S. aureus* forme un trouble uniforme abondant, parfois un dépôt et un voile en surface (Le Loir et Gautier, 2010).

Sur gélose au sang, *S. aureus* forme des colonies qui sont généralement jaunes pigmentées, lisse et hémolytiques (Foster et Geoghegan, 2015).



Figure 1 : Phénotype de *Staphylococcus aureus*, A : coloration de Gram de *S.aureus* observé au grossissement 1000. B : *S. aureus* cultivé sur gélose au sang de mouton à 5% incubé pendant une nuit à 37°C, noté les zones caractéristiques de bêta hémolyse autour des colonies. C : *S. aureus* cultivé sur la gélose au mannitol incubé pendant une nuit à 37°C, contrairement aux autres staphylocoques il fermente le mannitol ce qui entraîne la production d'acide et l'halo jaune classique sur la gélose (Astley *et al*, 2019).

4. Réservoir naturel de *S. aureus*

Le plus grand réservoir écologique de souches humaines de *S. aureus* est le nez. Cependant, la peau, les cheveux, et les muqueuses peuvent être également colonisés (Grace et Fetsch, 2018).

Selon Dellaras (2014), les staphylocoques sont des germes qui peuvent vivre :

Chapitre 1 : Aperçu général sur le Staphylococcus aureus

-en bactéries saprophytes dans la nature (sols, air, eaux, aliments)

-en bactéries commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (mammifères).

-en bactéries pathogènes, agents d'infections humaines ou animales qui peuvent être redoutables.

Le *S. aureus* est porté par une proportion importante de la population (Castro *et al*, 2018), ils peuvent être hébergés aussi dans l'intestin, les glandes sébacées et glandes sudoripares (Pebret, 2003).

5. Transmission de *S. aureus*

Les staphylocoques diffusent d'une personne à l'autre en général par l'intermédiaire des contacts manuels, essentiellement à partir du personnel soignant. Dans le milieu hospitalier, ils peuvent également être transmis à travers les aérosols émis par les patients atteints de pneumopathies (Schaechter *et al*, 1999 ; Pebret, 2003).

Le portage est un facteur de risque d'infections invasives dans le milieu hospitalier, en effet le personnel de la santé joue un rôle important dans la transmission du *S. aureus* car ils sont considérés comme étant un réservoir important de cette bactérie (Foster et Geoghegan, 2015).

1. Facteurs de virulence de *S. aureus*

1.1. Constituants de la paroi bactérienne

1.1.1. Capsule

S. aureus a développé de nombreux mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire. Le premier mécanisme de blindage est représenté par la formation d'une capsule ; une structure polysaccharidique entourant la paroi bactérienne (Kuipers *et al*, 2016). La production de capsule par *S. aureus* a été décrite en 1931 par Gilbert (Oriordan et Lee, 2004), codé par l'opéron *cap*, son expression est très réglementée et dépendante de la présence ou l'absence de certains facteurs comme le dioxyde de carbone (Lei et Lee, 2018 ; Kuipers *et al*, 2018).

Les capsules comprennent des unités répétitives tri-saccharidiques de N-acétyle D-fucosamine, ce sont des facteurs de virulence qui confèrent aux bactéries la capacité de résister à la phagocytose (Kuipers *et al*, 2016 ; Lei et Lee, 2018).

13 sérotypes ont été décrit, les sérotypes 5 et 8 représente 70% à 80% des isolats cliniques humains (Becker, 2018). Les souches cp5 et cp8 forment des colonies non mucoïdes. Des études suggèrent que la capsule favorise la colonisation et la persistance du *S. aureus* sur les muqueuses (Kuipers *et al*, 2016 ; Oriordan et Lee, 2004).

1.1.2. Peptidoglycane

Le peptidoglycane est le principal polymère structurel de la paroi cellulaire, dont la synthèse nécessite de multiples composants en interaction (Lund *et al*, 2018), il représente 50% du poids de la paroi staphylococcique (Franklin et Lowy, 1998). Il se compose de deux sous unités polysaccharidiques alternées de N-acétylglucosamine et acide N-acétylmuramique. Les chaînes peptidoglycanes donne de la rigidité à la paroi cellulaire, détermine sa forme et la protège de la lyse osmotique (Oliveira *et al*, 2018).

Le peptidoglycane peut avoir une activité semblable à celles des endotoxines. De plus, sa structure chez les souches staphylococciques est différente et peut contribuer à des variations de leur capacité de provoquer une coagulation intra-vasculaire (Franklin et Lowy, 1998).

1.1.3. Acides teichoïques

Appelé aussi acide ribitol teichoïque, il est lié par covalence au peptidoglycane (Franklin et Lowy, 1998), ils ont été découverts par Armstrong et son équipe. Le terme acide teichoïque englobe une famille diversifiée de glycomères de surface cellulaire contenant des unités répétées de polyol liées à un phosphodiester. Ils comprennent deux acides lipoteichoïques (LTA), ancrés dans la membrane bactérienne via un glycolipide (Brown *et al*, 2013). Ces derniers contribuent pour 40% de la masse de la paroi bactérienne et procure une charge négative à la surface cellulaire staphylococcique, jouant aussi un rôle dans l'acquisition des ions métalliques, la division cellulaire, la pathogénèse et la résistance aux antibiotiques (Brown *et al*, 2013 ; Oliveira *et al*, 2018).

1.2. Facteurs d'adhésion

1.2.1. MSCRAMMS

Les MSCRAMMS sont des protéines de surface qui reconnaissent la matrice adhésive, elles appartiennent à un type spécifique de bactéries retrouvées uniquement chez les Gram positif. Ces protéines d'adhésion se lie de manière covalente au peptide doglycane de la paroi cellulaire, un grand nombre des MSCRAMMS interagissent spécifiquement aux molécules de la matrice extracellulaire telles que le collagène, fibrinogène, fibronectine, laminine (Sridharan et Ponnuraj, 2016).

1.2.2. Les SERAMS

Le *S. aureus* exprime un groupe de protéines secrétées qui interagissent avec les molécules hôtes appelées SERAM (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) celles-ci incluent :

- coagulase (coa)
- Eap : Extracellular Adherence Protein.
- Emp : Extracellular Matrix binding Protein.
- Efb : Extracellular Fibrinogen Binding protein.

Chapitre 2 : Pathogénicité et virulence du Staphylococcus aureus

Les SERAMS se fixent avec des liaisons non covalentes aux protéines de la matrice extracellulaire, dont beaucoup peuvent se lier au fibrinogène, mais ne partagent pas le même mécanisme et domaine de liaison au fibrinogène que les protéines ancrées dans la paroi cellulaire. Une des protéines la mieux étudiée est l'Efb, une protéine de 16Kda impliquée dans l'évasion immunitaire (Le Loir et Gautier, 2010 ; Crosby *et al*, 2016).

1.2.3. La protéine A

Selon Callegan *et al* (1994), la protéine A est une exoprotéine associée à la paroi cellulaire qui se fixe à la région Fc de l'immunoglobuline G de la plupart des mammifères. Cette protéine est codée par le gène *Spa* (Coelho *et al*, 2011), administrée *in vivo*, la protéine A peut inciter un assortiment d'effets biologiques, et peut activer à la fois la voie classique et alternative du complément.

La protéine A pourrait induire l'inflammation de la cornée et inhibe également l'opsonisation et la phagocytose des staphylocoques *in vitro* (Callegan *et al*, 1994).

1.3. Les exoenzymes

1.3.1. La coagulase

C'est une protéine qui a la capacité d'induire la coagulation, c'est l'un des critères clé utilisé dans la microbiologie pour la classification et l'identification des espèces du genre *Staphylococcus*. Elle se lie à la prothrombine et déclenche aussi la conversion du fibrinogène en fibrine. C'est l'enzyme la plus célèbre du *S. aureus*, codée chromosomiquement, il en existe 12 isoformes différents. Elle empêche la phagocytose et joue aussi un rôle dans la formation des biofilms (Becker, 2018 ; Tam et Torres, 2019).

1.3.2. La staphylokinase

La staphylokinase (Sak) est une protéine à domaine unique composée d'une hélice alpha centrale, d'un feuillet beta à 5 brins et de deux brins beta plus courts. C'est également un cofacteur qui détourne la plasmine de l'hôte pour l'activer en plasminogène pour la dégradation des caillots de fibrine, elle participe aussi au surmontage de la barrière cutanée et favorise la dissémination bactérienne (Tam et Torres, 2019).

1.3.3. Hyaluronidase

C'est une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique ; un composant essentiel des matrices extracellulaires chez les vertébrés, assurant l'homéostasie et l'intégrité structurelle des tissus. Les seules espèces staphylococciques connues pour produire cette enzyme sont : *S. aureus*, *S. hyicus*, elle est impliquée dans la dispersion des bactéries (Tam et Torres, 2019).

1.3.4. La nucléase

La nucléase staphylococcique également connue sous le nom de thermonucléase due à sa résistance à la chaleur, fonctionne à la fois comme endo et exonucléase, nécessitant des ions calcium pour son activité qui consiste en la décomposition des substrats ADN et ARN par le clivage des liaisons 5'ester phosphoryliques (Tam et Torres, 2019).

1.3.5. Les Protéases

Les staphylocoques codent pour trois familles de protéases secrétées : les métalloprotéases, les cystéines protéases, et les sérines protéases. Collectivement, ces protéases ont un rôle dans l'acquisition des nutriments, propagation des bactéries et l'évasion immunitaire (Tam et Torres, 2019).

1.3.6. Les lipases

Les lipases sont des enzymes qui modifient les acides gras. Elles procurent aux bactéries le pouvoir de pénétrer à travers la barrière cutanéomuqueuse en clivant les acides gras de la peau, elles sont exprimées par 80% des souches du *S. aureus* (Le Loir et Gautier, 2010).

1.4. Les toxines

1.4.1. Les toxines porogènes

1.4.1.1. Les hémolysines

1.4.1.1.1. L'hémolysine alpha

La toxine alpha est une toxine hémolytique formant des pores qui endommagent la membrane de nombreux types de cellules des mammifères (Callegan *et al*, 1994). C'est un polypeptide de 33Kda sécrété par 95% des souches cliniques de *S. aureus*. Hla est une beta baril sous forme d'un monomère hydrosoluble, elle est toxique grâce à sa capacité d'oligomérisation en

Chapitre 2 : Pathogénicité et virulence du *Staphylococcus aureus*

une structure héptamérique sur la membrane de la cellule hôte, elle attaque la membrane en formant un canal transmembranaire hydrophile à travers la bicouche lipidique. En effet, il a été démontré que cette toxine affecte un large éventail de types de cellules humaines, y compris les cellules épithéliales, endothéliales, lymphocytes T, monocytes et macrophages (Oliveira *et al*, 2018).

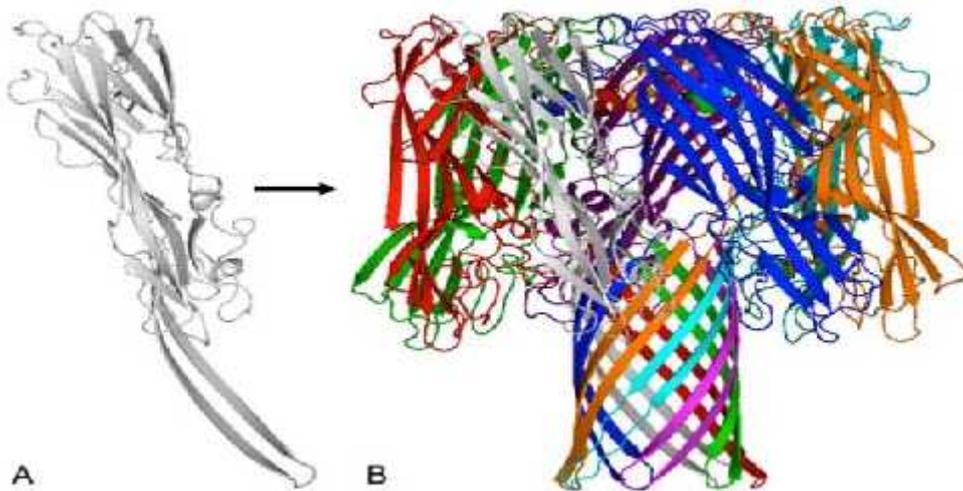


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la toxine alpha. A : structure monomérique, B : structure héptamérique (Schlievert *et al*, 2010).

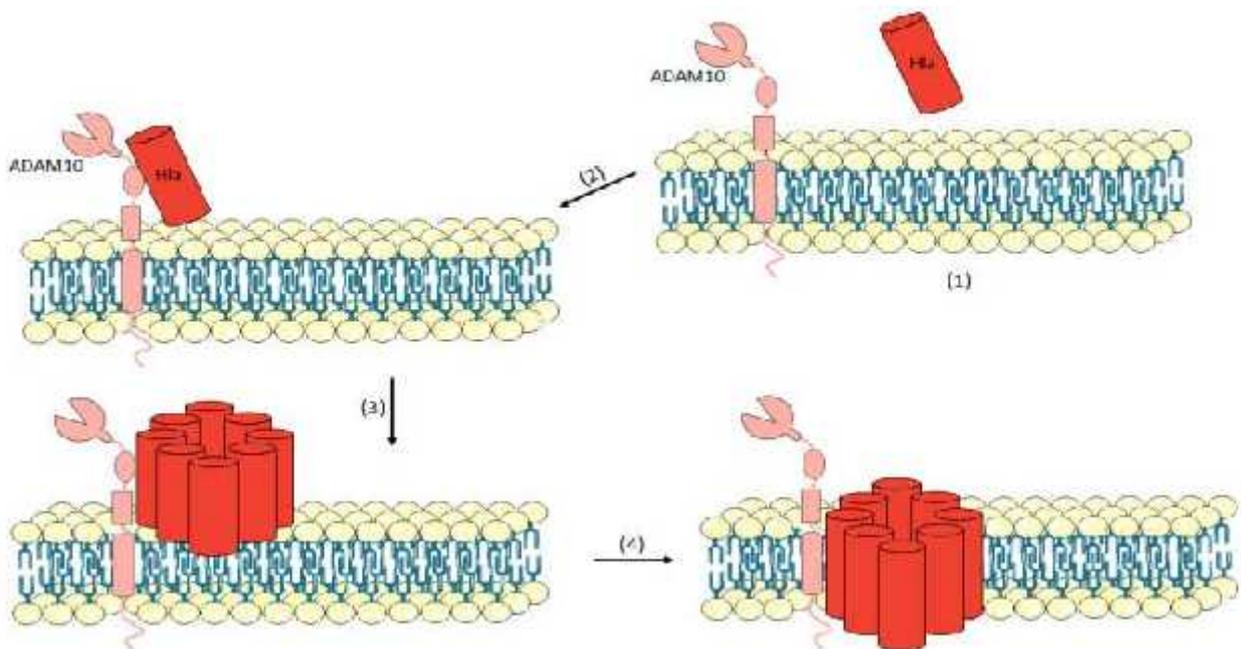


Figure 3 : Mécanisme d'action de la toxine alpha. ADAM 10 est un récepteur cellulaire de l'hémolysine alpha (Oliveira *et al*, 2018).

1.4.1.1.2. L'hémolysine beta

La toxine beta est une sphingomyélinase neutre, capable d'hydrolyser la sphingomyéline lipidique de la couche externe du phospholipide de la membrane cellulaire. Son activité nécessite du magnésium, elle est responsable de l'alpha hémolyse sur la gélose au sang. La toxine beta est toxique pour les monocytes humains mais inactive à des concentrations égales contre les érythrocytes humains, les fibroblastes, granulocytes et lymphocytes (Coelho *et al*, 2011 ; Astley *et al*, 2019).

1.4.1.1.3. L'hémolysine gamma

La gamma toxine est une toxine à deux composants ; HlgAB et HlgCB, qui sont codées dans le génome central et seraient présentes dans 99% des isolats cliniques. En culture *in vitro*, la gamma toxine est fortement régulée en présence de sang, HlgAB cible les récepteurs de chimiokines CxCR1, CxCR2 et CCR2. Tandis que, HlgCB cible le composant complémentaire C5a sur les récepteurs C5aR1 et C5aR2. HlgCB est actif contre les neutrophiles de l'homme et de lapin, de macaque et de vache, les neutrophiles de souris sont résistantes au HlgCB, seul le CCR2 qui est capable d'agir comme récepteur pour HlgAB (Astley *et al*, 2019).

1.4.1.1.4. L'hémolysine delta

La toxine delta est une protéine de 26 acides aminés, elle agit comme surfactant sur la membrane cellulaire et rend la cellule perméable en créant une sorte de cylindres à travers la membrane. Elle présente une structure tridimensionnelle en hélice alpha avec des domaines hydrophobes, elle cible différents sortes de cellules et elle est sécrétée par 97% des souches de *S. aureus* (Le Loir et Gautier, 2010).

1.4.1.2. Les leucotoxines

Chez le *S. aureus* les leucotoxines sont des toxines bicomposées, constituées d'une paire de protéines désignées S (lent) et F (rapide). La liaison initiale du récepteur de leucotoxine est médiée par le composant S suivit par la liaison du composant F, entraînant la formation d'un octamère lytique porogène qui s'insère dans la membrane cellulaire, entraînant un déséquilibre osmotique et une lyse cellulaire (Astley *et al*, 2019)

Chapitre 2 : Pathogénicité et virulence du *Staphylococcus aureus*

Tableau III : Les sous unités protéiques S et F des leucotoxines (Oliveira *et al*, 2018).

Leucotoxine	Sous unité S	Sous unité F	Cellules spécifiques
PVL	LuKS -PV	LuKF-PV	Leucocytes et neutrophiles.
LuK AB /LuK GH	LuKA / LuKH	LuKB / LuKG	Monocytes humains, cellules dendritiques, neutrophiles et leucocytes.
LuK ED	LuKE	LuKD	Cellules sanguines et leucocytes de lapin, neutrophiles humains et phagocytes de souris.
Toxine gamma	HlgA, HlgC	HlgB	Globules rouges et neutrophiles humains et leucocytes de lapin. leucocytes de lapin.

Parmi toutes ces leucotoxines, seules la gamma hémolysine et LuKED qui possèdent une activité hémolytique (Otto, 2014).

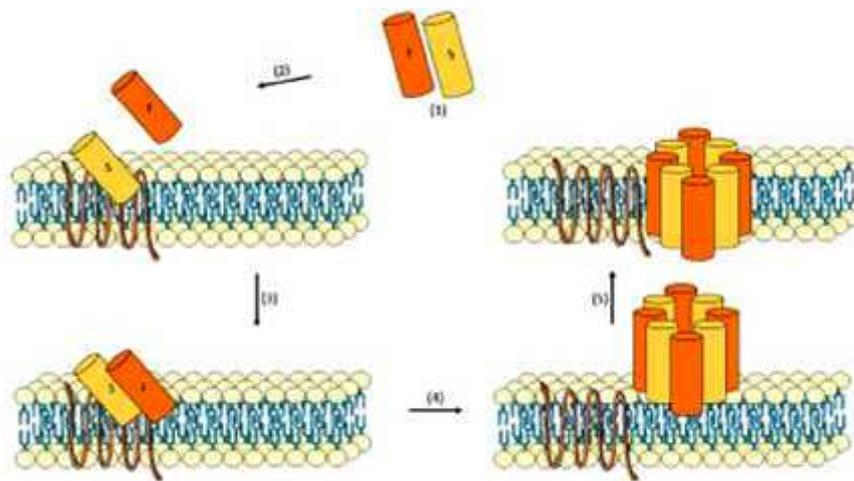


Figure 4: Mécanisme d'action des leucotoxines. Sous unité S en jaune, sous unité F en orange (Oliveira *et al*, 2018).

1.4.1.2.1. La leucocidine de Pantone-Valentine (PVL)

La PVL est une cytotoxine qui affecte les leucocytes et provoque une nécrose tissulaire. Purifiée par Wodin, à partir de surnageant de culture de *S. aureus*, elle est composée de deux

unités protéiques de 32 et 38 Kda. Le locus *pvl* est codé par au moins six prophages différents, elle est faiblement présente chez les souches cliniques de *S. aureus*, mais fortement associée aux souches communautaires CA-MRSA en particulier celles qui causent la pneumonie et les infections de la peau et des tissus mous (Oliveira *et al*, 2018 ; Tam et Torres, 2019).

1.4.1.3. Modulines solubles dans le phénol (PSM)

Les modulines solubles dans le phénol sont une famille de petits peptides de 20 à 44 acides aminés amphipathiques, sécrétés qui ne sont produits que par les espèces du genre *Staphylococcus*. Découvertes par Mehlin *et al* en 1999, à partir d'une culture de *S. epidermidis*, les PSM jouent plusieurs rôles dans la pathogenèse de *S. aureus* comme la facilitation de la dissémination du biofilm, l'activité cytolytique et l'activité pro inflammatoire (Oliveira *et al*, 2018 ; Astley *et al*, 2019).

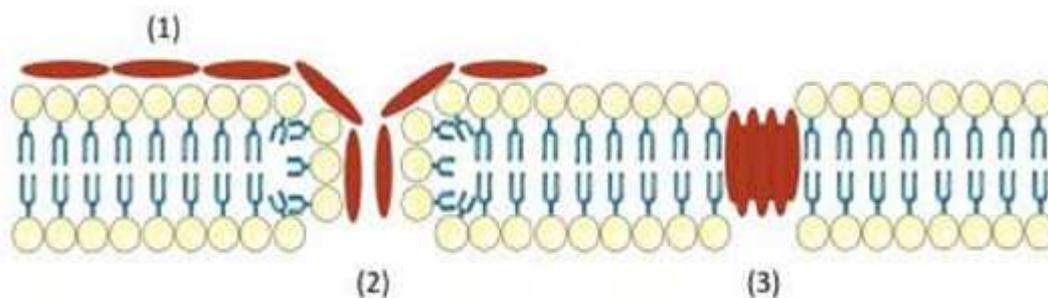


Figure 5: Modèle de mécanisme de formation de pores par les PSM de *S. aureus*. 1: les PSM se fixent sur la membrane cytoplasmique de manière non spécifique. 2 : désintégration de la membrane. 3 : Les PSM ont tendance à s'agréger en oligomères et à former un pore de courte durée (Oliveira *et al*, 2018).

1.4.2. Les toxines exfoliantes (ET)

Egalement appelées toxines épidermolytiques, se sont des sérines protéases extrêmement spécifiques sécrétées par *S. aureus*, ce sont des exotoxines associées au clivage des jonctions des kératinocytes et l'adhésion cellule-cellule dans l'épiderme de l'hôte (Oliveira *et al*, 2018).

Les principaux ET connues à ce jour sont la toxine exfoliative A, B, C, D, (ETA, ETB, ETC, ETD). L'ETA et L'ETB sont les plus impliquées dans les lésions cutanées humaines, tandis que l'ETC n'a été isolée qu'à partir d'une infection du cheval et aucune association avec une maladie humaine n'a été trouvée. L'ETD a été identifiée en 2002 dans un échantillon clinique

de *S. aureus*. Les ET sont produites par environ 5% des souches de *S. aureus* (Oliveira *et al*, 2018).

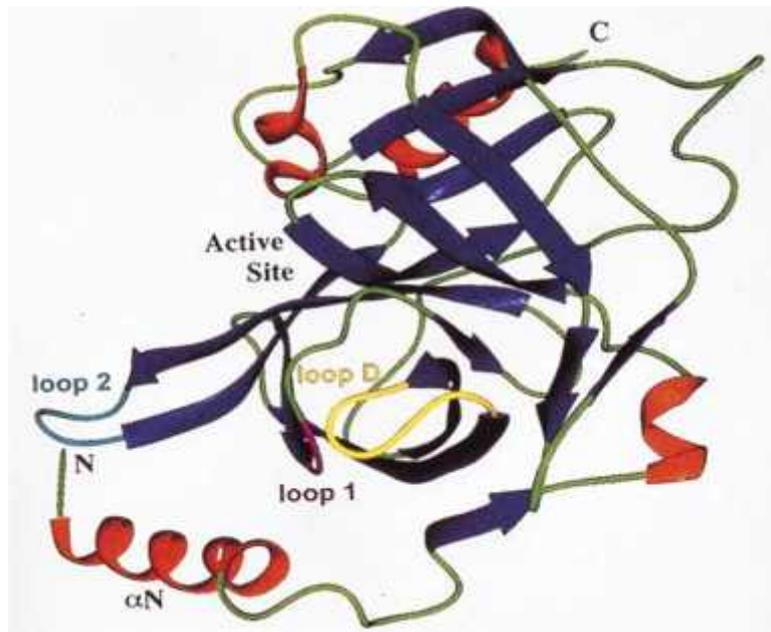


Figure 6: Diagramme tridimensionnel en ruban de la structure de la toxine exfoliante ETA (Ladhani *et al*, 1999).

1.4.3. Les superantigènes

1.4.3.1. Les entérotoxines (ES)

Les entérotoxines appartiennent à la grande famille des superantigènes, ils sont capables d'induire une interaction entre la chaîne variable beta du récepteur cellulaire des lymphocytes T et la molécule du complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH II) des cellules présentatrices d'antigènes. La liaison entraîne l'activation non spécifique et la prolifération des lymphocytes T suivie d'une libération massive de chimiokines et de cytokines pro inflammatoires, conduisant à un choc toxique potentiellement mortel (Le Loir et Gautier, 2010 ; Argudín *et al*, 2010).

Les entérotoxines de *S. aureus* sont de puissantes exotoxines de 20 à 30Kda, synthétisées tout au long de la phase logarithmique. Elles sont actives à des quantités de l'ordre du nanogramme, elles sont résistantes au traitement thermique, au pH bas, aux enzymes protéolytiques conservant ainsi leurs activités dans le tube digestif après ingestion. Cette famille de toxines protéiques non cytotoxiques comprend à l'heure actuelle 22 ou 23 types

d'entérotoxines les plus connues sont : SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, avec leurs variantes. Les mécanismes par lesquels les entérotoxines staphylococciques agissent ne sont pas encore bien élucidés. En revanche l'activation de cytokines entraîne la mort cellulaire par apoptose (Guiraud et Rosec, 2004 ; Argudin *et al*, 2010 ; Otto, 2014).

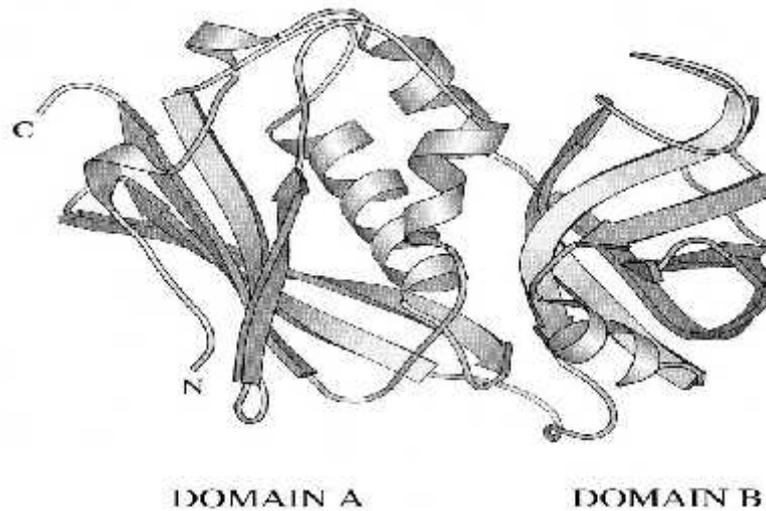


Figure 7 : Diagramme tridimensionnel de la toxine SEC3 (Dinges *et al*, 2000).

1.4.3.2. La toxine du syndrome du choc toxique TSST-1

Le superantigène le plus célèbre de *S. aureus* est la toxine du syndrome du choc toxique (TSST). Elle fait 22Kda de poids moléculaire, elle provoque un choc toxique en stimulant la libération d'interleukine 1 et 2 de TNF-alpha et d'autres cytokines (Otto, 2014).

Le syndrome du choc toxique est une maladie grave et potentiellement mortelle. Contrairement aux entérotoxines, la TSST ne provoque pas de vomissement. Toutes les entérotoxines et la TSST sont présentes dans seulement un petit nombre de souches de *S. aureus* (Otto, 2014).

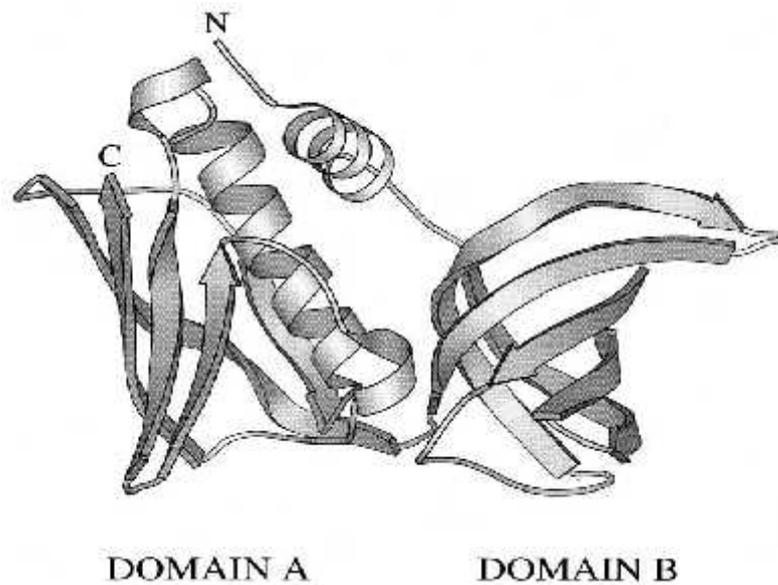


Figure 8 : Diagramme tridimensionnel de la toxine TSST-1 (Dinges *et al*, 2000).

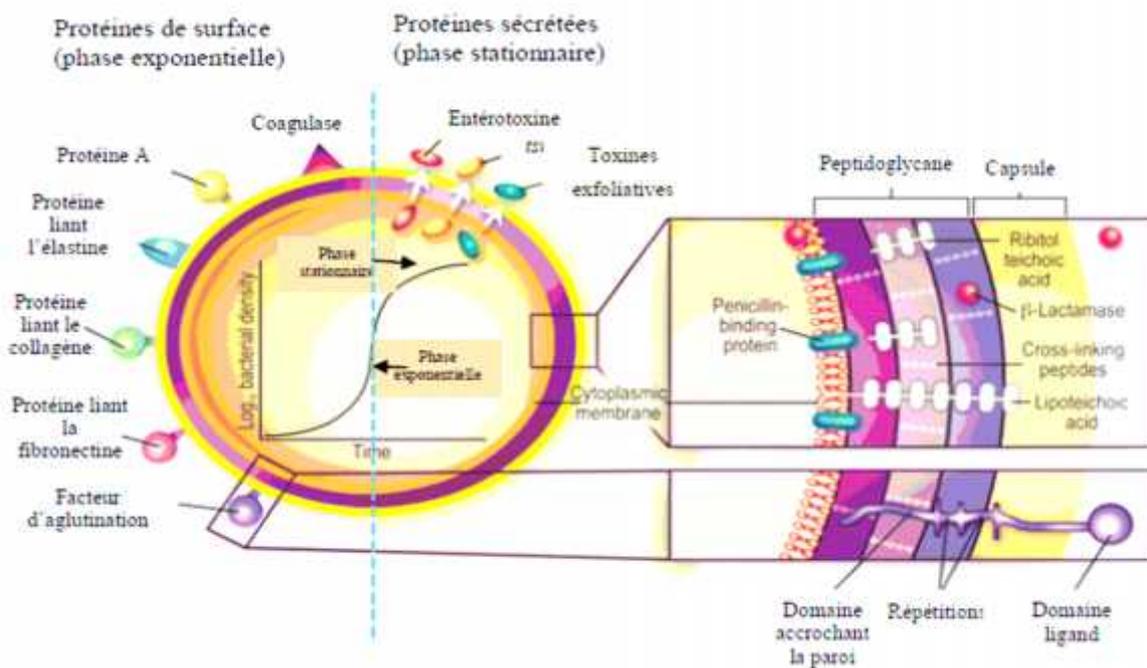


Figure 9 : Schématisation de quelques facteurs de virulence (Gordon et Lowy, 2008).

1.5. Le biofilm à *Staphylococcus aureus*

La colonisation nasale du *S.aureus* est un grand risque d'infection. Sa persistance dans la chaîne de production alimentaire est due à sa capacité de former un biofilm engendrant à la fois des problèmes industriels et sanitaires (Lister et Horswille, 2014 ; Paparella *et al*, 2018).

Chapitre 2 : Pathogénicité et virulence du *Staphylococcus aureus*

Un biofilm est défini comme étant une communauté microbienne dans laquelle les bactéries sont attachées à une surface et incorporées dans une matrice de polymères extracellulaires protectrice, il peut être constitué de cellules d'une seule ou plusieurs espèces bactériennes. Ce mode de croissance présente des physiologies modifiées et une expression homogène de protéines (Lister et Horswille, 2014 ; Paparella *et al*, 2018).

Les stades de développement de biofilm peuvent être divisés sur trois événements majeurs : attachement initial, maturation du biofilm et dispersion du biofilm.

Premièrement, un attachement réversible des cellules planctoniques se met en place, puis cet attachement devient irréversible médié par les MSCRAMMS et beaucoup d'autres protéines telles que la protéine A, les protéines associées au biofilm (BAP). Puis, la structure du biofilm commence à se développer par le moyen de formation de microcolonies et d'une matrice extracellulaire qui contiendra de l'ADN extracellulaire, des protéines et une variation de polymères organiques. Le constituant majeur de cette matrice de biofilm est l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) codée par l'opéron *ICA*. Elle joue un rôle dans la structure et l'accumulation du biofilm *in vivo* et *in vitro*. Le biofilm atteindra le stade mature et au final, les cellules attachées peuvent se disperser à l'aide d'agents dispersants comme les enzymes telles que la protéinase K, la dispersin B et peuvent à nouveau s'attacher à d'autres surfaces (Lister et Horswille, 2014 ; Paparella *et al*, 2018).

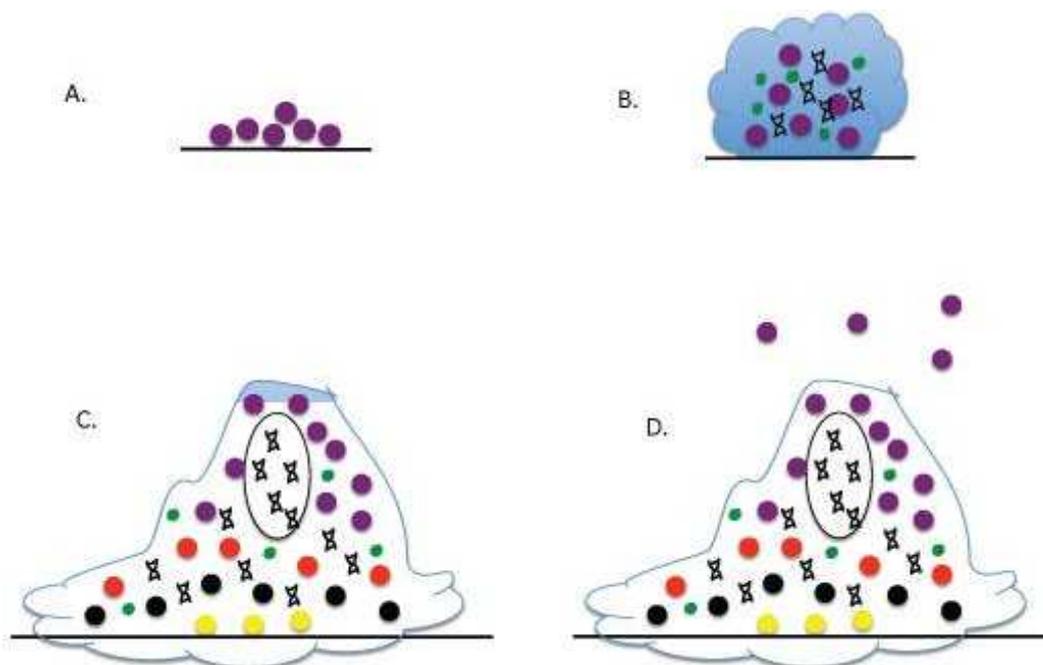


Figure 10: Stades de formation des biofilms staphylococciques. A : adhésion initial, B : phase d'accumulation, C : maturation, D : dispersion (Fey, 2010).

Chapitre 2 : Pathogénicité et virulence du *Staphylococcus aureus*

L'attachement de *S. aureus* aux implants médicaux (prothèses, cathéter, valves cardiaques) et tissu de l'hôte et l'établissement de biofilms matures augmente la persistance des infections et les rendent difficiles à éradiquer. De plus, la matrice de biofilm peut entraver l'accès aux défenses immunitaires, et les cellules du biofilm peuvent développer une résistance aux antibiotiques (Lister et Horswille, 2014).

Beaucoup de moyens de lutttes ont été testés avec succès comme les traitements physiques telle que les ultrasons, les nanoparticules peuvent inhiber la formation des biofilms et réduisent le nombre des cellules vivantes de *S. aureus* (Lister et Horswille, 2014 ; Paparella *et al*, 2018).

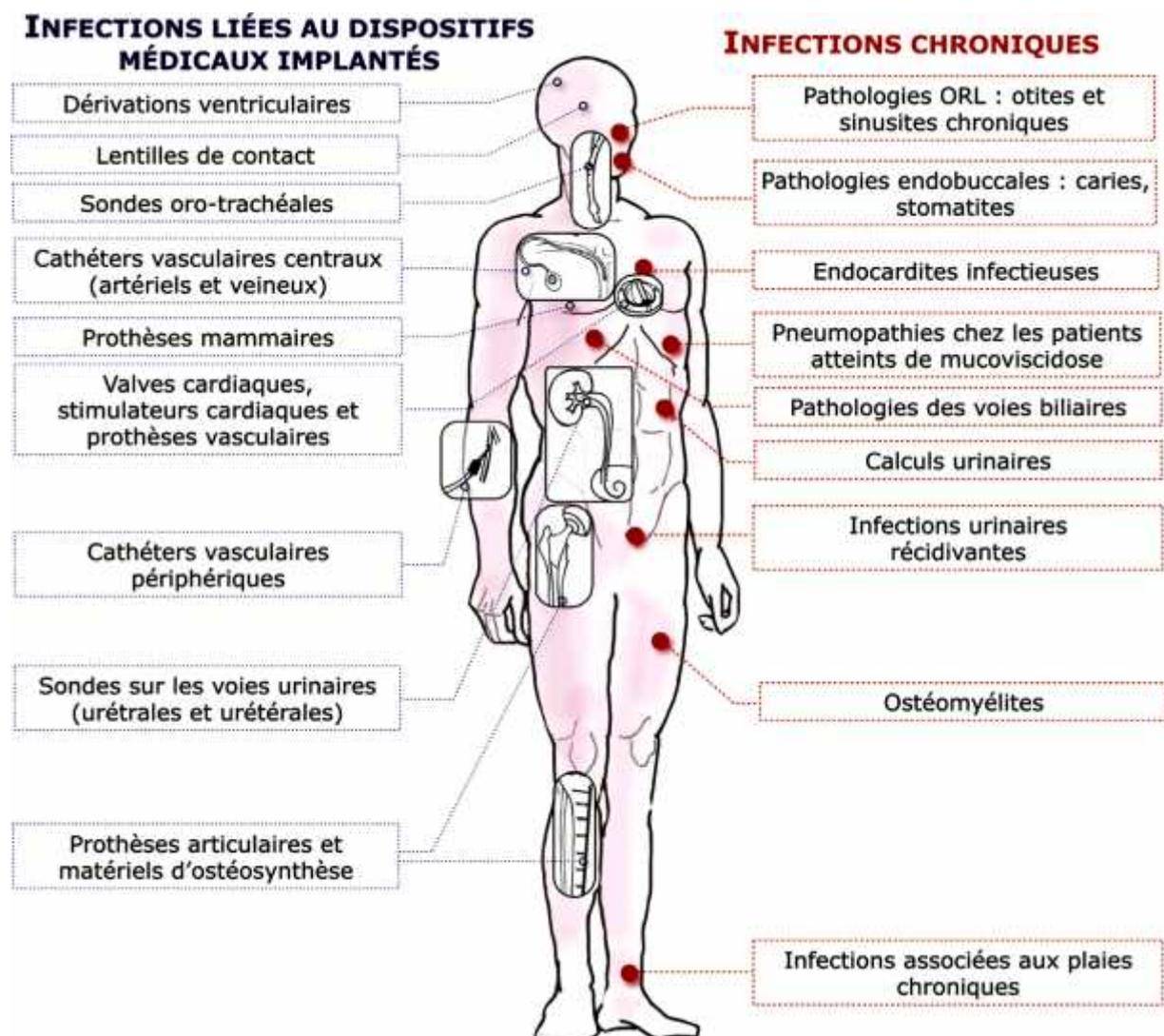


Figure 11 : Principales infections associées à la présence de biofilm (Lebeaux *et al*, 2014).

2. Les infections à *Staphylococcus aureus*

En principe, il y'a lieu de distinguer deux différents types d'infections provoquées par *S. aureus* : les infections pyogènes et les infections systémiques qui peuvent toucher pratiquement tous les organes (Becker, 2018).

S. aureus est un pathogène opportuniste humain, avec un large éventail de maladies comme les infections suppuratives, infections cutanées, septicémie potentiellement mortelle, pneumonie nécrosante, ostéomyélite, endocardite, et syndrome de choc toxique. Il est aussi responsable d'infections nosocomiales graves (Fitzgerald, 2012 ; Bietrix *et al*, 2019).

En plus d'être un pathogène humain, le *S.aureus* provoque une série d'infections chez les animaux d'élevage importants y compris les vaches laitières induisant des infections intra mammaires menant à la mammite chronique, engendrant des pertes économiques (Fitzgerald, 2012).

La compétence du *S. aureus* en tant que pathogène peut être attribué à son arsenal de facteurs de virulence, parmi lesquels les toxines sécrétées occupent une place importante. En effet la production d'exfoliatines est liée à des infections épidermiques telles que l'impétigo et le syndrome de la peau échaudée.

Le syndrome de la peau échaudée (SSSS : staphylococcal scalded skin syndrome), est une maladie caractérisée par une exfoliation cutanée, avec des manifestations qui comprennent la fièvre, l'hypersensibilité cutanée et la formation d'ampoules superficielles remplies de liquide et une séparation de la peau. Il survient principalement chez les nourrissons et les enfants, mais lorsqu'ils sont soumis à un traitement approprié le pourcentage de mortalité est faible (Oliveira *et al*, 2018).



Figure 12: Syndrome de la peau échaudée chez un sujet de 77 ans (Ladhani *et al*, 1999).

Chapitre 2 :Pathogénicité et virulence du Staphylococcus aureus

L'un des fléaux les plus redoutables des maladies staphylococciques est l'intoxication alimentaire (SFP), elle est la résultante d'une consommation de denrées alimentaires contenant des quantités suffisantes d'une ou plusieurs entérotoxines staphylococciques. Les symptômes apparaissent après 2 à 8 heures d'ingestion de l'aliment contaminé, les principaux signes ressentis sont : les nausées et vomissements, crampes abdominales, avec ou sans diarrhée, ça peut aller jusqu'à l'hospitalisation du sujet malade en particulier s'il s'agit de nourrissons et de personnes âgées et affaiblies (Argudin *et al*, 2010).

1. Historique des antibiotiques

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 sera tombée dans l'oubli, jusqu'à l'arrivée de deux chercheurs britanniques, Florey et Chain en 1939 qui avaient utilisé la pénicilline en thérapeutique. Le terme antibiotique a été proposé par R. Dubos. À 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 des antibiotiques

Les molécules employées pour le traitement des maladies infectieuses bactériennes sont appelées antibiotiques ; (du grec anti, contre et bios, vie). Ce sont des produits du métabolisme des moisissures ou de bactéries ou de leurs dérivés, ou obtenus par synthèse chimique, qui inhibent ou détruisent, même à très faible concentration, d'autres micro-organismes. Les moisissures productrices d'antibiotiques appartiennent principalement, à la classe des ascomycètes, aux genres *Penicillium* et *Cephalosporium*. Chez les bactéries, la majorité des antibiotiques sont synthétisés par des actinomycètes du genre *Streptomyces*, et *Bacillus*. Selon leur mode d'action au niveau des cibles cellulaires, les antibiotiques sont bactéricides ou bactériostatiques (Canu et Peter, 2000).

3. Classification des antibiotiques

Selon Duval et Soussy (1990), les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères :

-) **Leurs origines** : biosynthèse par des champignons, des bacilles ou des streptomyces ou issue de génie chimique.
-) **Leurs compositions chimiques** : dérivés d'acide aminé, hétérosidique ou polycyclique.
-) **Leurs effets** : antibiotiques bactéricides ou bactériostatiques.
-) **Modalité d'action** : de toutes ces classifications possibles, la classification la plus courante est celle par famille. Cependant les antibiotiques de la même famille

possèdent un certain nombre de caractères communs comme la composition chimique, spectre d'action similaire ou très rapproché, cibles bactériennes identiques, résistances bactériennes et sensibilité croisée, effets indésirables similaires.

4. Résistance aux antibiotiques

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).

4.1. Principaux modes de résistances

4.1.1. Phénomène d'imperméabilité

Pour qu'un antibiotique soit actif, il faut qu'il pénètre jusqu'à sa cible. Cela suppose qu'il soit capable de 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. On peut retenir : la capsule, la membrane externe, l'espace périplasmique, le peptidoglycane, la membrane cytoplasmique. La présence de la capsule n'est pas un obstacle à la pénétration des antibiotiques. Le peptidoglycane est un réseau lâche qui ne joue pas de rôle de rétention des substances, y compris des antibiotiques. L'espace périplasmique qui sépare le peptidoglycane de la membrane cytoplasmique est un bain liquide où peuvent se trouver des enzymes qui détruiront les antibiotiques (Gaudy et Buxeraud, 2005).

Les antibiotiques qui agissent sur les bactéries à Gram négatif doivent au moins franchir cette barrière. Cette bicouche lipidique est peu perméable aux molécules hydrophiles qui sont la majorité des antibiotiques. Les canaux que forment les porines traversent la membrane externe, c'est la voie de passage utilisée par la plupart des antibiotiques. Ces derniers doivent être suffisamment hydrophiles et de faible poids moléculaires pour traverser ces canaux (Gaudy et Buxeraud, 2005).

4.1.1.1. Résistance naturelle au phénomène d'imperméabilité

Les molécules hydrophobes telle que la pénicilline G, les macrolides, et les glycopeptides ne peuvent traverser la membrane externe ; c'est ce qui explique la résistance des bacilles à Gram négatifs vis-à-vis de ces molécules. La moindre sensibilité des *pseudomonas* par rapport

aux entérobactéries vis-à-vis un grand nombre de molécules, est due aux nombres beaucoup plus réduit de ces canaux et à leurs moindres perméabilités (Gaudy et Buxeraud, 2005).

4.1.1.2. Résistance acquise au phénomène d'imperméabilité

Le même mécanisme est aussi mis en cause dans les résistances acquises, l'exemple le plus classique est la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'imipénème. Ce type de résistance est lié à la diminution de la production de la porine OprD qui forme des canaux laissant passé l'imipénème, l'imperméabilité est maintenant le mécanisme le plus fréquemment mis en cause en France (Gaudy et Buxeraud, 2005).

4.1.2. Phénomène d'efflux

C'est un mécanisme qui nécessite une source d'énergie actif, des protéines transmembranaires impliquées normalement dans le transport de molécules nutritives fonctionnant comme de véritables pompes, elles favorisent l'excrétion accélérée de l'antibiotique. Caractéristique importante de ces systèmes d'efflux actifs, ils peuvent exportés des molécules différentes sur le plan structural et constitué des systèmes de multi résistance (Canu et Peter, 2000).

4.1.3. 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 : d'une résistance naturelle qui se fait avec la mauvaise affinité de certains antibiotiques pour les cibles ; les différentes molécules au sein d'une famille ne possèdent pas toutes la même affinité pour la cible bactérienne ainsi, l'azetréonam a peu d'affinité pour les PLP des bactéries à Gram positifs et pour celles des bactéries anaérobies strictes, ce qui explique une résistance naturelle à cet antibiotique. De même, les quinolones de première génération n'ont que peu d'affinité pour l'ADN gyrase des staphylocoques (Gaudy et Buxeraud, 2005).

4.2. La résistance bactérienne staphylococcique aux antibiotiques

Dès le début de l'utilisation clinique des antibiotiques, des souches bactériennes résistantes à ces molécules sont apparues. En effet, Fleming lançait déjà un avertissement face à une utilisation excessive de la pénicilline dès 1945 lors de ses discours d'acceptation du prix Nobel. Pour chaque nouvelle classe d'antibiotiques développée et commercialisée, des souches bactériennes résistantes ont émergé. Ce phénomène a été amplifié par l'utilisation

abusive des antibiotiques depuis un demi-siècle. En effet, des consommations élevées et un mésusage de ces molécules sont à l'origine de l'émergence et de l'antibiorésistance (Goossens *et al*, 2005).

4.2.1. Résistance aux bêtalactamines

Les antibiotiques de la famille des bêtalactamines agissent sur la paroi cellulaire de la bactérie, en inactivant des enzymes qui sont les transpeptidases ou transglycosylases de la réticulation de peptidoglycane ce qui affecte sa synthèse. La mort bactérienne ne résulte pas de l'activité directe de l'antibiotique, mais par autolyse car la fonction de la paroi cellulaire est réduite et lors de la présence de ce mécanisme auto lytique les bêtalactamines deviennent bactériostatiques plutôt que bactéricides (Guardabassi *et al* 2013).

4.2.1.1. Résistance à la pénicilline

En 1942, la résistance à la pénicilline est cliniquement reconnue dans les infections staphylococciques, les enzymes alpha lactamases produites par *S.aureus* sont restées inchangées plus de 50 ans car cette résistance est portée sur un plasmide, bien qu'elle peut aussi être portée sur un chromosome (smith et jarvis, 1999).

4.2.1.2. Résistance à la méticilline

Cette résistance est causée par l'acquisition du gène *mecA*, ce dernier code pour une autre protéine de liaison à la pénicilline appelée PBP2A, qui a une faible affinité pour les antibiotiques bêta lactamines. Le gène *mecA* fait partie d'un grand élément génétique mobile, le chromosome de la cassette staphylococcique *mec* (*scmec*) qui peut être intégré sur un site spécifique dans le chromosome de *S.aureus* sensible à la méticilline (SASM). La cassette staphylococcique *SCCmec* se lie à un ensemble de gènes de recombinaison chromosomiques (*ccrA*, *ccrB* ou *ccrC*) pour l'excision et l'intégration dans le chromosome hôte. Selon les combinaisons des complexes de gène *mecA* et *ccr* entaché par le génome bactérien, le typage moléculaire des souches de SARM a révélé onze principaux types de *SCCmec* et plusieurs sous types qui ont émergé dans le monde. En plus de la différence de ses complexes des gènes, les différents éléments *SCCmec* différents les uns des autres dans les marqueurs de résistance aux antibiotiques autres que les betalactamines (Graveland *et al*, 2011).

4.2.2. Résistance aux quinolones et fluoroquinolones

La résistance aux quinolones est une résistance acquise et croisée entre les différentes molécules et touche essentiellement les staphylocoques hospitaliers, en particulier le staphylocoque doré résistant à la méticilline (> 90 % de résistance). En revanche, les fluoroquinolones restent le plus souvent actives sur le staphylocoque doré sensible à la méticilline (> 90 % de sensibilité). L'acquisition de la résistance chez les staphylocoques est largement liée à la survenue de mutations chromosomiques dans les gènes *gyrA* et *parC*, au niveau d'une petite partie de chacun de ces gènes situés près de l'extrémité 5'. Ces mutations conduisent à une diminution de la liaison des quinolones sur leurs cibles intracellulaires, les complexes ADN-gyrase et ADN-topo-isomérase IV. Chez *S. aureus*, c'est la topo-isomérase IV, et non pas la gyrase comme chez *E. coli*, qui apparaît être la cible primaire des fluoroquinolones (Tankovic *et al* 1997).

4.2.3. Résistance aux aminoglycosides

Les aminosides traversent la membrane cytoplasmique par un mécanisme de transport actif nécessitant de l'énergie. L'énergie provient de la chaîne respiratoire or les bactéries anaérobies strictes et les bactéries anaérobies aéro-tolérantes comme les streptocoques en sont dépourvues, ce qui explique leurs résistances naturelles vis-à-vis des aminosides (Gaudy et Buxeraud, 2005). L'utilisation de l'aminoside répond au souhait d'obtenir une synergie bactéricide avec un inhibiteur de la paroi bactérienne (glycopeptide ou bêta-lactamine). Il existe trois types d'enzymes de résistance, chacune d'entre elles confèrent un phénotype de résistance spécifique aux aminosides. La résistance à la kanamycine traduit la présence d'une enzyme inactivatrice aminoglycoside phos-photransférase (photransférase (3')-III, qui fait perdre la synergie aussi avec l'amikacine. La résistance à la kanamycine et à la tobramycine due à la production d'une aminoglycoside nucléotidyltransférase (4') qui fait perdre la synergie avec ces aminosides et avec l'amikacine. La résistance à la gentamicine due à la synthèse d'une enzyme bi-fonctionnelle, aminoglycoside acétyltransférase (6')-phosphotransférase (2') fait perdre la synergie entre les inhibiteurs de synthèse de la paroi et tous les aminosides (sauf les streptomycines) (Leclercq, 2002).

4.2.4. Résistance à la tétracycline

La tétracycline est découverte pour la première fois en 1950, elle agit sur les sous unités 30S et 70S de ribosome en inhibant l'élongation des protéines bactériennes lors de leur synthèse.

La plupart des mécanismes de résistance à la tétracycline sont causées par efflux actif par une protéine codée par un gène plasmidique (Smith et Jarvis, 1999).

4.2.5. Résistance aux glycopeptides

Les glycopéptides tels que la vancomycine sont des antibiotiques qui ont été mises à disposition dès 1958, ils empêchent la formation de la paroi cellulaire en complexation avec la partie D-alanine–D-alanine du complexe phosphodisaccaride pentapeptide du peptidoglycane inhibant ainsi son élongation, la vancomycine inhibe également la synthèse de l'ARN (Smith et Jarvis, 1999). La vancomycine a été longtemps considérée comme le meilleur médicament pour le traitement de l'infection sévère à SARM y compris aussi l'infection communautaire associée à *S. aureus*. Cependant, la résistance du *S. aureus* à la vancomycine augmente tous les jours suscitant une inquiétude généralisée dans la communauté médicale (Guo *et al*, 2020). Il a été démontré que l'action de la vancomycine sur la bactérie induit la non résistance aux bêtalactamines et le transfert de matériels génétiques responsable de résistance à la vancomycine en particulier la cassette du gène *van A* aux staphylocoques qui est la cause principale de cette résistance et cette possibilité augmente surtout en milieu hospitalier (Smith et Jarvis, 1999).

4.2.6. Résistance aux macrolides, lincosamides 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 et 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. La production de méthylase inducible n'entraîne de résistance qu'aux antibiotiques inducteurs, qui sont les macrolides à noyau à 14 et 15 atomes (érythromycine, roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine, azithromycine) alors que les macrolides à noyau de 16 atomes (josamycine et spiramycine), les lincosamides (clindamycine et lincomycine) et les streptogramines B (pristinamycine I et quinupristine) restent actifs car se sont des non inducteurs. L'utilisation de la clindamycine ou d'un macrolide à noyau de 16 atomes est néanmoins déconseillée en raison d'un risque élevé de sélection de mutants constitutifs en présence de ces antibiotiques (Leclercq, 2002).

Objectifs de l'étude

L'objectif principal de notre étude se porte sur l'isolement du *Staphylococcus aureus* chez les bovins laitiers porté au niveau de leurs cavités nasales, et ceci pour estimer la prévalence de ce germe et étudier sa résistance vis-à-vis de quelques molécules d'antibiotiques utilisées en thérapeutiques humaines et vétérinaires, dans le but de déceler d'éventuelles formes de multi-résistances (SARM).

1. Matériels

1.1. Matériels de laboratoire

- Bec bunsen
- Etuve (Mettler, Germany)
- Autoclave (PBI International, Milano)
- Bain marie (Mettler, Germany)
- Vortex (Heidolph, Germany)
- Balance (Denver Instrument, USA)
- Réfrigérateur (Essalem Electronics, Algérie)
- Spectrophotomètre (Medline, United Kingdom)
- Boîte de Pétri
- Anse à boucle
- Micropipette
- Embouts
- Pipettes Pasteur
- Becher
- Flacons en verre stériles
- Lame en verre
- spatule
- Tubes à essai
- Tubes à hémolyse
- Pince
- Portoir

1.3. Échantillons biologiques

- Prélèvement nasal chez le bovin laitier
- Prélèvement nasal chez l'éleveur
- Echantillons de lait de mélange de chaque élevage de bovin
- Echantillon de lait individuel d'animal atteint ou soupçonné de mammites
- Souche de référence *S. aureus* ATCC 25923

1.4. Réactifs et milieux de culture utilisés

- Milieu de culture Mueller Hinton (Conda Pronadisa, Spain)
- Emulsion de jaune d'œufs
- Tétracycline de potassium (Institut Pasteur d'Alger, Algérie)
- Gélose Baird Parker (Conda Pronadisa, Espagne)
- Gélose BHI
- Bouillon cœur cerveau BHIB (Biokar, France)
- Gélose à ADN (Conda Pronadisa, Espagne)
- Bouillon Clark et Lubs (Institut Pasteur d'Alger, Algérie)
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Cosmania, Algérie)
- Plasma de lapin (Biorad, France)
- Voges Proskauer I (VPI : NaOH 16%) et II (VPII : Naphtol 6%) (Institut Pasteur d'Alger, Algérie)
- HCl 2N (MERCK, Germany)
- Disques d'antibiotiques (Liofilchem, Italy)
- Eau distillée stérile
- Eau physiologique stérile
- Glycérol

1.2. Matériels de prélèvement

- Ecouvillons stériles
- flacons stériles
- Gants
- Glacière

2. Méthodes

2.1. Lieu et période d'étude

Notre étude s'est déroulée au sein du laboratoire de recherche de biochimie analytique et de biotechnologie (LABAB), à l'université Mouloud Mammerie Tizi Ouzou, elle a débuté le mois de Mars 2020 jusqu'au mois de Septembre 2020. Elle s'est étalée sur 8 semaines de travail.

2.2. Protocol expérimental

2.2.1. Collecte de prélèvements

Notre présente étude a été réalisée sur quatre régions différentes de la wilaya de Tizi Ouzou qui sont : Tala Athmane, Yakouren, Freha, Azazga. Au total, 58 prélèvements naseaux des vaches laitières ont été effectués. En parallèle, un échantillon de lait de mélange de chaque élevage ainsi que des prélèvements nasaux chez les éleveurs ont été réalisés. Les prélèvements ont été acheminés dans une glacière jusqu'au laboratoire.

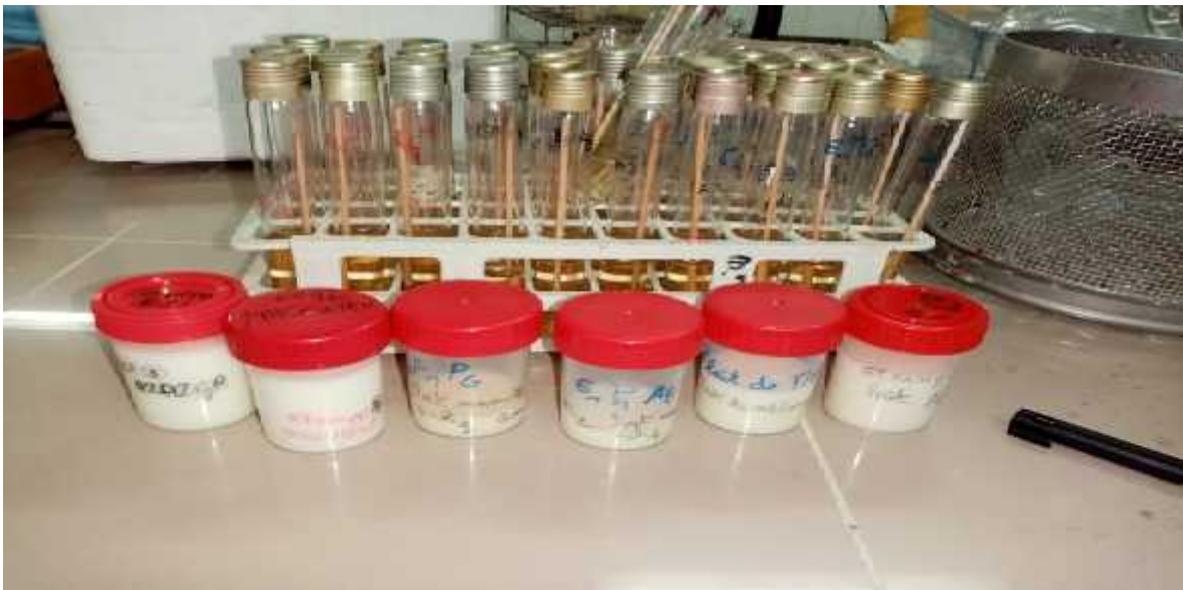


Figure 13 : Identification des prélèvements à analyser.

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Tableau IV : informations concernant les prélèvements effectués.

Régions	Tala Athmane			Fréha		Azazga	Yakouren
Elevages	Elevage 1	Elevage 2	Elevage 3	Elevage 4	Elevage 5	Elevage 6	Elevage 7
Nombre de Prélèvements nasaux chez le bovin laitier	6	7	8	19	/	8	10
Nombre de prélèvements de lait	Un lait mélange	Un lait de mélange	Un lait mélange	Un lait de mélange + un lait mammiteux	Un lait de mélange	Un lait de mélange	Un lait de mélange
Nombre de Prélèvements nasaux chez les éleveurs	/	/	/	1	/	1	1

2.2.1.1. Prélèvement nasal

Après avoir bien expliqué au propriétaire de l'élevage de bovin la cause qui nous a poussé à le solliciter et l'intérêt que porte cette présente étude, le prélèvement se fera comme suite :

- Enfiler une paire de gants ;
- Préparer les écouvillons et les tubes à essai contenant le bouillon de culture, Mueller Hinton
- Manutentionner l'animal avec l'éleveur ;
- Pénétrer l'écouvillon dans la narine de la vache et faire des mouvements rotatoires, puis le remettre dans un tube contenant le bouillon de Mueller Hinton + 6.5% de NaCl et le refermer.

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Le prélèvement nasal chez l'éleveur se fait de la même manière.

2.2.1.2. Échantillonnage du lait

Le prélèvement individuel du lait se fait de cette manière :

- Bien nettoyer les trayons avec une lingette propre.
- Eliminer les premiers jets de lait.
- Traire de chaque mamelle de chaque vache un peu de lait dans un flacon stérile, de telle sorte à éviter le contact du flacon avec les pis de la mamelle.
- En parallèle, des échantillons du lait de mélange ont été réalisés à partir de bidons ou de cuves de réfrigération.

Après avoir effectué tous les prélèvements, les tubes et les flacons d'échantillons de lait sont transportés dans une glacière puis gardés au réfrigérateur.

2.2.2. Analyses des prélèvements

2.2.2.1. Enrichissement

L'enrichissement a été fait dans un bouillon de Mueller Hinton avec 6.5% de NaCl pour les prélèvements naseaux puis ils sont incubés directement après identification des tubes, à 37°C pendant 24 à 48h.

Tant dis que, les échantillons de lait sontensemencés à la surface de la gélose sélective, Baird Parker, et ceci en ensemençant 50µl de lait à l'aide d'une micropipette, suivi d'un étalement à l'aide d'un râteau. Les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

2.2.2.2. Isolement

Les tubes présumés positifs (présentant un trouble) sontensemencés sur des boites de Pétri contenant de la gélose Baird Parker additionnée d'une émulsion de jaune d'œuf et de téllurite de potassium. Les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

2.2.2.3. Purification

Les colonies caractéristiques du *S. aureus* sur la gélose Baird Parker sont noires, rondes, opaques et entourées d'un halo clair, due à la dégradation des protéines du jaune d'œuf. Le travail consiste à prélever une à cinq colonies caractéristiques de *S. aureus* de chaque échantillon positif et les repiquer plusieurs fois sur la gélose BHI, jusqu'à avoir des cultures pures. Les boîtes ainsi obtenues sont incubées à 37°C pendant 24h.

2.2.2.4. Identification biochimique des isolats

2.2.2.4.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme sécrétée par certaines espèces bactérienne y compris le *S. aureus*, qui dégrade le peroxyde d'hydrogène qui est toxique pour la cellule bactérienne. La mise en évidence de cette enzyme se fait comme suite :

Le test est réalisé par le dépôt d'une colonie provenant d'une culture sur la gélose BHI contenant une souche suspecte dans une goutte d'eau oxygénée. Le test est présumé positif lorsqu'il y'a dégagement de bulles de gaz, ce qu'on appelle effervescence.

2.2.2.4.2. Recherche de l'ADNase

La mise en évidence de cette enzyme chez le *S. aureus* est comme suite :

En condition aseptiques, une colonie issue d'une culture sur la gélose BHI est ensemencée par stries sur une boîte contenant la gélose à ADN. L'incubation de la boîte est réalisée à 37°C/24h. La mise en évidence de l'ADNase est révélée par l'ajout d'acide chlorhydrique (HCl) à 2N. L'apparition d'une zone claire autour des stries révèle la libération des polynucléotides résultant de l'hydrolyse de l'ADN du milieu. Ainsi, la souche est considérée comme étant positive.

2.3.2.4.3. Recherche de la coagulase

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

Le test est réalisé par le mélange de 0.2 ml d'une culture de *S. aureus* sur le bouillon cœur cerveau (BHIB) avec 0.2 ml du plasma de lapin. Un témoin positif est réalisé en utilisant la

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

souche de référence *S. aureus* ATCC 25923. L'incubation est faite à 37°C de 1h à 4h. Le test est considéré comme positif lorsqu'il y a une prise en masse du plasma (formation d'un caillot).

2.2.2.4.4. Test VP (réaction de Voges Proskauer)

La recherche de la production d'acétoïne engendrée par la fermentation butyrique se fait en ensemençant les souches à tester à partir des cultures pures de BHI, dans le bouillon Clark et Lubs, qui est incubé à 37°C pendant 48h.

Après l'incubation, des gouttes des réactifs VPI et VPII sont rajoutées au milieu Clark et Lubs. Une coloration rouge est apparaitra dans le bouillon Clark et Lubs, si la souche est productrice d'acétoïne.

2.3.2.6. Antibiogramme

L'étude de la résistance bactérienne aux antibiotiques est réalisée selon la technique de diffusion des disques d'antibiotiques sur la gélose Mueller-Hinton.

Les souches à étudier sont repiquées sur milieu BHI afin d'avoir des cultures jeunes. Une suspension bactérienne préparée dans de l'eau physiologique, avec une densité optique comprise entre 0.08 et 0.1 à la longueur d'onde de 625 nm, préparée à partir de cette culture jeune. L'antibiogramme est réalisé en appliquant des stries serrées sur toute la surface de la gélose avec des écouvillons. Puis, des disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 heures. Après la lecture des zones d'inhibition, les souches sont classées en : souches sensibles, souches intermédiaires et souches résistantes, selon les recommandations du CLSI (2018) et de CASFM (2019).

2.3.2.5. Conservation des souches isolées

Après l'identification biochimique et l'attribution d'un code pour chaque souche, la conservation se fera dans des cryotubes par l'ajout d'un volume de cette culture bactérienne à deux volumes de glycérol. Ces tubes sont maintenus à -20°C.

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Prévalence du *S. aureus*

Au cours de notre étude, 58 écouvillonnages naseaux ont été effectués sur 58 vaches laitières à travers sept élevages de bovins laitiers, situés dans quatre régions différentes. Uniquement, 8 vaches se sont révélées porteuses de *S. aureus* dans leurs narines, soit une prévalence de 13.79%. Les prélèvements nasaux chez les éleveurs en contact permanent avec ces animaux de rente ont révélé la présence de *S. aureus* chez deux de ces éleveurs. Des souches de *S. aureus* ont été aussi isolées d'un seul prélèvement du lait de mélange parmi les huit prélèvements du lait collectés (tableau 5).

Après identification biochimique des isolats, 28 souches de *S. aureus* ont été confirmées, dont 17 ont été isolées à partir du portage nasal de bovins laitiers, 6 souches de portage nasal chez les éleveurs et enfin 5 souches du lait de mélange (tableau 5).

Tableau V : Fréquences d'isolement de *S. aureus*.

	Nombre de prélèvements	Nombre de prélèvements positifs	Fréquence d'isolement (%)	Nombre de souches isolées
Portage nasal chez le bovin laitier	58	8	13.79%	17
Portage nasal chez les éleveurs	3	2	66.66%	6
Echantillons de lait	7 échantillons de lait de mélange et un échantillon de lait individuel	Un seul échantillon de lait de mélange	12.5%	5
Total	69	11	15.94%	28



Figure 14 : Souches de *Staphylococcus* à ADNase positive

2.2. Résistance du *S. aureus* aux antibiotiques

Au cours de notre travail, les souches de *S. aureus* isolées ont été testées vis-à-vis de quelques molécules d'antibiotiques utilisées en thérapeutique humaine et en thérapeutique vétérinaire. L'étude a révélé l'existence de résistances, avec des taux variables, non seulement en fonction de la molécule d'antibiotique testée, mais aussi en fonction de l'origine de la souche (portage nasal chez le bovin, portage nasal chez l'éleveur ou lait cru). En effet, de fortes résistances vis-à-vis de la pénicilline G et de l'érythromycine ont été observées vis-à-vis toutes les souches quel que soit leurs origines, avec des taux de 82.14% et 28.57% respectivement. De faibles résistances ont été enregistrées vis-à-vis de la céfoxitine. Aucune résistance n'a été observée vis-à-vis les autres molécules, à savoir la gentamycine, l'ofloxacine, la néomycine, le chloramphénicol, le triméthoprim/sulfaméthoxazole et la tétracycline.

Chapitre 2 : Résultats et discussion

Tableau VI : Taux de résistance et de sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées.

prélèvement antibiotiques	Echantillons de lait		Prélèvements naseaux chez les éleveurs		Prélèvements naseaux chez le bovin		Total	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Pénicilline	5 100%	0 0%	6 100%	0 0%	12 70.58%	5 29.41%	23 82.14%	5 17.85%
Céfoxitine	1 20%	4 80%	0 0%	6 100%	1 5.88%	16 94.11%	2 7.14%	26 92.85%
Gentamycine	0 0%	5 100%	0 0%	6 100%	0 0%	17 100%	0 0%	28 100%
Erythromycine	0 0%	4 80%	3 50%	2 33.33%	5 29.41%	10 58.82%	8 28.57%	16 57.14%
Ofloxacine	0 0%	5 100%	0 0%	6 100%	0 0%	17 100%	0 0%	28 100%
Néomycine	0 0%	5 100%	0 0%	6 100%	0 0%	17 100%	0 0%	28 100%
Chloramphénicol	0 0%	5 100%	0 0%	6 100%	0 0%	17 100%	0 0%	28 100%
Tétracycline	0 0%	2 40%	0 0%	6 100%	0 0%	12 70.58%	0 0%	20 71.42%
Trimétoprime/ sulfaméthoxazol	0 0%	5 100%	0 0%	6 100%	0 0%	17 100%	0 0%	28 100%

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

A travers notre étude, deux souches SARM ont été isolées. La première a été isolée du lait de mélange, tandis que, la deuxième à partir d'un prélèvement nasal chez une vache laitière.

Chapitre 2 : Résultats et discussion

Tableau VII : informations concernant les souches SARM isolées.

La souche	Origine de la souche	Numéro de l'élevage	Région	Profils de résistance aux antibiotiques
S432	Lait de mélange	3	Tala Athmane	P/FOX
S457	Portage nasal chez le bovin	7	yakourene	P/FOX/E

P : Pénicilline, FOX : Céfoxitine, E : Erythromycine.



Figure 15 : Profil de résistance d'une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM).

2.2.2. Phénotypes de multirésistante

Aucune souche de *S. aureus* multirésistante n'a été trouvée. En revanche, deux souches sont résistantes à deux ou à trois molécules d'antibiotiques. La première est résistante vis-à-vis de la pénicilline et de la céfoxitine. Tandis que, la deuxième souche est résistante vis-à-vis de la pénicilline, de la céfoxitine et de l'érythromycine.

2. Discussion

S. aureus est un pathogène opportuniste polyvalent qui peut causer une variété d'infections comme l'intoxication alimentaire, des infections cutanées et des infections invasives voir mortelles (Papadopoulos *et al*, 2018). En 1948, Moss et ses collègues ont montré que le portage de *S.aureus* sur la peau dépendait du portage nasal, ils ont suggéré que le vestibule nasal était le site principal de la colonisation de cette bactérie (Sollid *et al*, 2013). Ce travail a été élaboré dans le cadre d'évaluer la présence de ce pathogène chez le bovin laitier dans quelques régions de Tizi Ouzou. En effet, la fréquence d'isolement de *S. aureus* dans la cavité nasale des vaches laitières est de 13.79%. Peu d'études sont disponibles concernant le portage nasal de *S. aureus* chez des animaux de rente en Algérie et à travers le monde. Notre résultat corrobore avec celui d'Agabou *et al* (2017), qui ont annoncé un taux de 15%. Néanmoins, Bounar-Kechih *et al* (2018), ont observé un taux d'isolement plus élevé chez le bovin, qui est de l'ordre de 55%. Des fréquences variables ont été rapportées par plusieurs auteurs. Elle est de 1.33% et 11.53 en Tunisie (Gharsa *et al*, 2015 ; Khemiri *et al*, 2018), 1.2% en Turquie (Garipcin et Seker, 2015), 42.8% en Portugal (Conceição *et al*, 2017) et 5.06% en Iran (Rahimi *et al*, 2015). Ces écarts signalés entre les prévalences de portage nasal pourraient être dus à plusieurs facteurs tels que la différence entre la taille des échantillons, les variations géographiques ainsi que les pratiques d'élevages implémentés au niveau de chaque élevage et de chaque pays.

Deux éleveurs (66.66%) parmi les trois écouvillonnés portaient le *S. aureus* dans leurs narines. Cette fréquence d'isolement est supérieure à celle annoncée par Akkou *et al* (2016), qui est de 38%. Au Maroc, 60% des éleveurs testés étaient porteurs de *S. aureus* (Mourabit *et al*, 2020). Papadopoulos *et al* (2019) ont rapporté une fréquence relativement élevée, de 51.5% en Grèce. Cette fréquence relativement élevée dans notre étude est due certainement à la taille réduite des prélèvements. Plusieurs facteurs peuvent influencer la colonisation des

Chapitre 2 : Résultats et discussion

éleveurs par *S. aureus*, tels que leur contact direct avec les animaux et leur exposition indirecte à l'environnement contaminé des élevages (Locatelli *et al*, 2017).

S. aureus a souvent été isolé du lait et de l'environnement de la transformation laitière (Papadopoulos *et al*, 2018). La fréquence d'isolement de *S. aureus* dans les prélèvements du lait était de 12.5%. Notre résultat ne rejoint pas ceux d'Adjlane-Kaouche *et al* (2014) et Titouche *et al* (2019), qui ont annoncé des taux relativement élevés, qui sont de l'ordre de 33.3% et 24%, respectivement. De hautes prévalences de *S. aureus* dans le lait cru ont été rapportées par plusieurs auteurs (Kamal *et al*, 2013 ; Jamali *et al*, 2015 ; Papadopoulos *et al*, 2018). La présence de *S. aureus* dans le lait reflète l'importance que tient ce germe dans la contamination microbienne de cette denrée alimentaire. En effet, *S. aureus* est la cause principale des mammites cliniques et sub-cliniques. Plusieurs sources de contamination du lait cru 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).

L'évolution de la résistance aux antibiotiques dans les souches de *S. aureus* est une préoccupation importante, tant pour la médecine humaine que vétérinaire. Dans cette étude, de fortes résistances ont été enregistrées vis-à-vis de la pénicilline G et de l'érythromycine. Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs auteurs qui ont rapporté de fortes résistances à l'encontre de ces deux molécules (Jamali *et al*, 2015 ; Akkou *et al*, 2016 ; Conceição *et al*, 2017 ; Khemiri *et al*, 2018 ; Titouche *et al*, 2019).

Aucune résistance n'a été observée vis-à-vis les autres molécules d'antibiotiques, à savoir la tétracycline, la gentamycine, la néomycine, le triméthoprim/sulfaméthoxazole, le chloramphénicol et l'ofloxacine. De faibles résistances ont été enregistrées vis-à-vis de la tétracycline, aussi bien chez les souches isolées chez les animaux et chez les éleveurs, ont été rapportées par Mourabit *et al* (2020), au Maroc. Des résistances à l'encontre des fluoroquinolone sont été observées chez des souches isolées de bovin laitier (Locatelli *et al*, 2017, Bounar-Kechih *et al*, 2018).

Aucune résistance vis-à-vis de le chloramphénicol n'a été observée concernant nos souches, quelques soit le type de prélèvement. Ceci, pourrait s'expliquer par le fait que cette molécule n'est pas utilisée en médecine vétérinaire.

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline constitue un grave problème de santé publique, en raison de sa capacité à infecter les humains et les animaux (Papadopoulos *et al*,

Chapitre 2 : Résultats et discussion

2018). Neradova *et al* (2020), dans une étude portant sur l'isolement de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) chez les vétérinaires professionnels en république Tchèque, ont révélé que 6.72% des vétérinaires étaient porteurs de SARM dans leurs mains.

Dans notre étude, deux souches SARM ont été isolées. L'une est isolée du lait cru et l'autre du portage nasal d'une vache. Tandis que, aucun SARM n'a été isolé chez les éleveurs que nous avons échantillonnés. Nos résultats corroborent avec ceux de plusieurs auteurs qui ont souligné l'émergence des SARM dans le lait cru, avec des fréquences variables selon les pays (Aras *et al*, 2012 ; Haran *et al*, 2012 ; Kamal *et al*, 2013 ; Basanisi *et al*, 2015 ; Jamali *et al*, 2015 ; Carfora *et al*, 2015 ; Papadouplos *et al*, 2018). En Algérie, des SARM ont été isolés dans le lait cru, avec des fréquences de 21.5% (Chaalal *et al*, 2018) et de 15.94% (Titouche *et al*, 2019). En revanche, Akkou *et al* (2015) ont pu isoler des SARM chez des éleveurs en contact avec des animaux.

Plusieurs études ont montré le risque associé à la présence des SARM chez les animaux d'élevage, ce qui montre que les animaux d'élevage pourraient constituer un moyen de transmission ou un réservoir potentiel d'infections aux humains (Ross Fitzgerald, 2012). La transmission zoonotique potentielle inclut le contact direct entre l'animal et l'éleveur, mais aussi le contact de l'éleveur avec l'environnement contaminé (Locatelli *et al*, 2017). Benito *et al* (2015) ont isolé un SARM portant le gène *mecC* dans une lésion de la peau d'un éleveur, ce dernier travaille dans un atelier de production de fromage au lait cru et en contact direct avec les animaux. Il est possible que le contact avec les animaux ou avec le lait cru puisse être à l'origine de cette souche. Le même constat a été rapporté par Carfora *et al* (2016) et Locatelli *et al* (2017), qui ont mis en évidence le transfert des SARM de bovins et des ovins vers des éleveurs.

Conclusion

La colonisation par le *S. aureus* est un phénomène en diffusion incessante, mais pas encore bien élucidé. Le *Staphylococcus aureus* dispose d'un pouvoir d'occupation de différentes parties du corps humain et animal surtout au niveau du vestibule nasal. De nombreuses études ont prouvées que le portage de *S. aureus* constitue une menace sanitaire et économique où le porteur sera sujet de beaucoup de maladies graves voir mortelles.

Pendant notre étude, 69 prélèvements ont été recueillis comprenant des écouvillonnages naseaux des vaches laitières et des éleveurs, et des échantillons de lait cru dans sept élevages de bovins situés dans la wilaya Tizi Ouzou, et sont soumis à un examen microbiologique pour détecter des souches de *S. aureus*.

Les résultats obtenus indiquent des pourcentages différents de contamination par le *S. aureus*. Ils sont respectivement de 13.79% chez les bovins, 66.66% chez les éleveurs et de 12.5% dans le lait cru. 26 souches SASM et 2 souches SARM ont été isolées. Des profils d'antibiorésistance ont été observés parmi les souches isolées. En effet, des résistances à la pénicilline, la céfoxitine et à l'érythromycine ont été observées.

Ces résultats témoignent sur le problème de santé public que posent les souches SARM d'où l'importance de leurs identifications immédiates. Cela, souligne la nécessité de mener des études plus vastes et multicentriques, avec des techniques plus approfondies de caractérisation génétique des gènes de résistance aux antibiotiques et de la virulence, pour mieux définir la transmission du *S. aureus* entre le bétail et l'homme.

Références bibliographiques

- J **Abdel-Moein KA. et Zaher HM. 2019.** Occurrence of multidrug-resistant methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among healthy farm animals: a public health concern. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 7:1, 55-60.
- J **Accarias S. 2014.** Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat immunologie et maladies infectieuses. Université Paul Sabastier Toulouse III.
- J **Adjalane-Kaouche S, Benhacin 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, Article ID 131593, 7 pages.
- J **Agabou A, Ouchenane Z, Ngba Essebe C, Khemissi S, Chehboub MTE, Chehboub IB, Sotto A, Dunyach-Remy C, Lavigne JP. 2017.** Emergence of Nasal carriage of ST80 and ST152PVL+ *Staphylococcus aureus* isolates from livestock in Algeria. Toxins, 9, 303.
- J **Aires-de-Sousa M. 2016.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. clinical microbiology and infection, 23, 373-380.
- J **Aissani D, Ait Idir T. 2018.** Prévalence et résistance des souches *Staphylococcus aureus* isolées d'animaux de la ferme. Mémoire de master sciences biologiques. Université Abderahmane Mira Bejaia Algérie.
- J **Akkou M, Antri K, Bachtarzi MA, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, Kaidi R, Meugnier H, Tazir M, Etienne J, Laurent F, et Ramdani-Bougoussa N. 2016.** Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Bovine Mastitis and Nasal Carriage of Workers in Contact to Animals in Algeria. Pakistan Veterinary Journal, 36(2): 184-188.
- J **Aras Z, Aydın I, Kav K. 2012.** Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from caprine mastitis cases. Small Ruminant Research, 102, 68-73.
- J **Argudín MA, Mendoza MC et Rodicio MR. 2010.** Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins, 2, 1751-1773.
- J **Astley R, Miller FC, Mursalin MdH, Coburn PS et Callegan MC. 2019.** An Eye on *Staphylococcus aureus* Toxins: Roles in Ocular Damage and Inflammation. Toxins, 11, 356.

Références bibliographiques

- J **Basanisi MG, Nobili G, La Bella G, Russo R, Spano G, Normano G, La Salandra G. 2015.** Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in Southern Italy. *Small Ruminant Research*, 135, 17-19.
- J **Becker K. 2018.** Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus*. Elsevier, p13-38.
- J **Benito, D, Gómez, P, Aspiroz C, Zarazaga, M, Lozano, C, Torres C. 2015.** Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 34 : 280-285.
- J **Bietrix J, Kolenda C, Sapin A, Haenni M, Madec J. Y, Bes M, Dupieux C, Tasse J. et Laurent F. 2019.** Persistence and Diffusion of *mecC*-Positive CC130 MRSA Isolates in Dairy Farms in Meurthe-et-Moselle County (France). *frontier in microbiology*, 10, article 47.
- J **Bouhar-Kechih S, Hamdi M. T, Aggad H, Meguenni N, et Cantekin Z. 2018.** Carriage Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Poultry and Cattle in Northern Algeria. *Veterinary Medicine International*, Article ID 4636121, 5 pages.
- J **Brown S, Santa Maria J. P et Walker S. 2013.** Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 67.
- J **Callegan MC, Lee SE, Hill JM, et O'Callaghan RJ. 1994.** Corneal Virulence of *Staphylococcus aureus* : Roles of Alpha-Toxin and Protein A in Pathogenesis. *infection and immunity*, 62 p. 2478-2482.
- J **Canu A. et Peter F. 2000.** Préparateur en pharmacie. Edition Tec et Doc, Paris, France.
- J **Carfora V, Caprioli A, Marri N, Sagriferi 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. *International Dairy Journal*, 42, 12-15.
- J **Castro A, Silva J, Teixeira P. 2018.** *Staphylococcus aureus*, a food pathogen : virulence factors and antibiotic resistance. *Food borne diseases*, Elsevier, p 213-238.
- J **Chaalal W, Chaalal N, Bourafa N, Kihal M, Diene SM, et Rolain JM. 2018.** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from food products in Western Algeria. *Foodborne Pathogens and disease*, 15:353–360.

Références bibliographiques

- J **Coelho SMO, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, et Souza MM. S. 2011.** *Short communication: Profile of virulence factors of Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil.* journal of dairy science, 94 :3305–3310.
- J **Conceicao T, de Lencastre H. et Aires-de-Sousa M. 2017.** Healthy Bovines as Reservoirs of Major Pathogenic Lineages of Staphylococcus aureus in Portugal. microbial drug resistance, 00, Number 00.
- J **Crosby H. A, Kwiecinski J, et Horswill A. R. 2016.** *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host-pathogen interactions. Adv Appl Microbiol, 96: 1–41.
- J **Dellaras C. 2014.** Pratique en microbiologie de laboratoire recherche de bactéries et de levures moisissures. Lavoisier. Paris.
- J **Denis F, Cattoir V, Martin CH, Ploy M, Poyart M. 2016.** Bactériologie médicale : techniques usuelles. Elsevier health science, France.
- J **Dinges MM, Orwin PM, et Schlievert PM. 2000.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical microbiology reviews, 13, p. 16–34.
- J **Elmonir W, Essa H, El-Tras W.F. 2019.** Ecology of *Staphylococcus aureus* and its antibiotic resistance genes in dairy farms : contributing factors and public health implications. Slov Vet Res, 56 (Suppl 22): 747–54.
- J **Erkihun A. et Hui Ying ch. 2020.** First *mecC* and *mecA* Positive Livestock-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (*mecC* MRSA/LA-MRSA) from Dairy Cattle in Malaysia. Microorganisms 8, 147.
- J **Fey PD. 2010.** Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections?, Curr Opin Microbiol, 13(5): 610–615.
- J **Fitzgerald JR. 2012.** Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat, Trends in Microbiology, 20, No. 4, 192-198.
- J **Flandrois JP. 1997.** Bactériologie médicale. Collections Azay, presses universitaires Lyon.
- J **Foster T. J, et Geoghegan J. A. 2015.** *Staphylococcus aureus*. Molecular medical microbiology. Elsevier, p 655-673.

Références bibliographiques

- J **Garipcin M et Seker E. 2015.** Nasal Carriage Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Cattle And Farm Workers In Turkey. *Veterinarski Arhiv*, 85 (2), 117-129.
- J **Gaudy C. et Buxeraud J. 2005.** Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. Edition Elsevier, Paris France.
- J **Gharsa H, Ben Slama K, Gómez-Sanz E, Lozano C, Zarazaga M, Messadi L, Boudabous A, Torres C. 2015.** Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* from nasal samples of healthy farm animals and pets in Tunisia. *Vector borne and zoonotic diseases*, 15(2):109-15.
- J **Gouasmia R. et Hechachenia M. 2015.** Usage des antibiotiques en élevage et risque sur la santé humaine .Mémoire de master en sciences biologiques. Université de Guelma Algerie.
- J **Grace D, et Fetsch A. 2018.** *Staphylococcus aureus*—A Foodborne Pathogen: Epidemiology, Detection, Characterization, Prevention, and Control: An Overview. In *Staphylococcus aureus*. Elsevier, P 3–10.
- J **Graveland H, Duim B, Duijkeren EV, Heederik D, Wagenaar JA. 2011.** Livestock-associated methicillin-résistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *International journal of médical microbiology*. 301, p 630-634.
- J **Guardabassi L, Larsen J, Weese JS, Butaye P, Battisti A, Kluytmans J, Lloyd DH, Skov RL. 2013.** Public health impact and antimicrobial selection of meticillin-resistant staphylococci in animals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 1. 55–62.
- J **Guiraud JP. et Rosec JP. 2004.** Pratiques des normes en microbiologie alimentaire. Edition AFNOR, France.
- J **Guo Y, Song G, Sun M, Wang J et Wang Y. 2020.** Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, article 107.
- J **Habera D. et Bahmed H. 2017.** Prévalence et antibiorésistance des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) dans le lait cru et les produits laitiers. Mémoire master sciences biologiques université Mouloud Mammerie Tizi Ouzou Algerie.
- J **Haran KP, Godden SM, Boxrud D, Jawahir S, Bender JB, Sreevatsan S. 2012.** Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including

Références bibliographiques

- methicillinresistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bullk tank milk from Minnesota dairy farms. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 688-695.
- J **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, 383-388.
- J **Kamal RM, Bayoumi MA, Abd et Aal SFA. 2013.** MRSA detection in raw milk; some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. *Food Control*, 33, 49-53.
- J **Khemiri M, Abbassi M. S, Couto N, Mansouri R, Hammami S, Pomba C. 2018.** Genetic characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and nasal samples of healthy cows in Tunisia: First report of ST97-t267-agrI-SCCmecV MRSA of bovine origin in Tunisia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, 161–165.
- J **Klimešová M, Manga I, Nejeschlebová L, Horá ek J, Ponížil A, Vondrušková E. 2017.** Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cattle, sheep, goat, and pig rearing in the Czech Republic. *Acta vet brno*, 86: 3–10.
- J **Kuipers A, Stapels D AC, Lleroy TW, Ya-Ping Ko, Ruyken M, Lee JC, van Kesse KPM et. Rooijackers SHM. 2016.** The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiology*, 162, 1185–1194.
- J **Ladhani S, Joannou CL, Locherie DP, evans RW, et Poston SM. 1999.** Clinical, Microbial, and Biochemical Aspects of the ExfoliativeToxins Causing Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. *Clinical microbiology reviews*, 12, p. 224–242.
- J **Le Loir Y et Gautier M. 2010.** *Staphylococcus aureus*, édition TEC × DOC, Eminter, Lavoisier, France.
- J **Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. 2014.** Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter, *Journal des Anti-infectieux*, 16, 112—121.
- J **Leclercq R. 2002.** Résistance des staphylocoques aux antibiotiques, club d'infectiologie, éditions scientifiques et médicales elsevier SAS ; 21, p375-383.
- J **Lei M. G, et Lee C. Y. 2018.** Repression of Capsule Production by XdrA and CodY in *Staphylococcus aureus*. *journal of bacteriology*, 200 Issue 18 e00203-18.

Références bibliographiques

- J **Lister JL. et Horswill AR. 2014.** *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4 article 178, 9.
- J **Locatelli C, Cremonesi P, Caprioli A, Carfora V, Ianzano A, Barberio A, Morandi S, Casula A, Castiglioni B, Bronzo V. and Moroni P. 2017.** Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herd. *Journal of Dairy Science*, 100:1–12.
- J **Lowy FD, MD. 1998.** *Staphylococcus aureus* infections. *the new england journal of medicine*, 520-532.
- J **Lund VA, Wacnik K, Turner RD, Cotterell BE, Walther CG, Fenn SJ, Grein F, Wollman A. JM, Leake MC, Olivier N, Ashley C, Mesnage S, Simon Jones, Foster SJ. 2018.** Molecular coordination of *Staphylococcus aureus* cell division. *eLife* ; 7:e32057.
- J **Mairi A, Touati A, Pantel A, Zenati K, Yahiaoui Martinez A, Dunyach-Remy C, Sotto A et Lavigne J. 2019.** Distribution of Toxinogenic Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* from Different Ecological Niches in Algeria. *Toxins*, 11, 500.
- J **Mourabit N, Arakrak A, Bakkali M, Zian Z, Bakkach J et Laglaoui A. 2020.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in farm animals and breeders in north of Morocco. *BMC Infectious Diseases*, 20:602.
- J **Muller A. 2017.** Bon usage des antibiotiques : résultats d'action dans différents types d'établissements de santé. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale environnement–santé. Université Bourgogne Franche-Comté.
- J **Neradova K, Jakubu V, Pomorska K et Zemlickova H. 2020.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary professionals in 2017 in the Czech Republic. *BMC Veterinary Research*, 16:4.
- J **O’Riordan K et Lee JC. 2004.** *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clinical microbiology reviews*, 17, p. 218–234.
- J **Oliveira D, Borges A et Simões M. 2018.** *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins*, 10, 252.
- J **Otto M. 2014.** *Staphylococcus aureus* toxins, *Curr Opin Microbiol*, 0: 32–37.
- J **Papadopoulos P, Angelidis AS, Papadopoulos T, Kotzamanidis C, Zdragas A, Papa A, Filioussis G, Sergelidis G. 2019.** *Staphylococcus aureus* and methicillin-

Références bibliographiques

- resistant *S. aureus* (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness. *Food Microbiology*, 84, 103249.
- J **Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, Kotzamanidis C, Zdragas A, Papa A, Filioussis G, Sergelidis D. 2018.** Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 35–41.
- J **Paparella A, Serio A, Rossi C, Mazzarrino G, Chaves Lopez C. 2018.** Food borne transmission of staphylococci. Pet to man travelling staphylococci : a world in progress. Elsevier, p 71-94.
- J **Pebret F. 2003.** Maladies infectieuses : toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales. Heures de France.
- J **Rahimi H, Dastmalchi Saei H, et Ahmadi M. 2015.** Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Frequency and Antibiotic Resistance in Healthy Ruminants. *Jundishapur J Microbiol* ; 8(10): e22413.
- J **Renai D, Hettak L. 2018.** Contribution à l'étude du portage du *Staphylococcus aureus* chez le bovin et la volaille. Mémoire de master sciences biologiques. Université Mouloud Mammerie Tizi Ouzou Algérie.
- J **Schaechter M, Medoff G. 1999.** Microbiologie et pathologie infectieuse. Barry I. Eisenstein, France.
- J **Schlievert P.M, Strandberg K. L, Lin Y. C, Peterson M.L, Donald Y. et Leung M. 2010.** Secreted Virulence Factor Comparison Between Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*, and its Relevance to Atopic Dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 125(1).
- J **Smith TL, Jarvis WR. 1999.** Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and infection*. Elsevier SAS, Paris, p 795-805.
- J **Sollid JUE, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. 2013.** *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 531–541.
- J **Speck PG, et Wormald PJ. 2018.** Is phage therapy suitable for treating chronic sinusitis *Staphylococcus aureus* infection? *future microbiology*, 13(6), 605-608.

Références bibliographiques

- J **Sridharan U et Ponnuraj K. 2016.** Isopeptide bond in collagen- and fibrinogen-binding MSCRAMMs. *Biophys Rev*, 8 : 75-83.
- J **Tam K et Torres VJ. 2019.** *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins & Extracellular Enzymes, *Microbiol Spectr*, 7(2).
- J **Tankovic J, Aubry-Damon H, Leclercq R. 1997.** Résistance aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. *Méd Mal Infect*, 27, Spécial : 207-16.
- J **Titouche Y, Hakem A, Houali K, Meheut T, Vingadassalon N, Ruiz-Ripa L, Salmi D, Chergui A, Chenouf N, Hennekinne J. A, Torres C, et Auvray F. 2019.** Emergence of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) ST80 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. *journal of dairy science*, 102 : 6876-6884.
- J **Titouche Y. 2018.** Risques de contamination microbienne du lait cru produit dans la wilaya de Tizi Ouzou : Caractérisation phénotypique et génotypique de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques. Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou. Algérie.

Annexes

Annexes 1 : 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
Chlorure de lithi.....	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 de l'eau courante et essuyer
- 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

Annexes

Émulsion de jaune d'œuf.....5mL

Bouillon cœur-cervelle (BHIB)

Extrait cœur- cervelle17g

Peptone pancréatique de gélatine.....10g

Na..... 5g

Phosphate disodique.....2.5g

Glucose.....2g

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15mn.
Pour l'obtention du milieu solide BHI, 20g d'agar bactériologique ont été additionné à 1L de bouillon BHIB lors de sa préparation.

Mueller 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 15mn.

Gélose à ADN

Hydrolysate tryptique de caséine.....20 g

ADN.....2 g

NaCl.....5 g

Gélose.....12 g

Eau distillée.....1000 mL

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

Annexes

Bouillon Clark et Lubs

Peptone..... 5g

Glucose..... 5g

Hydrogénophosphate de potassium..... 5g

Eau distillée..... 100 mL

L'eau physiologique

Chlorure de sodium.....9g

Eau distillée1000mL

Annexes

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

Souche	Catalase	ADNase	Coagulase	Code
C1BVNasEL3 ech4	+	+	+	S434
BVNasEL4ech5C3	+	+	+	S435
BVNasEL3eh3C1	+	+	+	S437
C2BVNasEL3ech6	+	+	+	S438
BVNasEL3ech3C2	+	+	+	S439
BVNasEL4ech5C1	+	+	+	S440
C1BVNasEL3ech6	+	+	+	S441
BVNasEL4ech2C2	+	+	+	S442
C3BVNasEL4ech2	+	+	+	S444
BVNasEL4eleveurC3	+	+	+	S445
BVNasEL4ech2C1	+	+	+	S446
BVNasEL3eleveurC1	+	+	+	S448
BVNasEL4eleveurC2	+	+	+	S450
BVNasEL3ech3C1	+	+	+	S451
BVNasEL3eleveurC3	+	+	+	S455
BVNasEL4ech1C3	+	+	+	S456
BVNasEL4ech1C1	+	+	+	S457
BVNasEL4eleveurC1	+	+	+	S458
BVNasEL3eleveurC2	+	+	+	S459
BVNasEL4ech2C2	+	+	+	S460
BVNasEL3ech7C1	+	+	+	S461
BVNasEL4ech10C3	+	+	+	S462
BVNasEL4ech1C2	+	+	+	S466
BVlaitEL3C4	+	+	+	S429
BVlaitEL3C3	+	+	+	S430
BVlaitEL3C5	+	+	+	S431
BVlaitEL3C2	+	+	+	S432
BVlaitEL3C1	+	+	+	S433
BVNasEL3ech4C3	+	+	+	S464

+ : Positif, BV : Bovin, EL : Elevage, ech : échantillon, C : Colonie, Nas : Nasal

Annexes

Annexe 3 : Tableau I : Résultats de l'antibiogramme des souches de *S. aureus* isolées.

ATB souche	P	FOX	C	CN	E	TE	SXT	OFX	N
S429	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S430	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S431	R	S	S	S	I	I	S	S	S
S432	R	R	S	S	S	I	S	S	S
S433	R	S	S	S	S	I	S	S	S
S445	R	S	S	S	I	S	S	S	S
S448	R	S	S	S	R	S	S	S	S
S450	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S455	R	S	S	S	R	S	S	S	S
S458	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S459	R	S	S	S	R	S	S	S	S
S434	R	S	S	S	R	S	S	S	S
S435	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S437	R	S	S	S	S	I	S	S	S
S438	R	S	S	S	S	I	S	S	S
S439	R	S	S	S	S	I	S	S	S
S440	S	S	S	S	I	S	S	S	S
S441	R	S	S	S	S	I	S	S	S
S442	S	S	S	S	I	S	S	S	S
S444	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S451	R	S	S	S	S	I	S	S	S
S456	R	S	S	S	R	S	S	S	S
S457	R	R	S	S	R	S	S	S	S
S460	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S461	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S462	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S464	R	S	S	S	R	S	S	S	S
S466	R	S	S	S	R	S	S	S	S

S : Sensible, R : Résistant, I : Intermédiaire.

Annexes

Tableau II : Antibiogramme des souches de *S. aureus* isolées et testées vis-à-vis de 09 molécules d'antibiotiques.

ATB / Souche	P	FOX	C	CN	E	TE	SXT	OFX	N
S429	15	30	29	21	27	26	30	26	19
S430	6	22	25	21	29	19	23	21	19
S431	6	24	25	22	18	15	27	27	19
S432	6	19	28	21	28	15	27	26	19
S433	15	31	30	23	27	15	29	26	19
S445	15	27	25	20	22	27	28	29	21
S448	14	28	27	18	6	25	29	29	18
S450	15	29	25	21	26	26	29	29	22
S455	16	34	27	21	6	30	33	31	20
S458	19	31	29	22	30	30	31	29	21
S459	14	28	26	19	6	25	28	29	19
S434	13	29	26	21	6	28	30	28	19
S435	39	23	27	21	29	28	30	26	19
S437	13	27	27	19	27	15	31	27	19
S438	14	29	25	20	26	17	29	28	19
S439	18	28	27	21	25	18	31	29	19
S440	42	27	24	19	21	27	29	28	19
S441	12	27	25	20	29	16	31	27	19
S442	40	26	25	21	22	25	29	20	19
S444	39	26	26	19	30	25	29	25	19
S451	15	28	28	19	23	16	29	28	18
S456	17	29	31	21	6	29	30	29	19
S457	6	21	25	22	12	30	32	30	22
S460	36	25	26	19	23	25	30	25	19
S461	21	29	26	21	24	28	28	30	19
S462	17	28	27	22	25	27	31	29	20
S464	15	28	28	22	6	26	30	29	19
S466	17	29	27	20	6	30	29	29	19

Annexes

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

Famille	Antibiotique	Diamètre critique			Références
		Sensible	Intermédiaire	Résistant	
-lactamines	Pénicilline G	29	-	28	CLSI 2018
	Céfoxitine	22	-	< 22	CASFM 2019
Aminoglycosides	Gentamicine	15	13-14	12	CLSI 2018
	Néomycine	18	-	< 18	CASFM 2018
Macrolides	Erythromycine	23	14-22	13	CLSI 2018
Tétracyclines	Tétracycline	19	15-18	14	CLSI 2018
Quinolones	Ofloxacine	18	15-17	14	CLSI 2018
Phénicol	Chloramphénicol	18	13-17	12	CLSI 2018
Inhibiteurs de synthèse de l'acide folique	Triméthoprim- Sulfaméthoxazole	16	11-15	10	CLSI 2018

Résumé

Staphylococcus aureus est une bactérie commensale de la flore cutanéomuqueuse de l'homme. En raison de sa virulence et sa résistance aux antibiotiques habituels, cette bactérie a une grande importance dans la pathologie humaine et animale.

L'objectif de notre étude est d'estimer le portage nasal de *Staphylococcus aureus* chez le bovin laitier. Pour cela, des prélèvements nasaux chez des vaches laitières ont été réalisés à travers sept élevages situés dans quatre régions de la wilaya de Tizi Ouzou. En parallèle, des échantillons du lait de mélange et des prélèvements nasaux des éleveurs ont été recueillis.

L'isolement des souches a été réalisé sur de la gélose Baird Parker, suivi d'une identification biochimique des isolats. La résistance aux antibiotiques a été testée selon la méthode de diffusion des disques sur de la gélose Mueller Hinton et en suivant les recommandations du CLSI(2018) et CASFM(2019).

Au total, 28 souches de *S. aureus* ont été isolées. L'étude de leurs résistances aux antibiotiques révèle une forte résistance vis-à-vis la pénicilline G, avec un taux de 82.14%. Une résistance relativement faible vis-à-vis l'érythromycine a été observée. Deux souches SARM ont été isolées.

Les résultats obtenus de cette étude révèlent le danger associé à la présence des SARM chez le bovin laitier. Ainsi l'installation d'un protocole de biosécurité et des bonnes pratiques d'hygiène, permet d'éviter la propagation des SARM au niveau des élevages et tout le long de la chaîne de production.

Mots clés : *S. aureus*, portage nasal, résistance aux antibiotiques, SARM, élevages laitiers, bovin...

Summary

Staphylococcus aureus is a commensal bacterium of the cutaneous mucous flora of humans. Due to its virulence and resistance to common antibiotics, this bacterium is of great importance in human and animal pathology.

The objective of our study is to estimate the nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. To do this, nasal samples were taken from dairy cows through seven farms located in four regions of the wilaya of Tizi Ouzou. In parallel, samples of the blended milk and nasal swabs from the breeders were collected.

Isolation of the strains was performed on Baird Parker agar, followed by biochemical identification of the isolates. Antibiotic resistance was tested using the Mueller Hinton agar disc diffusion method and following the recommendations of CLSI (2018) and CASFM (2019).

A total of 28 strains of *S. aureus* were isolated. The study of their resistance to antibiotics reveals a strong resistance to penicillin G, with a rate of 82.14%. Relatively low resistance to erythromycin has been observed. Two MRSA strains were isolated.

The results obtained from this study reveal the danger associated with the presence of MRSA in dairy cattle. Thus, installing a biosecurity protocol and good hygiene practices helps prevent the spread of MRSA on farms and all along the production chain.

Key words: S. aureus, nasal carriage, antibiotic resistance, MRSA, dairy farms, bovine...

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre 1

Aperçu général sur le *Staphylococcus aureus*

Chapitre 2

Pathogénicité et virulence du *Staphylococcus aureus*

Chapitre 3

L'antibiorésistance chez le *Staphylococcus aureus*

Partie expérimentale

Chapitre 1

Matériels et méthodes

Chapitre 2

Résultats et discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes
