

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE TLEMCCEN

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE A L'AGROALIMENTAIRE, AU BIOMEDICAL ET A L'ENVIRONNEMENT
(LAMAABE)

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN BIOLOGIE
Option Microbiologie

Présentée par
Mr Sid Ahmed REBIAHI

Thème :

**CARACTERISATION DE SOUCHES DE
Staphylococcus aureus ET ETUDE DE
LEUR ANTIBIORESISTANCE AU NIVEAU DU
CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE
TLEMCCEN**

Soutenue le :

Devant la commission d'examen :

Pr. B. MOUSSA BOUDJEMAA	Professeur	Président	Université de Tlemcen
Pr. Dj. ABDELOUAHID	Professeur	Directeur de thèse	Université de Tlemcen
Pr. M. KIHAL	Professeur	Examinateur	Université d'Es-Senia Oran
Dr. H. HASSAINE	Maitre de conférences	Examinatrice	Université de Tlemcen
Dr. JL. AYMERIC	Maitre de conférences	Examinateur	Université Montpellier 2

2011-2012

Remerciements

*Mes plus vifs remerciements vont à
Monsieur D.J. ABDELOUAHID, Professeur à l'université de Tlemcen. Sa gentillesse, sa
disponibilité dans les moments difficiles, et ses conseils judicieux ont été pour moi l'unique
repère, puisse-t-il trouver dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude.*

*Je témoigne ma reconnaissance à
Mr B. MOUSSA BOUDJEMAA, Professeur à l'université de Tlemcen, pour l'honneur
qu'il nous fait de présider le jury.*

*Je remercie vivement
Mr M. KIHAL, Professeur à l'université d'Es-Senia, Oran, pour avoir accepté de juger ce
travail.*

*Je remercie profondément
Mme H. HASSAINE, Maitre de conférences à l'université de Tlemcen pour avoir accepté
d'examiner ce travail. Ses encouragements et sa confiance m'ont permis d'avancer dans ce
travail.*

*Un grand hommage à
Mr J.L. AYMERIC, Maitre de conférences à l'université de Montpellier 2, pour avoir
accepté en toute modestie d'examiner ce travail, et pour son aide logistique dans la partie
du travail réalisé en France.*

*Je remercie énormément
Mr Morad ARIBI, Maitre de conférences à l'université de Tlemcen, pour son aide et son
soutien, je te serai toujours redevable.*

*Hommages respectueux à
Mr Gérard LEFRANC, Professeur à l'université de Montpellier 2, pour sa simplicité et son
amitié.*

*Un grand merci au
Docteur Patrick Curmi, directeur de recherche INSERM, Université Evry-val-d'Essonne,
pour sa confiance, sa perspicacité, et son dévouement à la science.*

*Je remercie vivement Dr Z. Boucherit, Maitre de conférences à l'université de Tlemcen, qui
a mis à notre disposition tous les équipements de son laboratoire.*

*Je remercie spécialement Mr Salah-Eddine ARIF, et Mr le Professeur Flavio Toma pour
leur contribution à une réelle coopération entre l'Université d'Evry et celle de Tlemcen.*

Abréviations

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie.

spa : gène de la protéine A.

agr : accessory gene regulator.

SCCmec : staphylococcal chromosomal cassette.

TSST-1 : toxine du choc toxique staphylococcique.

PVL : leucocidine de Panton Valentine.

SCN : Staphylocoques à coagulase négative.

PLP : protéines liant les pénicillines.

Mec A : gène de résistance à la méticilline.

Van : gène de résistance à la vancomycine.

bla Z : gène de résistance aux β -lactamines.

ADN : acide désoxyribonucléique.

PCR : *polymerase chain reaction*.

pb : paires de base.

NNIS : *National Nosocomial Infection Surveillance*.

CLSI : *Clinical and Laboratory Standard Institute*.

NCCLS : *National comity for clinical laboratory institute*.

VISA : *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*.

SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine.

h-VISA: *heterogeneously resistant VRSA*.

VRSA : *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*.

VSSA : *vancomycin- susebtible Staphylococcus aureus*.

GRSA : *glycopeptide-resistant Staphylococcus aureus*.

GISA : *glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus*.

CDC: *center of disease control*.

CLIN: Comité de lute contre les infections nosocomiales.

OMS : organisation mondiale de la santé.

ISO : infection du site opératoire.

IN : infections nosocomiales.

TR : Taux résiduel.

ERG : Enterococcus résistant aux glycopeptides.

ERV : Enterococcus résistant à la vancomycine.

EDP : Enterococcus dépendant de la vancomycine.

LLR: low level resistance.

HLR: high level resistance.

Liste des tableaux

Tableau 1. Différents caractères bactériologiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	page 4
Tableau 2. Les maladies causées par les Staphylocoques	page 5
Tableau 3. Facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	page 10
Tableau 4. Caractéristiques des principaux clones de SARM isolés en France	page 18
Tableau 5. Oligonucléotides utilisés	page 22
Tableau 6. Les nouvelles recommandations de CLSI déclarées en 2006	page 25
Tableau 7. Concentrations critiques et critères interprétatifs de la résistance à la vancomycine des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	page 25
Tableau 8. Caractéristiques des patients présentant une infection nosocomiale causée par <i>Staphylococcus aureus</i> ayant une sensibilité intermédiaire à la vancomycine (SARIV)	page 28
Tableau 9. Les principales techniques de détection de <i>S. aureus</i> résistant à la vancomycine, recommandées par CLSI, CA-SFM, et CDC	page 33
Tableau 10. Enzymes inactivatrices des aminosides et phénotypes de résistance	page 36
Tableau 11. Calcul de l'incidence et de la prévalence	page 45
Tableau 12. Origine et caractéristiques des souches de références utilisées dans ce travail	page 47
Tableau 13. Schémas pour la préparation des solutions d'antibiotique	page 60
Tableau 14. Les différentes combinaisons testées	page 62
Tableau 15. Réactifs supplémentaires nécessaires	page 67
Tableau 16. Préparation d'un mix de digestion	page 69
Tableau 17. Propriétés des couples d'amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance à la vancomycine	page 71
Tableau 18. Préparation du mix pour l'amplification des quatre souches de références (témoins positif et négatif)	page 72
Tableau 19. Etapes du cycle de l'amplification	page 73

Tableau 20. Préparation du mix pour 15 tubes	page 74
Tableau 21. Phénotypes de résistance aux aminosides	page 89
Tableau 22. Distribution des concentrations minimales inhibitrices chez les SARM	page 98
Tableau 23. CMI et index FIC des différentes associations contre une souche résistante à la vancomycine (Sa1)	page 102
Tableau 24. Densités optiques des extraits d'ADN des souches testées	page 108

Liste des figures

Figure 1. Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique	page 4
Figure 2. Facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	page 7
Figure 3. Syndrome de la peau ébouillantée dû à l'épidermolysine A	page 8
Figure 4. Paroi de <i>S. aureus</i>, localisée à l'extérieur de la membrane cytoplasmique	page 12
Figure 5. Mécanisme de résistance de <i>S. aureus</i> à la méticilline par PLP2	page 20
Figure 6. Bases génétiques et biochimiques de la résistance de <i>S. aureus</i> à la méticilline	page 21
Figure 7. Algorithme pour le test de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à la Vancomycine selon le (CDC) (2010)	page 26
Figure 8. Comparaison de la paroi d'une cellule sensible et une autre résistante à la vancomycine	page 30
Figure 9. Épaississement de la paroi des souches VISA	page 31
Figure 10. Le phénomène de 'trapping' des souches VISA	page 31
Figure 11. Répartition des infections nosocomiales validées en fonction du site	page 42
Figure 12. Organigramme de l'identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	page 49
Figure 13. Marqueur 1 Kb (1), et 100pb (2) (<i>Invitrogen</i>)	page 70
Figure 14. Schéma représentatif du programme de la PCR réalisée	page 75
Figure 15. Distribution de l'infection du site opératoire selon le sexe dans le service de chirurgie	page 77
Figure 16. Représentation graphique de la durée d'hospitalisation des patients infectés par <i>Staphylococcus aureus</i>	page 78
Figure 17. Répartition des infections nosocomiales (ISO) dues à <i>S. aureus</i> dans le service de chirurgie selon l'âge	page 80

Figure 18. Les types d'antibiothérapie utilisés pour le traitement des patients infectés	page 81
Figure 19. Pourcentage de <i>Staphylococcus aureus</i> au service de Chirurgie	page 83
Figure 20. Distribution des biotypes chez les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées du service de chirurgie	page 83
Figure 21. Pourcentage de résistance aux antibiotiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	page 86
Figure 22. Représentation de l'état de multirésistance des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	page 97
Figure 23. Résultat de l'association Gentamycine-Vancomycine	page 104
Figure 24. Résultat de l'association Imipènème-Vancomycine	page 105
Figure 25. Gel d'électrophorese des extraits d'ADN des quatre souches de référence (controle positif et controle negatif)	page 107
Figure 26. Digestion des extraits d'ADN de dix souches de <i>Staphylococcus aureus</i> par l'enzyme de restriction KpnI	page 109
Figure 27. Résultat de l'optimisation de l'amplification des souches de références	page 109
Figure 28. Révélation du gène <i>vanA</i> par l'amplification chez les souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	page 110
Figure 29. Mécanisme de résistance des souches VRSA	page 111
Figure 30. Représentation schématique du transfert du transposon Tn1546 provenant d'une souche d'<i>Enterococcus</i> spp. Vers <i>Staphylococcus aureus</i>	page 113
Figure 31. Représentation schématique permettant la comparaison entre les éléments Tn1546 chez les IRL-VRSA et les HLR-VRSA	page 115

SOMMAIRE

Introduction	1
Etude bibliographique	3
Généralités sur Staphylococcus aureus	3
1.1. Historique et nomenclature	3
1.2. Taxonomie	3
1.3. Caractères bactériologiques	3
1.4. Les maladies causées par les Staphylocoques	5
1.5. Facteurs de virulence	6
1.5.1. Les toxines formant des pores (ou pore-forming toxins PFTs)	6
1.5.2. Les toxines à activité protéolytique	7
1.5.3. Les superantigènes	9
1.5.3.1. Le syndrome du choc osmotique	9
1.5.3.2. L'intoxication alimentaire	9
1.5.3.3. La maladie de Kawasaki	9
1.5.3.4. La dermatite atopique	9
1.5.4. Facteurs Structuraux	12
1.5.5. Les adhésines	13
1.5.6. Exoprotéines enzymatiques et toxiques	13
1.5.7. Facteurs de persistance	13
1.5.7.1. Le Biofilm	13
1.5.7.2. Variant microcolonies (SCVs)	14
1.5.7.3. Les enzymes	14
1.6. Pouvoir pathogène	15
1.6.1. Habitat et colonisation	15
1.6.2. Colonisation et l'infection	15
2. Résistance aux antibiotiques	
2.1. La résistance naturelle	16
2.2. La résistance acquise	16
2.3. Résistance à la méticilline	16
2.4. Mécanismes de résistance à la méticilline	18
2.5. Support de résistance	20
2.6. Détection de la résistance à la méticilline	22
2.6.1. Gènes de résistance utiles pour la détection de l'antibiorésistance	22
2.6.2. Les souches séquencées de S. aureus	23
2.7. Résistance de Staphylococcus aureus à la vancomycine	24
2.7.1. Définitions	24
2.7.2. Staphylococcus aureus ayant une résistance intermédiaire à la vancomycine	27
2.7.3. Staphylococcus aureus résistant à la vancomycine	27
2.7.4. Staphylococcus aureus ayant une résistance hétérogène à la vancomycine	29

2.7.5. Le mécanisme de résistance	29
2.8. Méthodes de détection et de détermination de la sensibilité aux glycopeptides	32
2.8.1.2. Analyse des populations	34
2.8.2. Les méthodes génétiques	34
2.8.2.1. PFGE	34
2.8.2.2. RAPD	34
2.8.2.3. PCR multiplex	35
2.9. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux aminoglycosides	35
2.10. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux MLST	37
2.11. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à la Rifampicine	38
2.12. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à la Fosfomycine	39
3. Les infections nosocomiales	39
3.1. Définitions des infections nosocomiales	40
3.2. Epidémiologie	40
3.3. Les différents types d'infections nosocomiales	40
3.3.1. Infections urinaires	40
3.3.2. Infections respiratoires	41
3.3.3. Infections du site opératoire	41
3.3.4. Bactériémies nosocomiales primaire et secondaire	41
3.3.5. Les autres localisations infectieuses	42
3.4. Les services à risques	42
3.5. Incidence et prévalence	43
3.5.1. La prévalence	43
3.5.2. L'incidence	44
3.5.3. Relation entre incidence et prévalence	44
3.5.4. L'analyse des données	44
Matériels et méthodes	47
1. Matériels	47
1.1. Matériels biologiques	47
2. Méthodes	48
2.1. Prélèvement réalisés en chirurgie	48
3. Isolement et purification	50
4. Identification	50
4.1. Recherche de la catalase	50
4.2. Recherche de la coagulase	51
4.3. Recherche de la DNase (Désoxyribonucléase)	52
4.4. Identification par plaque API STAPH	53
5. Analyse statistique	54
6. Antibiogramme	54
6.1. Principe	54
6.2. Technique	54
6.3. Lecture et interprétation	55
7. Test iodométrique	55
8. Recherche de la résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à la méticilline	56
9. Recherche de la résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à la vancomycine	57
10. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	58
10.1. Technique de dilution sur milieu gélosé	58
10.2. Détermination de la CMI sur microplaque	61

11. Etude des associations d'antibiotiques par la technique d'échiquier	62
12. Extraction de l'ADN génomique	64
12.1 Protocole du Kit NucleoSpin ® tissue	64
12.2 Protocole du kit DNeasy Tissue (QIAGEN)	68
13. Dosage de l'ADN	68
14. Digestion enzymatique	68
15. Recherche et amplification du gène de résistance à la vancomycine vanA	70
15.1 Electrophorèse des souches de références	70
15.2. Amplification du gène vanA des souches de références	71
15.3. Recherche du gène vanA chez les souches de Staphylococcus aureus	74
Résultats et Discussion	76
1. Epidémiologie	76
2. Identification	82
3. Antibiogramme	84
3.1. Les bêta-lactamines	85
3.2. Les aminosides	87
3.3. Clindamycine	89
3.4. Erythromycine	90
3.5. Rifampicine	90
3.6. Fosfomycine	90
3.7. La Vancomycine	91
4. Concentration minimales inhibitrices (CMI)	98
5. Associations d'antibiotiques	102
6. Détection du gène vanA	107
Conclusion	116
Références bibliographiques	118
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

Les infections acquises à l'hôpital sont une réalité préoccupante surtout dans des services à haut risque tels que le service de chirurgie, qui recrute des patients extrêmement vulnérables à la colonisation et par conséquent à l'infection. Ces infections sont souvent la résultante d'un certain nombre de facteurs tels que les pratiques de soins, la flore liée au patient ou encore l'environnement. Parmi les micro-organismes les plus incriminés dans ces infections, *Staphylococcus aureus* occupe une place privilégiée. Son pouvoir pathogène, son caractère ubiquiste et l'absence d'exigences nutritionnelles font de cette bactérie un exemple d'adaptation et de dissémination surtout lors des ruptures de la barrière cutanée, ou l'immaturation du système immunitaire.

Cette situation semble se compliquer par l'émergence et la progression du phénomène de résistance aux antibiotiques qui place les cliniciens dans une impasse, face à des germes réfractaires à tous types de traitement limitant à la fois les schémas thérapeutiques aggravant le pronostic des malades et prolongeant leur durée de séjour. Ces résistances aux antibiotiques apparaissent plus ou moins rapidement selon la plasticité génétique de la bactérie et la nature chimique de ces molécules. Cette adaptation a touché également l'aptitude de résister à plusieurs molécules d'antibiotiques telles que la méticilline, et qui s'étend à la résistance envers la majorité des β -lactamines pour atteindre la vancomycine considérée jusqu'à présent comme l'une des dernières lignes de défense.

L'utilisation extensive et fréquemment abusive des antibiotiques couplée à un déséquilibre dans l'hygiène hospitalière, permet à ces infections une évolution fulgurante traduisant ainsi plusieurs épidémies. Ce phénomène décrit comme une valse mondiale, ne semble pas épargner l'Algérie qui enregistre une fréquence grandissante de SARM. Ce qui engendre un taux de mortalité élevé et un surcoût tout aussi important.

Ainsi, pour contrôler cette évolution et tenter de prévenir ces complications, l'objectif de notre travail a été axé sur la caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* isolées du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Algérie). Ces données pourront permettre la compréhension du phénomène de résistance et surtout ses spécificités dans le service de chirurgie.

Il s'agit de déterminer les profils et les niveaux de résistance de *Staphylococcus aureus*, un intérêt particulier a été porté à la recherche de résistance vis-à-vis de la vancomycine.

Le point de départ de ce travail a été de réaliser une enquête épidémiologique, d'évaluer l'incidence et la prévalence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), pour entamer dans une seconde étape la mise en évidence de la multirésistance, tout en mettant l'accent sur certains facteurs de risques ayant un impact sur ces infections. Ainsi, il nous a paru nécessaire d'approfondir les connaissances relatives aux mécanismes biochimiques de cette résistance tout en essayant d'explorer un support génétique pouvant être à l'origine du phénomène.

CHAPITRE 1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur *Staphylococcus aureus*

1.1. Historique et nomenclature

Les staphylocoques ont été identifiés dès l'aube de l'ère pasteurienne par Pasteur lui-même, Ogston et Rosenbach, et n'ont jamais cessé de susciter des recherches tant leur importance est grande en pathologie. Ce sont en effet des bactéries qui peuvent être d'inoffensifs commensaux ou provoquer des infections d'une extrême gravité ; celles-ci peuvent se présenter sous la forme de cas isolés, de petites épidémies familiales ou de graves épidémies dans les collectivités [1].

1.2 Taxonomie

Selon la 9^{ème} édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en GC, dans le phylum des firmicutes ;

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus* [2]

1.3. Caractères bactériologiques

Staphylococcus aureus est un germe appartenant au groupe des cocci à Gram positif qui pousse en amas. Cette bactéries non productrice de spores mais résistante, peut survivre longtemps sur des objets inanimés et secs, elle résiste aussi relativement bien à la chaleur (Figure 1) (Tableau1) [3].

Tableau 1. Différents caractères bactériologiques de *Staphylococcus aureus* [2]

Morphologie	Regroupé en paire, tétrade ou amas réguliers Immobilisé ; non sporulé
Dimension (µm)	0,5-1
Teneur en GC (mol%)	33%
Taille du génome (Mb)	2,8 - 2,9
Type respiratoire	Aéro anaérobie facultatif
Type trophique	chimioorganotrophe
Métabolisme	Fermentaire et /ou respiratoire
Autres caractères	Catalase positive – oxydase négative Halophile – mésophile (37°C) et psychrophile (6-12°C) Neutrophile pH_{opt}=7 ; pH_m ; Aw : basse, jusqu'à 0,83

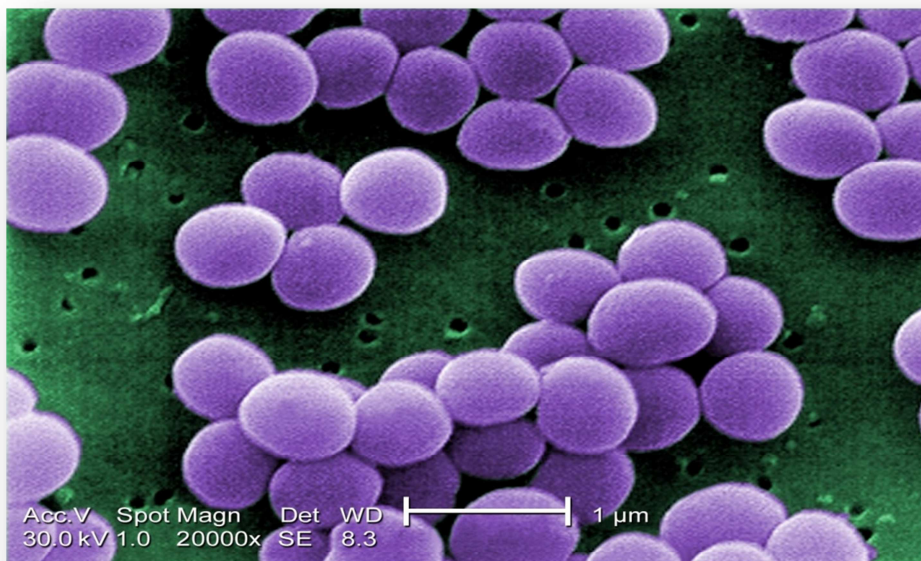


Figure1 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)

<http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/> [4]

1.4. Les maladies causées par les Staphylocoques:

Staphylococcus aureus, parmi les autres pathogènes de l'homme, est celui qui est responsable de la plus grande variété de maladies (tableau 2) [3].

Tableau 2 : Les maladies causées par les Staphylocoques [3].

Infections de la peau et des tissus mous

Furoncles, abcès

Infections des plaies (traumatiques, chirurgicales)

Cellulite

Impétigo (aussi causé par les Streptocoques)

Bactériémies (souvent avec des abcès métastatiques)

Endocardites

Infection du système nerveux central

Abcès du cerveau

Méningite-rare

Abcès épidural

Infections pulmonaires

Embolie

Aspiration

Muscles et squelette

Ostéomyélite

Arthrite

Tractus génito-urinaire

Abcès rénal

Infection du tractus urinaire inférieur

Maladies provoquées par des toxines

Syndrome du choc toxique

Intoxications alimentaires (gastroentérites)

1.5 Facteurs de virulence (tableau 3) :

Cette bactérie est solidement armée pour effacer un certain nombre de défenses que son hôte pourrait lui opposer (anticorps, phagocytose ou cytotoxicité), ces parades se distribuent en plusieurs groupes de toxines. La pathogénicité de *S. aureus* est surtout reliée à l'expression de facteurs de virulence. En plus de facteurs structuraux, il a en effet la capacité de sécréter, après invasion, des facteurs d'adhésion, des toxines ou encore des enzymes (**figure 2**). Quelques exemples de ces facteurs sont résumés dans le tableau 3. Les Staphylocoques résistants à la méticilline ne sont pas nécessairement plus virulents que ceux qui sont sensibles, certains facteurs permettent aux *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'amplifier leur virulence et d'exprimer différents syndromes [5].

1.5.1 Les toxines formant des pores (ou pore-forming toxins PFTs) :

Ces toxines cytolitiques ont la capacité de détruire les cellules de défense de l'hôte en formant des pores au niveau des membranes cellulaires [7]. Les PFTs sont souvent sécrétées sous forme de monomères, leur caractéristique commune est la sécrétion par la bactérie sous forme de protéines libres hydrosolubles [8].

En fonction des PFTs, des facteurs lipidiques ou protéiques interviennent ensuite pour permettre l'interaction de ces toxines avec les membranes de leurs cibles cellulaires [9].

Deux grands groupes de PFTs se sont distingués en fonction de leur structure tridimensionnelle :

- Les alpha-PFTs : dont la structure secondaire est formée d'une simple hélice alpha hydrophobe.
- Les bêta-PFTs ou leucotoxines : où le pore est constitué majoritairement de brins bêta s'assemblant en tonneaux bêta, Les leucocidines par opposition aux hémolysines ont pour cible les polynucléaires, les monocytes et les macrophages. Deux protéines sont importantes : LukE-LukD et la Leucocidine de Panton Valentine (LPV) composée de Luke S-PV et Luke F-PV dont le gène est codé par un phage [9].

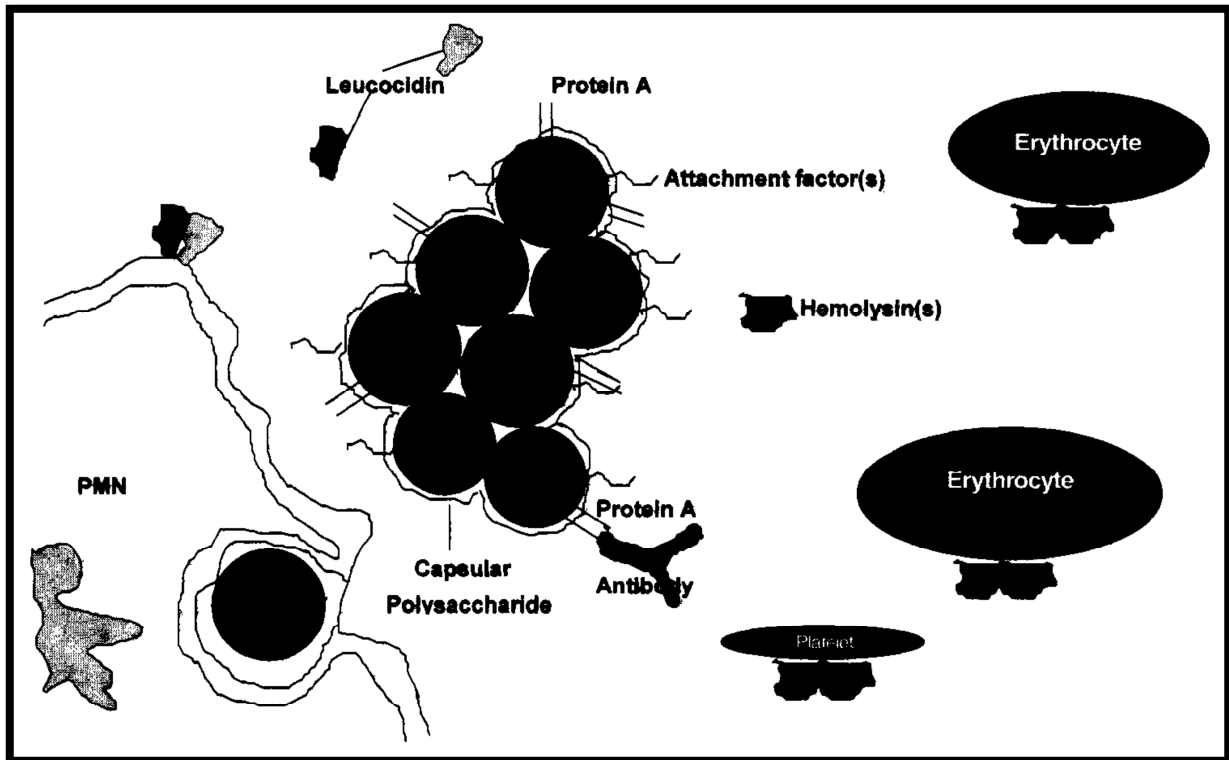


Figure 2: Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* [6]

1.5.2 . Les toxines à activité protéolytique :

Les épidermolysines : Elles font parties des protéases à sérine active, *S. aureus* sécrète la sérine protéase V8 qui clive spécifiquement la liaison peptidique des résidus aspartate et glutamate.

Ces protéases à sérine hydrolysent les protéines dont la cible majeure est la desmogléine-1, une protéine desmosomale du stratum granulosum de l'épiderme, expliquant ainsi le décollement observé lors de l'impétigo du jeune enfant dans le syndrome de la peau ébouillantée ou lors d'impétigo bulleux (figure 3) [9].



Figure 3 : Syndrome de la peau ébouillantée dû à l'épidermolysine A [9]

L'épidermolysine atteint la zone du stratum granulosum, par diffusion à travers les capillaires du derme, induisant une perte d'adhérence cellulaire entre les zones de l'épithélium kératinisé engendrant un décollement intra-épidermique [10].

Actuellement, quatre épidermolysines isoformes ont été caractérisées (A, B, C, D), les gènes codant pour ces toxines Eta, Etb, Etc, et Etd ont été également caractérisés ; le gène codant l'épidermolysine A est porté par un bactériophage, tandis que celui de l'épidermolysine B est à transmission plasmidique [9].

Autres protéases :

- les Staphopaines A et B, sont des protéases à cystéines.
- Les métalloprotéases comme l'auréolysine qui pourrait avoir plusieurs rôles en complément de la coagulase, elle détruit les inhibiteurs de protéases participant ainsi à la formation de thrombus [9].

Les inhibiteurs de protéases :

La « *chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus* » ou CHIPS, est produite par 60% des isolats cliniques. Elle agit par inhibition du chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes et bloque la voie du complément, limitant ainsi le recrutement des polynucléaires neutrophiles au site de l'infection, en se fixant sur l'extrémité N-terminale de l'anaphylatoxine C57 du complément ainsi qu'au récepteur du formyl-méthionine-leucine-phénylalanine [9].

1.5.3. Les superantigènes :

En situation normale les lymphocytes T4 (LT4) reconnaissent les antigènes présentés à la surface d'une membrane cellulaire présentatrice d'antigène via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, puis forment un complexe tri-moléculaire activant la cascade des LT4 (complexe TCR des LT4+antigène+CMH II). Un super antigène est une protéine bactérienne capable d'activer le CMH du macrophage et la chaîne V-béata du récepteur des LT4 (TCR).

Le *S. aureus* est capable de produire plus d'une trentaine de superantigènes, comprenant entre autres des entérotoxines. Cette interaction entre le super antigène et le domaine Vbéta du LT4 ne permet plus une réponse spécifique, et est à l'origine de l'expansion de mille fois plus de LT4, responsable de la stimulation massive et indistincte du système immunitaire. Des cytokines (TNF α , IL-1) sont ainsi produites en trop grande quantité, induisant une réponse inflammatoire incontrôlée pouvant aboutir à un état de choc vasoplégique [11].

1.5.3.1. Le syndrome du choc osmotique :

Il est souvent associé à des toxines (TSST-1, Entérotoxine B et C), le choc toxique staphylococcique peut succéder à une infection suppurative chez un enfant, ou toucher un adulte présentant une infection post opératoire ou bien apparaître chez une femme en période menstruelle.

1.5.3.2. L'intoxication alimentaire :

Provoquée par l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques thermostables qui résistent aux enzymes du tube digestif.

1.5.3.3. La maladie de Kawazaki :

Ou syndrome lympho-cutanéomuqueux, c'est une vascularité infantile des artères de moyen et petit calibre, la production de superantigènes staphylococciques à la phase aigue, a été incriminée dans la genèse de la maladie de Kawazaki [9].

1.5.3.4. La dermatite atopique :

La suppression de l'immunité innée observée au niveau de la peau explique la colonisation cutanée par *S. aureus* [9].

Tableau 3. Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* [12]

	Facteurs	Gènes	fonctions
Constituants de la paroi cellulaire	Clumping factor A	<i>clfA</i>	Adhésion au fibrinogène
	Clumping factor B	<i>clfB</i>	Adhésion au fibrinogène
	Coagulase	<i>coa</i>	Liaison au fibrinogène
	Protéine Fib A	<i>fibA</i>	Liaison au fibrinogène
	Fibronéctine liée à la protéine A	<i>fnbA</i>	Attachement à la fibronéctine
	Fibronéctine liée à la protéine B	<i>fnbB</i>	Attachement à la fibronéctine
	Collagène lié à la protéine	<i>cna</i>	Adhésion au collagène
	Elastine liée à la protéine	<i>ebps</i>	Liaison à l'élastine
	Protéine analogue MHC	<i>map ou eap</i>	Liaison à la protéine de la matrice extracellulaire (incluant fibronéctine, fibrinogène vitronectine, sialoprotéine osseuse et thrombospondine)
	Adhésine intracellulaire Polysaccharidique	<i>pia</i>	adhésion intracellulaire et formation de biofilm
	Protéine A	<i>spa</i>	invasion possible des défenses de l'hôte
	Polysaccharides capsulaires (types 1, 5 et 8)	<i>cap</i>	Molécule Anti-phagocytose
	Entérotoxines A-E, H	<i>sea-e, h</i>	Invasion des défenses de l'hôte avec des superantigènes, responsables des diarrhées associées à la nourriture
	Syndrome du choc Toxique toxine-1	<i>tst</i>	Invasion des défenses de l'hôte avec des superantigènes responsables de TSS

Toxines et enzymes extracellulaires	Toxine exfoliative A, B	<i>eta, etb</i>	Invasion des défenses de l'hôte, agents responsables du syndrome de la peau ébouillante
	Lipase	<i>geh</i>	Invasion des défenses de l'hôte
	Protease V8	<i>Sas P ou ssp</i>	Invasion des tissus et modification des protéines de surface
	Leucocidine de Panton-Valentine	<i>lukF, lukS</i>	Invasion des défenses de l'hôte, lyse des phagocytes de l'hôte
	Staphylokinase	<i>sak</i>	Invasion des défenses de l'hôte
	Hemolysine -a	<i>hla</i>	Invasion des Tissus, à partir des pores dans les membranes des cellules de l'hôte
	β-hemolysine	<i>hlb</i>	Tissue invasion, sphingomyelinase
	δ-hemolysine	<i>hld</i>	Potentialisation de la β-hemolysine
	γ-hemolysine	<i>Hla A, B, C</i>	Potentialisation de la lyse des cellules de l'hôte
	Phospholipase C	<i>plc</i>	Lyse cellulaire
	Elastase	<i>sepA</i>	Invasion des tissus
	Hyaluronidase	<i>hysA</i>	Invasion des tissus

1.5.4. Facteurs Structuraux

- **Le peptidoglycane** : joue un rôle dans l'activation du complément, stimule la sécrétion des cytokines par les macrophages ainsi que l'agrégation des plaquettes [13].
- **L'acide téichoïque** : il est lié au peptidoglycane (*Wall Teichoic Acid WTA*) ou bien à la membrane cytoplasmique (*lipoteichoic acid LTA*). Il assure trois rôles principaux ;
 - 1) La protection contre les antimicrobiens et le stress environnemental,
 - 2) Le contrôle de l'activité enzymatique et la concentration cationique de l'enveloppe,
 - 3) La liaison aux différents récepteurs et surfaces (figure 4) [14].

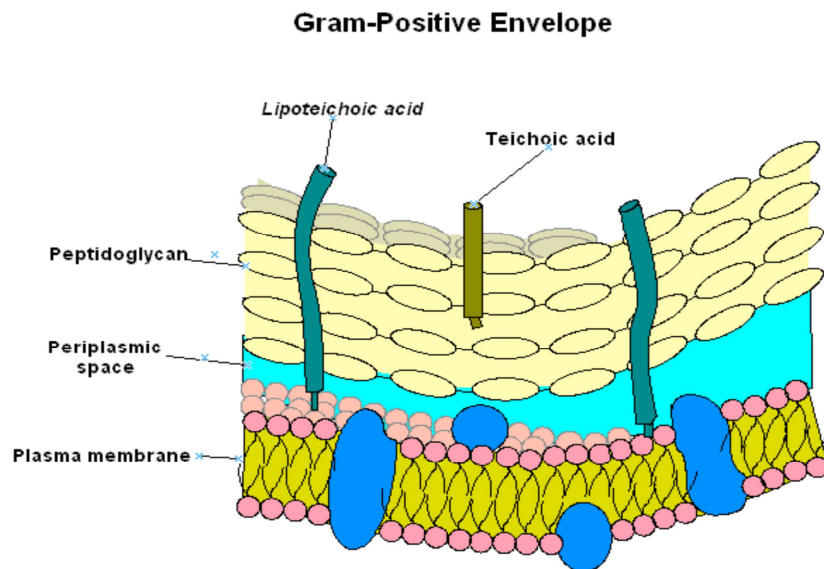


Figure 4 : Paroi de *S. aureus*, localisée à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, constitué majoritairement de peptidoglycane (en jaune) au sein duquel sont enchâssés les acides téichoïque et lipoteichoïques.

<http://www.conceptdraw.com/sampletour/medical/GramPositiveEnvelope.gif>

- **La capsule :**

Les polysaccharides capsulaires de *S. aureus* ont permis sa classification en 11 sérotypes. Les sérotypes 5 et 8 sont les principaux rencontrés en pathologie humaine [13] [15]. Ils inhibent la phagocytose [5] et peuvent induire la formation d'abcès [16].

1.5.5. Les adhésines

Ce sont des molécules impliquées dans l'adhésion, classées en deux groupes "*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*" ou (MSCRAMMs) et "*Secretable Expanded Repertoire Adhesive molecules*" ou (SERAMs) [17].

Les MSCRAMMs constituent une famille de plus de 20 membres qui reconnaissent les composants de la matrice extracellulaire (ECM). Les SERAMs forment un groupe de 5 adhésines, y compris, la protéine A liant le fibrinogène, la coagulase, protéine liant le fibrinogène extracellulaire, la protéine liant l'ECM et la protéine d'adhérence extracellulaire (Eap) [17].

1.5.6. Exoprotéines enzymatiques et toxiques

Durant l'infection, la production de différentes enzymes comme les protéases, les lipases, les élastases..., facilite la destruction des tissus, l'évasion à la défense de l'hôte, la dissémination systémique et les localisations métastatiques [5]. *S. aureus* sécrète de nombreuses toxines ayant pour objet de détourner ou de neutraliser la réponse immunitaire [9].

1.5.7. Facteurs de persistance

1.5.7.1. Le Biofilm

La formation d'un biofilm renforce l'adhésion aux matériaux et protège la bactérie des défenses immunitaires et de l'action des antimicrobiens [18]. Cette antibiorésistance est attribuée à la présence de matrice polysaccharidique, un taux de croissance lent, une hétérogénéité spatiale, ainsi qu'à des physiologies spécifiques, tolérantes ou résistantes [19], [20], [21].

1.5.7.2. Variant microcolonies (SCVs)

Ces microcolonies, désignées autrefois par “G” gonidiales, variantes et naines, constituent des sous populations de bactéries à croissance lente [22], survivants à des concentrations létales d’antibiotiques sans avoir pour autant un mécanisme de résistance spécifique [23]. Elles diffèrent du phénotype normal par la petite taille des colonies, un taux de croissance réduit et elles sont plus résistantes à l’action des aminoglycosides et des inhibiteurs de la paroi [24].

1.5.7.3. Les enzymes

- **Coagulase libre : la staphylocoagulase**, ou **coagulase libre**, c’est une protéine extracellulaire thermostable caractéristique de *S. aureus*, à l’exception de certaines souches staphylococciques d’origine animale telles que *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, et *Staphylococcus delphini* qui possèdent également la coagulase [25]. En l’absence de Ca^{2+} , elle provoque la coagulation du plasma humain ou du lapin (prélevé sur citrate, oxalate, héparine ou EDTA) [26].
- La coagulase forme avec la prothrombine (coagulase-reacting factor :CRF) du plasma, un complexe appelé **Staphylothrombine** qui converti le fibrinogène en fibrine [27]. C’est un facteur primordial dans le pouvoir pathogène en coagulant le plasma autour des coques et les protégeant de la phagocytose (les leucocytes ayant une mauvaise pénétration à l’intérieur des caillots de fibrine) [28]; elle est à l’origine des thrombophlébites suppurées [26].
- **Lipases** : Une des façons dans laquelle les cellules hôtes répondent à une infection est la production des acides gras et des lipides, qui forment des petits trous dans la membrane bactérienne, alors que *S. aureus* produit des enzymes appelées lipases qui détruisent ces acides gras avant de causer des dommages au niveau de la membrane bactérienne [28].
- **Hyaluronidase** : cette enzyme extracellulaire thermolabile hydrolyse l’acide hyaluronique, substance fondamentale de la matrice du tissu conjonctif, ce qui permet la diffusion tissulaire des *S. aureus* [29]. Cette enzyme est produite uniquement dans la phase exponentielle de croissance [30].
- **Staphylokinase** : la staphylokinase (SAK) est une glycoprotéine de 136 acides aminés sécrétée par certaines souches de *S. aureus* [31].

- La SAK facilite l'activation des plasminogène, les précurseurs de la protéase fibrinolytique plasmine [32]. Elle forme un complexe avec le plasminogène, qui converti ainsi en plasmine active, d'autres molécules de plasminogène ; dans le plasma, cette enzyme peut dissoudre des amas de fibrine sans pour autant y associer une dégradation du fibrinogène [33]. Cette substance thermolabile est antigénique et joue un rôle dans la formation d'embolies septiques [26].

1. 6. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène désigne l'ensemble des particularités d'un microorganisme lui permettant de coloniser, de se multiplier et de provoquer une maladie dans un organisme hôte [4].

1.6.1. Habitat et colonisation

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Ils peuvent également survivre sur des surfaces inanimées telles que la literie, les vêtements, et les poignées de portes [34].

Chez l'homme, les staphylocoques font partie de la flore résidante cutanée qui joue un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constitue une barrière contre l'implantation des bactéries de la flore transitoire [35]. Les fosses nasales antérieures constituent avec les zones humides de la peau comme les aisselles et le périnée, un site de portage préférentiel de cette bactérie [9]. La fréquence du portage cutané dépend du portage nasal [36]. La transmission interhumaine est le plus souvent manuportée [37]. ou même par les aérosols émis par des patients atteints de pneumopathie [34].

1.6.2. Colonisation et infection

La base de la colonisation de *S. aureus* est complexe et mal connue mais semble impliquée dans le contact de la bactérie avec son hôte ainsi que dans son aptitude d'adhésion et d'évasion aux défenses immunitaires. Les patients porteurs de *S. aureus* ont plus de risque de développer une infection que les autres [38]. Après l'introduction du germe dans l'organisme, le plus souvent après rupture de la barrière cutanée (blessures, cathéters, chirurgie, brûlures...) ou au niveau d'un follicule pileux [39]

L'infection peut évoluer différemment en fonction de nombreux paramètres liés à l'agent infectieux lui-même et à l'état de l'organisme infecté. La maladie infectieuse est définie comme un état morbide, qui résulte de la rupture d'équilibre entre les moyens de défense de l'organisme et les facteurs de pathogénicité (Tableau 3). Elle peut rester limitée au point de l'introduction du germe (abcès), ou bien atteindre les parties locorégionales, en empruntant les relais lymphatiques, ou enfin, il y a diffusion de l'agent infectieux dans tout l'organisme provoquant une infection généralisée [40].

2. Résistance aux antibiotiques

2.1 La résistance naturelle

La résistance naturelle d'une bactérie est une caractéristique propre à une espèce bactérienne, qui est partagée par toutes les souches normales de cette espèce. Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification, elle se traduit habituellement par des CMI supérieures à la valeur critique basse de concentration (c) de l'antibiotique concerné [41].

2.2 La résistance acquise

La résistance acquise est une caractéristique de certaines souches au sein de l'espèce considérée. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation ou par acquisition de matériel génétique étranger [42].

2.3 Résistance à la méticilline

Une souche est dite « résistante à la méticilline » lorsqu'elle présente une résistance aux pénicillines du groupe M, et par extension à toutes les β -lactamines. Elle se définit par une concentration minimale inhibitrice supérieure à 2 mg/l pour l'oxacilline, la pénicilline M de référence [43]. Les souches SARM sont le plus souvent résistantes à d'autres classes d'antibiotiques [44], elles sont considérées comme des bactéries multirésistantes, et la résistance à la méticilline est depuis lors utilisée, comme marqueur de multirésistance [45]. Bien qu'il n'existe pas de définitions de la multirésistance universellement acceptée, certains auteurs qualifient les microorganismes multirésistants par leur aptitude à résister à une ou plusieurs classes d'antibiotiques [46], d'autres requièrent pour cette multirésistance au moins trois molécules d'antibiotiques [47].

Etude Bibliographique

Les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont responsables d'environ 30 % des infections nosocomiales. Les SARM diffusent de façon épidémique et il existe un clone majoritaire français dont les caractéristiques moléculaires sont proches du clone V. D'autres clones de SARM hospitaliers peuvent être plus rarement isolés comme le clone ibérique correspondant aux souches résistantes à la gentamicine ou des souches proches du clone pédiatrique. Les SARM hospitaliers sont aussi responsables d'infections communautaires chez des patients ayant des facteurs de risque comme des antécédents d'hospitalisation [48].

Le développement des outils de biologie moléculaire a permis de réaliser des études d'épidémiologie globale (ou macro-épidémiologie), de donner des noms aux grands clones pandémiques de SARM et de montrer leur diffusion au niveau national et international [49] (Tableau 4).

L'appartenance d'une souche de SARM à un clone est démontrée en caractérisant la souche successivement par :

- Le séquençage de 7 gènes (en anglais, MLST pour *multilocus sequence typing*) [50].
- La caractérisation du nombre et de la structure des répétitions présentes dans la séquence codante de la protéine A de *S. aureus* (*spa typing*) [51].
- La caractérisation de la cassette contenant le gène de résistance *mec A* à la méticilline (*SCCmec* pour *staphylococcal chromosomal cassette*) [49], [52].
- Le type d'allèle *agr* de chacun des grands clones pandémiques [53].

Tableau 4 : Caractéristiques des principaux clones de SARM isolés en France [48].

Dénomination du clone	Souche de référence	Séquence type	Type spa	Type agr	Type de SCCmec	Gènes de la TSST-1	Gènes de la PVL	Clones détectés en France	Principales résistances aux ATB
Clone archaïque	Col	250	8	1	I	-	-	Non	
Clone ibérique	PER34	250	51	1	IA	-	-	Clone minoritaire Hospitalier Notamment Des souches GISA	Kanamycine Tobramycine Gentamicine ±Macrolides Quinolones
Clone pédiatrique	HDE268	5	311	2	IV	- (+ en France)	-	Clone minoritaire hospitalier et communautaire avec souvent le gène TSST-1	Kanamycine Tobramycine Tétracyclines Acide fusidique
Clone V	BK2529	8	64	1	IV	-	-	Clone majoritaire hospitalier	Kanamycine Gentamicine ±macrolides Quinolones
Clone PVL	H1 2002 0213	80	40	IV	-	-	+	Clone majoritaire communautaire	Kanamycine Tobramycine Acide fusidique

Abréviations : *spa* : gène de la protéine A ; *agr* : accessory gene regulator ; *SCCmec* : staphylococcal chromosomal cassette ; TSST-1 : toxine du choc toxique staphylococcique ; PVL : leucocidine de Panton Valentine.

2.4 Mécanismes de résistance à la méticilline

Les mécanismes et les gènes de résistance des staphylocoques dorés et des staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont les mêmes. En revanche, la fréquence des résistances diffère : elle est plus élevée pour les SCN, au moins ceux que l'on isole dans les infections humaines (*Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus haemolyticus*) [54].

Staphylococcus aureus a su progressivement s'adapter au développement de l'antibiothérapie en créant des mécanismes de résistance vis-à-vis de la plupart des produits [55].

La résistance à la méticilline chez les staphylocoques est principalement due à la présence du gène *mec A* présent dans une cassette *SCC mec* [56], c'est un élément génétique mobile intégré dans le chromosome. Ce gène code pour une transpeptidase appelée *PLP2a*, impliquée dans la synthèse du peptidoglycane et qui a une faible affinité pour la bêtalactamine [57].

Etude Bibliographique

La résistance à l'oxacilline (ou résistance à la méticilline) traduit la présence d'une cible des β -lactamines nouvelle et insensible à ces antibiotiques [54]. L'origine de la méticillinorésistance chez *Staphylococcus aureus* est triple :

- **Synthèse d'une nouvelle PLP** : c'est la principale. Elle est le fait de la présence d'un gène *mecA* qui contrôle la synthèse de PLP additionnelles « anormales » ayant une très faible affinité (Figure 5)

Pour toutes les β -lactamines. De très fortes variations d'expression de la méticillinorésistance sont observées d'une souche à l'autre et selon les conditions de culture [58]. L'origine de ce gène *mec* reste encore inconnue [59].

On parle d'expression hétérogène de la résistance. Quatre classes ont été décrites par Tomasz en fonction de la proportion de mutants résistants au sein de la souche étudiée : une classe homogène, classe 4 (toutes les bactéries expriment le même haut niveau de résistance), et trois classes hétérogènes, classe 1, 2 et 3 (il existe dans la population bactérienne des sous-populations plus ou moins résistantes [60].

- **Production d'enzymes** : l'hyperproduction de β -lactamases aboutit à un bas niveau de résistance à l'oxacilline. Ces souches sont nommées BORSA (*Borderline Oxacilline Resistant Staphylococcus aureus*). Cette résistance est restaurée in vitro par les inhibiteurs de β -lactamases [58]. La β -lactamase est une enzyme inductible codée par le gène *blaZ* porté par un plasmide [61]. C'est une enzyme qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines, les rendant inactives [62]. L'expression du *blaZ* est régulée par deux gènes, *blaR1-blaI* situés en amont et transcrits en direction opposée à *blaZ* [61].

- **Modification des PLP** : appelée aussi résistance intrinsèque, la résistance par modification de la cible moléculaire des β -lactamines est la plus fréquente [63], les PLP sont normales, elles ne sont pas néosynthétisées mais leur affinité pour les β -lactamines est diminuée, modifiée (souche MODSA pour *Modified Staphylococcus aureus*). Ces souches sont rares [58]. *Staphylococcus aureus* possède quatre isoformes natives de protéines liant les pénicillines (PLP), une famille de protéases à sérine intervenant dans la synthèse du peptidoglycane. Elles sont la cible des β -lactamines qui empêchent ainsi la constitution de la paroi bactérienne, conduisant à la mort de la bactérie [64].

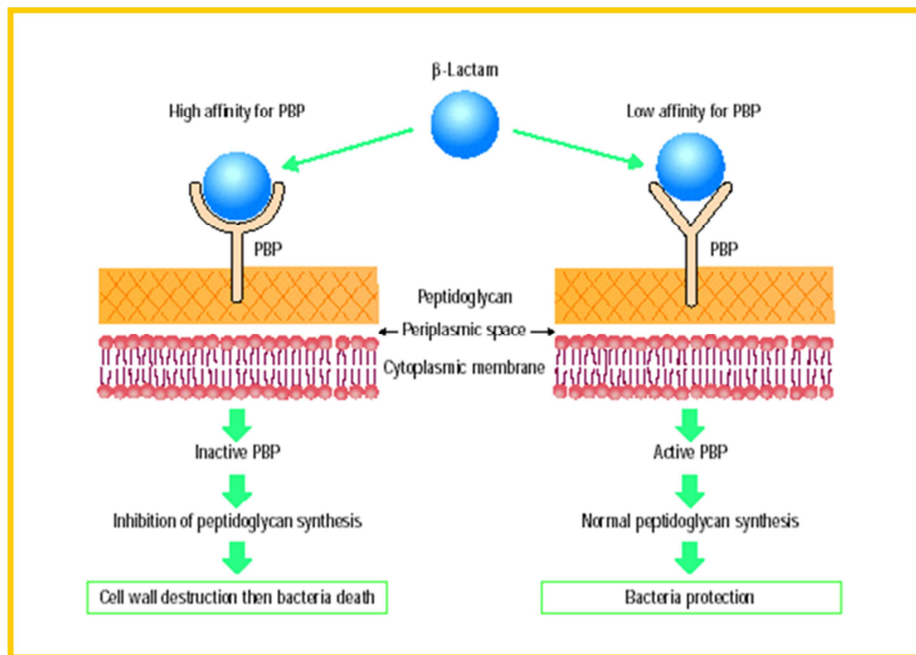


Figure 5 : Mécanisme de résistance de *S. aureus* à la méticilline par PLP2

La connaissance des mécanismes de résistance et leur compréhension doivent permettre une meilleure utilisation des antibiotiques dont le but est multiple :

- Permettre en premier lieu d'être actif sur les bactéries impliquées dans les infections ;
- Limiter l'émergence des souches résistantes ;
- Eviter l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance [42].

2.5 Support de résistance

La résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* est acquise par l'insertion dans le chromosome d'un élément génétique mobile appelé *SCC mec* (pour *staphylococcal cassette chromosome mec*) abritant le gène *mecA*, [65] [66].

Le *SCC mec* correspond à un fragment d'ADN de 21 à 67 kb intégré dans le chromosome des SARM au niveau d'un site unique appelé *attBsc* localisé près de l'origine de réplication du chromosome bactérien [67] [68]. Cette région est un lieu de prédilection pour l'ajout de séquences d'insertion et de transposons, en particulier ceux codant pour la résistance aux antibiotiques [69].

Etude Bibliographique

Pour ses mouvements, le SCC *mec* porte une paire de gènes codant pour les recombinases A et B appelés « *cassette chromosomal recombinase genes A and B* » (*ccrAB* ou *ccrA* et *ccrB*). Ces recombinases appartiennent à la famille des « invertases-resolvases » et sont capables de mobiliser cet élément génétique [70].

Cinq classes du complexe gène *mec* et cinq allotypes du complexe gène *ccr* ont été identifiés (figure 6), Ils diffèrent par leur taille et leur composition génétique [71].

Le site d'intégration de l'extrémité 3' des éléments SCC *mec* dans le génome de *Staphylococcus aureus* est situé au niveau d'une séquence hautement conservée : le gène *orfX* [70]. Il s'agit d'un cadre de lecture ouvert (ORF ou *open reading frame*) de fonction inconnue [72].

Le gène *mecA* a été découvert et cloné en 1986. Cette séquence d'ADN n'est pas retrouvée dans les souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la pénicilline. L'hypothèse d'une transposition à partir de souches de staphylocoques à coagulase négative est le plus souvent évoquée [64].

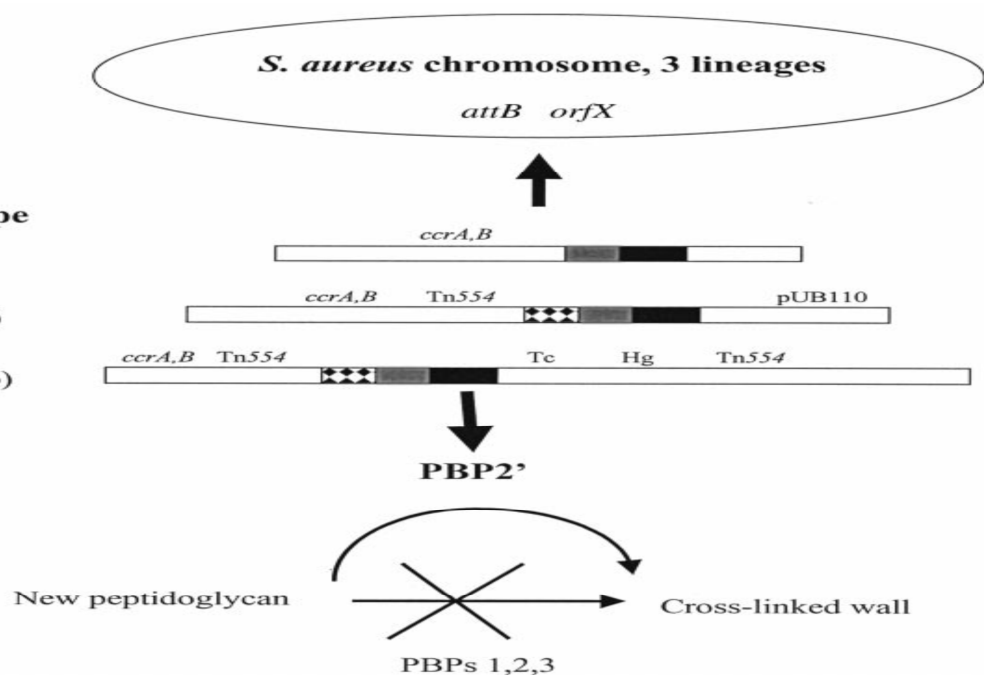


Figure 6 : Bases génétiques et biochimiques de la résistance de *S. aureus* à la méticilline [73]

2.6 Détection de la résistance à la métilcilline

Une identification correcte des SARM en utilisant des méthodes conventionnelles est complexe, et certaines souches sont difficiles à classer, une souche peut apparaître sensible par une méthode et à la limite résistante par une autre. Les méthodes de laboratoire pour la détection de la résistance sont influencées par différentes variables : comme la température et la période d'incubation, l'inoculum, et le sel utilisé dans le milieu de culture ; tous ces éléments pourraient améliorer ou supprimer la croissance de SARM [74].

Pour ces raisons, plusieurs méthodes moléculaires ont été mises au point pour détecter le gène *mecA* dans les isolats cliniques de SARM [75], [74]. Ces techniques génotypiques sont devenues le standard de référence pour la détection et la confirmation de la résistance à la métilcilline pour les staphylocoques dorés [76], [77].

Plusieurs études ont montré une excellente corrélation entre la détection par PCR du gène *mecA* et les résultats obtenus par test de sensibilité en microdilution. La méthode PCR permet aussi de mieux différencier entre le staphylocoque doré de haute résistance et celui de résistance intermédiaire [78], [77].

2.6.1. Gènes de résistance utiles pour la détection de l'antibiorésistance:

Le choix des amorces et des sondes d'hybridation (tableau 5) permet l'amplification d'un fragment de 184 pb correspondant à la région de jonction entre l'extrémité droite de SCC *mec* et une séquence du gène *orfX* spécifique de *S. aureus* [72].

Tableau 5 : Oligonucléotides utilisés [72].

Nom	Séquence 5' 3'
Amorce <i>Forfx</i>	GGATCAAACGGCCTGC
Amorce <i>Rmec</i>	CCTTTATGAAGCGGCTG
Sonde <i>Aorfx</i>	ATGCGGGTTGTGTTAATTGAACAAGTGT
Sonde <i>Sorfx</i>	AGAGCATTTAAGATTATGCGAGGAGAAG

Les amorces et les sondes choisies permettent une amplification de la jonction entre le gène *orfX* et *mecA*, ce qui rend la réaction de PCR spécifique du SARM même au sein d'une flore polymorphe [72].

Après comparaison des séquences de jonction de droite de *SCC mec* et *orf X*, une région de 16 pb d'homologie relativement élevée a été trouvée, avec seulement 1 ou 2 bp différentes entre les éléments *SCC mec* des types I à V.

Cunyet *al.*, en 2005, ont décrit l'utilisation d'une amplification par PCR, avec cette séquence comme une amorce sens et une séquence hautement conservée dans *orfX* comme amorce anti-sens, pour identifier des SARM contenant différents types d'éléments *SCCmec* [79].

Les séquences d'amorces utilisées dans ce dosage étaient les suivantes [79]:

***rjmec* (sens), 5'-TATGATATGCTTCTCC (positions 57641-57656, D86934, et**

***ORFX1r* (anti-sens), 5'-AACGTTTAGGCCATACACCA (58042 - 58022, D86934).**

2.6.2. Les souches séquencées de *S. aureus*

- COL : SARM isolée dans les années 1960.
- N315 : SARM acquise à l'hôpital, isolée en 1982.
- Mu50 : SARM acquise à l'hôpital et résistante à la vancomycine isolée en 1997
- SARM252 : SARM acquise à l'hôpital isolée en 1997, un des clones majeurs trouvés aux USA et représentant d'un groupe causant 50% des infections en Grande-Bretagne.
- Mw2 : SARM communautaire. Elle a causé une septicémie fatale à une petite fille de 16 mois dans le Nord Dakota (USA) en 1998.
- MSSA476 : SARM communautaire isolée en 1998 à partir d'un jeune garçon de 9 ans.

La taille des génomes séquencés varie de 2813 à 2903 Mb et est constitué d'un seul chromosome circulaire, parfois accompagné d'un plasmide.

La structure générale des chromosomes des différentes souches est bien conservée, avec la majorité des gènes présentant un pourcentage élevé d'identité (> 97%) et organisés dans le même ordre. Ces régions conservées sont interrompues par de petites régions présentant des différences entre les génomes [80].

2.7 Résistance de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine

Au fur et à mesure que le SARM devenait un agent pathogène nosocomial important, l'utilisation de la vancomycine a augmenté dans les centres hospitaliers. L'apparition des staphylocoques à coagulase négative comme cause significative de bactériémies nosocomiales a aussi favorisé l'utilisation de la vancomycine [81].

Aux États-Unis, le « National Nosocomial Infection Surveillance » (NNIS) a fait état d'environ 75 % de staphylocoques à coagulase négative résistants à la vancomycine et près de 50 % pour *Staphylococcus aureus* dans les unités de soins intensifs [82].

En France, les valeurs se situent entre 30 et 40% selon les sites. Les premiers rapports sur la résistance aux glycopeptides ont été publiés en 1979 pour les staphylocoques à coagulase négative et en 1997–1998, pour *S. aureus* [83].

2.7.1 Définitions

Il est rapidement apparu qu'une diminution de la sensibilité aux glycopeptides pouvait recouvrir des situations très différentes en termes épidémiologiques, cliniques et bactériologiques. De nombreux termes ont été utilisés dans la littérature pour désigner les souches de *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Par ailleurs, les recommandations pour la catégorisation clinique des souches de *Staphylococcus aureus* selon leur sensibilité aux glycopeptides sont différentes d'un pays à l'autre, ce qui peut être source de confusion [84].

En janvier (2006), le Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) a modifié les critères de sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine [85] (tableau 6).

Tableau 6: les nouvelles recommandations de CLSI déclarées en 2006 [86], [87]

Germe	Catégorie des souches	CMI (mg/ml)
VSSA	Sensibles	≤2
VISA	Intermédiaires	4-8
VRSA	Résistantes	≥16

VSSA : *Staphylococcus aureus* sensible à la vancomycine

VISA : *Staphylococcus aureus* intermédiaire à la vancomycine

VRSA : *Staphylococcus aureus* résistante à la vancomycine

CMI : Concentration minimale inhibitrice

Actuellement, et suite à de nombreux échecs thérapeutiques, ces critères ont subi un remaniement. Ainsi en 2010, le CLSI [85] et l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [88], qualifient toute souche ayant une CMI > 2µg/ml de « résistante ». Tandis que le CA-SFM [89] requière une concentration minimale inhibitrice supérieure à 8 pour assigner toutes souches de *S. aureus* à la classe des résistantes à la vancomycine (tableau 7).

Tableau 7 : Concentrations critiques et critères interprétatifs de la résistance à la vancomycine des souches de *Staphylococcus aureus*

Agent	Recommandations	Sensible (mg/l)	Intermédiaire (mg/l)	Résistant (mg/l)
Vancomycine	CLSI	≤ 2	-	>2
	CA-SFM	≤ 4	-	>8
	EUCAST	≤ 2	-	>2

CA-SFM : comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CLSI : clinical and laboratory standard institute (anciennement NCCLS)

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Le CDC a proposé en 2010 une démarche pour distinguer entre les VISA/VRSA (figure 7).

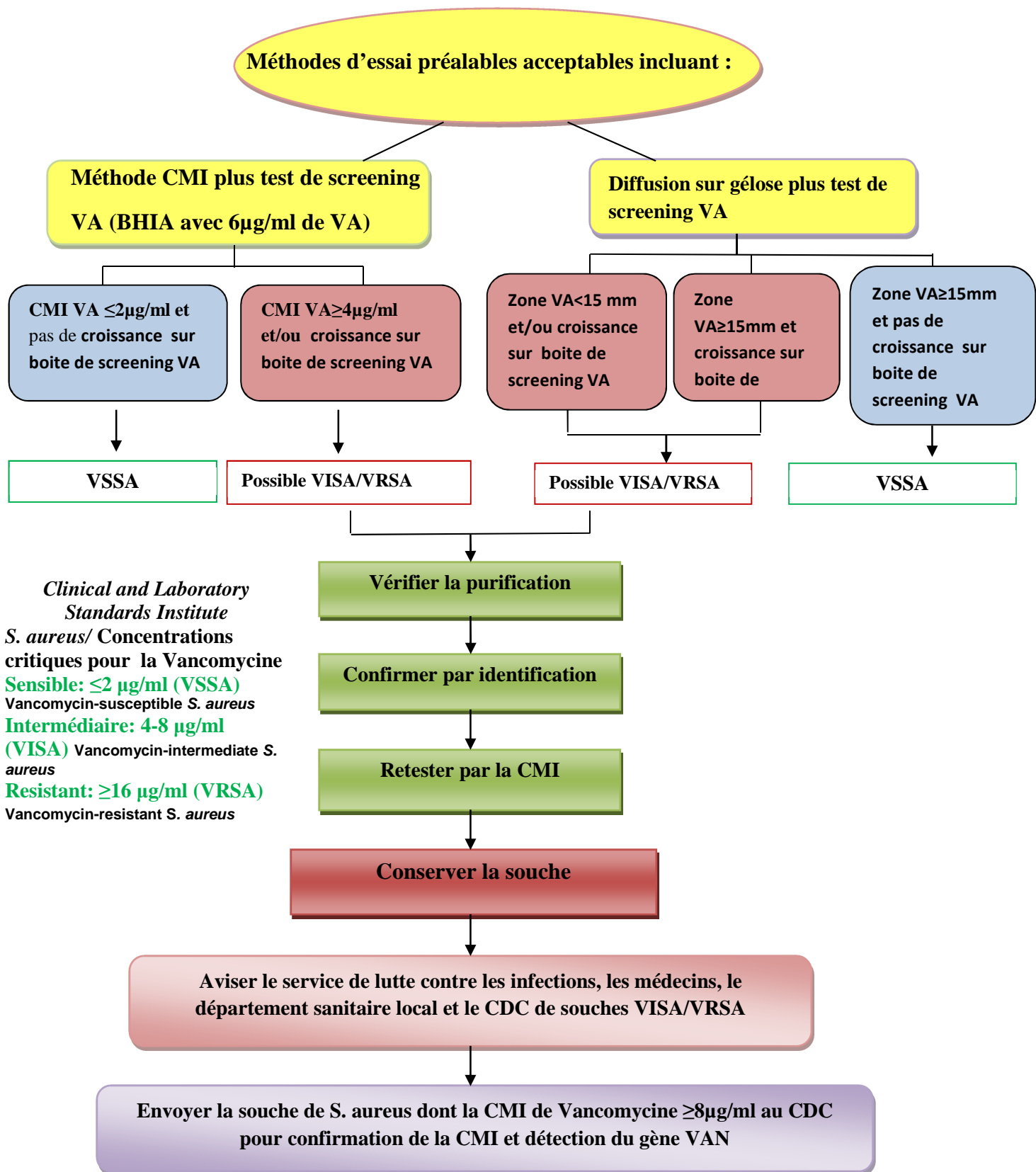


Figure 7 : Algorithme pour le test de résistance de *Staphylococcus aureus* à la Vancomycine selon le Centers for disease control and prevention (CDC) (2010) [90]

2.7.2 *Staphylococcus aureus* ayant une résistance intermédiaire à la vancomycine

Le terme **SARIV**, pour *Staphylococcus aureus* ayant une résistance intermédiaire à la vancomycine (en anglais, **VISA**, pour *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) ou même **GISA** (pour *glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus*) est plus précis, puisque toutes les nouvelles souches de *Staphylococcus aureus* ont une résistance intermédiaire aux glycopeptides (vancomycine et téicoplanine), l'acronyme **VISA (SARIV)** est utilisé plus fréquemment [91]. Environ 100 cas ont été rapportés, provenant de diverses zones géographiques : Europe, Amérique du Sud, Asie et États-Unis (tableau 8) [92].

2.7.3 *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine

L'acronyme **SARV**, pour *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine (en anglais, **VRSA**, pour *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*, ou **GRSA**, pour *glycopeptide-resistant Staphylococcus aureus*), laisse entendre que la vancomycine ne peut éliminer le *Staphylococcus aureus* responsable d'une infection même si elle est administrée à des doses et pour une période de temps suffisantes. Aux États-Unis et au Canada, cet acronyme a été réservé aux souches de staphylocoque dont la CMI pour la vancomycine est $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ [93].

Cependant, en dehors de ces pays, le terme « résistant » peut être utilisé pour des souches de *Staphylococcus aureus* dont la CMI est égale à $8 \mu\text{g/ml}$, notamment au Japon [94].

En 1999, La *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*, a classé les micro-organismes dont la CMI pour la vancomycine est $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ comme résistants [78], [95].

La CMI de cette sous population pour la vancomycine est $\geq 8 \text{ mg/l}$; Il est important de se rappeler que pour Hiramatsu et ses collaborateurs, une souche est «résistante» à la vancomycine (VRSA) si sa CMI est $= 8 \mu\text{g/ml}$ [66]. Depuis la première souche présentant une résistance hétérogène hVISA au Japon, 14 études épidémiologiques ont été publiées entre 1997 et 2001, afin d'estimer la prévalence et l'évolution de ces souches. 132 hVISA parmi 7920 souches de *Staphylococcus aureus* testées, soit une prévalence de 1,67%. Ces isolats représentent les souches de *Staphylococcus aureus* dans le monde entier, y compris le Japon, Corée, Hong Kong, Thaïlande [99] ; Espagne, Grèce, Allemagne, Italie et Angleterre [100]. La fréquence de ces souches en France a subi une variation de 0 % jusqu'à 25 % [101]. Aux États-Unis, cette fréquence a été estimée à moins de 2 % [91] [102], alors qu'au Japon, Hiramatsu a rapporté une fréquence de 20 % [66].

Etude Bibliographique

Tableau 8 : Caractéristiques des patients présentant une infection nosocomiale causée par un *Staphylococcus aureus* ayant une sensibilité intermédiaire à la vancomycine (SARIV) [96]

Cas	Lieu	Age/Sexe	Condition sous jacente	Infection à SARM	Durée de l'exposition à la vancomycine
1	Japon	4 mois/M	Chirurgie cardiaque pour correction d'une atrésie de l'artère pulmonaire	Infection de plaie postopératoire	41 Jours
2	Michigan	59ans/M	Dialyse péritonéale ambulatoire de longue date	Péritonite	22-27 semaines
3	New Jersey	66ans/M	Diabète, insuffisance cardiaque, insuffisance rénale légère, colonisation prolongée par le SARM	Bactériémie persistante	11-17semaines
4	New York	79ans/M	Hypertension artérielle, insuffisance rénale, hémodialyse chronique	Bactériémie, infection au site d'un cathéter central, autre bactériémie (décès)	8 grammes de vancomycine au cours des 4 derniers mois de vie
5	Slovaquie	Enfant/ ?	Immunodépression, syndrome de Job, lymphome non hodgkinien	Cellulite et abcès cutanés multiples	Non précisée
6	France	2ans/F	Leucémie	Infection au site d'un cathéter central, bactériémie, puis infections secondaires (effusion pleurale, abcès sous-cutanés)	10 jours, puis 15 jours avec téicoplanine, puis 10 jours avec quinupristine/ dalfopristine
7	Royaume-Uni	82ans/M	Insuffisance rénale chronique consécutive à une fibrose rétropéritonéale, hémodialyse depuis 4 semaines	Infection au site d'un cathéter central, bactériémie (décès)	21 Jours
8	Illinois	63ans/F	Insuffisance rénale, hémodialyse chronique, hospitalisations fréquentes pour complications (ex. : infections de cathéters centraux)	Bactériémie, endocardite	Traitements répétés à la vancomycine depuis juin 1998 ; pour la dernière hospitalisation : 25 jours
9	Minnesota	56 ans/ ?	Hémodialyse chronique, maladie vasculaire périphérique, infection récurrente à SARM associée à un cathéter	Ostéomyélite vertébrale, bactériémie (infection traitée ;décès)	18 semaines
10	Nevada	27/ ?	Cholécystectomie compliquée	Abcès hépatique polymicrobien (incluant SARM) (infection traitée par drainage chirurgical)	10 semaines

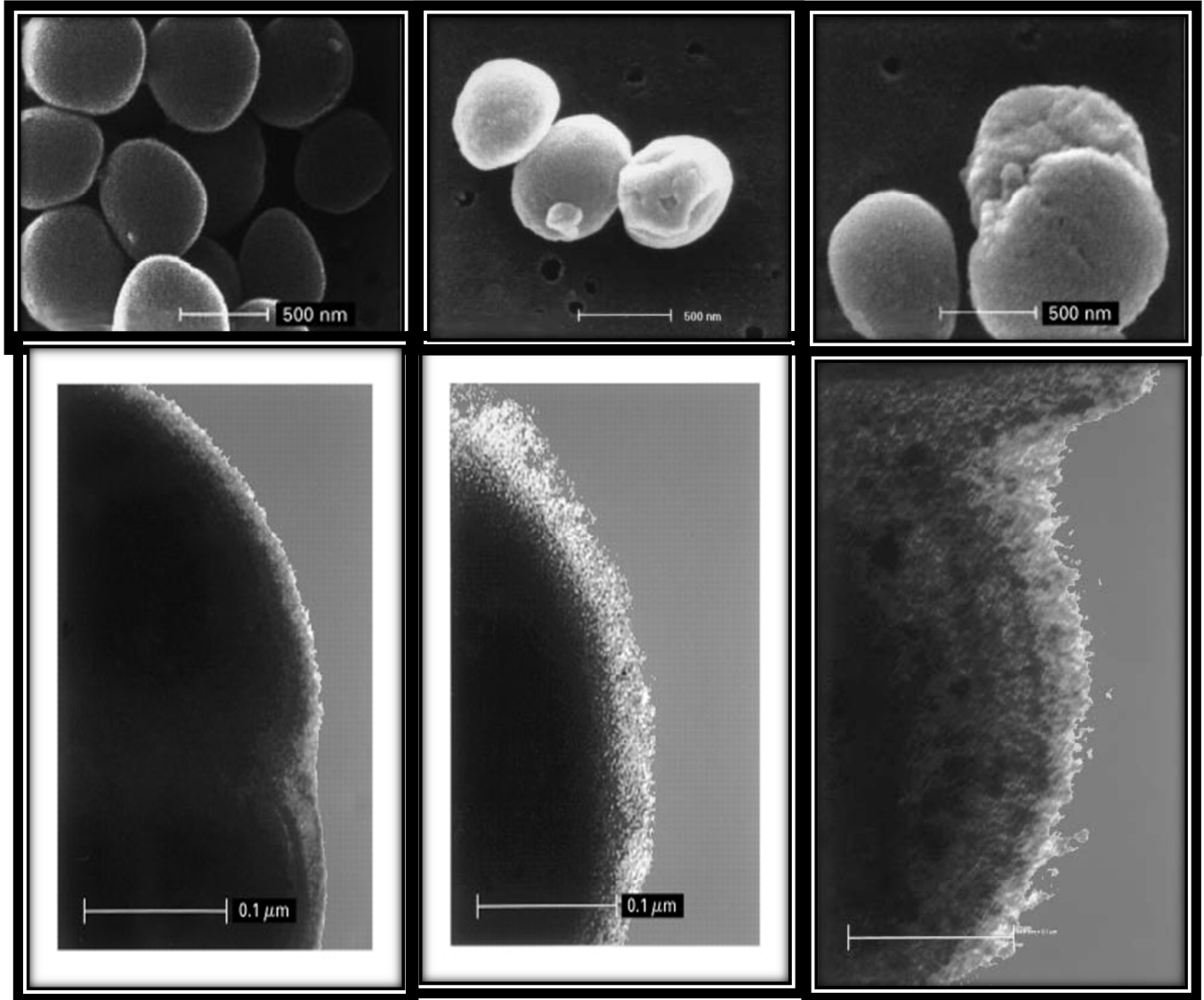
2.7.4 *Staphylococcus aureus* ayant une résistance hétérogène à la vancomycine

Le terme hétéro-SARV (en anglais, *hetero-VRSA*, pour *heterogeneously resistant VRSA*) provient des travaux de Hiramatsu et de ses collaborateurs. En effet, ces auteurs ont décrit le prototype de la souche hétéro-VRSA. Une souche hétéro-VRSA peut être définie comme étant une souche de *Staphylococcus aureus* qui renferme des sous-populations de cellules filles « résistantes » à la vancomycine, mais dont la CMI de la souche parentale originale pour la vancomycine se situe entre 1 et 4 µg/ml [97]. Seule une partie de la population ($1/10^6$) va exprimer la résistance à la vancomycine [98].

2.7.5. Le mécanisme de résistance

Le mécanisme de résistance chez les GISA et chez les hétéro-GISA demeure quant à lui mal compris. Ces souches présentent de multiples mutations qui entraînent des anomalies de synthèse et de composition du peptidoglycane avec un épaississement de la paroi cellulaire (figure 8) [103]. Cette accélération de la synthèse du peptidoglycane entraîne une augmentation du nombre de sites D-alanine-D-alanine disponibles pour fixer la vancomycine (figure 9), ces résidus servent de « fausses cibles » pour séquestrer les molécules de vancomycine qui ne peuvent pas pénétrer à travers la paroi cellulaire et restent bloquées « phénomène de trapping » (figure 10) [104].

Une quantité supérieure de ces antibiotiques sera donc nécessaire pour atteindre les sites actifs au niveau de la membrane cytoplasmique, l'accélération de la synthèse et du renouvellement de la paroi cellulaire de ces souches semble nécessiter une augmentation de la quantité de NAM (N-acétyl muramique) disponible et une accélération du captage du NAG (N-acétylglucosamine) [106]. Cette augmentation des besoins en précurseurs de la paroi bactérienne entraînent une consommation accrue de glutamine [86], La disponibilité de cette dernière deviendrait alors insuffisante pour fournir un groupement NH_4^+ à l'acide D glutamique [107]. Le défaut d'amidation qui en résulte semble être responsable d'un degré de maillage plus faible du peptidoglycane [108].



1

2

3

Figure 8 : Comparaison de la paroi d'une cellule de *Staphylococcus aureus* sensible (1) et une autre résistante à la vancomycine (2, 3)

(Image prise par microscopie électronique à transmission grossissement : $\times 30000$)

(Smith *et al.* ,1999) [105].

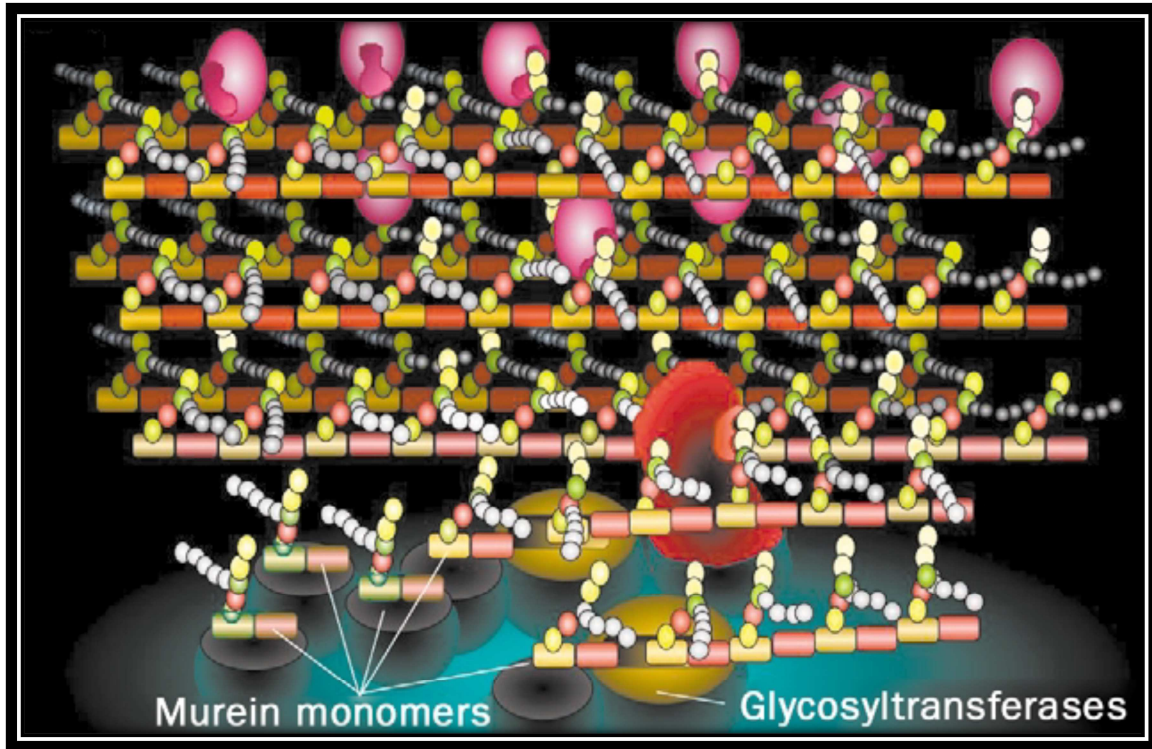


Figure 9. Épaissement de la paroi des souches VISA

(Hiramatsu , 2001) [66]

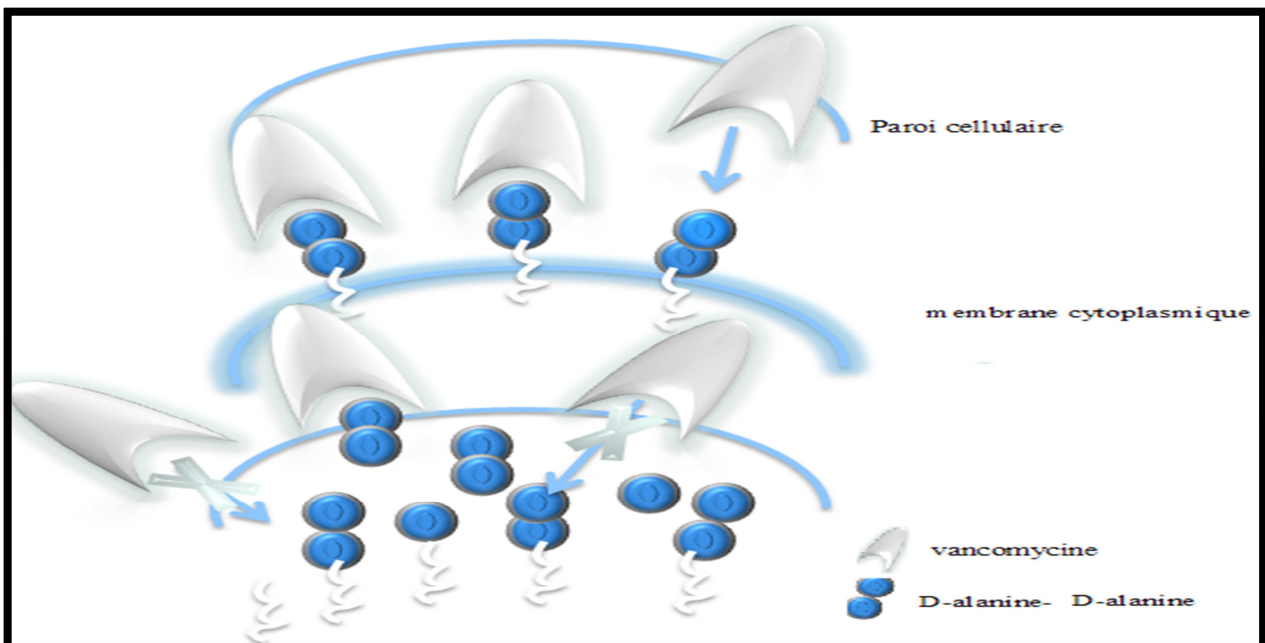


Figure 10. Le phénomène de « trapping » des souches VISA

(Sieradzki *et al* ., 1999 ; Appelbaum , 2006)[109], [104]

L'exposition prolongée à la vancomycine semble constituer l'élément essentiel de l'acquisition in vivo du phénotype de résistance [94], [110]. Il est à noter que cette résistance est instable et peut être réversible [102].

Le risque de développement de résistance est plus important avec la teicoplanine. La plupart des souches GISA décrites présentent des CMI plus élevées à la teicoplanine qu'à la vancomycine. C'est pourquoi, la teicoplanine est utilisée pour détecter les niveaux bas de résistance aux glycopeptides [111].

2.8 Méthodes de détection et de détermination de la sensibilité aux glycopeptides

2.8.1. Méthodes phénotypiques

2.8.1.1 Caractérisation de la résistance par différentes méthodes

Les quelques souches cliniques de GRSA isolées jusqu'à présent ont été détectées par les méthodes classiques d'antibiogramme sur gélose et par le test de screening, au contraire, le bas niveau de résistance aux glycopeptides et son caractère réversible rendent la détection des GISA et des hétéro-GISA difficile en routine au laboratoire de bactériologie (tableau 9) [112].

Mais la seule technique qui permet de distinguer clairement les trois catégories sensibles, hétéro résistantes et résistantes, est l'étude des populations.

Tableau 9 : les principales techniques de détection de *S. aureus* résistant à la vancomycine, recommandées par CLSI, CA-SFM, et CDC.

<i>Organisations</i>	<i>Recommandations</i>	<i>Remarques</i>
<p>CLSI (CLSI, 2005) [113]</p>	<p>Gélose Brain Heart Infusion (BHIA) supplémentée avec 6 mg/l de vancomycine</p>	<p>Détecter les souches GISA, GRSA, elle ne permet pas la détection des souches hétéro-résistantes.</p>
<p>CA-SFM (CA-SFM, 2005) [114]</p>	<p>Gélose Mueller-Hinton supplémentée avec 5 mg/l de teicoplanine</p>	<p>Sensible, détecte à la fois les souches résistantes et les souches hétéro-résistantes. Elle est peu spécifique et nécessite des tests de confirmation</p>
<p>CDC (CDC, 2006) [115]</p>	<p>E-test la réalisation de mesure de concentration inhibitrice de vancomycine et teicoplanine à partir d'un inoculum dense ensemencé sur une gélose BHIA incubée 48h à 35°C.</p>	<p>Confirme rapidement la résistance de bas niveau aux glycopeptides sensible et spécifique le coût élevé des réactifs, cette technique est peu applicable en première intention.</p>

2.8.1.2. Analyse des populations d'une souche de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis des glycopeptides

La méthode d'analyse des populations permet de mettre en évidence l'existence de sous-populations capables de croître sur des concentrations croissantes de glycopeptides au sein d'une souche de *Staphylococcus aureus*.

Cette méthode consiste à déposer un inoculum fort (10^7 à 10^8 UFC/ml) sur des milieux BHI contenant des concentrations croissantes de vancomycine. Les souches de *Staphylococcus aureus* homogènes et hétérogènes peuvent ainsi être détectées. Cette méthode longue et fastidieuse n'est pas applicable en pratique courante de laboratoire [116].

2.8.2. Les méthodes génétiques

2.8.2.1. PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)

Cette technique est basée sur la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction ayant peu de sites de coupure. Les fragments générés sont d'une taille trop grande (10 à 800 kb) pour être séparés par une électrophorèse conventionnelle. On utilise alors une électrophorèse avec un champ électrique à orientation variable, les fragments les plus grands se réorientent le plus lentement [117].

Cette méthode a de nombreux avantages par rapport aux autres techniques de typage : pouvoir discriminant élevé, excellente reproductibilité. Les limites de cette technique sont sa lenteur d'exécution d'environ une semaine, et son coût [118].

2.8.2.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Elle est basée sur l'amplification aléatoire de séquences de l'ADN bactérien à l'aide d'amorces courtes. Elle ne nécessite aucune information préalable sur le génome analysé, elle détecte le polymorphisme engendré par différents phénomènes de mutation au niveau du site d'appariement de l'amorce [119], [120]. Son pouvoir discriminant par rapport au PFGE serait équivalent ou inférieur selon les études [121].

2.8.2.3 PCR multiplex

Cette technique permet en même temps la détection des gènes de résistance aux glycopeptides par l'identification des différentes souches : *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* en utilisant des amorces complémentaires du gène *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* ou *vanG* (paires d'amorces spécifiques de chaque gène) et aussi pour un fragment du gène codant pour la D-Ala-D-Ala ligase *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et pour *Staphylococcus aureus*. Les fragments obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium [122].

2.9. Résistance de *Staphylococcus aureus* aux aminoglycosides

Les staphylocoques sont normalement sensibles à tous les aminosides, antibiotiques bactéricides, concentration dépendante. Les aminosides sont surtout utilisés en association avec les β -lactamines ou les glycopeptides avec lesquels, ils synergisent en bactéricidie [123].

Deux mécanismes d'importance clinique inégale sont impliqués dans la résistance chez les staphylocoques :

1. Altération de la cible ribosomale : celle-ci concerne principalement la Streptomycine, qui par sa fixation sur une protéine ribosomale, permet la sélection de mutants résistants. ce mécanisme est en revanche exceptionnellement en cause pour les autres aminosides étant donné que ceux-ci ont plusieurs sites de fixation ribosomaux qui ne se chevauchent pas.
2. Modification enzymatique des aminosides : c'est de loin, le mécanisme de résistance le plus répandu. La synthèse de ces enzymes est codée par des gènes plasmidiques ou transposables [124]. Ces enzymes sont divisées en trois classes en fonction de la réaction biochimique qu'elles catalysent :
 - Acétylation d'un groupement aminé : aminoside acétyltransférases (**AAC**),
 - Phosphorylation : aminoside phosphotransférases (**APH**),
 - Adénylation : aminoside nucleotidyltransférases (**ANT**)

Chaque enzyme est dénommée en fonction de la molécule qu'elle modifie et reconnaît un certain nombre d'aminosides qu'elle modifie, ce qui se traduit par un phénotype de résistance (tableau 10) [125]:

Etude Bibliographique

Le Phénotype K : résistance de haut niveau à la kanamycine et à l'amikacine due à une phosphorylase.

Le Phénotype KT : résistance de haut niveau à la kanamycine, l'amikacine, et à la tobramycine, due à une adénylase.

Le Phénotype KTG : résistance de haut niveau à la kanamycine, amikacine, tobramycine, nétilmicine et gentamicine, induite par la présence d'une enzyme bifonctionnelle ayant des activités de phosphorylation et d'acétylation [126].

Tableau 10. Enzymes inactivatrices des aminosides et phénotypes de résistance
(Daurel et Leclercq., 2008) [127]

Phénotype	Acronyme de phénotype	Enzyme	Conséquence sur la synergie avec les bêtalactamine ou les glycopeptides
Kanamycine	K	aminoside phosphotransférases (APH3'III)	Pas de synergie avec Kanamycine et Amikacine
Kanamycine-Tobramycine	KT	aminoside nucléotidyltransférases (ANT (4')-(4'')-I)	Pas de synergie avec Kanamycine, Tobramycine et Amikacine
Kanamycine-Tobramycine-Gentamycine	KTG	aminoside acétyltransférases 6' phosphotransférases 2'' (AAC (6')-APH(2''))	Pas de synergie avec Kanamycine, Tobramycine, Gentamycine, Amikacine et Nétilmicine

2.10. Résistance de *Staphylococcus aureus* aux macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS)

Les macrolides ont une activité bactériostatique sur les staphylocoques, seules les streptogramines, association de deux composés agissant en synergie, ont une activité bactéricide temps dépendante [123].

La résistance aux MLS est due à trois mécanismes : La modification de la cible des antibiotiques, la modification des antibiotiques et l'efflux actif de ceux-ci.

- La modification de cible est de loin le mécanisme le plus répandu et confère un spectre de résistance croisée entre macrolides, lincosamides et streptogramines B. En effet, les souches résistantes produisent une méthylase responsable de la diméthylation d'une adénine de l'ARN23S de la sous-unité ribosomale 50S [128].

Cette altération spécifique et unique du ribosome bactérien a pour conséquence de réduire l'affinité entre l'érythromycine et sa cible sans doute du fait de changement de conformation de l'ARN ribosomal 23S. La résistance conférée est croisée entre l'ensemble des macrolides, les lincosamides et les streptogramines B dont les sites de fixation se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS_B.

Trois déterminants génétiques apparentés, *erm A* souvent porté par des transposons de type *Tn554*, *ermC* souvent porté par des plasmides et rarement *erm B* porté par le transposon *Tn551*, codent pour une méthylase [129].

La modification des antibiotiques est due à diverses enzymes spécifiques chacune d'une classe d'antibiotique et qui confèrent donc un spectre étroit de résistance. Une inactivation enzymatique des macrolides à noyau à 14 atomes (érythromycine, oléandomycine, clarithromycine) et à 16 atomes (spiramycine, josamycine, rosaramycine) mais non de l'azithromycine, apparemment due à une estérase a été rapportée chez une souche clinique de *S. aureus* par ailleurs résistante à l'érythromycine par efflux actif [130].

Les mécanismes d'efflux actif ne touchent que les antibiotiques de structure apparentée. Une érythromycine ainsi que les autres macrolides à noyau 14 et 15 atomes peuvent subir un efflux actif par un mécanisme ATP-dépendant codé par le gène *msrA* [131]. Ce gène code pour une protéine homologue aux ABC-transporteurs (ABC pour *ATP-binding cassette*) qui sont des protéines d'efflux actif ATP-dépendantes très répandues chez les eucaryotes et les procaryotes. La protéine MsrA agirait en coopération avec des gènes chromosomiques de staphylocoques codant pour des protéines transmembranaires [132]. La résistance est inductible par les macrolides à noyau à 14 et 15 atomes. Les autres MLS ne sont pas inducteurs [133].

2.11 Résistance de *Staphylococcus aureus* à la Rifampicine

La rifampicine bloque l'initiation de la transcription en inhibant sélectivement la synthèse d'ARN messager par la liaison à la transcriptase (ARN polymérase ADN-dépendante). La liaison est stœchiométrique et le site de fixation est localisé dans la sous-unité β de cette protéine. Depuis les premières descriptions en 1973, tous les mécanismes de résistance connus sont chromosomiques. La fréquence de mutation peut atteindre 10^7 pour les cocci à Gram positif et les mutants sont sélectionnés *in vitro* en une étape. Ceci impose l'utilisation de la rifampicine en association avec d'autres antibiotiques afin de prévenir l'émergence des mutants résistants. Deux niveaux de résistance sont distingués : une résistance de haut niveau (CMI > 32 mg/L) et une sensibilité diminuée (CMI 1-4 mg/L contre 0,008 mg/L vis-à-vis d'une souche sensible). La résistance à la rifampicine est surtout décelée chez les souches méticillinorésistantes [133].

La résistance est récessive, ce qui explique l'absence de résistance plasmidique. En effet, les mérodiplôïdes rifampicine S/rifampicine R sont sensibles à la rifampicine car les molécules de transcriptase sensibles, inactivées par la rifampicine bloquent les sites promoteurs de l'ADN et préviennent la transcription par les molécules d'enzymes résistantes [133].

Chez *S. aureus*, la résistance à la rifampicine (phénotype R) est liée à la sélection de mutants résistants de la sous unité β de la ARN polymérase ADN dépendante [123].

2.12. Résistance de *Staphylococcus aureus* à la Fosfomycine

La fosfomycine, antibiotique lentement bactéricide temps dépendant, interfère dans la première étape de la synthèse de la paroi bactérienne. Elle agit comme analogue du phosphoénolpyruvate et se lie de façon covalente à la pyruvyltransférase qui ne peut plus assurer la condensation de l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine avec le phosphoénol pyruvate [123].

La fosfomycine pénètre dans le cytoplasme bactérien par deux systèmes de transport actif : celui des L- α - glycérophosphates et celui des hexoses-phosphates. Ce dernier système est activé par la présence de glucose 6-phosphate. Les résistances à la fosfomycine rapportées sont le fait de mutations, sans doute portant sur le transport de l'antibiotique (gènes *glpT* et *uhp*) et survenant à assez haute fréquence d'où l'emploi de cet antibiotique en association. Une résistance plasmidique à la fosfomycine a été décrite chez *S. aureus* et chez les staphylocoques à coagulase négative. Le gène *fosB* est porté chez *S. aureus* par des petits plasmides de 2,7 kilobases [134] [135].

3. Les infections nosocomiales

3.1. Définitions des infections nosocomiales

Toute maladie due à des microorganismes, contractée à l'hôpital, cliniquement et/ou microbiologiquement reconnaissable est dite « **nosocomiale** ». Elle affecte soit le malade du fait de son admission à l'hôpital ou des soins qu'il a reçus (hospitalisation ou soins ambulatoires), soit le personnel hospitalier, du fait de son activité, que les symptômes de la maladie apparaissent ou non, pendant que l'intéressé se trouve à l'hôpital [136].

C'est une réaction pathologique, causée par des microorganismes, dont l'origine est hospitalière. Elle peut concerner les personnes séjournant, visitant, ou travaillant à l'hôpital :

- ❖ L'infection nosocomiale « exogène » est la conséquence d'un microorganisme provenant de l'environnement hospitalier.
- ❖ L'infection nosocomiale « endogène » est la conséquence d'un acte réalisé à l'hôpital. Dans ce cas, le germe en cause est d'origine dite « communautaire ». [137].

- ❖ L'infection nosocomiale qui atteint un professionnel travaillant à l'hôpital est dite « professionnelle » [137].

3.2. Epidémiologie

L'OMS estime qu'en moyenne 190 millions de personnes sont hospitalisées chaque année dans le monde et que 9 millions d'entre elles contractent une infection hospitalière à cette occasion. Environ un million de patients meurent chaque année, dans le monde, de ces infections nosocomiales [138].

La fréquence globale des infections associées aux soins mesurée par des études internationales, varie de 5 à 10% des hospitalisations. De nombreuses études réalisées ont montré que les infections nosocomiales (IN) sont des indicateurs de la qualité des soins. [139].

Les services les plus touchés par ordre décroissant sont : la réanimation avec un taux de prévalence des IN à 30%, la chirurgie 7 à 9%, la médecine 5% à 7%. En chirurgie 2,5% des interventions se compliquent d'une infection du site opératoire (ISO). Les taux d'ISO varient de 1,3% pour le groupe d'intervention à faible risque d'infection chez les patients avec peu d'antécédents médicaux, et à 20% en moyenne pour le groupe d'intervention à risque élevé d'infection chez les patients les plus fragiles [140].

3.3. Les différents types d'infections nosocomiales

Le site de l'infection est variable selon l'unité de soins, selon le recrutement du service, selon les thérapeutiques et les mesures préventives. Les principales localisations infectieuses sont illustrées dans la Figure 11 [139].

3.3.1 Infections urinaires

Les IN urinaires sont prédominantes, cela s'explique par l'utilisation courante des bandelettes urinaires (une sonde à demeure 63.2 % et les IN urinaires 30% à 40% des infections) [136].

80% de ces infections sont associées à la mise en place d'une sonde vésicale, Comme environ 15% des patients hospitalisés seront sondés au cours de leur hospitalisation, 1 à 4,5 % des IN urinaires vont se compliquer d'une bactériémie dite secondaire [141].

Escherichia coli (*E. coli*) est isolé dans 80% des prélèvements urinaires. Cette espèce bactérienne représente la première cause d'infection nosocomiale urinaire [142].

3.3.2 Infections respiratoires

Sont à la première place des infections dans les unités de réanimation et de soins intensifs [143]. Aux premières places des facteurs de risque on cite les dispositifs invasifs : ventilation mécanique, intubation trachéale ainsi les sondes naso-gastrique (42.1%) qui peuvent causer (29%) des IN pulmonaires [136].

3.3.3 Infections du site opératoire

Toute intervention chirurgicale peut se compliquer d'une infection du site opératoire (ISO), qui résulte de la multiplication d'un agent infectieux. L'ISO peut se manifester après un délai variable suivant la contamination qui peut elle-même se produire avant, pendant ou après l'intervention. Même dans des conditions idéales, des séries contemporaines associant l'antibioprophylaxie et un flux laminaire font état d'un taux d'infections après arthroplastie totale de hanche qui varie de 0,1 à 1 %. La mise en place d'un corps étranger (prothèses cardiaques, vasculaires, orthopédiques, drains) est un facteur important d'infections postopératoires [143].

Pour les infections du site opératoire (ISO), on accepte comme nosocomiales les infections survenant dans les 30 jours suivant l'intervention ou s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervention [139]. Les facteurs favorisant la survenue d'une ISO est une chirurgie en région anatomique contaminée ou sale, une durée opératoire supérieure à 50 minutes et un séjour préopératoire supérieur à 6 jours [144].

3.3.4 Bactériémies nosocomiales primaire et secondaire

Une bactériémie est considérée comme primitive lorsqu'aucun foyer n'est retrouvé. Cette définition inclut les infections secondaires dont le point d'appel est un cathéter [145].

Pour les infections sur cathéter, un délai de 24 heures suffit [139]. La bactériémie peut se prolonger et entraîner une septicémie. La majorité des septicémies nosocomiales sont dues à des bacilles à Gram négatif (75% des cas) [143]. La fréquence des bactériémies nosocomiales est la plus élevée en unité néonatale de soins intensifs (44.8%) et en réanimation pédiatrique (35.9%) [145].

3.3.5 Les autres localisations infectieuses (représentent environ 13% des IN) :

De très nombreuses autres localisations sont possibles, on peut citer des infections du système nerveux central, de la peau, du tube digestif [143], des voies génitales après instrumentations ou interruption de grossesse, des régions buccale et périnéale. Toutes ces localisations peuvent être à l'origine de bactériémies avec une fréquence variable selon le degré de l'immunosuppression et la nature des germes en cause [143].

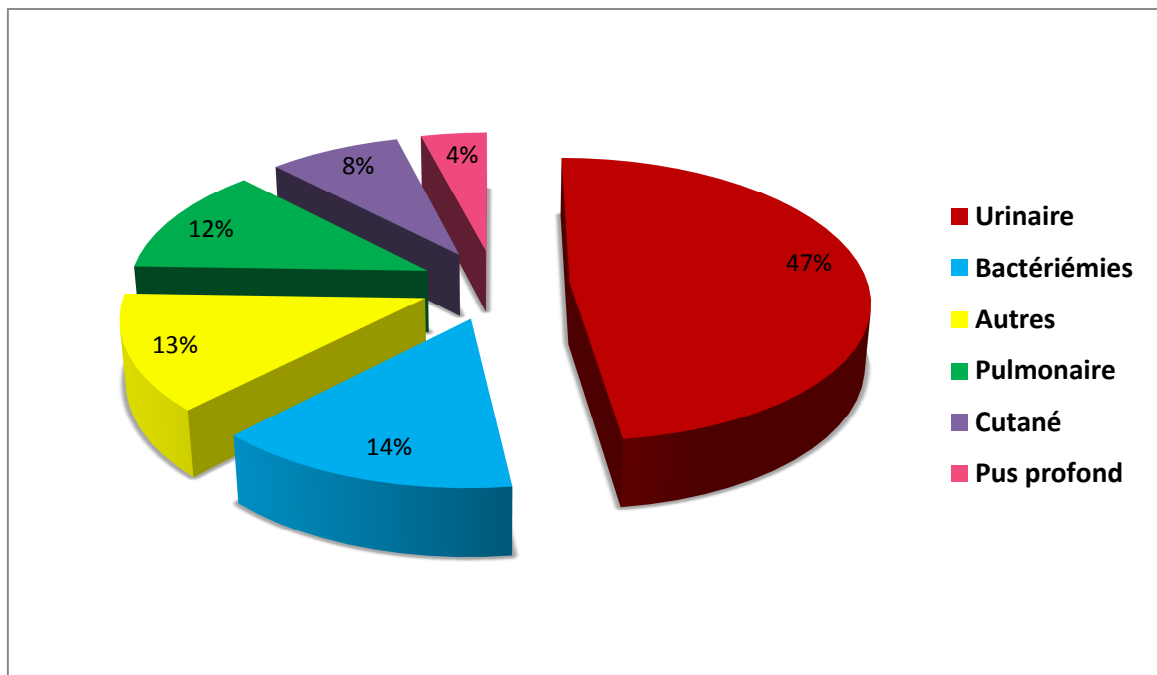


Figure 11 : Répartition des infections nosocomiales validées en fonction du site (Botterel *et al.*, 2004) [146].

3.4. Les services à risques

Les taux d'infections nosocomiales sont variables selon le recrutement des services et, pour un hôpital donné, du niveau technique de ses activités. C'est ainsi que l'on constate une plus importante proportion d'infections nosocomiales dans les centres hospitaliers universitaires que dans les centres hospitalier généraux, en raison de leur activité médico-chirurgicale spécifique, notamment en termes de greffes, de chimiothérapies lourdes ou de traitements de grands brûlés. [139].

Toutes structures confondues, les services à risques, sont, par ordre décroissant, ceux de réanimation (taux d'infections nosocomiales en moyenne de 28,1 %), puis de chirurgie (7,4 %), de médecine (7,2 %), de gynécologie-obstétrique (2,7 %) et de pédiatrie (1,4 %) [139].

3.5. Incidence et prévalence

C'est dans le contexte de la pandémie staphylococcique du début des années 60 que l'idée d'une surveillance systématique des infections nosocomiales est apparue. Le point de départ de la surveillance des bactériémies peut être le laboratoire de microbiologie, avec une recherche, dans les services d'hospitalisation, d'informations complémentaires permettant d'établir le caractère "nosocomial" de la bactériémie, d'identifier la porte d'entrée, et d'estimer les dénominateurs afin d'établir des taux de bactériémies [147].

Deux méthodes générales de travail peuvent être utilisées pour la surveillance (ou pour la réalisation d'enquête) l'étude de la prévalence et de l'incidence.

3.5.1. La prévalence

Elle repose sur la surveillance de l'ensemble de patients hospitalisés, à un moment donné, dans le ou les services surveillés [148].

Réaliser une étude de prévalence des infections nosocomiales consiste à identifier un jour donné, les patients ayant une infection active le jour de l'enquête, il a été proposé que des enquêtes de ce type, réalisées périodiquement, puisse fournir des données utiles pour la surveillance [149].

On calcule alors un taux de prévalence (par hôpital, par type de services ou de patients) en rapportant le nombre de patients infectés un jour donné au nombre de patient présents ce même jour.

Il existe deux types de prévalence :

- ❖ la prévalence instantanée, calculée à un instant donné.
- ❖ La prévalence de période, qui mesure le nombre de personne atteintes par une affection à un moment quelconque au cours d'une période donnée.

3.5.2. L'incidence

Elle repose sur la surveillance continue dans le temps d'un ensemble de patients, avec enregistrement des nouveaux cas d'infections survenant pendant l'hospitalisation. La situation de chaque patient, au regard de l'infection, est évaluée pour l'ensemble de son séjour hospitalier et, au terme de l'étude, on calcule un taux d'incidence, un taux d'attaque ou un ratio d'infection.

L'avantage est évident en termes de temps de travail (concentré sur une courte période) et de la rapidité dans la disponibilité de l'information, le plus souvent réalisées dans l'ensemble des services. L'incidence mesure le nombre de nouveaux cas I d'un problème de santé donnée survenus dans une population d'effectif N pendant une période T [150].

Ce nombre I étant toujours le numérateur, on distingue plusieurs types d'incidence selon le dénominateur (tableau 11).

3.5.3. Relation entre incidence et prévalence

La prévalence des infections nosocomiales varie avec l'incidence de ces infections mais aussi avec la durée d'observation de l'infection, et donc aussi avec la durée du séjour, de ce fait, les taux de prévalence sont en général surestimés par rapport aux taux d'incidence correspondants (les infectés ayant des durées de séjour considérablement augmentées) [150].

3.5.4. L'analyse des données

L'analyse peut être réalisée manuellement mais l'outil informatique est une aide considérable pour restituer rapidement des données et éviter des erreurs de calcul.

Plusieurs logiciels sont capables de traiter ce type de données: EXCEL, NOSOCOM, EPIINFO. Leur choix dépend essentiellement du matériel disponible dans l'établissement et des habitudes de l'utilisateur, le traitement automatisé impose un certain niveau de sécurité informatique (sauvegarde, confidentialité).

Tableau 11 : Calcul de l'incidence et de la prévalence (Giard et al., 2005) [150]

Indicateur	Numérateur	Dénominateur	Avantages	Limites
prévalence de la maladie	nombre de malades présent dans la population P	effectif de la population P	utile pour apprécier les besoins d'une population correspondant à une affection chronique	Ne tient pas compte de l'évolution dans le temps Ne détecte pas les phénomènes épidémiques Sous-estime des cas lors de maladie de courte durée (guérison rapide ou mortalité précoce élevée)
Incidence de la maladie	Nombre de nouveaux cas période «I» pendant une période T		Mesure dynamique du flux des nouveaux malades. Représente la vitesse d'apparition d'une affection dans une population. Le taux et la densité d'incidence tiennent compte d'un facteur d'exposition	Nécessite un suivi dans le temps de la population
Taux d'incidence de la maladie		Effectif moyen des personnes susceptibles de devenir des cas pendant cette période T		
Densité d'incidence de la maladie		Effectif des personnes susceptibles de devenir des cas durés de la période T		

Objectifs de l'analyse

- Sensibiliser l'ensemble du personnel hospitalier à la réalité de ce phénomène infectieux.
- Permettre aux établissements n'ayant pas l'habitude de ce type de surveillance de se former à la réalisation d'une enquête épidémiologique.
- Permettre la mobilisation de l'ensemble de l'établissement autour d'un projet de surveillance
- Informer l'ensemble du personnel hospitalier du taux de prévalence des infections nosocomiales dans leur établissement.
- Mettre en œuvre l'organisation d'un recueil épidémiologique standardisé de données de prévalence à partir d'un réseau local d'établissements pour obtenir un indicateur global de tendance [151].

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1 Matériels biologiques

220 souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de service de chirurgie générale ont fait l'objet de notre travail.

Souches de référence : tableau 12

**Tableau 12 : Origine et caractéristiques des souches de références
utilisées dans ce travail**

Origine	Souches de références	Caractéristiques et Utilisations
Institut Pasteur d'Alger	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	Identification
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Contrôle de l'antibiogramme
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Contrôle de l'antibiogramme
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Sensible à la pénicilline
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Résistante à la pénicilline et à l'oxacilline (test de screening de la méticillinorésistance)

Laboratoire d'immunogénétique moléculaire, Université Montpellier 2	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Contrôle négatif (PCR)
	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	Contrôle négatif (PCR)
	<i>Enterococcus faecium</i> (<i>vanA</i>)	Contrôle positif (PCR)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>vanA</i>)	Contrôle positif (PCR)

2. Méthodes

2.1 Prélèvement réalisés en chirurgie

Les prélèvements ont été réalisés au niveau de deux services de chirurgie (A et B) du CHU de Tlemcen entre du 16 Avril 2007 et le 11 Mai 2009, ciblant des plaies superficielles sur deux cent quatre-vingt-sept patients (287) ayant contracté une infection nosocomiale.

Les étapes suivantes décrivent la démarche à suivre pour l'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* (figure 12).

Matériels et Méthodes

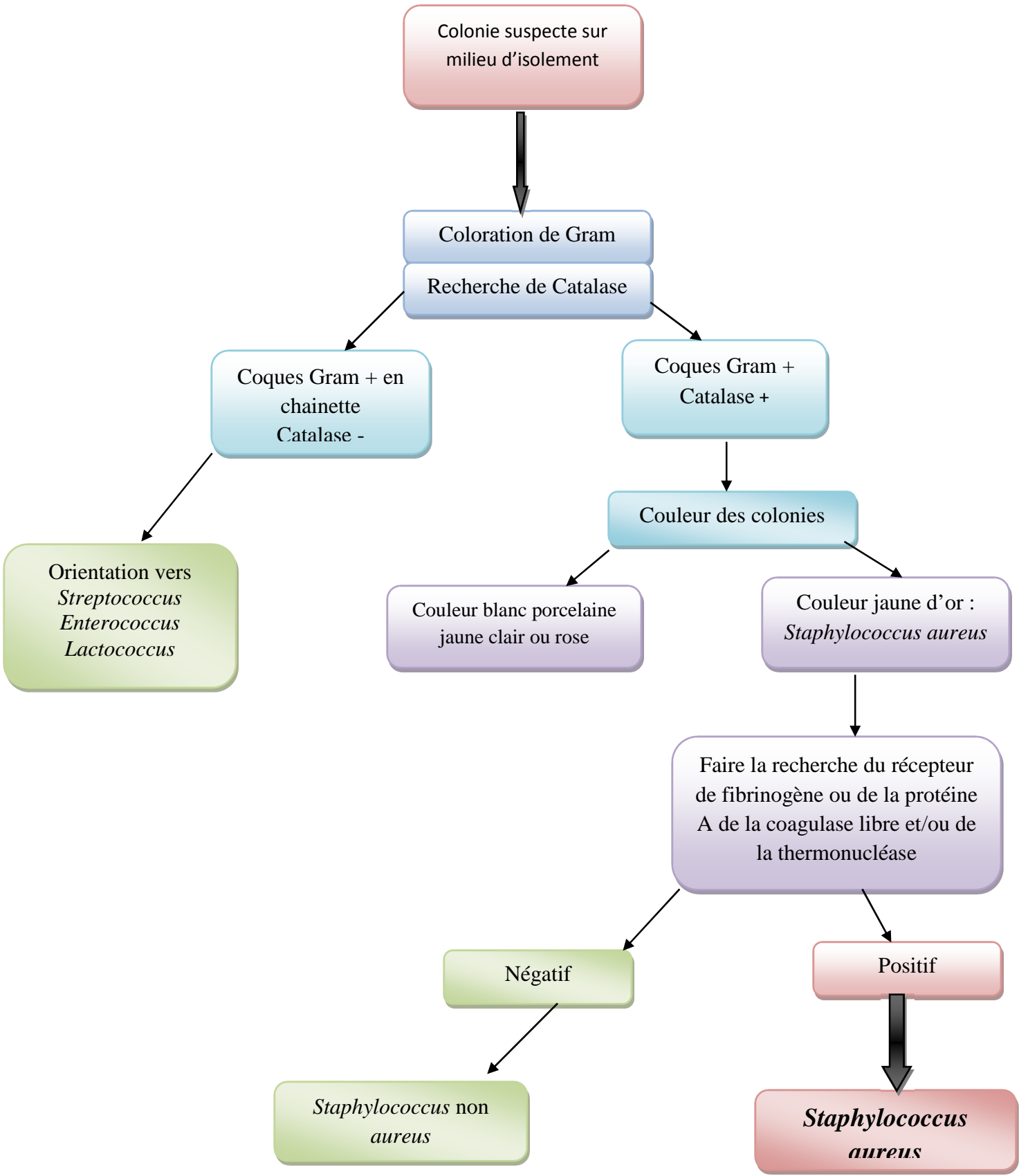


Figure 12 : Organigramme de l'identification de *Staphylococcus aureus* (Leyral et al., 2003) [152]

3. Isolement et purification

L'isolement a été réalisé par repiquage successif sur bouillon nutritif et sur le milieu Chapman, incubés 18 à 24 h à 37°C. *Staphylococcus aureus* donne des colonies jaunes crémeuses bombées de 1 à 2 µm de diamètre dégradant le mannitol en acide lactique sur Chapman (abaissement du pH = acidification du milieu).

4. Identification

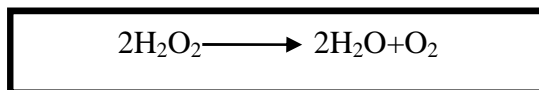
La pureté des souches a été vérifiée par la coloration de Gram pour sélectionner les cocci à Gram positif. Toutes les souches ont été identifiées grâce aux méthodes bactériologiques classiques (production de catalase et de coagulase), et par les caractères biochimiques à l'aide des galeries *API 20 Staph* (Bio Mérieux).

4.1. Recherche de la catalase

➤ Principe

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries.

La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d' O_2 sous forme gazeuse selon la réaction suivante.



➤ Technique

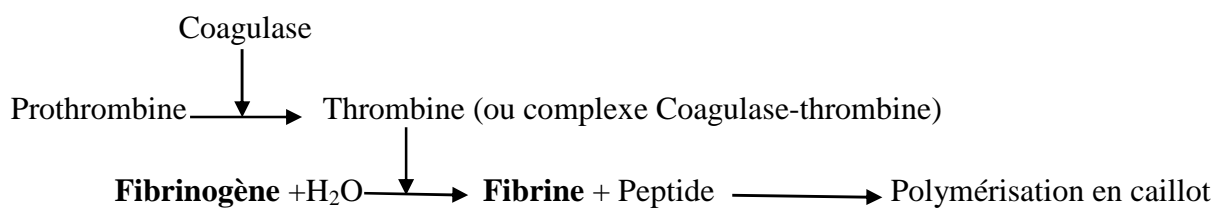
A partir d'un milieu solide et aérobie, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame.

➤ Lecture

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d'O₂ [153].

4.2. Recherche de la coagulase

La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme thermostable ; la staphylocoagulase ou coagulase. La staphylocoagulase agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium.



Parmi les *staphylococcus*, pratiquement seul *Staphylococcus aureus* la possède, certaines souches de *S. aureus* peuvent en être dépourvues (10 à 15 % en milieu hospitalier), la perte de la coagulase étant souvent reliée à un traitement antibiotique.

Dans l'organisme, l'action de la coagulase est à l'origine de microcaillots de fibrine à l'intérieur desquels les bactéries peuvent proliférer à l'abri des défenses de l'organisme.

La recherche de la coagulase de *Staphylococcus* est compliquée par la présence d'un récepteur au fibrinogène provoquant l'agglutination de la souche placée dans un plasma oxalaté (on parle de coagulase « liée »).

➤ Technique

- Réaliser une culture en bouillon.
- Etuver 24h à 37°C.
- Mettre dans un tube à hémolyse 4 gouttes de bouillon agité et 4 gouttes de plasma de lapin oxalaté.
- Placer le tube au bain d'eau à 37°C durant 2 à 24h,
- Observer toutes les heures.
- une coagulation pourra être observée par une prise en masse du liquide [153].

4.3. Recherche de la DNase (Désoxyribonucléase)

➤ Principe :

Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'acide désoxyribonucléique grâce à une enzyme : la DNase. La mise en évidence chez *Staphylococcus* d'une DNase thermostable suffit à l'identification de l'espèce *aureus*.

La réaction catalysée est la suivante :



Les deux réactifs utilisés pour la recherche d'une DNase sont :

- ✓ L'acide chlorhydrique HCl 1mol/dm³, qui précipite les molécules d'ADN combinées à des protéines.
- ✓ Le bleu de toluidine qui se colore en rose en présence des composés d'hydrolyse de l'ADN.

Technique à l'acide chlorhydrique [154]

- Les bactéries sontensemencées en réalisant une strie à la surface de la gélose. Il est possible d'étudier simultanément 4 ou 5 souches différentes sur une même boîte de Pétrie.
- Il faut ensuite incuber à 37°C jusqu'à obtention d'une culture suffisante, en générale le temps est 24 h.
- Après l'incubation, inonder la surface du milieu avec quelques millilitres d'HCl et réaspirer l'excès.
- Attendre 10 à 15 min.

➤ Lecture :

La lecture se fait sur un fond noir. Lorsque l'ADN est hydrolysé, un halo clair est visible au pourtour de la strie, alors que l'ADN, sous l'action de l'acide, est à l'origine d'un précipité blanchâtre.

➤ Technique au bleu de toluidine [153]

- ✓ A partir d'une culture en bouillon cœur cerveau, placer un aliquote de la culture agitée de 24h au bain d'eau à 100°C durant 15 min.
- ✓ Percer le milieu de cupules à l'aide d'un emporte-pièce ou d'une pipette Pasteur.
- ✓ Prélever une goutte de bouillon bouilli et la mettre dans une cupule.
- ✓ Faire de même avec une goutte de bouillon non chauffé.
- ✓ Incuber durant 4h à 37°C et faire une première lecture puis une deuxième à 24h.

➤ Lecture :

Rose : plus d'ADN donc **DNase+**

Bleu : ADN toujours présent, **pas de DNase**.

4.4. Identification par plaque API STAPH (Biomérieux)

❖ Principe

Les différents tests de la galerie se présentent sous forme déshydratée. Leur reconstitution se fait lors de l'addition à chaque tube, d'API STAPH mediumensemencé avec la souche à étudier. Celle-ci doit être cultivée au préalable sur un milieu approprié. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs [152].

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

5. Analyse statistique

Les données ont été encodées et analysées avec le logiciel Epi Info 2000 version 3.5.3 (2011).

6. Antibiogramme

6.1. Principe

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les normes préconisées par le *Clinical Laboratory Standard institute (CLSI)*.

Les disques d'antibiotiques utilisés (Sanofi Diagnostique Pasteur, France) :

Pénicilline (10 UI) ; Imipenème (10µg) ; Oxacilline (1µg) ; Céfazoline (30µg) ; Streptomycine (30µg) ; Gentamicine (10µg) ; Tobramycine (10µg), Erythromycine (15µg) ; Clindamycine (2µg) ; Fosfomycine (50µg) ; Rifampicine (15µg) ; Clindamycine (2µg); et Vancomycine (30µg) ;

Un contrôle de qualité a été réalisé au préalable de chaque antibiogramme en utilisant des souches de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Escherichia coli* ATCC 25922.

6.2. Technique

- Repiquer une colonie à partir d'une culture pure développée de 24 heures sur un milieu d'isolement dans 10 ml de bouillon Cœur Cerveau (BHIB).
- Incuber à 37° C pendant 6 à 7 heures sous agitation.
- Grâce à un colorimètre, mesurer la densité optique de l'inoculum et ajuster en ajoutant la culture s'il est très faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est très fort, la densité optique doit être entre 0.08 et 0.1 à 625 nm équivalente à 10⁸UFC /ml (0,5 Mc Farland).
- Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de l'inoculum, tremper un écouvillon dans cette suspension.
- Presser fermement contre la paroi intérieure du tube juste au-dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever le liquide excédentaire.
- Étaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application afin d'obtenir une distribution égale de l'inoculum.
- Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri dès que possible à moins de 15 minutes après l'ensemencement à l'aide d'une pince stérile.
- Incuber les boîtes à 35°c pendant 18 heures [155].

6.3. Lecture et interprétation

Mesurer avec précision les diamètres de chaque zone d'inhibition en mm, et classer la bactérie dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante (annexe I).

7. Test iodométrique

En pratique, la détection seulement quantitative des différentes β -lactamases, se base sur la modification du cycle β -lactame ouvert, s'accompagnant de la formation d'acide pénicilloïque pour les pénicillines, et céphalosporoïque pour les céphalosporines.

▪ Principe

C'est une technique de détection rapide de β -lactamases, basée sur la réduction du complexe iodo-amidon par l'acide pénicilloïque libéré après l'action de la β -lactamase ainsi le déplacement de l'iode en iodure entraîne une décoloration de l'amidon [156].

✓ *Souche à étudier*

Préparer une suspension dense d'une culture de 18 à 24 heures.

✓ *Réactifs*

- Solution tampon phosphate à 0,5 M
- Solution iodée
- Solution de benzylpénicilline (100 ml) à 5 mg/l.

▪ *Préparation du gel*

- ✓ Chauffer à ébullition la solution d'amidon jusqu'à dissolution complète, une fois devenue limpide, la ramener à 55°C au bain marie.
- ✓ Ajouter 2ml de la solution iodée et 3ml de la solution de benzyl pénicilline à 5mg/ml et bien homogénéiser.
- ✓ Couler alors le mélange gélosé dans les boîtes de pétri.
- ✓ Après solidification du gel, faire des puits de 4 à 5mm de diamètre séparés de 3cm environ.
- ✓ Remplir les puits avec 20 μ l de la suspension bactérienne à étudier.

▪ Lecture et interprétation

- ✓ *Réaction positive* : en 20 à 30 mn, une zone décolorée apparaît autour des puits, qui tend à s'agrandir avec le temps. La lecture se fait alors après 3 à 4 heures.
- ✓ *Réaction négative* : aucune modification de la coloration, même après 24 h d'incubation.

8. Recherche de la résistance de *Staphylococcus aureus* à la méticilline (ou Oxacilline):

Le dépistage du *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline a été réalisé sur milieu Mueller Hinton additionné de 4% de NaCl et contenant une concentration finale d'Oxacilline de 6µg/ml selon les lignes directrices du (CLSI) [155].

➤ Technique

▪ Préparation de la solution d'oxacilline

Diluer 6mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis faire une solution au 1/10ème.

- Mettre 2ml de cette solution dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre, ajouter 18 ml de gélose Muller Hinton additionnée de 4% de NaCl, mélanger en faisant des mouvements rotatoires.
- ❖ **Inoculum** : A partir d'une culture pure de 18 h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- ❖ Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- ❖ Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit équivalente à 0,5 Mac Farland, ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- ❖ L'ensemencement se fait par spots, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne.
- ❖ Les souches de références doivent être testées dans les mêmes conditions.
- ❖ Incuber 24 h à 37°C.

- ❖ **Lecture** : la culture de plus d'une colonie de la souche test suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toute les β -lactamines.

9. Recherche de la résistance de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine (Test de Screening)

➤ Principe

Le test de screening de la résistance à la vancomycine [*Vancomycin Agar Screen Test* (VAST)] est recommandé par le CLSI, il représente un test de criblage des souches en présence d'une concentration connue de vancomycine égale à $6\mu\text{g/ml}$ [155], [157].

➤ Technique

- ❖ Préparer une solution de vancomycine dans de l'eau distillée stérile à une concentration de $60\mu\text{g/ml}$.
- ❖ Mettre 2 ml de la solution dans une boîte de pétri et ajouter 18 ml de la gélose Cœur Cerveau (BHIA) en surfusion en mélangeant par des mouvements rotatoires.
- ❖ Couler une boîte témoin (20 ml du milieu cœur cerveau sans antibiotique).
- ❖ A partir d'une culture pure de 18 h sur milieu solide, repiquer une colonie isolée dans 5 ml de bouillon cœur cerveau.
- ❖ Incuber 4 à 6 h à 37°C sous agitation.
- ❖ Mesurer et ajuster la densité optique de l'inoculum entre 0.08 et 0.1 équivalente à 0.5 Mac-Farland ou 10^8 UFC/ml , lue à 625 nm.
- ❖ L'ensemencement : Déposer en spots 10 μl de la suspension bactérienne.
- ❖ incuber 24 heures à $35^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$.
- ❖ deux souches de références ont été testées dans les mêmes conditions :
 - 1- témoin négatif : *S. aureus* ATCC 25923 **sensible**.
 - 2- Témoin positif : *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 **résistante**.

➤ Interprétation

- Absence de colonies : la souche est dite « sensible ».
- Présence de deux colonies ou plus, la souche est dite « résistante ».

10. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Deux méthodes ont été réalisées pour déterminer les CMI.

10.1 Technique de dilution sur milieu gélosé

Cette technique consiste à déposer des suspensions bactériennes calibrées sur des milieux contenant des concentrations croissantes d'antibiotique. La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Cette étude a été réalisée en respectant les directives éditées par le « *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 'CASFM'* » [43].

➤ Technique

a- Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique (tableau 13)

- Diluer 51,20 mg de poudre de l'antibiotique à tester dans 100 ml de solvant approprié pour obtenir une concentration de 5120 µg/ml (solution-mère).
- Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 dans le solvant approprié jusqu'à la concentration de 1,25 µg/ml.
- Répartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la plus forte concentration.
- Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires.
- La dilution obtenue ($1/10^{\text{ème}}$) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées.
- Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.
- Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

b- Préparation de l'inoculum bactérien

- Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 MF, ce qui correspond à 10^8 CFU/ml. Utiliser l'eau physiologique à 0,9 % pour la préparation de la suspension directe à partir d'une culture jeune de la bactérie à tester.
- Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose, 2 μ l soit 10^4 UFC par spots de 5 à 8 mm.

c- Incubation

- Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn).
- Renverser les boîtes et incuber à $37^\circ\text{C} \pm 2$ pendant 16-20 heures.

d- Lecture des CMI

- Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive.
- Noter la CMI (la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible).
- Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

Tableau 13 : Schéma pour la préparation des solutions d'antibiotique

Etape	Concentration (µg/ml)	ATB (ml)	Diluant (ml)	Concentration intermédiaire	Concentration finale (µg/ml)
Solution mère	5120			5120	512
1	5120	2	2	2560	256
2	5120	1	3	1280	128
3	5120	1	7	640	64
4	640	2	2	320	32
5	640	1	3	160	16
6	640	1	7	80	8
7	80	2	2	40	4
8	80	1	3	20	2
9	80	1	7	10	1
10	10	2	2	5	0,5
11	10	1	3	2,5	0,25
12	10	1	7	1,25	0,125

10.2. Détermination de la CMI sur microplaque [155]

Des microplaques à fond en U (plaque à microtitration) sont utilisables pour la détermination des CMI. Une plaque à 96 puits permet la détermination des CMI de 08 souches vis-à-vis d'un même type d'antibiotique.

➤ Technique

a- Gamme des dilutions d'antibiotique :

- Dissoudre 20,48 mg de poudre titrée d'antibiotique dans le volume adéquat du solvant correspondant, pour obtenir une solution mère à 2048 µg/ml.
- Réaliser à partir de la solution mère, les dilutions semi-logarithmiques de raison 2 ; on obtient des concentrations intermédiaires allant de 512 µg/ml à 0,063 µg/ml.
- Répartir dans chaque puits les dilutions d'antibiotiques, à raison de 25 µl par cupule

b- Préparation de l'inoculum bactérien

- Préparer à partir d'une culture pure de bactéries en phase exponentielle, une suspension de la souche à étudier, dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile (ou de bouillon MH), d'une densité équivalente à 0,5 MF (10^8 CFU/ml)
- Diluer la suspension d'opacité 0,5 MF au $1/10^{\text{ème}}$.
- Inoculer les cupules de la microplaque avec 5 µl de suspension bactérienne afin d'obtenir une concentration finale de $5 \cdot 10^5$ CFU/ml.
- Pour chaque série, réaliser un témoin sans antibiotique.

c- Distribution du milieu MH

- Répartir dans les cupules 70µl de bouillon MH, la concentration d'antibiotique obtenue va ainsi de 512 µg/ml à 0.5 µg/ml.

d- Incubation

- Recouvrir la plaque d'un couvercle en plastique et incuber.

e- Lecture

- Lire l'opacité ou le dépôt au fond de la cupule.
- La CMI de chaque antibiotique correspond à la 1^{ère} cupule 'claire' (pas de culture par rapport au témoin sans antibiotique).
- Comparer la CMI lue, aux CMI critiques correspondantes à chaque antibiotique testé

11. Etude des associations d'antibiotiques par la technique d'échiquier sur microplaque [156]

Cette technique permet de quantifier l'interaction de deux antibiotiques A et B en réalisant l'association d'une gamme de concentrations de A et de B représentant une progression géométrique à raison de 2.

Différentes combinaisons ont été testées (tableau 14), toutes ces molécules sont sous forme injectable et font partie de l'arsenal thérapeutique disponible au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen.

Tableau 14 : Les différentes combinaisons testées

Antibiotique A	Antibiotique B
Gentamycine	Vancomycine
Imipenème	Gentamycine
Pipéracilline	Vancomycine
Imipenème	Vancomycine
Oxacilline	Vancomycine
Céfotaxime	Vancomycine

➤ **Technique**

- 1- Préparer les concentrations des antibiotiques A et B dans 10 ml de bouillon Muller-Hinton.
- 2- La première colonne et la dernière rangée de la microplaque sont prévues pour la détermination de la CMI de chaque antibiotique seul (CMI microplaque).
- 3- Distribuer horizontalement 50 µl de chaque concentration de A.
- 4- Distribuer verticalement 50 µl de chaque concentration de B.
- 5- Ajouter 90 µl de bouillon MH.

➤ **Préparation de l'inoculum bactérien**

- Préparer à partir d'une culture pure de bactéries en phase exponentielle, une suspension de la souche à étudier, dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile (ou de bouillon MH), d'une densité équivalente à 0,5 MF (10^8 CFU/ml)
 - Diluer la suspension d'opacité 0,5 MF au $1/10^{\text{ème}}$.
 - Inoculer les cupules de la microplaque avec 10 µl de suspension bactérienne afin d'obtenir une concentration finale de $5 \cdot 10^5$ CFU/ml.
- 6- Incuber à 37°C.

➤ **Lecture**

Après 18 heures d'incubation, noter dans chaque rangée le premier tube, contenant A+B, sans croissance visible.

-Déterminer, dans chacun de ces puits les fractions de concentration inhibitrice FIC de A et de B soit FIC A et FIC B.

- la valeur de l'association est quantifiée par l'index FIC :

FIC A : correspond au rapport de la CMI de A avec B sur la CMI de A seul,

FIC B : correspond au rapport de la CMI de B avec A sur la CMI de B seul.

$$\mathbf{FIC = FIC A + FIC B = \frac{CMI\ de\ A\ avec\ B}{CMI\ de\ A\ seul} + \frac{CMI\ de\ B\ avec\ A}{CMI\ de\ B\ seul}}$$

- Si l'index FIC est inférieur à 0,75, l'association est *synergique*,
- Elle est *additive* s'il est équivalent à 1,
- *Indifférente* s'il est compris entre 1 et 2 et
- *Antagoniste* s'il est supérieur à 2.

12. Extraction de l'ADN génomique

12.1 Protocole du Kit NucleoSpin[®] tissu

L'extraction a été réalisée par le **Kit NucleoSpin[®] tissu (MACHEREY-NIGEL)**, qui a été conçu pour une préparation rapide et efficace d'un ADN génomique hautement pure.

❖ Composition du Kit :

- Tampon T1 : Lyse
- Tampon B1 : **Préparation de B3**
- Tampon B2 : **B1 + B2 → B3**
- Tampon BW : **Lavage**
- Tampon B5 : **Lavage**
- Tampon BE : **Elution**
- Protéinase K : **Lyse cellulaire**

❖ Préparation de l'échantillon

- Préparer une culture bactérienne de 24 h des souches à étudier.
- Selon la densité de la culture, prendre jusqu'à 1 ml de culture bactérienne.
- Centrifuger jusqu'à 1 ml de culture pendant 5 min à 8000g, enlever le surnageant.

❖ Pré-lyse de l'échantillon

- Reprendre le culot dans 180 µl de tampon T1 par pipetage de haut en bas. Ajouter 25 µl de protéinase K, et vortexer vigoureusement
- Ajouter 20 µl une solution de RNase à 20 mg / ml, et incuber pendant 5 min supplémentaire à température ambiante.
- Incuber à 56° jusqu'à ce que la lyse complète soit obtenue (au moins 1-3 h). Vortexer de temps en temps pendant l'incubation ou utiliser un incubateur agitateur.
- Les échantillons peuvent être aussi bien incubés pendant la nuit.

❖ Lyse de l'échantillon

- Vortexer les échantillons, puis ajouter 200 µl de tampon B3, vortexer vigoureusement et incuber à 70°C pendant 10 min.
- Vortexer brièvement.

❖ Ajuster les conditions de liaison à l'ADN

- Ajouter 210 µl d'éthanol (96 - 100%) à l'échantillon et vortexer vigoureusement.
- Après addition de l'éthanol, un précipité filamenteux peut devenir visible, ceci n'affectera pas l'isolement de l'ADN.

❖ Liaison de l'ADN

- Placer chaque échantillon sur les colonnes NucleoSpin® tissue (tube de collecte).
- Centrifuger 1 min à 11000 x g.
- Jeter l'effluent et placer la colonne dans le tube de prélèvement.

- Si l'échantillon n'est pas tiré complètement à travers la matrice, répéter l'étape de centrifugation à 11000 x g. Jeter l'effluent

❖ Laver la membrane de silice

Premier lavage :

- Ajouter 500 µl de tampon BW.
- Centrifuger 1 min à 11000xg.
- Jeter l'éluat et placer la colonne dans le tube de prélèvement.

Deuxième lavage :

- Ajouter 600 µl de tampon B5 dans la colonne et centrifuger 1 min à 11000xg.
- Jeter l'éluat et placer la colonne dans le tube collecteur.

❖ Sécher la membrane de silice

- Centrifuger la colonne pendant 1 min à 11000 x g. L'éthanol résiduel est éliminé au cours de cette étape.

❖ Éluer l'ADN très pur

- Placer la colonne NucleoSpin Tissue ® dans un microtube de 1,5 ml, et ajouter 100 µl de Tampon BE préchauffé 70 ° C.
- Incuber à température ambiante pendant 1 min.
- Centrifuger 1 min à 11000 x g.

12.2 Protocole du kit DNeasy Tissue (QIAGEN)

Ce protocole a concerné les souches de références utilisées dans la PCR comme témoin positif et négatif du gène *vanA*.

- ✓ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (témoin négatif : absence du gène *Van A*)
- ✓ *Enterococcus hirae* ATCC 10541 (témoin négatif : absence du gène *Van A*)
- ✓ *Enterococcus faecalis* (témoin positif : présence du gène *Van A*)
- ✓ *Enterococcus faecium* (témoin positif : présence du gène *Van A*)

Tableau 15 : Réactifs supplémentaires nécessaires

Tampon pour lyse enzymatique ; ajouter le lysozyme juste avant utilisation
20 mM de Tris·Cl, pH 8,0
2 mM d'EDTA
Triton® X-100 1,2%
20 mg/ml de lysozyme

1. A partir d'une culture de 24h en bouillon Luria-Bertani, Culotter les bactéries (max. 2×10^9) en les centrifugeant 10 min à $5000 \times g$
2. Reprendre le culot bactérien dans 180 μ l de tampon enzymatique.
3. Incuber au moins 30 min à 37°C.
4. Ajouter dans l'ordre 25 μ l de Protéinase K (10 mg/l), et 200 μ l de tampon AL.
5. Mélanger en vortexant.
6. Incuber 30 min à 70°C.
7. Ajouter 200 μ l d'éthanol (96 à 100%) à l'échantillon et mélanger en vortexant. Il est important de mélanger vigoureusement l'échantillon, le tampon AL, et l'éthanol afin d'obtenir une solution homogène.
8. Déposer le mélange de l'étape 4 dans la colonne DNeasy placée dans le tube de collecte de 2 ml ; centrifuger 1 min à 6000xg. Jeter l'effluent et le tube collecteur.
9. Placer la colonne DNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 ml, ajouter 500 μ l de tampon AW1 et centrifuger 1 min à 6000xg. Jeter l'effluent et le tube collecteur.
10. Placer la colonne DNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 ml, ajouter 500 μ l de tampon AW2 et centrifuger 3 min à vitesse maximale afin de sécher la membrane DNeasy. Cette centrifugation permet d'éviter de contaminer l'éluât par des résidus d'éthanol. Jeter l'effluent et le tube collecteur.
11. Placer la colonne DNeasy dans un tube propre de 1,5 ml et l'élué en déposant 200 μ l de tampon AE directement sur la membrane.

12. Incuber 1min à température ambiante puis centrifuger 1 min à 6000xg. L'élution avec 100 µl au lieu de 200 µl augmente la concentration finale en ADN mais réduit également le rendement total.

13. Dosage de l'ADN

Ce dosage permet à la fois de quantifier la concentration d'ADN, et de contrôler de sa pureté.

➤ Technique

L'ADN est dosé par mesure de la densité optique à 260 nm, en utilisant un *Nano photomètre*® Paerl de type *IMPLEN*. Une unité d'absorbance à 260 nm à une solution de 50 µg/µl d'ADN double brin, l'ADN est considéré comme pure lorsque le rapport A260/A280 est supérieur à **1,8**.

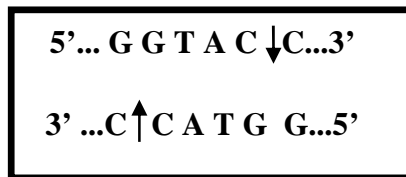
- Choisir le Lid adapté (Lid 50 [0,7µl - 4µl]).
- Vérifier le nano spectrophotomètre : il s'agit de mesurer la concentration d'une solution d'ADN plasmidique PMAFP™ Green-N, de concentration bien connue (de l'ordre de 500 µg/µl).
- Le tampon d'élution TE (2µl) du kit d'extraction DNeasy, a servi de témoin blanc.
- Mesurer la densité des extraits d'ADN et déterminer la concentration par conversion en µg/µl.

14. Digestion enzymatique

Cette technique a été réalisée dans le but d'explorer le polymorphisme génétique des extraits d'ADN provenant de 10 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du CHU de Tlemcen.

Pour cette fin, nous avons opté pour une enzyme de restriction de type KpnI (*Fermentas Fast digest*), cette enzyme est caractérisée par une digestion rapide (5-15 min), et une action sur l'ADN plasmidique, l'ADN génomique, et les produits PCR.

Le site de restriction de l'enzyme est :



➤ **Technique**

- Réaliser un mix pour 11 tubes (tableau 16)

Tableau 16 : Préparation d'un mix de digestion

	Volume par tube (µL)	Mix 11 tubes (µl)
H₂O (milliQ)	30	330
Tampon fast-digest 10X	5	55
Enzyme KpnI (Fermentas Fast digest)	5	55

- A partir du mélange mix, répartir dans chaque tube 40 µl.
- Ajouter 10 µl de chaque extrait génomique dans chacun des 10 tubes.
- Mélanger délicatement en tournant les tubes vers le bas.
- Incuber dans un bain-marie à 37°C pendant 5 minutes.
- Inactiver l'enzyme par une élévation de la température à 80°C pendant 5 minutes.

➤ **Migration sur gel d'agarose à 1% (*Invitrogène*)**

a- Préparation du gel

- Peser 1g d'agarose dans un Erlen de 500 ml.
- Ajouter 100 ml de tampon TAE 10X (10 fois concentré).
- Faire fondre ce mélange au four à micro-ondes, en arrêtant le four de temps en temps pour agiter. Le mélange doit être parfaitement transparent, sans particules d'agarose.
- Ajuster le volume à 100 ml.
- Ajouter 7 µl de la solution de bromure d'éthidium à 10 mg/ml.
- Homogénéiser.
- Couler dans l'appareil sans faire de bulles.
- Placer le peigne.

- Laisser refroidir.

b- Solution de dépôt

- Déposer dans le premier puits 7 μ l de marqueur à 1Kb (figure 13).

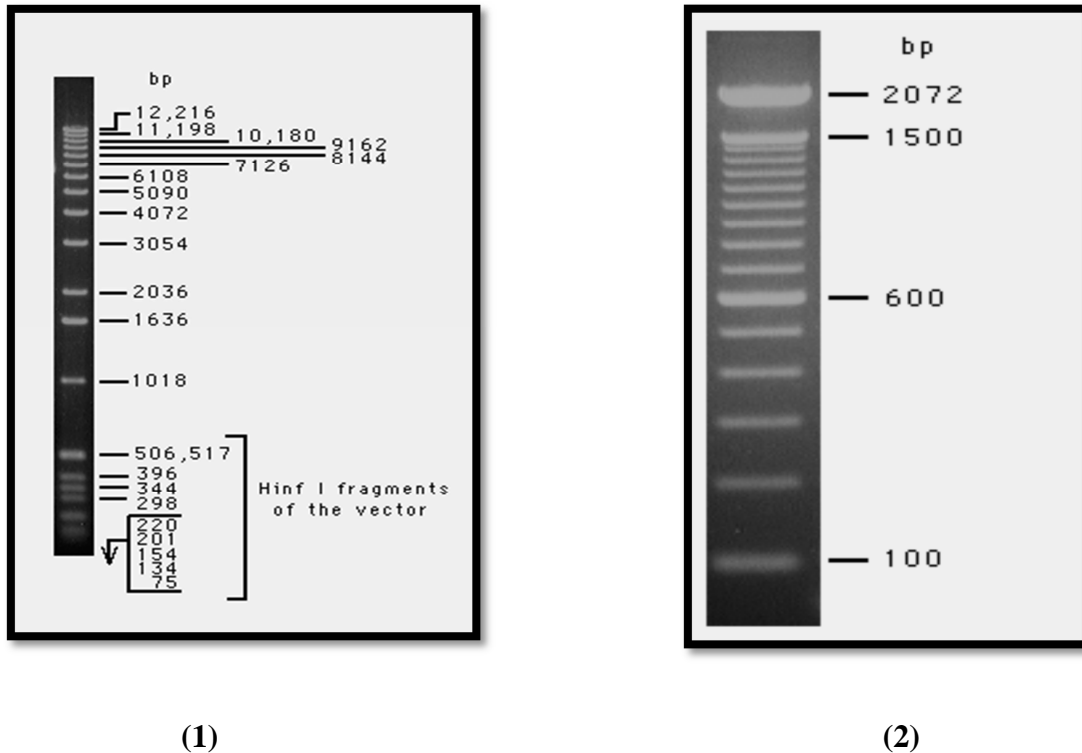


Figure 13 : Marqueur 1 Kb (1), et 100pb (2) (Invitrogen)

- Déposer 15 μ l d'ADN digéré plus 3 μ l de Bleu de bromophéno 6X.
- Laisser migrer en actionnant le générateur à 120 Volt.

c- Visualisation

Lorsque la migration est suffisante, arrêter le générateur, ôter le gel de la cuve, et le déposer sur un trans-illuminateur pour une visualisation.

15. Recherche et amplification du gène de résistance à la vancomycine *vanA*

15.1. Electrophorèse des souches de références

Une électrophorèse des extraits génomiques de quatre souches de références : deux témoins positifs possédant le gène *vanA*, et deux témoins négatifs (tableau 12), a été réalisée en délivrant au fond des puits d'un gel d'agarose à 1%, une solution de dépôt contenant pour chaque échantillon : **2 μ l d'extrait d'ADN+ 2 μ l de bleu de bromophéno 6X+ 8 μ l d'eau milliQ.**

Pour la recherche des gènes de résistance à la vancomycine, plusieurs couples d'amorces ont été utilisés (tableau 17) :

Tableau 17 : Propriétés des couples d'amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance à la vancomycine

Nom de l'amorce	Séquence	Gène de résistance
EA1s	GGGAAAACGACAATTGC	<i>vanA</i>
EA2as	GTACAATGCGGCCGTTA	<i>vanA</i>
EB3s	ACGGAATGGGAAGCCGA	<i>vanB</i>
EB4as	TGCACCCGATTTTCGTTT	<i>vanB</i>
ED1s	TGTGGGATGCGATATTCAA	<i>vanC</i>
ED2as	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA	<i>vanC</i>
EE1s	TGTGGTATCGGAGCTGCAG	<i>vanE</i>
EE2as	ATAGTTTAGCTGGTAAC	<i>vanE</i>
EG1s	CGGCATCCGCTGTTTTTGA	<i>vanG</i>
EG2as	GAACGATAGACCAATGCCTT	<i>vanG</i>

15.2. Amplification du gène *vanA* des souches de références [158]

La détection du gène *vanA* a été réalisée dans un volume de 50 µl [un appareil *Gene Amp (PCR system 9700)*], suivie d'une révélation sur gel d'agarose (TAE 1X, 1% *Invitrogen*) + 7µl de bromure d'Ethidium (10 mg/ml, *Sigma*). Les échantillons ont été colorés en utilisant le bleu de bromophénol.

- Les amorces utilisées sont :

EA1 (+) : GGGAAAACGACAATTGC

EA2 (-) : GTACAATGCGGCCGTTA

Celles-ci ont été diluées : 20µl dans 80µl d'eau.

- La *Taq* polymérase utilisée est de type *Invitrogen*, elle est constituée d'un seul dipeptide avec un poids moléculaire d'environ 94 KDa. La *taq* DNA polymérase est stable à la chaleur et pourra synthétiser à des températures élevées l'ADN simple brin à partir de modèles, en présence d'une amorce.

➤ **Préparation du mix (tableau 18)**

Tableau 18 : Préparation du mix pour l'amplification des quatre souches de références (témoins positif et négatif)

Produit	Volume pour un tube (µl)	Mix pour 5 tubes (µl)
Eau	27,8	139
TP 10X taq	5	25
MgCl ₂	1,5	7,5
dxTP	8	40
Oligo sens EA1	2,5	12,5
Oligo anti-sens EA2	2,5	12,5
Taq polymérase	0,7	3,5
Volume total	48	240

- A partir du mélange mix, répartir dans chaque tube 48 µl.
- Ajouter 2 µl de chaque extrait génomique dans chacun des 4 tubes.
- Mettre dans l'appareil PCR.
- La taille du fragment amplifié par le couple EA1-EA2 : 732 pb.
- Réaliser 30 cycles PCR (tableau 19).

Tableau 19 : Etapes du cycle de l'amplification

Etape	Temperature (°C)	Temps
Dénaturation	94,00	15 sec
Hybridation	52,00	30 sec
Elongation	72,00	1min 30sec

- **Dépôt sur gel d'agarose à 1%**
 - déposer dans le premier puits le marqueur **1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen™)**.
 - déposer le mélange (4µl de produits PCR + 6µl d'eau milliQ+2µl de bleu 6X).
 - après migration, visualiser sur un trans-illuminateur.

En vue d'optimiser le résultat de l'amplification, certains changements ont été effectués :

1. Augmentation de la température d'hybridation de deux degrés Celsius (soit 54°C).
2. Augmentation du nombre de cycles à 40 cycles.
3. Augmentation du volume d'ADN à amplifier à 5µl.
4. La *Taq* polymérase a été également changée, en utilisant une *Taq* polymérase de marque *Fermentas (Dream Taq DNA polymerase)*
5. Solution de dépôt : déposer 3µl de marqueur 1Kb, 100pb,
6. Pour les souches de références, déposer 7µl de produits PCR+ 2µl de bleu de bromophénol 6X.

15.3. Recherche du gène *vanA* chez les souches de *Staphylococcus aureus*

La détection du gène *vanA* a été réalisée par PCR chez 10 souches de *S. aureus*. Pour cette fin, un mix pour quinze tubes (10 souches de *S. aureus* + les quatre souches de référence) a été préparé comme suit (tableau 20).

Tableau 20 : Préparation du mix pour 15 tubes

Produit	Volume pour un tube (µl)	Mix pour 15 tubes (µl)	Concentration finale
H₂O milliQ	26,75	401,25	-
TP10X	5	75	1X
dxtp	8	120	0,4mM
Amorce EA1s	2,5	37,5	0,5mM
Amorce EA2as	2,5	37,5	0,5mM
<i>Dream Taq Fermentas</i>	0,25	3,75	1,25 U

- A partir du mélange mix, répartir dans chaque tube 45 µl.
- Ajouter 5 µl de chaque extrait génomique dans chacun des 15 tubes.
- Mettre dans l'appareil PCR.
- La taille du fragment amplifié par le couple EA1-EA2 est **732 pb**.
- Réaliser 40 cycles PCR comme suit (figure 14).

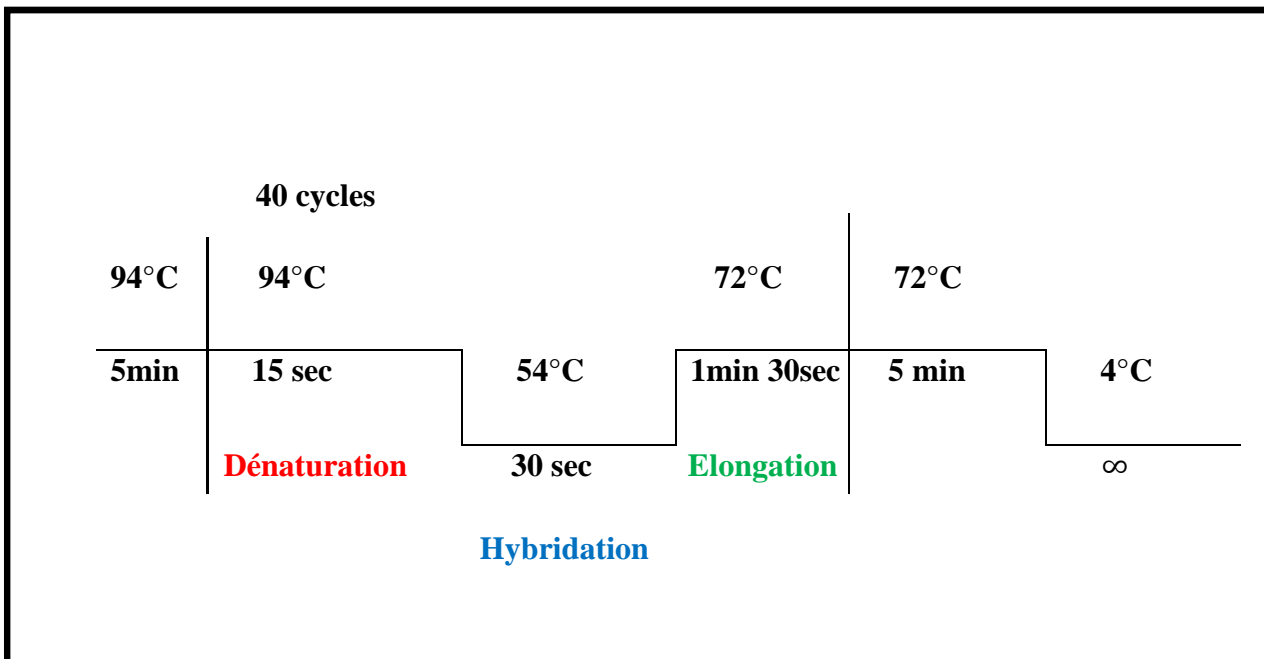


Figure 14 : Schéma représentatif du programme de la PCR réalisée

- **Dépôt sur gel d'agarose à 1%**
 - Déposer dans le premier puits 10 µl de marqueur **1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen™)**.
 - Déposer le mélange (20µl de produits PCR+ 2µl de bleu 6X).
 - Après migration sur gel d'agarose à 1% avec le tampon TAE 1X (120 V), visualiser sur un trans-illuminateur (chambre noire).

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Epidémiologie

Un total de 220 souches de *Staphylococcus aureus* a été isolé entre le 16 avril 2007 et le 11 mai 2009, à partir de 560 prélèvements superficiels réalisés par écouvillonnage sur des plaies post opératoires de deux cent quatre-vingt-sept (287) patients ayant contracté une infection nosocomiale dans le service de chirurgie générale du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (658 lits). En dehors des patients provenant du service d'urgence, ce service recrute un nombre important de patients pour des interventions que l'on peut assimiler à la chirurgie générale comportant plusieurs types de chirurgie : chirurgie viscérale ; chirurgie vasculaire ; chirurgie endocrinienne ; proctologique et même parfois gynécologique.

Ont été inclus dans ce travail, les patients ayant subi une intervention chirurgicale et présentant une suppuration après un délai de quarante-huit heures qui suivent l'opération. Le caractère nosocomial de ces infections a été confirmé par les cliniciens en se basant sur des signes cliniques : douleur à la palpation, rougeur, augmentation de la chaleur locale, écoulement anormal. Ces patients n'ont pas reçu d'antibiothérapie préopératoire à visée prophylactique.

L'Age moyen des patients était de 48 ± 15 ans, avec un taux de 65% de femme et 35% d'homme, (figure 15). Le sexe constitue un facteur de risque d'infection : Oberholzer et al. (2000) [159], ont montré que pour les polytraumatisés, l'incidence des infections était augmentée de façon significative chez l'homme (30,7 % versus 17,0 %).

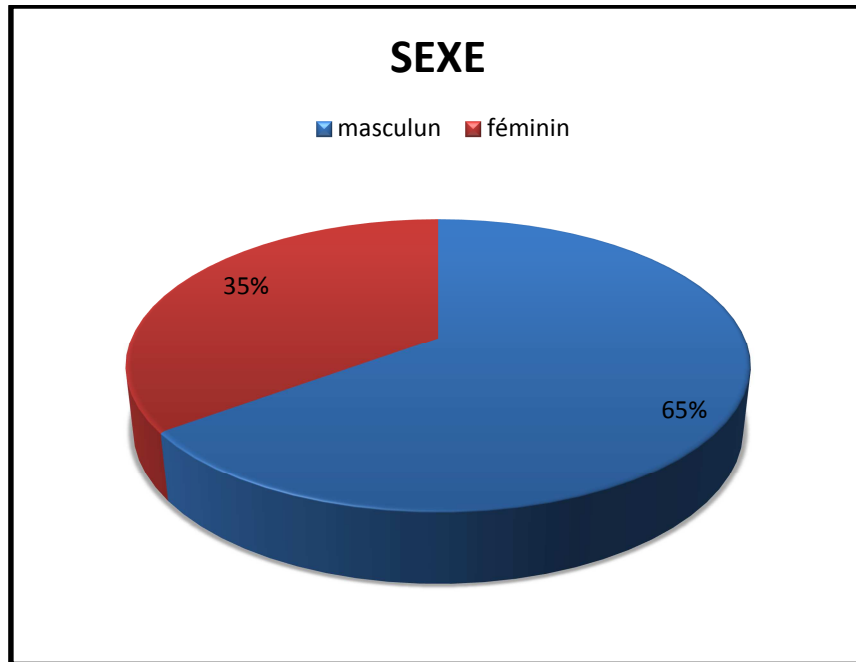


Figure 15 : Distribution de l'infection du site opératoire selon le sexe dans le service de chirurgie

Les résultats montrent que la durée moyenne de séjour est de l'ordre de 9.25 J et que 69% de la population ayant contracté une infection nosocomiales a séjourné moins de 10 jours. Cette période d'hospitalisation a été prolongée chez 3% des patients pour atteindre une durée entre 2 et 6 mois (figure 16).

Parmi les composantes de cette période d'hospitalisation, la durée de séjour préopératoire reste le premier facteur de risque préopératoire. Ainsi, l'on pourra assister à une augmentation du taux d'infection pariétale en chirurgie propre allant de 1% en cas de séjour préopératoire inférieur à 1 jour à 4% en cas de séjour préopératoire supérieur à 14 jours [160].

Dans une étude américaine publiée en 2004, les facteurs de risque de survenue d'une ISO à SARM chez des patients opérés en majorité en unité d'orthopédie-traumatologie étaient le transfert secondaire en unité de poursuite de soins et de rééducation, une durée de l'antibiothérapie postopératoire de plus de 24 heures, la présence d'un drainage du site opéré plus de 24 heures et un séjour hospitalier de plus de 3 jours après l'intervention [161].

Résultats et Discussion

Le patient polytraumatisé hospitalisé a un risque élevé de développer une infection nosocomiale. La susceptibilité des polytraumatisés aux infections varie selon le mécanisme et la gravité du traumatisme : elle croît avec la durée de séjour à l'hôpital, et une hospitalisation au-delà de 3 à 5 jours constitue un facteur de morbidité, voire de mortalité important.

Concernant les conséquences de la survenue d'une ISO, on peut estimer qu'elle occasionne un allongement du séjour de 2 semaines en moyenne, que le taux d'hospitalisations itératives est doublé et que le surcoût engendré est de 300 % [162].

La durée de séjour peut être modifiée selon la résistance du microorganisme responsable de l'infection. Engemann et al en 2003 ont signalé une augmentation de 1.2 fois dans la durée de séjour et des frais d'hospitalisation chez les patients ayant subi une infection du site opératoire causée par des SARM par rapport à celle due à des SASM [163].

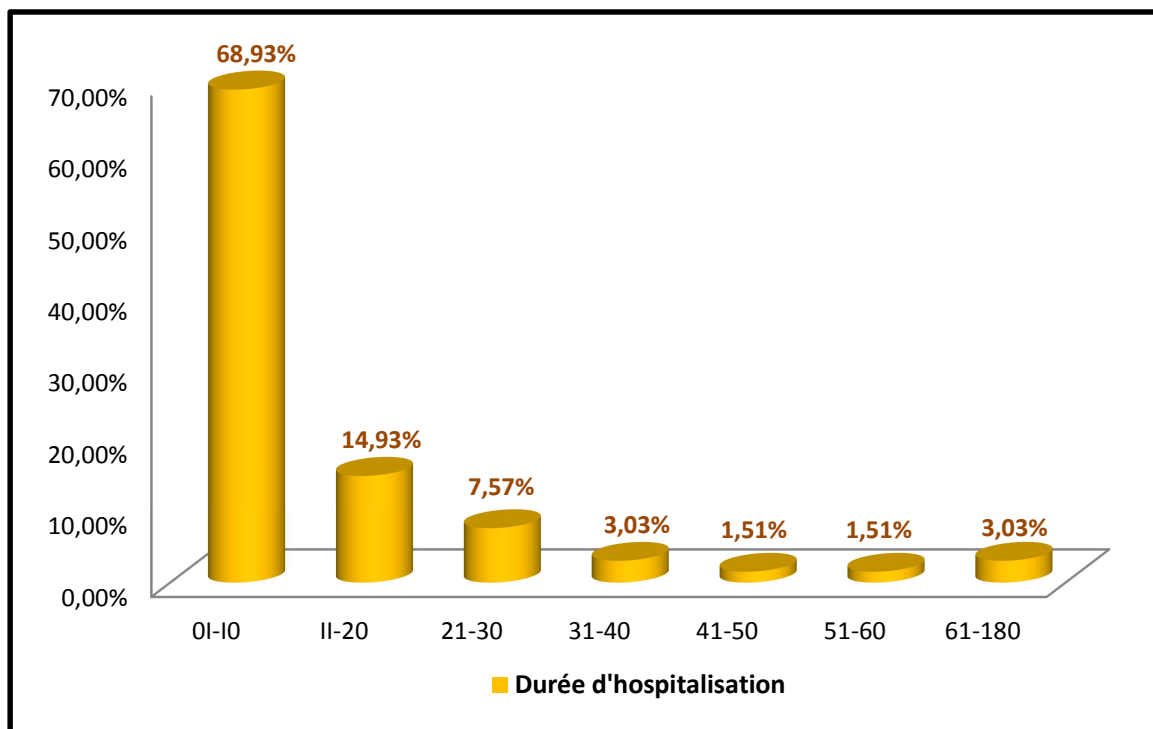


Figure 16 : Représentation graphique de la durée d'hospitalisation des patients infectés par *Staphylococcus aureus*

Résultats et Discussion

Le risque infectieux dépend aussi de nombreux facteurs dont certains de ces facteurs sont liés au patient (flore cutanée, portage de staphylocoque résistant à la méticilline (SARM), pathologie sous-jacente, infection préexistante,...), d'autres sont liés à l'environnement direct du patient (bloc opératoire, qualité de l'air et de l'eau, hygiène de l'équipe chirurgicale et des soignants, matériel...). Le polytraumatisé présente un risque particulier d'infection en raison de l'atteinte traumatique multiple, des lésions viscérales, et des gestes invasifs nécessaires à la ressuscitation [160].

L'un des facteurs de risque liés aux patients est l'âge. Nos résultats montrent que la majorité des patients ayant une infection nosocomiale (40%) ont une tranche d'âge entre 41 et 60 ans, et qu'une proportion non négligeable (23%) a un âge supérieur à 61 ans (Figure 17), . Ce résultat ne concorde pas avec la littérature qui souligne que l'âge est un facteur de risque infectieux aux deux extrémités de la vie, avant 1 an et après 75 ans ou ceci peut aisément s'expliquer par l'importance de la morbidité chez le sujet âgé [164].

Dans une étude prospective conduite sur 2 ans, Bochicchio et al (2001) [165], ont montré que le risque relatif d'infection nosocomiale chez le polytraumatisé était multiplié par 2,2 chez les patients de plus de 65 ans.

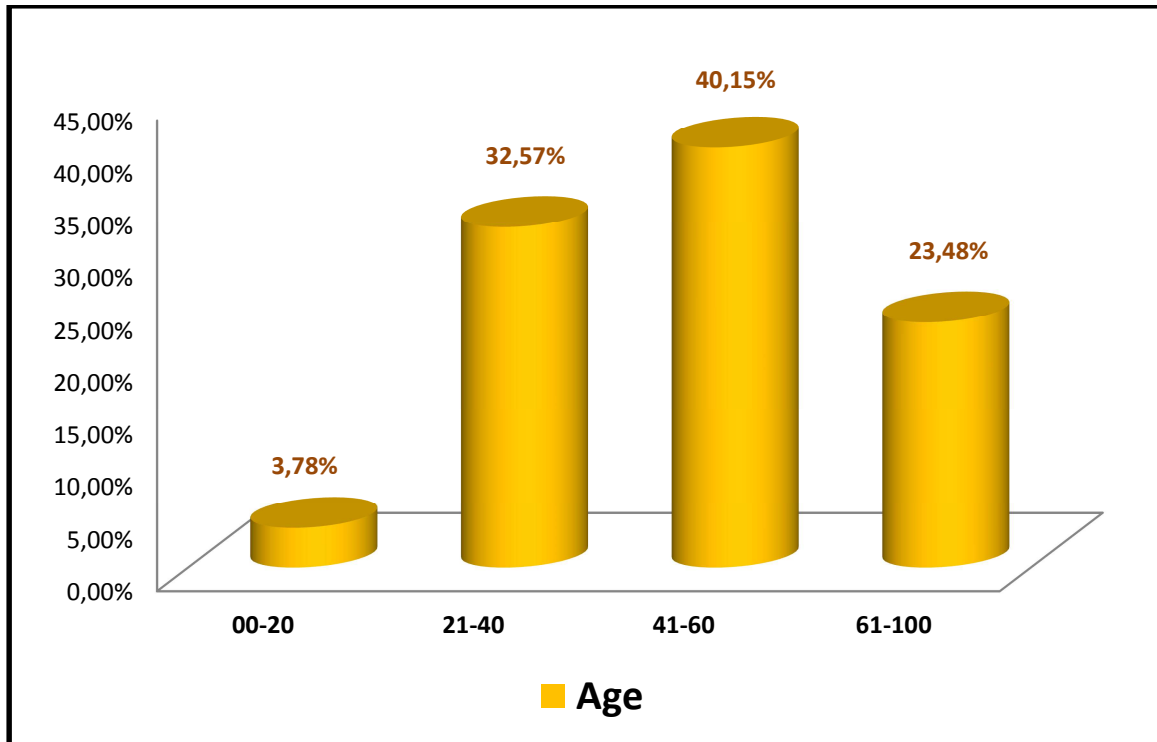


Figure 17 : Répartition des infections nosocomiales (ISO) dues à *S. aureus* dans le service de chirurgie selon l'âge

Différents schémas thérapeutiques ont été utilisés pour traiter ces infections nosocomiales dues à *S. aureus*. La majorité de ces traitements (47%) est composée de l'association de deux antibiotiques (figure 18) suivie, de la monothérapie qui a concerné 42% des cas, la trithérapie a été également sollicitée pour traiter 11% de ces infections. La molécule la plus utilisée en monothérapie a été la Céfazoline (73%) alors qu'en bithérapie l'association Céfazoline/gentamycine a été la plus employée par les prescripteurs avec un taux de 60%. Le choix de ces traitements n'a pas été basé sur des résultats d'un antibiogramme ou des données de sensibilité spécifique à ce service.

Résultats et Discussion

Les protocoles optimisant la prescription d'antibiotiques devraient :

- Limiter les prescriptions d'antibiotiques non nécessaires (empiriques, prophylactiques, thérapeutiques) et non indiquées cliniquement ;
- Considérer que l'utilisation d'une stratégie de prescription d'antibiotiques peut limiter l'émergence de résistance.
- Considérer que l'utilisation d'un grand choix « hétérogène » d'antibiotiques peut aider à la réalisation d'une stratégie potentiellement efficace sur l'émergence des résistances ;
- Prescrire un antibiotique selon l'analyse de l'écologie du moment ;
- Utiliser des protocoles d'hygiène optimisant le contrôle des infections ;
- Reconnaître et isoler les patients colonisés ou infectés par des bactéries multirésistantes.
- Limiter la durée du traitement, et établir une rotation des antibiotiques peuvent effectivement apporter une solution.
- Accepter de changer ses habitudes, se maintenir au courant des avis d'experts, établir un protocole réfléchi [166].

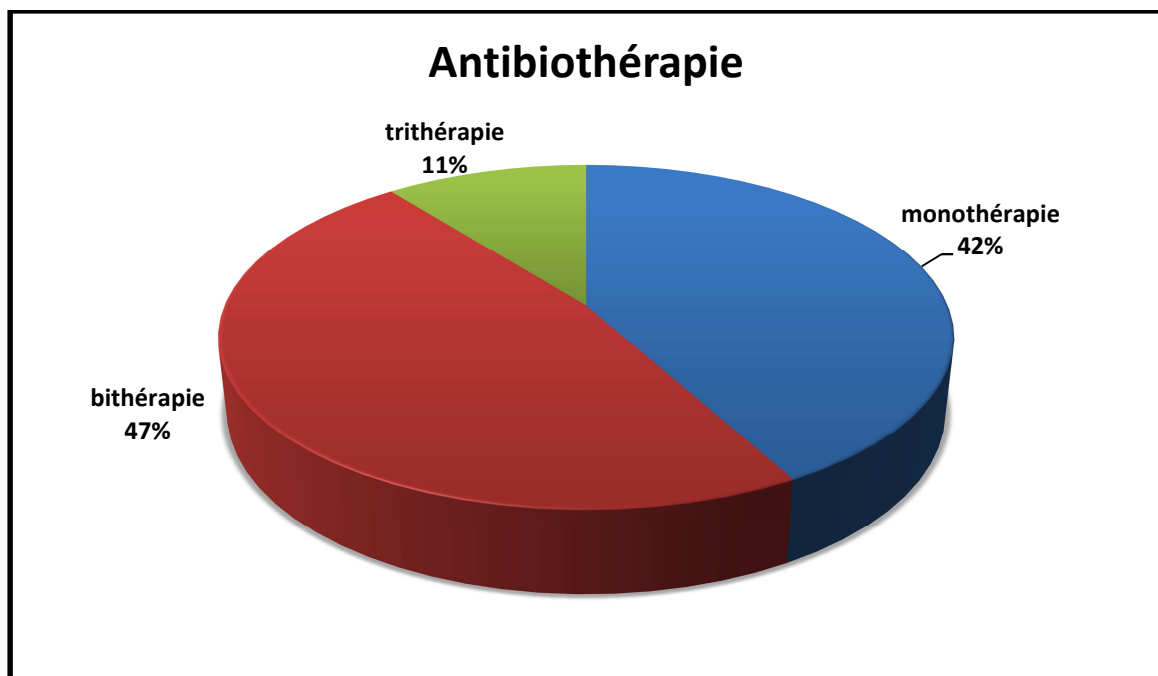


Figure 18 : Les types d'antibiothérapie utilisés pour le traitement des patients infectés

Résultats et Discussion

L'incidence des SARM pour 1000 journées d'hospitalisation dans le service de chirurgie de Tlemcen, a été de l'ordre de 0.5 pour 1000 journées d'hospitalisation. Ce taux est relativement plus important que celui signalé en Tunisie (0.3 pour 1000 journées d'hospitalisation) [167]. En France, dans le centre hospitalier de Pontoise, l'incidence pour 1000 journées d'hospitalisation a diminué respectivement de 0,92 ; 0,74 ; 0,67 pour 1999, 2000 et 2001 [168].

Dans une autre étude l'incidence des bactériémies nosocomiales à SARM peut être estimée à 0,04 épisodes pour 1000 jours d'hospitalisation. Elle est cependant très variable selon le service considéré, de 0,01 épisode pour 1000 jours d'hospitalisation en psychiatrie à 2,48 épisodes pour 1000 jours d'hospitalisation en réanimation [169, 170].

2. Identification

L'étude bactériologique nous a permis d'isoler 220 souches qui se sont avérées des cocci à Gram positif, immobiles, aéro-anaérobies facultatives possédant une catalase, une coagulase et une thermonucléase; ce qui a permis de les assigner à l'espèce *Staphylococcus aureus*. Cette identification a révélé une prédominance de cette espèce par rapport aux staphylocoques à coagulase négative (figure 19).

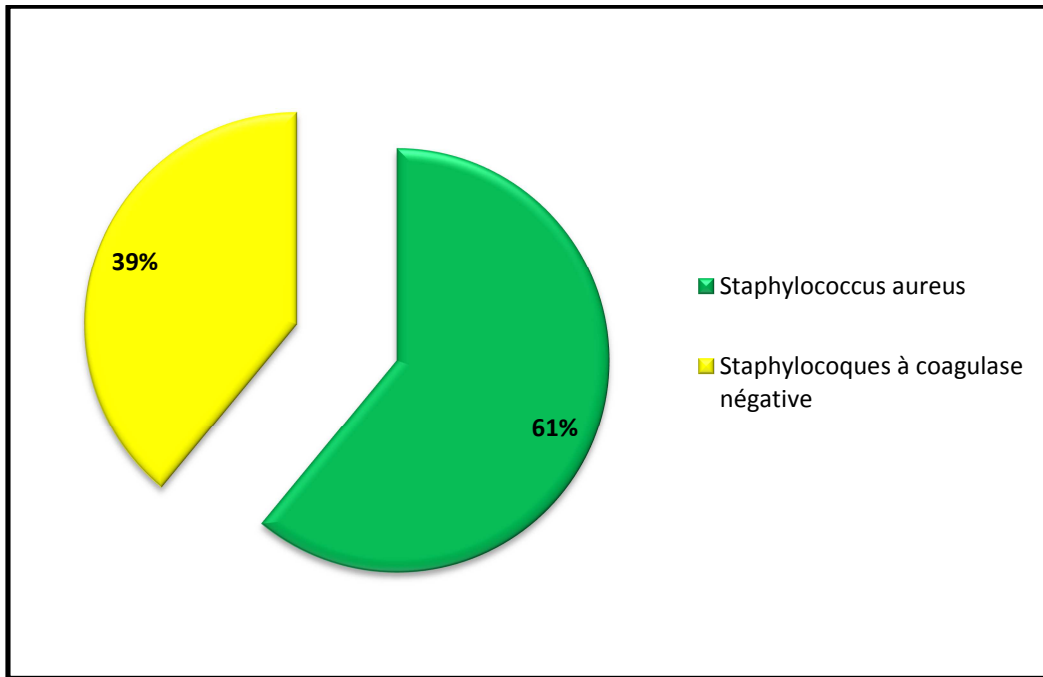


Figure 19 : Pourcentage de *Staphylococcus aureus* au service de Chirurgie

Ces résultats ont été confirmés par le système API Staph qui a révélé la prédominance du biotype 6736153 chez 83% des souches, suivis du biotype 6336153 chez 17 % (figure 20).

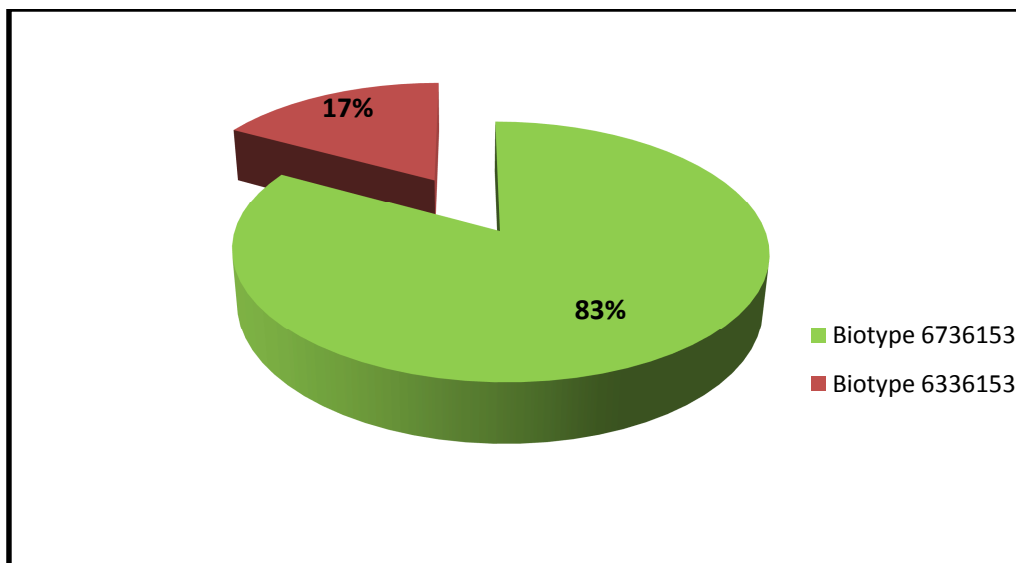


Figure 20 : Distribution des biotypes chez les souches de *Staphylococcus aureus* isolées du service de chirurgie

3. Antibiogramme

L'histogramme I (figure 21) illustre le caractère résistant des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) présentant une résistance croisée aux β -lactamines qui s'étend à d'autres familles d'antibiotiques réduisant ainsi le choix des molécules thérapeutiques. La totalité des SARM isolées dans ce travail s'est avérée également résistante à la pénicilline, l'amoxicilline, la Céfoxitine et l'imipenème.

Ces souches ont également échappé à l'action des aminoglycosides traduisant des taux de résistance allant de 61.8% pour la streptomycine jusqu'à 30.3% pour la gentamicine. Ce phénomène n'a pas épargné la kanamycine et la tobramycine.

L'érythromycine et la clindamycine ont présenté respectivement des pourcentages de résistance de 55.75% et de 12.12%. Par ailleurs, La fosfomycine et la rifampicine ont été pondéralement plus actives exprimant des taux de sensibilité dépassant les 90%.

Bien que la vancomycine ait été hautement active sur les souches testées, trois isolats ont pu exprimer une résistance à cette molécule.

Contrairement aux SARM, les souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline ont affiché un niveau de sensibilité plus important avec tout de même une résistance vis-à-vis de la pénicilline et de la streptomycine.

3.1. Les bêtalactamines

La production de β -lactamase par le test iodométrique a été retrouvée chez 93% des souches testées, ce qui pourrait expliquer la résistance à certaines β -lactamines comme la pénicilline ou l'amoxicilline. Selon daurel et leclercq (2008) [127], la sensibilité des souches de *S. aureus* sauvages aux bêtalactamines varie selon la molécule, 80 % à 95 % des souches produisent une pénicillinase qui inactive la pénicilline G et l'ampicilline, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*. Une hyperproduction de pénicillinase peut être responsable de l'hydrolyse des pénicillines M, céphalosporines et des carbapénèmes. Les inhibiteurs de pénicillinase restaurent *in vitro* l'activité des β -lactamines sur ces souches [123]. Bien que le test iodométrique soit un test qualitatif, certaines souches se sont démarquées par une vitesse et une importante production de β -lactamases. Ce qui pourrait expliquer en partie la résistance des souches testées à l'imipenème, la Céfoxitine et même à l'oxacilline.

Le gène de la pénicillinase appartient à un transposon, localisé le plus souvent sur un large plasmide, qui peut porter également des gènes de résistance à d'autres antibiotiques (aminosides, macrolides), à des antiseptiques ou à des métaux lourds [171]. Il peut également s'intégrer dans le chromosome [172]. Les bêtalactamines ont pour cibles différentes enzymes (« protéines liant les pénicillines » ou PLP) impliquées dans la formation du peptidoglycane. La fixation des bêtalactamines à ces cibles entraîne l'absence de polymérisation du peptidoglycane et secondairement la synthèse par la bactérie d'autolysines conduisant à sa mort. Les bêtalactamines sont donc bactéricides [127].

En Afrique, la prévalence des SARM évolue dans les deux sens, elle a été de l'ordre de 36% au Bénin en 2006 [173], avant de diminuer en 2008 enregistrant un taux de 14.5% [174]. Alors qu'en Algérie le taux de SARM ne cesse d'augmenter allant de 4.5% en 2002 [47], pour atteindre 33.2% en 2004 [175], et 45% en 2006 [176]. Les résultats de notre étude situent la prévalence des SARM dans le service de chirurgie du CHU de Tlemcen à un taux de 52%.

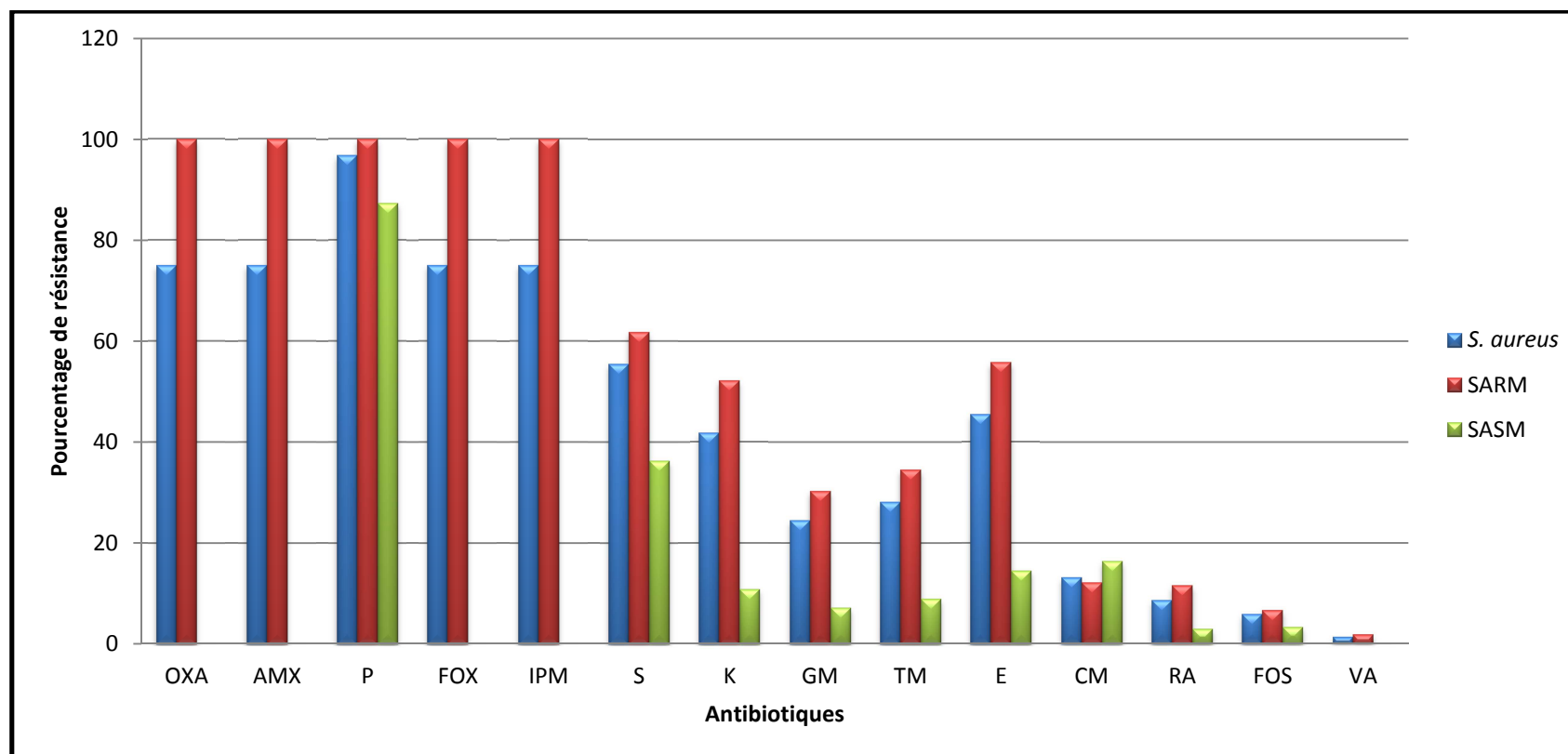


Figure 21 : Pourcentage de résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus*

OX : oxacilline, AMX : Amoxicilline ; P : Pénicilline, FOX : Céfoxitine, IPM : Imipenème, S : Streptomycine, K : Kanamycine, GM : Gentamycine, TM : Tobramycine, E : Erythromycine, CM : Clindamycine, RA : Rifampicine, FOS : Fosfomycine, VA : Vancomycine ; SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ; SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline.

Ce pourcentage bien qu'inférieur à ce qui a été signalé aux Etats Unis et au Sénégal avec respectivement 70% et 72% [177, 178], se rapproche de celui enregistré en Egypte en 2004 [179], mais il demeure nettement supérieur à ce qui a été rapporté en Côte d'ivoire, Maroc et Tunisie avec respectivement 25% ,19.3%, et 15.3% [180, 181, 167]. En effet les données peuvent changer en fonction du temps d'un service à l'autre [182].

En France, l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) a enregistré entre 1998 et 2003 un taux de SARM de 35% [183], ce pourcentage ne cesse de diminuer [45], grâce à certaines mesures préventives des infections nosocomiales telles que l'isolement des patients et l'utilisation généralisée de solutions hydro alcooliques et [184].

Notre taux de SARM relativement important pourrait être expliqué d'une part, par l'accumulation de ces souches de plusieurs mécanismes de résistance (la flexibilité génétique de *Staphylococcus aureus* lui a permis l'acquisition de plusieurs mécanismes) [66], et d'autre part, par une pression de sélection générée par une utilisation irrationnelle des antibiotiques [185].

3.2. Aminosides

L'analyse des résultats de la résistance à la gentamicine des SARM en Algérie montre que son taux est globalement en progression : il était de l'ordre de 7% en 2006 [175]. Actuellement, il se situe à 34% [186]. Dans les pays voisins la tendance est également à la hausse, elle était à 16.4% au Maroc [187], et a atteint 59% en 2007 [188], pour revenir à 53.84 % en 2009 [181]. En Tunisie la résistance des SARM se stabilise autour de 18% [187, 189, 167].

Au Liban, la résistance des SARM aux aminosides a été représentée par deux pourcentages relativement éloignés ; ainsi paradoxalement à un faible taux (6.25%) vis-à-vis de la gentamicine et de la tobramycine, Hamze et al, en 2003 [190], ont signalé un pourcentage élevé (90%) pour l'amikacine et la kanamycine.

Résultats et Discussion

Contrairement à cette évolution, en France la fréquence de sensibilité des souches de SARM aux antibiotiques surveillés (gentamicine, tobramycine, érythromycine et fluoroquinolones) a augmenté depuis 1998. Par exemple, la fréquence de sensibilité à la gentamicine est passée de 61 % en 1998 à près de 90 % en 2002 [183].

L'augmentation du niveau de sensibilité à la gentamicine chez les SARM isolés en Europe au cours de la période 2000-2007, pourrait être en partie expliquée par l'apparition d'un clone, nommé ST22 qui se distingue par sa sensibilité à la gentamicine.

Bien que notre taux de SARM résistant à la tobramycine soit nettement supérieur à celui signalé par ouchenane en 2011 (6.25%) [191], il se rapproche du taux enregistré en Tunisie par Saidani *et al.*, en (2006) [189].

La lecture interprétative de l'antibiogramme a permis de détecter trois phénotypes de résistance aux aminosides, avec une prédominance du phénotype KGT (45%) qui a pour origine une enzyme bifonctionnelle ayant à la fois une action de phosphorylation et d'acétylation (Tableau 21) [123]. Ce taux demeure plus important que celui signalé par Hamze et al (2003) [190].

Cette augmentation pourrait être expliquée par une possible évolution vers la résistance. En effet, les souches de *S. aureus* qui sont résistantes aux pénicillines du groupe M, sont connues par leur habilité à résister à plusieurs autres groupes d'antibiotiques et tout particulièrement aux aminoglycosides, aux cyclines, à l'acide fusidique, aux fluoroquinolones, et même aux glycopeptides [192, 193].

Tableau 21: Phénotypes de résistance aux aminosides

Phénotype observé	Mécanisme déduit	Pourcentage (%)
Km R,Tm S,Gm S	Aminosides phosphotransférase APH^I(3')-	39.21
Km R,Tm R,Gm S	Aminosides nucléotidyltransferase ANT (4')	15.68
Km R,Tm R,Gm R	Aminosides phosphotransférase- -Aminosides nucléotidyltransferase AAC (6')-APH (2')	45.09

Km : Kanamycine ; Tm : Tobramycine ; Gm : Gentamycine ; R : Résistant ; S : sensible

3.3. Clindamycine

Avec un taux de résistance à 12.12% la clindamycine a été pondéralement active sur les souches testées. En effet, cette molécule est dotée de propriétés anti staphylococciques intéressantes, notamment ses capacités de diffusion tissulaire, ou son absence d'induction de la production d'une méthylase. Néanmoins son utilisation est déconseillée en raison d'un risque élevé de sélection de mutants constitutifs [54].

3.4. Erythromycine

Les résultats montrent que la résistance à la Clindamycine a été souvent associée à celle de l'érythromycine ce qui nous incite à penser au même mécanisme de résistance (MLSgB) qui confère la résistance aux Macrolides, Lincosamides et Streptogramine [123]. Notre taux de résistance à l'érythromycine (55.75%) a été relativement plus important que celui signalé par (25%) [173, 189]. La résistance à cette molécule chez les SARM varie d'un pays à un autre allant de 10% en 2003 au Liban jusqu'à 93.9% aux Etats Unis [190, 194].

3.5. Rifampicine

La Rifampicine a été efficace contre les souches de SARM isolées, puisque 11% seulement d'entre elles ont pu résister à cette molécule (figure 21). En Algérie, son utilisation a été relativement délaissée au profit de nouvelles molécules ; ce qui pourrait expliquer la restauration de son efficacité. Cette molécule qui peut réduire de façon significative le portage nasal [195], est connue pour son efficacité sur le SARM. Ces données corroborent avec les taux signalés par Benjemaa *et al* (2004) [187], Ramdani-Bougoussa *et al* (2006) [175], Mastouri *et al* (2006) [167], qui ont trouvé respectivement des taux de 6.7%, 2.3%, et 2%.

3.6. Fosfomycine

L'efficacité de la fosfomycine a été remarquable, puisque cette molécule a été active sur 93% des SARM. A l'étranger, les données sont similaires et convergent souvent vers une stabilité. En effet, en Tunisie le taux de résistance des SARM à la fosfomycine était de l'ordre de 6.66% en 2004 [187], il a atteint 7% en 2009 (Mastouri *et al* 2006) [167]. Ces taux sont légèrement inférieurs à ce qui a été enregistré par Picot *et al* en (2009) (9%) [196].

L'ensemble de ces données reflète l'état de multi résistance des souches de SARM isolées dans cette étude selon siegel *et al* (2007) [46], les microorganismes multirésistants se définissent comme des microorganismes qui résistent à une ou plusieurs classes d'antibiotiques. D'autres auteurs rapportent qu'il n'existe pas de définition de la multi résistance universellement acceptée, et qualifient un microorganisme de multirésistant, lorsqu'il résiste à au moins trois molécules d'antibiotiques [191]. Par exemple, la résistance à l'enrofloxacin, la marbofloxacin, la difloxacin et l'oribofloxacin peut être assimilée à la résistance à la même et unique classe d'antibiotiques (fluoroquinolones). L'accumulation de plusieurs mécanismes de résistance vis-à-vis de différentes molécules d'antibiotiques pourrait être l'origine de la multirésistance [197].

3.7. vancomycine

La vancomycine représente toujours actuellement l'un des traitements les plus probants face aux infections à *S. aureus* résistant à la méticilline, mais cette utilisation systématique a conduit à l'émergence de souches *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) évoquant une crainte de développer un aspect épidémique.

L'antibiogramme a révélé que trois souches se sont distinguées par leur résistance à la vancomycine. Ces souches qui pourraient être les premières isolées en Algérie, ont très bien toléré 6µg/ml de cet antibiotique dans le test de screening. Cette concordance avec les profils d'antibiogrammes a été encore une fois appuyée par les résultats des CMI et se caractérisent par une fluctuation allant de (16µg/ml) jusqu'à, (128µg/ml) (Tableau 22).

La première souche (Sa1) été isolée à partir d'un prélèvement d'une plaie infectée chez un patient diabétique présentant un abcès au dos avec une CMI élevée atteignant les 128 µg/ml. La deuxième souche (Sa2), résistante à la vancomycine avec une CMI importante atteignant 64 µg/ml a été isolée à partir d'un malade ayant une péritonite par perforation d'ulcère. Une troisième souche a été isolée (Sa3)(CMI 16µg/ml) à partir d'un patient ayant subi une cholécystectomie.

Résultats et Discussion

Mastouri *et al* (2006) [167], ont isolé deux souches ayant une sensibilité diminuée : la souche M4 (CMI vancomycine = 6 µg/ml, CMI teicoplanine = 32 µg/ml) a été isolée d'hémoculture chez un malade qui est décédé d'une septicémie à SARM après échec thérapeutique suite à un traitement par la teicoplanine. La souche M41 (CMI vancomycine = 4 µg/ml, CMI teicoplanine = 24µg/ml) a été isolée de cathéter chez un malade ayant évolué favorablement sous traitement à la vancomycine. Contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, leur CMI de l'oxacilline étaient >256µg/ml. Certains auteurs estiment que le coût biologique d'une résistance est l'un des facteurs qui détermine sa stabilité et sa diffusion, ainsi la dissémination dans le monde des clones de SARM a été associée à leur capacité à compenser le coût biologique nécessaire pour abriter la Cassettes *mec* (*SCCmec*) [198].

La délétion du gène *mecA* chez certaines souches de *S. aureus* ayant une résistance intermédiaire à la vancomycine suggère que la résistance simultanée aux β-lactamines et aux glycopeptides est un fardeau pour cette espèce [199].

Hiramatsu *et al* en (1997) [94], ont isolé une souche SARM clinique, désignée Mu3, chez un patient ayant une pneumonie postopératoire qui a été insensible au traitement à la vancomycine. Bien que l'état du patient s'est amélioré au cours des huit premiers jours, la situation s'est dégradée entre le neuvième et le douzième jour ; ce qui a incité les cliniciens à changer le schéma thérapeutique en appliquant avec succès une combinaison composée de l'arbécacine et l'association sulbactam/ampicilline. Malgré que les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine vis-à-vis de cette souche (Mu3) étaient respectivement de l'ordre de 2µg/ml et de 8µg/ml en utilisant la technique de microdilution, l'analyse des sous population a révélé une résistance hétérogène à la vancomycine. Ainsi respectivement 0,01%, 0,003%, et 0,0001% de la population de MU3 a exprimé des CMI de 2 µg/ml ,4 µg/ml et 8µg/ml.

Environ 6 mois plus tard, une autre souche de SARM, désignée MU50, isolée par la même équipe chez un bébé de 4 mois qui a développé une surinfection de plaie postopératoire causée par un SARM qui a résisté au traitement à la vancomycine enregistrant des CMI de 8 µg/ml pour la vancomycine et 16 µg/ml pour la teicoplanine. La souche partage avec MU3 exactement le même profil électrophorétique en champ pulsé (PFGE), mais présente un niveau de résistance nettement supérieur. Ainsi, 100% de la population a pu croître dans 4 µg / ml de vancomycine, et 0,0001% de la population dans 12 µg / ml de vancomycine.

Résultats et Discussion

Après l'isolement de MU50 au Japon, deux souches VRSA ont été isolées aux Etats-Unis: une du Michigan, et l'autre du New Jersey; les deux étaient des SARM. La première souche (966) a été isolée chez un patient qui avait été traité à long terme (six mois) pour une péritonite associée à des SARM. La deuxième souche VRSA (992), était isolée à partir d'un patient qui avait été traité pendant six mois avec de multiples recours à la vancomycine. Dans les deux cas, ces souches VRSA semblent avoir développé cette résistance au cours de la longue période de traitement. Kleinschmidt *et al* en (2005) [200], ont signalé que l'exposition in vitro des SARM communautaires à la vancomycine augmente modestement sa CMI vis-à-vis de cette molécule.

L'augmentation des SARM dans les hôpitaux algériens a favorisé l'intégration des glycopeptides dans les schémas thérapeutiques permettant l'élimination de ces souches, ces molécules étaient jusqu'à ces dernières années préservées du phénomène de résistance. D'autres auteurs ont déclaré que l'augmentation des SARM a accompagné l'utilisation abusive de la vancomycine [177].

Découvertes en 1997 au Japon, la sensibilité réduite à la vancomycine a rapidement conquis le monde avec des cas signalés aux Etats Unis, en Europe et en Afrique [92, 86, 201]. Cette dissémination a été accompagnée d'une évolution terminologique ; ainsi, les souches qualifiées autrefois de sensibles selon le *National Committee for Clinical Laboratory Standards* se sont retrouvées assignées à la classe des intermédiaires (VISA) selon les nouvelles lignes directrices du CASFM CLSI [86].

Ce changement a touché logiquement les autres catégories (intermédiaire, résistante). Cette situation s'est compliquée par l'émergence en parallèle d'une sous population exprimant une résistance hétérogène à la vancomycine responsable d'un certain nombre d'échecs thérapeutiques [94]. Dans ce cas, une faible proportion réagit différemment et développe une CMI deux à huit fois plus importante que la cellule parentale. Ce qui constitue une étape préalable à l'acquisition de la résistance homogène à la vancomycine (VISA).

- Différence entre résistance hétérogène et homogène

En comparant la souche MU3 qui présente une résistance hétérogène à la vancomycine et la souche MU50 caractérisée par une résistance homogène à la vancomycine, cette dernière en plus d'une augmentation des sous unités du peptidoglycane et d'une polymérisation du peptidoglycane néo synthétisé, présente une production de sous unités non aminées.

- 1 augmentation de l'offre de sous unité du peptidoglycane.
- 2 augmentations de la polymérisation du peptidoglycane néo synthétisé.
- 3 augmentation de la production de sous unité non aminé.

1+2 permettent d'atteindre un niveau de résistance hétérogène (MU3)

1+2+3 sont nécessaires à l'expression d'un haut niveau de résistance (MU50).

Concernant ces souches certaines données traduisent l'existence de nombreuses modifications de la paroi bactérienne avec notamment une production accrue de précurseurs du peptidoglycane [202, 109].

La microscopie électronique à transmission a permis de révéler chez les souches SARV, une épaisseur anormale due à l'accumulation des couches de peptidoglycane donc production de plus de muréines et par conséquent, il faut une grande concentration de vancomycine pour saturer tous les monomères de muréine. Cet épaissement accompagné d'un phénomène de colmatage des mailles du peptidoglycane suite au piégeage de la vancomycine entrave la pénétration accrue de cette molécule [66].

Pour être actifs, les glycopeptides doivent traverser le peptidoglycane et se lier à leurs cibles sur la membrane cytoplasmique. Or, plus le nombre de cellules de *S. aureus* est important dans un site d'infections, plus les molécules de Vancomycine seront séquestrées entraînant une espèce de solubilisation de l'antibiotique et par conséquent, une diminution de sa concentration tissulaire [104].

Pour prévenir cette situation, les cliniciens procèdent à l'élimination chirurgicale des abcès et le drainage du pus [66], certaines de leurs procédures invasives nécessitent l'utilisation de cathéters, ce qui constitue un problème supplémentaire car le staphylocoque doré est connue pour sa production de biofilm. La première souche de *S. aureus* résistante à haut niveau à la vancomycine (VRSA), a été isolée à partir du site de sortie d'un cathéter chez un patient dans un établissement au Michigan [203].

Résultats et Discussion

Selon Stahl 2010 [204], le problème récurrent qui se pose aux cliniciens dans ces situations est de savoir quand instituer un traitement antibiotique dont le spectre couvre *S. aureus* méti-R (SARM) ? Cette question est particulièrement critique chez les patients neutropéniques : d'emblée ? À titre empirique ? Après documentation bactériologique ? En cas d'échec d'une antibiothérapie de première ligne ? Dans ses recommandations de 2007, l'ECIL (*European Conference on Infections in Leukemia*) préconise l'introduction immédiate d'un glycopeptide en cas de sepsis sévère ou de choc septique et en cas d'infection de la peau et des tissus mous (ce qui inclut les infections associées aux CVC). La société Américaine des maladies infectieuses (IDSA) recommande en 2002 l'utilisation de vancomycine chez les patients neutropéniques en cas de suspicion de présence de SARM à un taux élevé. Il est à noter que les concentrations nécessaires pour éradiquer des microorganismes insérés dans un biofilm doivent être cent à mille fois supérieures à celles utilisées contre les bactéries à l'état planctonique. En raison de la limitation de diffusion des molécules d'antibiotiques, de la répulsion électrostatique, du phénomène de séquestration et de la quiescence des bactéries. Afin de contrecarrer cette situation, les cliniciens optent pour la réalisation d'un verrou d'antibiotique dans la lumière du cathéter, en utilisant une concentration de la vancomycine qui doit être 1000 fois supérieure à la CMI. [204]

D'autres chercheurs ont réussi à fixer par liaison covalente la vancomycine sur une surface en titane, cet attachement permet à la fois d'empêcher la formation de biofilm tout en éradiquant la prolifération bactérienne de manière prolongée [205].

Mais, l'infection causée par des souches de VRSA est réfractaire au traitement à la vancomycine. Les principaux facteurs à l'origine d'une efficacité limitée sont les suivants:

- 1) Concentrations limitée dans les tissus atteignables de la vancomycine,
- 2) Son faible activité bactéricide contre les staphylocoques, et
- 3) Son inefficacité

La Vancomycine inhibe la transglycosylation en se liant aux substrats de la transglycosylase, c'est à dire le (peptidoglycane naissant et la chaîne lipidique monomère précurseur située sur la muréine dans la surface extérieure de la membrane cytoplasmique. Elle se lie à ces cibles vitales en reconnaissant les extrémités de D-alanyl-D-alanine dipeptidiques des muuropeptides. Cependant, le problème est que ces séquences D-alanyl-D-alanine dipeptidiques sont également présentes en quantité énorme dans la paroi cellulaire préexistante, et elles sont donc des cibles non vitales de la vancomycine [206].

Résultats et Discussion

Dans le processus de transpeptidation de la paroi cellulaire, la transpeptidase (PBP) réduit le nombre de Terminaison D-alanyl-D-alanine, un par un, en coupant le D-alanine terminal et reliant l'avant-dernier D-alanine à l'extrémité du groupe aminé libre d'un pont penta glycine transversale. De cette façon, le peptidoglycane de *S. aureus* devient fortement réticulé. Mais, encore 20-30% des sous unités peptidoglycane (disaccharide peptides) conservent des terminaison D-alanyl-D-alanine [207]. Si 20% des sous-unités sont non réticulées, chaque cellule de *S. aureus* possède 6×10^6 sites de liaison à la vancomycine [208]. Puis, il s'en suit que 10^8 cellules de *S. aureus* se lient à 1,44 μ g de vancomycine permettant ainsi sa séquestration au niveau de la membrane cellulaire. Étant donné que ces sites extrêmement abondants dans la paroi cellulaire sont de fausses cibles, une quantité énorme de vancomycine est consommée sans présenter d'activité antimicrobienne. Ainsi, l'efficacité antimicrobienne de la vancomycine diminue lors de sa séquestration dans les mailles du peptidoglycane [109]. 60% des couches du peptidoglycane de la paroi de Mu50 sont saturées par un excès de vancomycine, une carence en glutamine et une activité accrue de la glucosamine 6P synthétase [107].

Pour être efficace, un antibiotique doit bénéficier d'une bonne diffusion tissulaire afin d'atteindre sa cible le plus rapidement possible avec des concentrations suffisamment élevées. Or, Le taux résiduel sanguin insuffisant de la vancomycine majore le risque d'émergence de souches résistantes, le taux résiduel optimal ne peut correspondre à une valeur arbitrairement déterminée mais doit être 4 à 8 fois, voire plus de 8 fois la CMI dans les infections sévères à *S. aureus* et en particulier dans les infections ostéoarticulaires [209].

La valeur initialement recommandée pour le Taux résiduel (TR) de 5-10 mg/l a été réévaluée en raison de l'apparition des souches avec des CMI proches des concentrations critiques et surtout devant l'observation croissante d'échecs thérapeutiques ; plus récemment des TR de vancomycine de 15-20 mg/l ont donc été recommandés pour le traitement des infections sévères à staphylocoques, et en particulier celles pour lesquelles la pénétration de la vancomycine est faible. Cependant, devant la grande variabilité des CMI de la vancomycine (0.12-4 mg/l), le choix des posologies devrait induire l'obtention d'un TR qui sera un multiple de la CMI (5 à 10 fois la CMI) de la souche responsable de l'infection [210].

Résultats et Discussion

Les glycopeptides ont une activité bactéricide temps-dépendante sur les staphylocoques, il faut que la concentration au contact de la bactérie soit maintenue en permanence au-dessus de la CMI (27) dans le LCR. A partir d'une concentration > 5mg/l, il y a décroissance importante de l'inoculum et que cette décroissance est maximale quand elle atteint 10 mg/l.

Pour les CMI et CMB égale à 2, le rapport Cmax/CMI est de l'ordre de 4 ou 5. Ce qui voudrait dire que la prescription des glycopeptides devrait être adaptée pour établir des concentrations tissulaires (4-5 fois la CMI). Temps de contact 40% et 24 % avec des doses élevées. [210]

La figure 22, illustre le caractère multirésistant de notre collection de SARM qui présente une résistance croisée aux β -lactamines et qui s'étend à d'autres familles d'antibiotiques réduisant ainsi l'éventail des molécules thérapeutiques actives. Ainsi, en moyenne 23% des souches testées résiste à 8 molécules d'antibiotiques. Cette multirésistance a été tellement prononcée que 13% des antibiotypes se sont distingués par une résistance croisée à 11 antibiotiques.

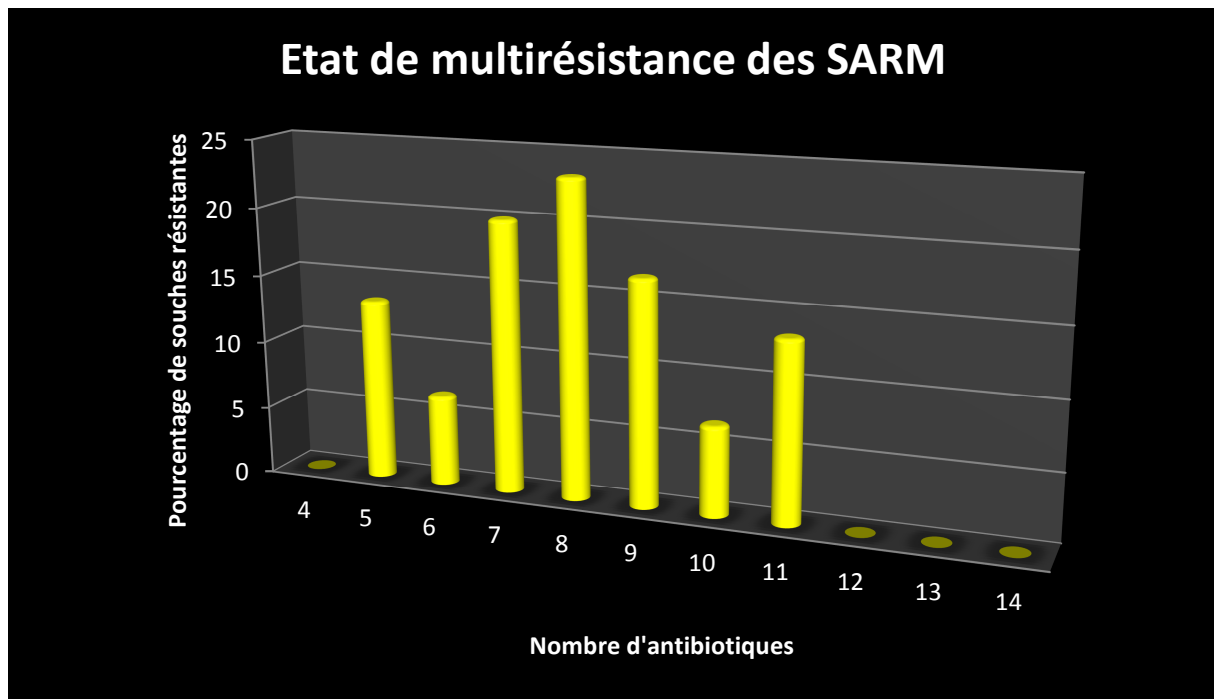


Figure 22 : Représentation de l'état de multirésistance des souches de *Staphylococcus aureus*

4. Concentration minimales inhibitrices (CMI)

Outre la confirmation du caractère résistant des souches testées, les CMI ont permis de connaître le niveau actuel de cette résistance. Cette concordance avec les profils de l'antibiogramme et les tests de screening s'est traduite par une fluctuation des niveaux de résistance dépassant parfois les 256µg/ml. (Tableau 22).

La résistance des SARM à l'oxacilline semble être de haut niveau au vue des CMI retrouvées, puisque 71% de ces souches possèdent des CMI supérieures à 64µg/ml. Ce qui pourrait encore une fois confirmer que le mécanisme de modification de la cible a été à l'origine de cette résistance. Il est à noter que le mécanisme d'hyperproduction de pénicillinases peut être également responsable de l'hydrolyse des pénicillines du groupe M (Méticilline, oxacilline) mais ce mécanisme génère un bas niveau de résistance [123].

Ce résultat reste inférieur à celui signalé par Kato et al en (2006) [211] où 100% des SARM avait une CMI supérieure ou égale à 512µg/ml.

Cette résistance de haut niveau semble également concerner toutes les autres β-lactamines (imipénème, Céfotaxime et Pipéracilline).

Tableau 22 : Distribution des concentrations minimales inhibitrices chez les SARM

CMI (µg/ml)	Pourcentage de SARM						
	VA	OXA	IPM	CTX	PIP	GM	RA
CMI<0.5	34	0	0	0	0	33	89
0.5≤ CMI< 1	30	0	0	0	0	37	2
1≤ CMI<2	33	0	0	0	0	8	3
CMI=2	0	0	0	0	0	7	2
2< CMI<8	0	11	26	0	0	5	1
8≤ CMI<64	1	18	39	0	30	7	3
64≤ CMI<256	2	45	35	65	53	3	0
CMI≥256	0	26	0	35	17	0	0

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice, SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méticilline, VA : vancomycine, OXA : oxacilline, IPM : imipénème, CTX : céfotaxime, PIP : pipéracilline, GM : gentamicine, RA : rifampicine.

Résultats et Discussion

Ainsi, 35% des SARM se sont caractérisées par une CMI de l'imipenème dépassant les 64µg/ml. Ce taux est nettement plus faible que celui retrouvé dans une étude réalisée dans un hôpital à Tokyo où 80% des SARM avait une CMI entre 64 et 128µg/ml [211].

Contrairement aux β-lactamines, les aminosides ont affiché des CMI relativement faibles. Ainsi, 78% des souches testées ont présenté des CMI inférieures à 2µg/ml. Dans un travail réalisé en 2010 incluant 200 souches de SARM isolées du centre hospitalier de Détroit aux Etats Unis, 9% seulement ont exprimé des CMI vis-à-vis de la tobramycine inférieures ou égales à 2µg/ml. Cette différence entre les résultats pourrait être expliquée par plusieurs facteurs, entre autre les habitudes de prescription qui génèrent une pression de sélection spécifique à chaque établissement. [212]

Concernant la rifampicine, les CMI relevées dans ce travail traduisent une certaine efficacité 89% des SARM s'est distingué par une CMI inférieure à 0.5µg/ml. Or, une concentration minimale inhibitrice faible n'est pas toujours synonyme de sensibilité, ainsi actuellement l'EUCAST préconise de placer une souche dans la classe des sensibles, lorsqu'elle a une CMI inférieure à 0.06 µg/ml. [88]

La vancomycine a été fidèle à sa réputation de molécule anti-staphylococcique, son efficacité a été de loin la plus prononcée puisque, à l'exception de trois souches, la totalité des isolats a exprimé des CMI inférieures à 2µg/ml.

L'augmentation des CMI a toujours été corrélée aux échecs thérapeutiques, une étude réalisée par Hydayat et al en 2006 [213], sur 95 patients, a montré qu'une élévation de CMI de la vancomycine (1.5-2µg/ml) était un facteur prédictif de l'échec thérapeutique. Cette rechute est principalement liée à une ignorance des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques par exemple lors d'une fréquence d'administration trop faible pour des antibiotiques temps-dépendant tels que les bêtalactamines et les macrolides ou si la posologie choisie est trop faible.

Il existe des situations où, malgré la prise d'antibiotique, l'infection persiste et s'aggrave dans ce cas, elle est sanctionnée de rechute. Ces échecs peuvent être liés à des facteurs d'origine variée dont : (Défenses de l'hôte, résistance bactérienne, accessibilité du site, schéma thérapeutique adapté) [214]. Certaines de ces infections seulement peuvent être évitées par une approche thérapeutique plus rationnelle qui prend en considération les notions de l'épidémiologie bactérienne, des profils de sensibilité aux antibiotiques, des mécanismes d'action des antibiotiques, de leur voie d'administration, et des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (PK/PD) prédictifs de leur efficacité [215].

Résultats et Discussion

Les erreurs de diagnostic conduisent à l'utilisation d'antibiotiques inactifs contre le germe infectant, mais aussi parfois à une antibiothérapie injustifiée en absence d'infection bactérienne [214].

L'acquisition de résistance en cours de traitement est devenue un problème préoccupant. Elle se rencontre lorsque l'exposition de la bactérie à l'antibiotique induit l'expression de mécanisme de résistance [214]. L'exemple le plus démonstratif est le mécanisme de résistance inductible vis-à-vis des glycopeptides [102].

Les surinfections et substitutions de flore surviennent facilement lorsque l'antibiotique utilisé est actif sur les bactéries commensales, favorisant la sélection d'espèces qui lui sont naturellement résistantes. Ainsi, un traitement à l'ampicilline d'une infection urinaire peut conduire à l'éradication d'*E. coli*, mais peut aussi sélectionner des *Klebsiella pneumoniae* préexistants.

Une bactéricidie insuffisante de l'antibiotique, un inoculum fort ou même un antagonisme entre antibiotiques peuvent également mener à un échec thérapeutique.

Certaines bactéries dites persistantes ou quiescentes, bactéries avec un métabolisme extrêmement ralenti, peuvent survivre pendant de très longues périodes dans des sites peu accessibles aux antibiotiques. Ceci les rend insensibles à la plupart des antibiotiques qui n'agissent que sur les métabolismes actifs.

Les hôtes immunodéprimés sont, à plusieurs titres, des candidats à l'échec thérapeutique. En effet, ils sont susceptibles de développer des infections particulières, à germes opportunistes et/ou à traitement difficile. Il convient de rappeler que le plus souvent les antibiotiques n'ont qu'un rôle d'appui, en diminuant l'inoculum bactérien, permettant aux défenses de l'hôte d'éradiquer des pathogènes en cause. Ainsi, la neutropénie est une situation clinique à l'origine d'échec thérapeutique [214].

Outre une mauvaise compliance, une résorption insuffisante peut survenir suite à une perfusion intraveineuse défectueuse, ou à des troubles digestifs (vomissements, diarrhée) après une administration orale [216].

Résultats et Discussion

Ce sont les paramètres PK/PD sériques qui sont prédictifs de l'efficacité dans de très nombreuses infections (respiratoires, cutanées, osseuses) et sont devenus un des critères majeurs de choix des antibiotiques en clinique. De plus, ces paramètres PK/PD sont la pierre angulaire du développement préclinique des antibiotiques, de la détermination des doses et du rythme d'administration, ainsi que de l'établissement des CMI critiques permettant de classer les souches dans la zone sensible ou résistante [215].

Un consensus semble se dessiner sur la base du quotient inhibiteur maximum sérique ou rapport C_{max}/CMI (il doit être compris entre 8 et 10 fois la CMI [217]).

Un échec thérapeutique peut également survenir si la posologie choisie est trop faible ou si sa pénétration dans les liquides et les tissus de l'organisme est défectueuse. Ainsi, des antibiotiques faiblement liposolubles (par exemple, β -lactamines, aminosides, et vancomycine) pénètrent mal ces sites protégés [218].

Dans toute population bactérienne, à la condition qu'elle soit suffisamment abondante, il existe spontanément des mutants résistants à un antibiotique donné, en quantité plus ou moins importante selon la taille de cette population bactérienne. Cette sous-population résistante peut être sélectionnée si les bactéries sont mises en présence d'une concentration d'antibiotique supérieure à la CMI de la population principale, sensible, et inférieure à la CMI de la population minoritaire, résistante qui aura ainsi le loisir de se développer « sans obstacle ». Seule une concentration d'antibiotique au moins égale à la CMI de la sous-population résistante évitera la sélection de ces mutants résistants. C'est la concentration de prévention de l'émergence des mutants, elle est donc généralement équivalente à la CMI de la sous-population résistante [217].

Comme pour les bêtalactamines, l'efficacité bactériologique des glycopeptides est liée à l'obtention d'un quotient inhibiteur résiduel de l'ordre de 8 ($QI = 8$), ce qui correspond à un temps pendant lequel les concentrations sériques de l'antibiotique sont supérieures à sa CMI dans l'intervalle séparant deux administrations ($T > 8 CMI = 100\%$). Elle est également corrélée au rapport de l'aire sous la courbe des concentrations sériques sur la CMI (l'ASIC), dont la valeur seuil a été fixée à un minimum de 250-500 [219]. La prévention de l'émergence de résistance est également corrélée à l'ASIC [217].

5. Associations d'antibiotiques

Devant le phénomène de résistance, les associations d'antibiotiques demeurent une excellente alternative thérapeutique, en permettant à la fois la prévention de l'émergence des résistances et l'élargissement du spectre d'action qui peut atteindre des foyers polymicrobiens profonds. Les résultats des différentes associations testées sur la souche VRSA (Sa 1) (tableau 23), montrent que sur six combinaisons d'antibiotiques différentes, deux associations se sont distinguées par un effet synergique: la vancomycine additionnée à l'imipénème, et la vancomycine avec la gentamicine, cette dernière a été la plus efficace avec l'index FIC le plus bas (0.31), à l'exception de l'imipénème additionné à la vancomycine, toutes les associations combinant une β -lactamine à la vancomycine ont exprimé un effet d'antagonisme ; cette inefficacité a également touché l'association de la gentamicine avec l'imipénème.

Tableau 23. CMI et index FIC des différentes associations contre une souche résistante à la vancomycine (Sa1)

Associations		Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/ml}$)					
A	B	CMI de l'antibiotique A (seul)	CMI de l'antibiotique B (seul)	CMI de l'antibiotique A (associé à B)	CMI de l'antibiotique B (associé à A)	Index FIC	Index FIC
GN+VA		32	128	8	8	0.31	Synergie
IPM+VA		32	128	16	8	0.56	Synergie
OXA+VA		256	128	512	128	3	Antagonisme
PIP+VA		64	128	128	128	3	Antagonisme
CF+VA		256	128	128	128	2.5	Antagonisme
IPM+GN		32	32	32	32	2	Antagonisme

Légende : GN : Gentamicine ; VA : Vancomycine ; IPM : Imipénème ; OXA : Oxacilline ; PIP: Pipéracilline ; CTX : Céfotaxime ; FIC : Fraction de concentration inhibitrice.

Résultats et Discussion

Ces combinaisons avec leur effet synergique et bactéricide, offrent une action rapide conjuguée à une toxicité réduite [220]. Spécialement face aux SARM, la pharmacocinétique et la concentration tissulaire des glycopeptides plaident en faveur d'une utilisation en association [221]. La vancomycine est connue pour sa lenteur de bactéricidie et sa néphrotoxicité mais elle demeure efficace si elle est utilisée à un quotient inhibiteur (rapport taux sérique/CMI) au moins égale à 8 [222, 202].

Les résultats montrent que l'association de la vancomycine avec la gentamicine a été la plus active (figure 23). Dans la littérature, les résultats sont divergents, alors que certains auteurs comme Goldstein et al [223], ont signalé que l'association de la vancomycine aux aminoglycosides n'est pas une combinaison appropriée pour le traitement des GISA, mais elle permet la prévention du choc septique. D'autres études soulignent l'efficacité de l'arbécacine associée à la vancomycine [224] ou l'amikacine avec la vancomycine [225].

Sur les quatre différentes combinaisons associant une β -lactamine avec la vancomycine, seule l'activité de l'imipénème a été amplifiée en présence de la vancomycine entraînant ainsi un effet de synergie (figure 24). En effet, de nombreux travaux ont rapporté que cette association est fortement active contre les SARM [226, 227]. Et même contre les GISA, l'association d'un glycopeptide à une β -lactamines possède un effet synergique contre les SARV [228].

Toutes les souches de *S. aureus* qui ont acquis l'opéron *vanA* sont résistantes à la méticilline, lorsqu'elles sont cultivées en l'absence de glycopeptide, il a été démontré que la vancomycine (ou teicoplanine) et l'oxacilline, à des concentrations qui sont atteignables en thérapie, ont un puissant effet synergique contre les SARV à la fois in vitro et dans un modèle animal [229, 230]. La résistance à la méticilline est due à la synthèse d'une PLP2, une transpeptidase qui reste active en présence des β -lactamine.

En présence de représentants des deux classes de médicaments, tels que la vancomycine et l'oxacilline, les bactéries synthétisent un précurseur du peptidoglycane dont la terminaison a été modifiée le D Ala-D lac qui n'est pas un substrat utilisable par PLP2 lors de l'étape de transpeptidation car la transpeptidase est inactivée. Ce type de combinaison a été testé dans le modèle animal pour traiter l'endocardite causée par une SARV. Ainsi, par rapport à une monothérapie, l'utilisation de la nafcilline (β -lactamine) associée à la vancomycine a permis l'éradication totale de l'infection [229].

Résultats et Discussion

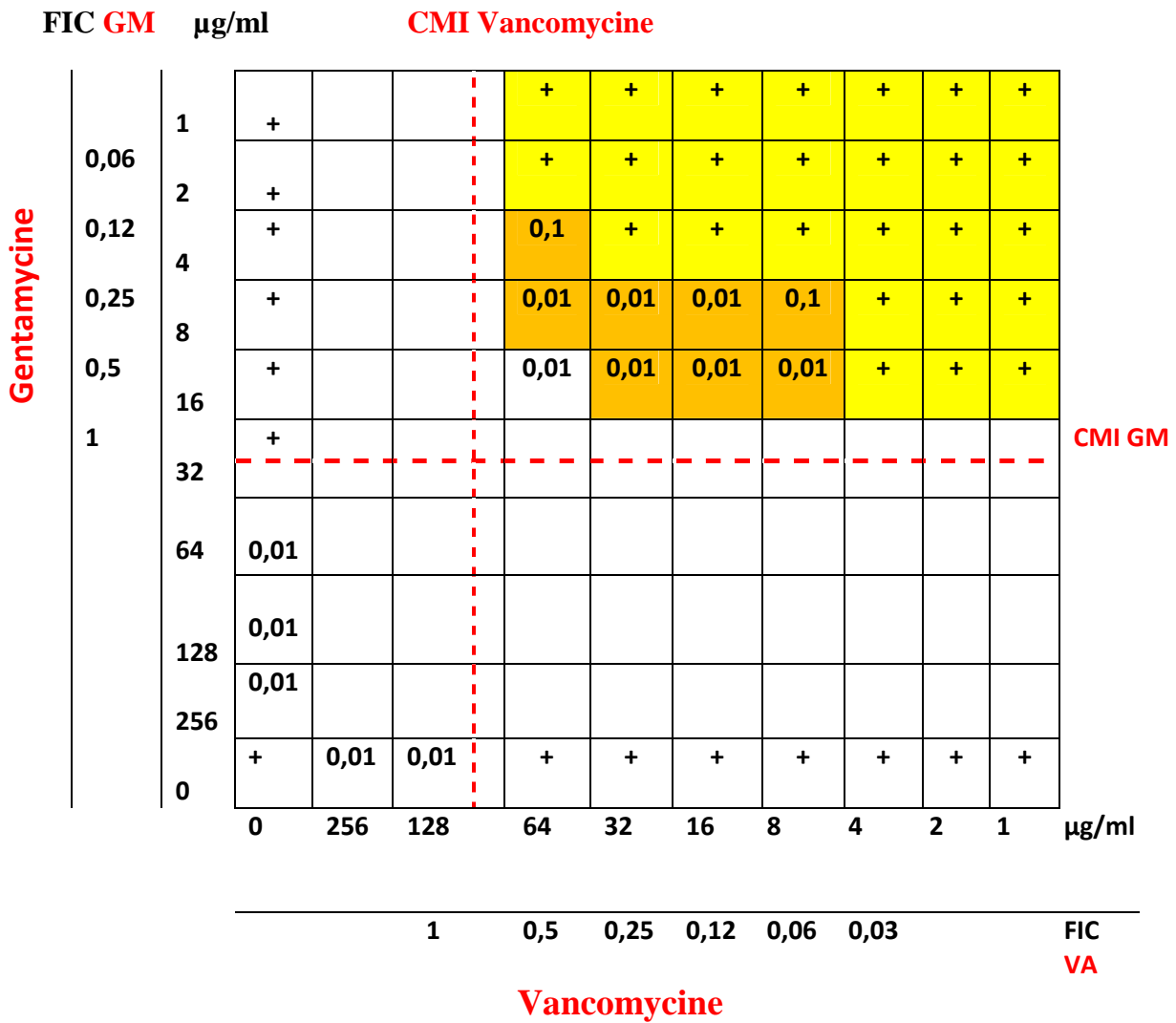


Figure 23 : Résultat de l'association Gentamycine-Vancomycine

FIC : Fraction de Concentration Inhibitrice

+ : croissance bactérienne

Résultats et Discussion

Une étude in vivo a montré l'intérêt de l'utilisation de l'association Céfpirome avec la vancomycine dans le traitement des infections sévères à SARM en réanimation. Comparée à l'utilisation de la vancomycine seule, cette combinaison s'est caractérisée par une meilleure cinétique bactéricide, une diminution rapide du taux de protéine C réactive (CRP) et l'absence de sélection d'autres germes multirésistants [231].

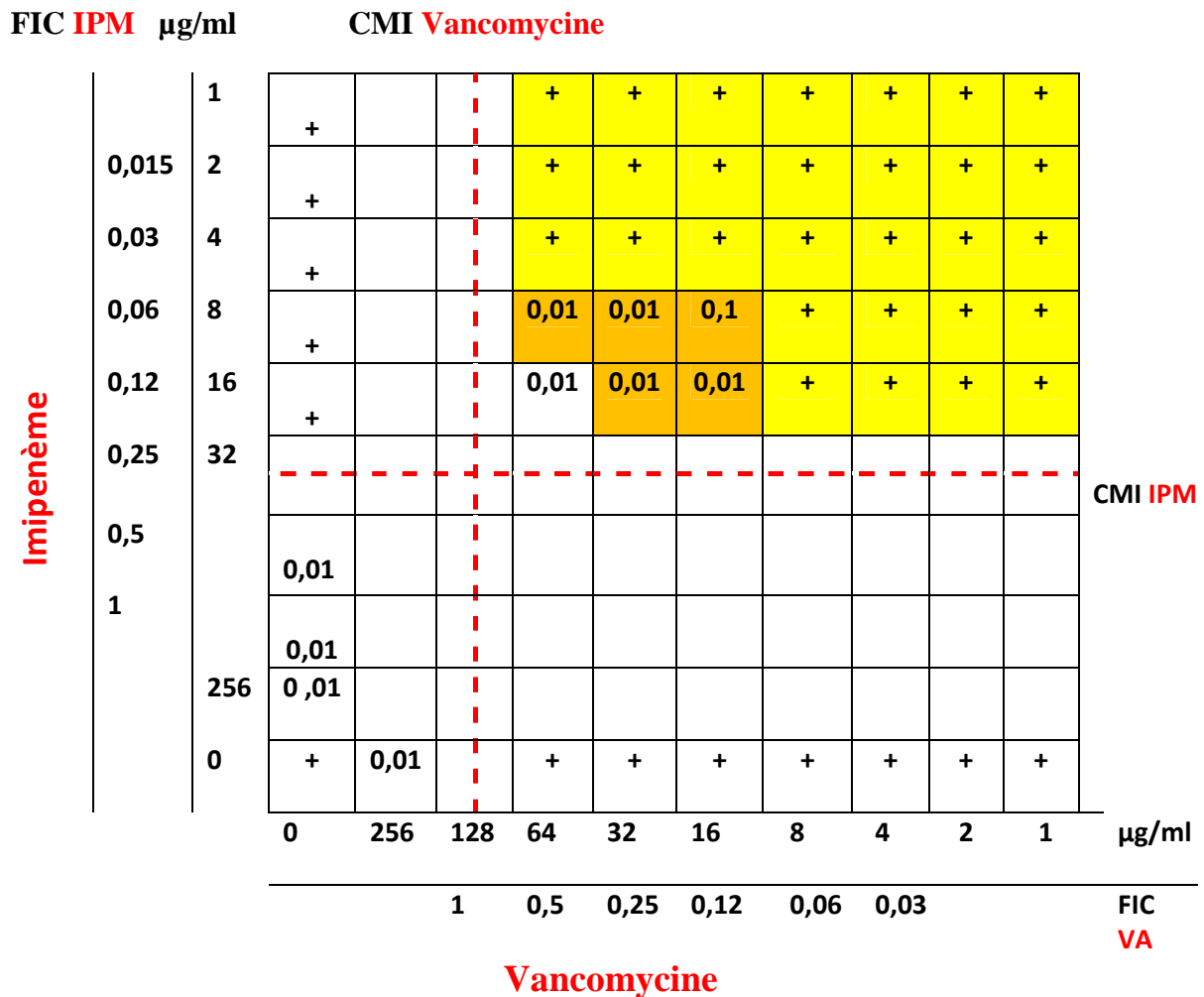


Figure 24 : Résultat de l'association Imipenème-Vancomycine

Résultats et Discussion

Contrairement à ce qui a été enregistré par Climo et al [228], toutes nos autres associations combinant les β -lactamines (Pipéracilline, Céfotaxime et oxacilline) à la vancomycine se sont soldées par un effet d'antagonisme. Ce résultat semble en accord avec celui rapporté par Goldstein et al en (2003) [232]. Nos résultats ont montré que la combinaison de l'imipénème et de la gentamicine a exprimé également une interaction antagoniste. Alors que d'autres travaux ont expliqué la synergie entre la gentamicine et l'ampicilline par l'action de cette dernière sur la paroi qui facilite l'entrée de la gentamicine aboutissant à une bactéricidie plus rapide [233].

D'autres synergies contre des souches de *Staphylococcus* surtout entre bêtalactamines et aminosides (Cephalotine avec Amikacine et Dicloxacilline/Amikacine) ont été signalées par Novales et al en (2006) [225]. L'antagonisme a été également révélé par plusieurs études montrant ainsi l'inefficacité d'association contre des souches SARM telles que celles combinant la vancomycine à la tétracycline ou le chloramphénicol ou même aux macrolides [224].

Les notions de synergie et d'antagonisme peuvent être envisagées selon le regard du microbiologiste ou du clinicien, le premier va les définir en terme de concentration minimale inhibitrice (CMI) ou bactéricide (CMB), avec des effets mesurés in vitro, le second en terme de guérison du patient ou d'échec clinique [233].

In vivo, les résultats des essais cliniques diffèrent, dans une étude réalisée par Paul et al (2004) sur 7586 patients comparant le traitement par bêtalactamine, seule ou en association à un aminoside, la fréquence d'échec clinique a été moins importante avec la monothérapie alors que la toxicité rénale a été plus prononcée avec la bithérapie [234]. En revanche, dans un autre travail, l'association d'une bêtalactamine avec une fluoroquinolone a accompagné une réduction de la mortalité [235]. L'association des céphalosporines de troisième génération avec la fosfomycine est connue pour sa synergie sur les SARM mais uniquement si la bactérie est sensible à la fosfomycine. Cette synergie s'explique par l'action de la fosfomycine qui diminue l'expression des PLP 2 et 4, mais aussi celle de la PLP 2' reconnue comme support de la résistance chez les SARM. Cette diminution d'expression des PLP 2, 4 et 2' s'accompagne d'une meilleure expression de la PLP 3 qui permet aux bêtalactamines d'être efficaces [236]. D'autant plus que cette molécule est caractérisée par un risque élevé de sélection ; ce qui justifie encore plus son utilisation en association [237].

Résultats et Discussion

Nous avons utilisé uniquement les combinaisons de molécules utilisées dans ce service et justement l'antibiothérapie dans les pays en voie de développement se heurte aux problèmes de coût et de disponibilité des antibiotiques, et devrait s'adapter aux différentes contraintes propres à chaque contexte.

6. Détection du gène *vanA*

L'électrophorèse des extraits d'ADN des quatre souches de référence (contrôle positif et contrôle négatif).

- ✓ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (témoin négatif : absence du gène *vanA*)
- ✓ *Enterococcus hirae* ATCC 10541 (témoin négatif : absence du gène *vanA*)
- ✓ *Enterococcus faecalis* (témoin positif : présence du gène *vanA*)
- ✓ *Enterococcus faecium* (témoin positif : présence du gène *vanA*)

a permis de confirmer la présence d'ADN qui reste le point de départ de toute investigation en biologie moléculaire (figure 25). En effet, la technique d'extraction par le kit DNeasy Tissue se prête très bien à l'utilisation, sa simplicité et sa reproductibilité font de cette technique un excellent outil d'exploration. Cette technique a été utilisée avec succès dans plusieurs travaux sur les entérocoques [238].

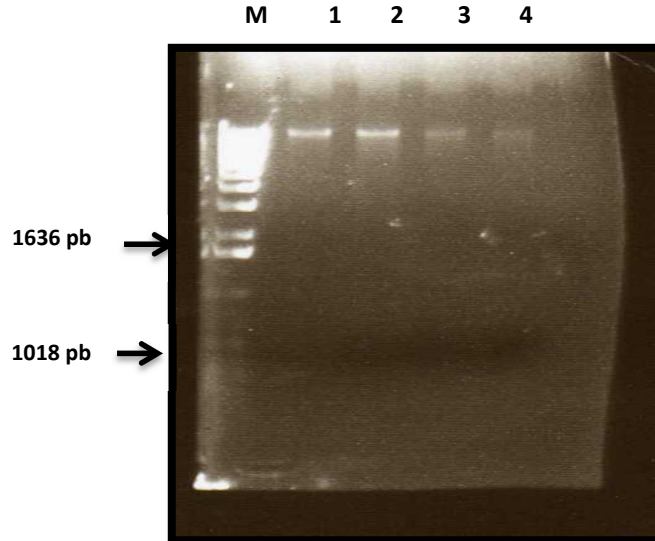


Figure 25 : Gel d'électrophorèse des extraits d'ADN

des quatre souches de référence (contrôle positif et contrôle négatif)

Piste M : Marqueur moléculaire (1Kb invitrogène), Piste 1 : *Enterococcus faecium* (VanA), Piste 2 : *Enterococcus faecalis* (VanA). Piste 3 *Enterococcus hirae* ATCC 10541. Piste 4 : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Résultats et Discussion

Les résultats du dosage des extraits d'ADN des dix souches de *S. aureus*, et des quatre souches de référence (*Enterococcus*) par nanophotométrie a montré globalement des concentrations homogènes d'ADN (tableau 24), ce qui confirme l'efficacité de l'extraction et permet d'entamer la digestion enzymatique et les amplifications.

Tableau 24 : Densités optiques des extraits d'ADN des souches testées

Espèce	Code	Densité optique
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1	0.095
<i>Enterococcus faecalis</i> (vanA)	2	0.230
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	3	0.105
<i>Enterococcus faecium</i> (vanA)	4	0.113
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0.053
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	0.160
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	0.055
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	0.228
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	0.123
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	0.098
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	0.925
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	0.908
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	0.028
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	0.103

Les résultats de la digestion enzymatique par KpnI des dix souches de *Staphylococcus aureus* (figure 26) n'ont pas été probants, car la révélation n'a montré qu'une bande unique dans la piste numéro 2 avec une concentration des extraits d'ADN dans les puits sans aucune migration visible. Cette technique a été réalisée en vue de mettre en relief un quelconque polymorphisme. D'autres techniques semblent être plus adaptées à *Staphylococcus aureus* telles que l'électrophorèse en champs pulsés ou (*Pulse Field Gel Electrophoresis* : PFGE) qui permet une séparation des fragments dont la taille varie de quelque kilobases à 10000 kilobases.

Résultats et Discussion



Figure 26 : Digestion des extraits d'ADN de dix souches de *Staphylococcus aureus* par l'enzyme de restriction KpnI

M : marqueur, 1 : Sa1, 2 : Sa2, 3 : Sa3, 4 : Sa4, 5 : Sa5, 6 : Sa6, 7 : Sa7, 8 : Sa8, 9 : Sa9, 10 : Sa10.

L'amplification du gène *vanA* chez les deux souches de références (témoins positifs) a subi une optimisation qui s'est traduite par un changement dans la clarté des bandes. En effet, l'augmentation du volume d'ADN à amplifier (5 μ l), couplée à une élévation des températures d'hybridation de 2 °C (54°C) et un accroissement du nombre de cycles à 40 a nettement amélioré le rendement de la PCR (figure 27).

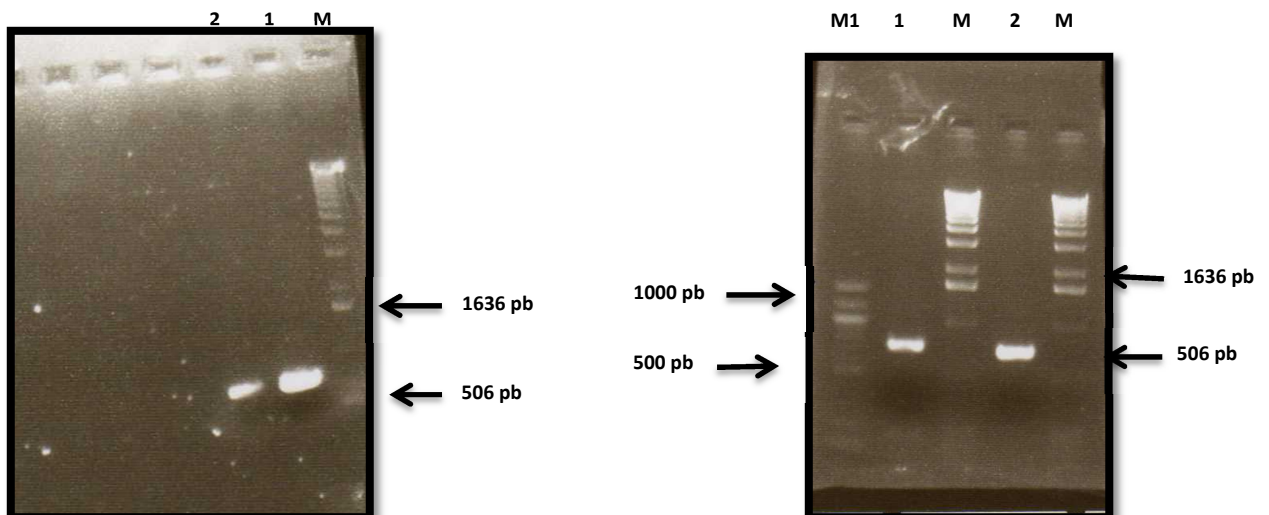


Figure 27 : Résultat de l'optimisation de l'amplification des souches de références

M : marqueur 1Kb (Invitrogène), 1 : *E. faecalis* (*vanA*), 2 : *E. faecium* (*vanA*), M1 : marqueur 100 pb

Résultats et Discussion

Les résultats de l'amplification du gène *vanA* chez dix souches *Staphylococcus aureus* dont quatre provenant de l'unité de néonatalogie et rentrant dans le cadre d'une autre étude, a révélé la présence du gène *vanA* chez les souches résistantes à la vancomycine isolé du service de chirurgie en l'occurrence Sa1, Sa2 et Sa3 et l'absence de ce gène chez trois souches de *S. aureus* sensible à la vancomycine. Ainsi la figure n :28, révèle la présence d'une bande équivalente à l'amplification du gène *vanA* dans la piste 4,5 et 9. Ces bandes sont localisées aux même niveau que celles retrouvées chez les témoins positifs dans la piste 11 et 13 et se caractérisent par une taille équivalente à 732 pb.

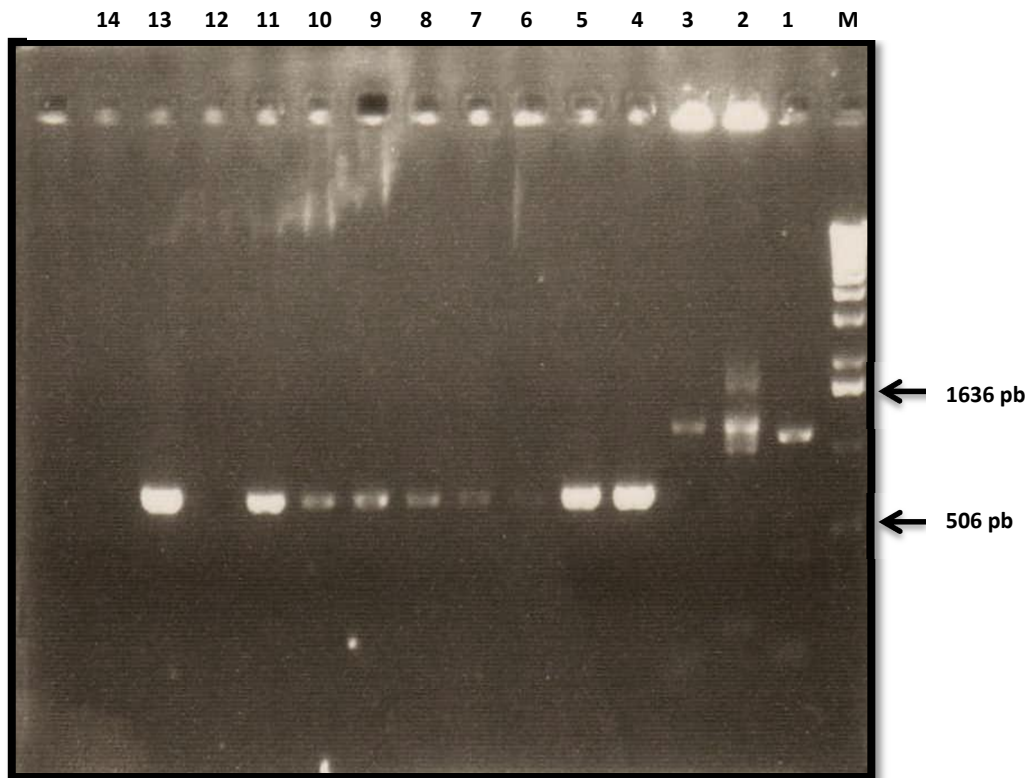


Figure 28 : Révélation du gène *vanA* par l'amplification chez les souches de *Staphylococcus aureus*

M : marqueur, 1 : Sa4, 2 : Sa5, 3 : Sa6, 4 : Sa1, 5 : Sa2 ; 9 : Sa3 ;

6 : Na4 ; 7 : Na1 ; 8 : Na2 ; 10 : Na3

11: *Enterococcus faecium* (témoin positif : présence du gène *vanA*)

12: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (témoin négatif : absence du gène *vanA*)

13 : *Enterococcus faecalis* (témoin positif : présence du gène *vanA*)

14 : *Enterococcus hirae* ATCC 10541 (témoin négatif : absence du gène *vanA*)

Résultats et Discussion

Le mécanisme qui confère une résistance de haut niveau aux glycopeptides, résulte de l'acquisition d'un gène exogène *vanA* [102, 239]. Ce gène est le plus fréquemment rencontré chez les entérocoques et, à ce jour, il reste le seul détecté chez *Staphylococcus aureus*. L'acquisition de la résistance à la vancomycine chez les souches VRSA implique généralement le transfert horizontal entre *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* (figure 30) d'un plasmide conjugatif contenant le transposon *Tn1546* [240]. Le Staphylocoque doré détruit à son tour le plasmide étranger mais intègre le gène de résistance dans son propre plasmide. Ce transfert a été signalé pour la première fois in vitro en 1992, il a montré que *vanA* pourrait être transféré et exprimé dans *Staphylococcus aureus* [241, 242].

L'opéron *vanA* est présent sur le transposon *Tn1546*, cet élément génétique mobile qui appartient à la famille Tn 3, est composé de neuf gènes : *vanR* et *vanS*, *vanH*, *vanA*, et *vanX*; *ORF1* et *ORF2*, *vanY*, *Vanz* [243]. La présence du *vanA* a été détectée par amplification PCR et southern blot, Chez les deux souches du Michigan et de Pennsylvanie montrant une différence de localisation au niveau du plasmide porteur, 58kb et 127kb respectivement [243]. La résistance à la vancomycine est due à la présence de l'opéron *vanA* codant des enzymes dans lequel le C-terminal D-Ala- est remplacé par D-lactate [244]. Ce changement de la cible provoque une substitution qui diminue considérablement l'affinité à la vancomycine (figure 29) [245].

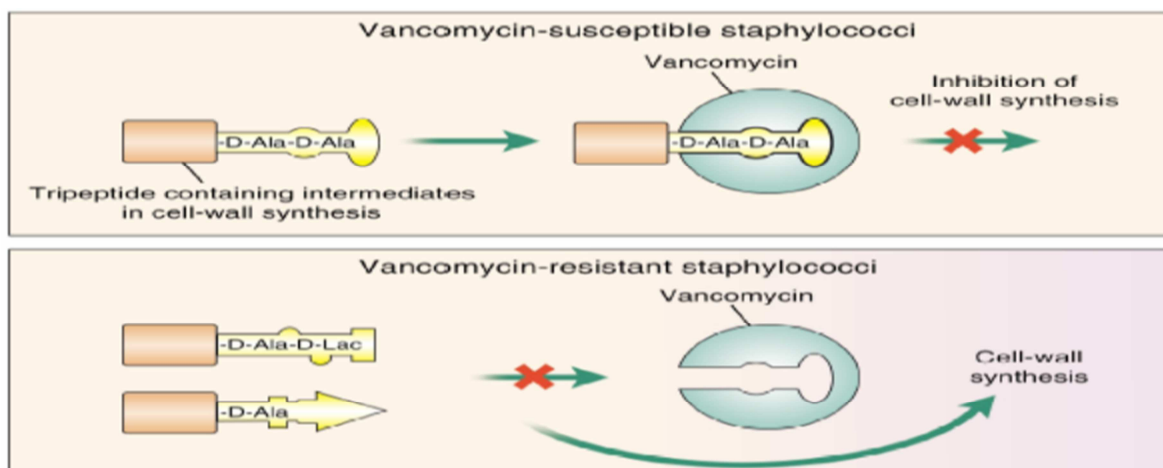


Figure 29. Mécanisme de résistance des souches VRSA (Lefort, 2008) [245]

Les premiers cas de résistance à la vancomycine ont été décrits en 2002 chez des patients ayant une forte comorbidité (diabète, insuffisance rénale chronique en particulier),

Résultats et Discussion

ces patients ont subi une coinfection causée par des entérocoques résistants à la vancomycine et des Staphylocoques résistants à la méticilline [203]. Ce travail a pu démontrer que la résistance du SARM aux glycopeptides avait été acquise par transfert du gène *VanA* d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV) vers le SARM [246]. L'opéron *vanA* est situé dans des éléments transposables étroitement liés à *Tn1546* qui sont généralement véhiculés par des plasmides autotransférables. Ces plasmides ne sont pas spécifiques aux entérocoques, et peuvent donc être transférés à une large gamme de bactéries à Gram positive [241]. L'émergence du phénomène de résistance est en corrélation directe avec l'utilisation excessive et irrationnelle des antibiotiques [247]. Lorsque les glycopeptides sont utilisés pour la thérapie, en particulier par voie orale, ils exercent une pression sélective sur la flore normale qui peut devenir un réservoir de gènes de résistance aux glycopeptides potentiellement transférables aux bactéries pathogènes [248]. Cette résistance est en constante propagation, son évolution laisse présager l'émergence de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à toutes les molécules d'antibiotiques disponibles dans l'arsenal thérapeutique [249]. La vie sur terre est régie par une règle universelle, à savoir la survie du plus fort, ainsi la pression constante générée par les antibiotiques sélectionne progressivement des bactéries et aboutit subitement à l'apparition d'une résistance importante assurant ainsi une évolution par des sauts quantiques [249].

La taille du fragment d'amplification du gène *vanA* est de l'ordre 732 pb [250]. L'amplification des extraits des trois souches résistantes à la vancomycine a confirmé la présence du gène *vanA*, ce qui pourrait confirmer l'hypothèse d'acquisition du ce gène par phénomène de conjugaison lors d'un contact avec des entérocoques résistants à la vancomycine.

L'interaction de la vancomycine avec les entérocoques a tellement évoluée, qu'actuellement certaines souches ont développé une dépendance vis-à-vis de cette molécule. Une souche d'*Enterococcus faecium* dépendante de la vancomycine pour sa croissance a été isolée à partir des selles d'une patiente ayant subi une transplantation hépatique et porteuse d'entérocoque résistant à la vancomycine avant la greffe, puis traitée par vancomycine pour une infection à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline [251]. Cette souche d'entérocoques vancomycine dépendante (EDV) provient d'une souche d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV) et nécessite pour sa croissance la présence de la vancomycine [251].

Résultats et Discussion

Chez neuf souches SARM et résistante à la vancomycine ayant acquis par conjugaison un plasmide provenant d'Entérocoques, cinq souches ont intégré par recombinaison l'élément Tn1546 dans leur propre plasmide [240]. Certains plasmides entérococciques peuvent se répliquer de façon efficace chez le staphylocoque, ils sont maintenus de manière stable chez le nouvel hôte (figure 30). D'autres n'auront pas cette possibilité et seront perdus au cours de la division cellulaire ce qui entrainera leur solubilisation dans la descendance. Toutefois, dans une deuxième étape, l'élément Tn1546 pourrait être transposé du plasmide entrant vers un réplicon staphylococcique (plasmide ou chromosome). Le plasmide acquis se comporte comme vecteur suicidaire permettant la livraison du transposon qui sera sauvé par recombinaison [241].

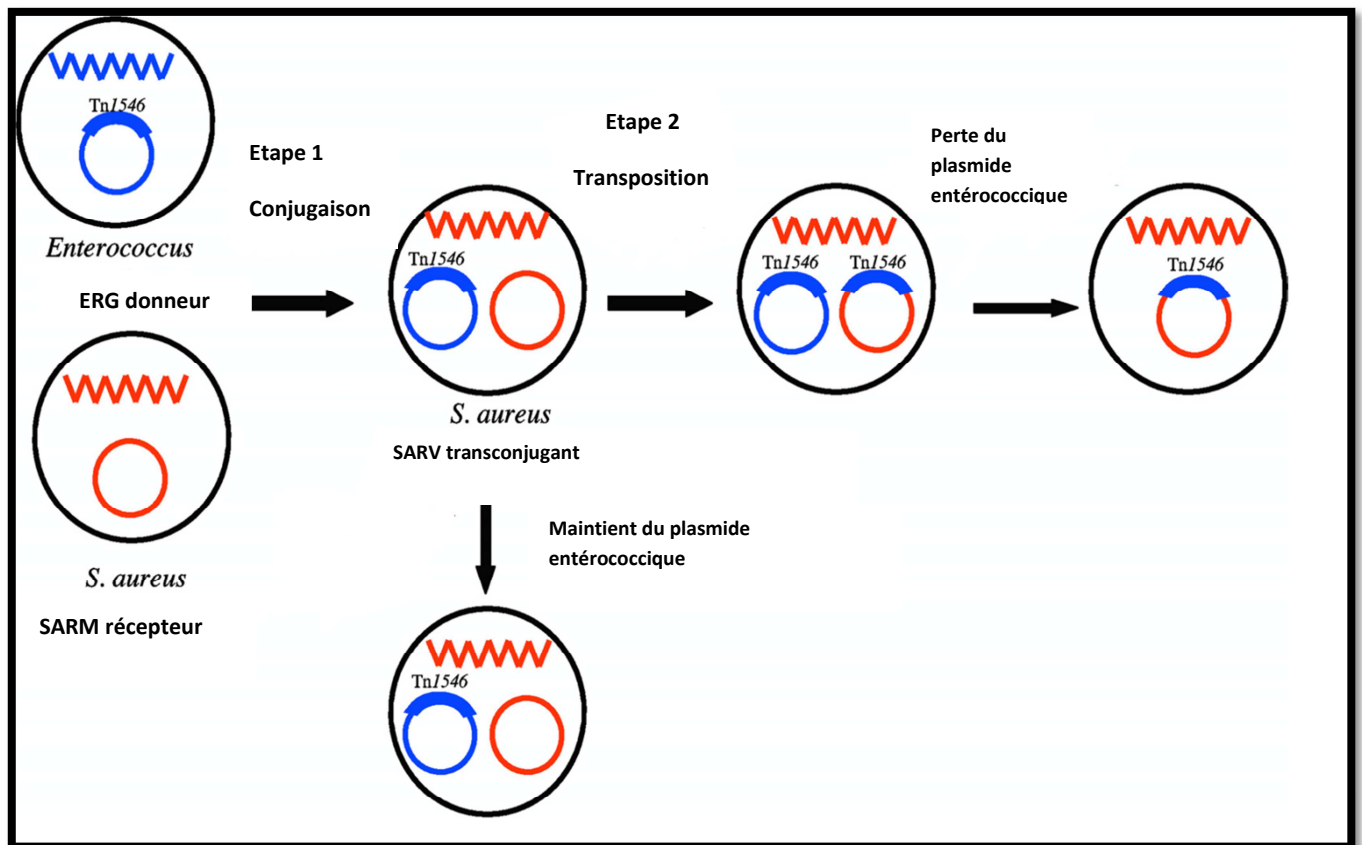


Figure 30 : Représentation schématique du transfert du transposon Tn1546 provenant d'une souche d'Enterococcus spp. Vers *Staphylococcus aureus*
Périchon et Courvalin, 2009 [252]

Les Zigzag rouge et bleu représentent respectivement l'ADN chromosomique d'Enterococcus et *S. aureus*. Cercle Bleu : plasmide entérococcique avec une haute fréquence de transfert. Cercle rouge : plasmide staphylococcique. ERG : Enterococcus résistant aux glycopeptides SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine. SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline.

Résultats et Discussion

Bien que le gène *vanA* ait été retrouvé chez nos trois souches résistantes à la vancomycine. Une de ces souches a exprimé un niveau de résistance modéré (16µg/ml.). De telles isolats ont déjà été signalés dans la littérature, ils sont nommés 'LLR VRSA' pour *low-level-resistant VRSA*, ce sont des souches possédant le gène *vanA*.

L'analyse par PCR et la cartographie de séquençage de l'ADN des groupes de gènes *vanA* chez deux souches LLR VRSA (VRSA-2 et VRSA-3) a indiqué que tous les gènes de structure impliqués dans la résistance sont présents et dans le même ordre que dans Tn1546. Cependant, deux séquences d'insertion, IS1216V et IS1251, sont insérées à la place de l'ORF1 et dans la région intergénique *vanSH*, respectivement, en laissant intact le gène de structure pour les enzymes de résistance (Figure 31) [243, 251].

Les deux souches LLR-VRSA avaient une copie d'une séquence d'insertion qui a perturbé le gène de la transposase de Tn1546. En l'absence de cette protéine, l'élément génétique ne peut pas être transposé. L'étude par technique de réplique a montré que (50%) des souches LLR-VRSA après une nuit de culture en l'absence de pression sélective perdent leur résistance à la vancomycine, alors que dans les mêmes conditions, la résistance était parfaitement stable chez les isolats HLR-VRSA. La Perte de résistance par les souches LLR-VRSA résulte probablement d'une réplique inefficace du plasmide entérococcique déterminant la résistance dans le nouvel hôte [240, 252] (Figure 31).

Le mécanisme de résistance par le gène *vanA* est de type inductible. En absence de glycopeptides dans le milieu, la voie de résistance n'est pas exprimée, alors qu'en présence d'un inducteur (vancomycine ou teicoplanine), le mécanisme de résistance est activé. Le délai avant l'expression phénotypique de résistance correspond au temps nécessaire à la synthèse de précurseurs du peptidoglycane se terminant par D-lac et l'élimination de la sensibilité par l'action de *vanX* et de *vanY*. Cette induction est fortement retardée (8 h) chez les souches LLR-VRSA par rapport aux HLR-VRSA (environ 3 h) [240, 252].

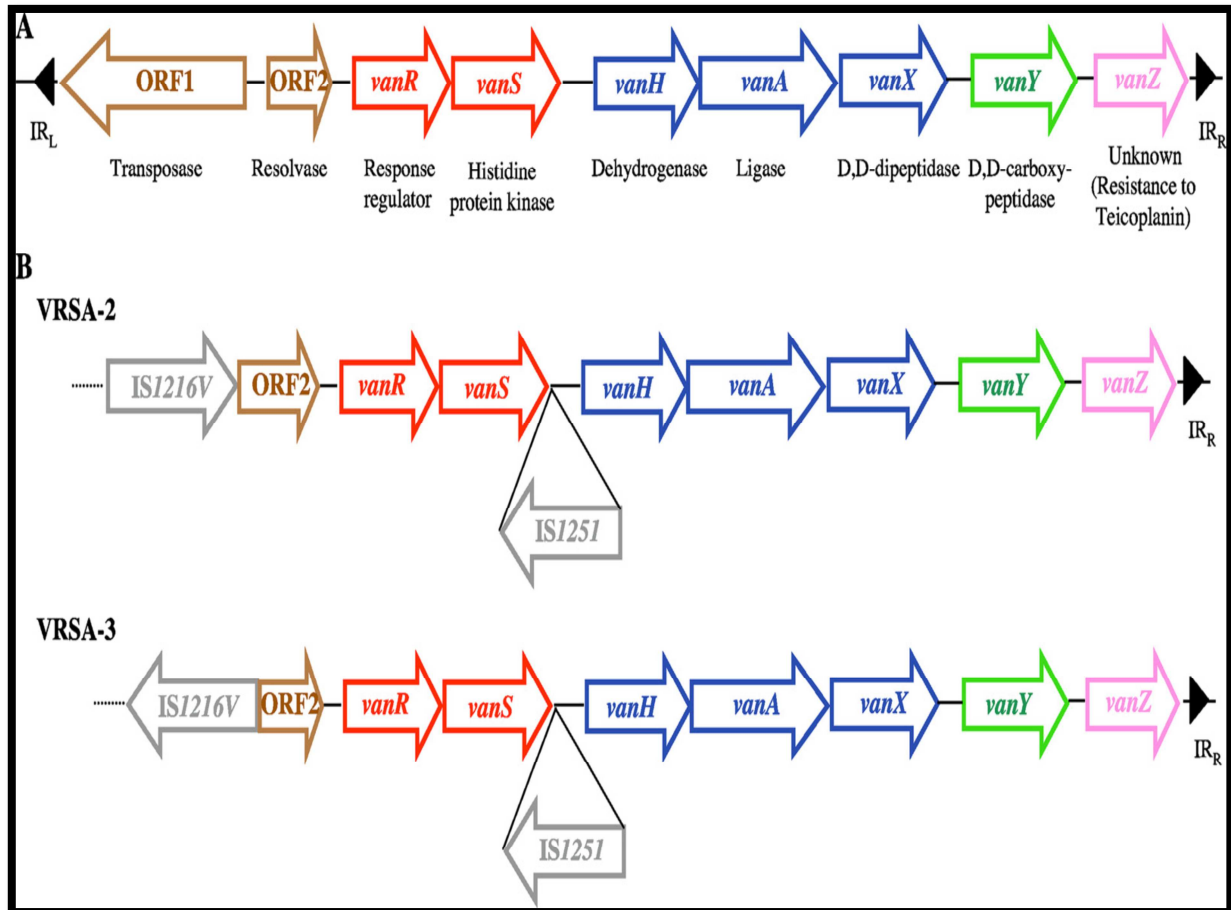


Figure 31 : Représentation schématique permettant la comparaison entre les éléments Tn1546 chez les IRL-VRSA et les HLR-VRSA (Périchon et Courvalin 2009) [252]

(A) Représentation schématique de Tn1546. IRL et IRR : séquence inversée gauche et droite, respectivement. Les Flèches vides représentent des séquences codantes et indiquent la direction de la transcription. Flèches marron : gènes nécessaires à la transposition. Flèches rouges : des gènes de régulation. Flèches bleues : les gènes nécessaires à la résistance. Flèche verte : gène accessoire. Flèche rose : gène de fonction inconnue. Flèches grises, des séquences d'insertion.

(B) Organisation de l'élément Tn1546 dans les souches VRSA-2 et VRSA-3

CONCLUSION

Conclusion

Notre étude a montré une prévalence importante de SARM (52%) au niveau du service de chirurgie du CHU de Tlemcen (Algérie). Ces souches qui sont souvent associées à des complications assez graves, se caractérisent par une densité d'incidence de 0,5 pour 1000 journées d'hospitalisation. Expriment une multirésistance qui touche plusieurs molécules allant des β -lactamines, des aminosides et atteignant même la vancomycine. Ces résistances sont souvent de haut niveau au vue des CMI enregistrées. Ainsi, trois souches se sont distinguées par leur résistance en tolérant 6 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine sur BHIA dans le test de criblage. Ces souches qui pourraient être les premières isolées en Algérie se caractérisent par différentes CMI (16 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$ et 128 $\mu\text{g/ml}$). L'analyse des extraits d'ADN de ces souches par amplification révèle la présence du gène *vanA* qui pourrait être le déterminant génétique de cette résistance à la vancomycine.

Cette situation semble être le reflet d'une utilisation irrationnelle d'antibiotiques et l'absence d'une politique nationale bien définie. L'étude épidémiologique a révélé un polymorphisme de souches, ce qui pourrait annuler l'hypothèse d'une épidémie ayant pour origine la même souche clonale, et a identifié un certain nombre de facteur de risques dont la durée de séjour, l'âge ou encore le portage nasal. A l'origine de la diffusion de ces souches, le transfert horizontale via le personnel soignant ou à travers différents supports contaminés. Ces souches ont complété leur patrimoine génétique soit par mutations ou par acquisition de nouvelles structures (plasmides) ; ce qui leur a permis d'accumuler les mécanismes de résistance. L'utilisation d'association d'antibiotiques telle que la vancomycine combinée à la gentamicine pourrait être un réflex bénéfique contre les souches de sensibilité diminuée à la vancomycine. Les infections causées par les GRSA ne sont pas une fatalité, car elles sont en partie évitables par des mesures de préventions permettant d'inhiber la dissémination des SARM, d'explorer et de surveiller l'évolution de cette résistance.

Le relevé de ces infections et l'analyse des données épidémiologiques devraient être à la base de toute action de lutte et de prévention en assurant une meilleure efficacité. Cette efficacité

est largement tributaire de la sensibilisation de l'ensemble des acteurs en milieu hospitalier aux risques et aux conséquences de l'infection nosocomiale.

La prévention de ces infections passe impérativement par le respect de certaines mesures :

-Une Prise de conscience de l'autorité sanitaire ainsi que le personnel soignant du risque généré par ces résistances.

-Une utilisation rationnelle des antibiotiques basée sur une lecture interprétative de l'antibiogramme dans des conditions critiques, le choix thérapeutique devrait être fondée sur des données de sensibilité spécifique à chaque service.

-L'instauration d'une politique stratégique et efficace pour l'amélioration des conditions d'hygiène, il s'agit de l'implications de tous les acteurs de la santé : décideurs, médecins, microbiologistes, personnels soignants, hygiénistes, pour assurer une formation et une sensibilisation. Ce sont autant d'éléments qui doivent inciter les épidémiologistes et les gestionnaires à accorder une place de choix dans leurs préoccupations à la lutte et à la prévention des infections nosocomiales et à œuvrer ensemble et en concertation à la mise en place de programmes de prévention et à leur évaluation périodique.

-Promouvoir la recherche en matière de caractérisation de la résistance. Concernant les SARM, créer une base d'enregistrement de données qui permettra de suivre la circulation des différents clones.

-Des précautions rigoureuses doivent être entreprises en vue de réduire les risques de transmission de ces microorganismes, elles doivent être appliquées à l'ensemble des patients. Quel que soit le statut infectieux, et lors de tous risque de contact avec n'importe quel produit biologique, mais également lors de contact avec une peau lésée, des muqueuses du patient ou toutes surfaces inanimées. Il est également impératif de procéder à un isolement systématique des patients à risque dès l'entrée dans un service.

-Le lavage des mains demeure la première ligne de défense. Ce geste doit être aussi efficace que redondant moyennant des solutions hydro-alcooliques avant et après chaque soin sur un même patient. Ce qui pourrait limiter les infections nosocomiales.

En perspectives de ce travail, il serait intéressant de pouvoir approfondir l'aspect génétique de cette résistance tout en explorant les mécanismes intervenant dans la régulation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Fleurette J. Staphylocoques et Microcoques. In Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Paris : Médecine-Sciences. Flammarion 1989 ; p 773.
- [2] Prescott L.M, Harley J.P, Klein D. Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université 2010.
- [3] Schaechter M, Medoff G, Eisenstein Barry I. Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Université, Paris Bruxelles 1999 ; p188-189.
- [4] <http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/>
- [5] Gordon RJ et Lowy FD. Pathogenesis of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Infection. Clinical Infectious Diseases 2008; 46:S350-9.
- [6] Dunman PM & Projan SJ. *Staphylococcus aureus*, Infection and Disease. Ed Allen L. Honeyman et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001, p 4.
- [7] Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: from structure to function. Prog Biophys Mol Biol 2005; 88:91-142.
- [8] Lesieur C, Vecsey-Semjen B, Abrami L, Fivaz M, van der Goot FG. Membrane insertion: the strategies of toxins. Mol Membr Biol 1997;14:45-64.
- [9] Vincenot.F, Saleh.M, Prévost.G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Revue francophone des laboratoires 2008; 407:61-69.
- [10] Gravet A, Couppié P, Meunier O, Clyti E, Moreau B, Pradinaud R, Monteil H, Prévost G. *Staphylococcus aureus* isolated from impetigo produces both epidermolysins A or B and LukE+LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. J Clin Microbiol 2001; 39:4349-56.
- [11] Schlievert PM, Case LC. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. Methods Mol Biol 2007; 391:113-26.
- [12] Cheung. A.L. *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Ed Allen L. Honeyman et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001.
- [13] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339:520–532.
- [14] Xia G, Kohler T, Peschel A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology 2010; 300:148–154.
- [15] Durand, G., M. Bes, et al. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 847-53.
- [16] O’Riordan C, Lee J.C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides, *clin Microbiol Rev*. 2004 ; 17(1) : 218-234.
- [17] Chavakis, T. et al. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial secretable expanded repertoire adhesive molecules’ (SERAM) in disturbing host defense systems. Thromb. Haemost 2005; 94 :278–285.

- [18] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167–93.
- [19] Mah et O'took. Mecanism of biofilm resistance to antimicrobial agent. *Trends Microbiol.* 2001; 3 : 34-39.
- [20] Steward PS et Costerton JW. Antibiotique resistance of bacteria in biofilms. *The lancet* 2001; 358 :135-138.
- [21] Gilbert P, Allison DG et Mc Bain AJ. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross resistance? *Symp Ser Soc App Microbiol.* 2002 ; 92 :98-110
- [22] Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med* 2001; 344:11–6.
- [23] Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64:357-72.
- [24] Proctor RA, Von Eiff. C, Kahl BC, Becker K et al. Small Colony Variants a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infection. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:295-30.
- [25] Langlet S, Quentin G, Contant G, Ghnassia C.J. Method chromogénique d'identification rapide de *Staphylococcus aureus*. *Annales de Biologie clinique*, 1999; 57 (2) : 191-6.
- [26] Avril J.L, Dabernat H, Denis F et Monteil H. bactériologie clinique 2^{ème} édition. Paris : Ellipses Marketing, 1992 ; p14-16-17.
- [27] Peacock S J. *Staphylococcus aureus* in: Principales and practice of clinical bactériology. 2nd edition. England: John Wiley & Sons Ltd, 2006; p 76.
- [28] Tally P.F. Les staphylocoques, abcès et autres maladies. In : Microbiologie et pathologie infectieuse, 2^{ème} édition. De Boeck, 1999 ; pp 192-193.
- [29] Makris G, Wright D.J, Ingham E, et Holland T.K. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus*- a virulence factor? *Microbiology*; 2005; 150:2013.
- [30] Poncholi V. Staphylococcal extracellular surface enzymatic activity. In: *Staphylococcus aureus* infection and Disease. USA : Kluwer Academic Publishers, 2002; p 145.
- [31] Alessi M.C. Quels nouveaux fibrinolytiques ? Sang, thrombose, vaisseaux. 2000; 12 (6): 371-8.
- [32] Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* 2004; 72:1169-76.
- [33] Deverrière B.V.M. Reproduction expérimentale de mammites à *S. aureus* chez la brebis : Comparaison lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Toulouse : Université Paul Sabatier (2007).
- [34] Freeman-Cook .L and Freeman-Cook .K. *Staphylococcus aureus* infections. Chelsea House Publishers. Philadelphia, 2006, p 26-29.
- [35] Eveillard Matthieu. Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. *Biologie cellulaire. ANGERS : UNIVERSITE D'ANGERS* 2007 ; p159.
- [36] Nguyen Van JC, Kitzis M.-D, Ly A, Chalfine A, Carlet J, Ben Ali A, Goldstein F. Détection de la colonisation nasale de *Staphylococcus aureus*. *Pathologie Biologie* 2006 ; 54 :285-292.

- [37] Dumitrescu, Dauwaldera O , Gilleta Y, Vandenescha F, Etiennea J, Linaa G, Tristana A. Les infections communautaires à *Staphylococcus aureus* en pédiatrie : émergence des staphylocoques dorés résistants à la méticilline d'origine communautaire. Revue francophone des laboratoires 2008 ; 407 :71-80
- [38] Weirtheim. HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 2005; 5:751–62.
- [39] SFHH. Surveiller et prévenir les infections associées aux soins. 2010 ; Vol XVIII - N° 4.
- [40] Bouziani M. Les pathologies infectieuses : Aspect épidémiologique et prophylactique. Dar El Gharb 2002.
- [41] CA SFM. (2009). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- [42] Gaudy, C et Buxeraud, J. Antibiotiques pharmacologie et thérapeutiques, Elsevier SAS, 2005 ; P.21-22.
- [43] CASFM (2010). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Communiqué 2010.
- [44] Speller DC, Johnson AP, James D, Marples RR, Charlett A, George RC. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid. England and Wales. Lancet 1989; 350:323-5.
- [45] Grohs P. Évolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques : la méticilline est-elle encore un marqueur de multirésistance ? Pathologie Biologie 2009 ; 57 : 1–8.
- [46] Siegel J, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. Am J Infect Control 2007; 35:S165–93.
- [47] Kesah C., Ben Redjeb S., Odugbemi T. O., Boye C. S.B., Dosso M., Ndinya Achola J. O, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 153–156.
- [48] Tristan A , Durand G , Durupt F , Ferry T, Res M, Reverdy M-E , Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J. SARM : Données épidémiologiques récentes et évolution de la résistance. Revue Francophone des Laboratoires, novembre 2005, N ° 376.
- [49] Oliveira D.C., Tomasz A., de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Lancet Infect. Dis. 2002; 3:180-189.
- [50] Robinson D.A., Enright M.C., Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Clin. Microbiol Infect 2004; 10: 92-9.
- [51] Harmsen D., Claus H., Witte W, Rothganger J., Turnwald D, Vogel U., Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management, J. Clin. Microbiol. 2003; 41 : 5442-5448.
- [52] Ito T., Max .X., Takeuchi E, Okuma K, Yuzawa H., Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC, Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48 : 2637-2651.

- [53] Jarraud S, Mouget C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey E, Nesme X., Etienne J., Vandenesch E, Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease, *Infect. Immun.* 2002; 70 : 631-641.
- [54] Leclercq R. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann Fr Anesth Réanim* 2002 ; 21 : 375-83.
- [55] Descloux E., Mohammedi I., Gilleta Y., François B., Etienne J. Pneumonie nécrosante à *Staphylococcus aureus* communautaire résistant à la méticilline et producteur de leucocidine de Panton-Valentine chez un adulte. *Réanimation* 2007 ; 16 : 256–258.
- [56] Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:67–74.
- [57] Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10: 781–91.
- [58] Gueudet, T., Lemblé C. Détection de la résistance à l'oxacilline chez *Staphylococcus aureus* : comparaison de cinq techniques utilisables en routine *Pathologie Biologie* 2004 ; 52 :617–621.
- [59] Scanvic-Hameg A., May-Michelangeli, L., Le Turdu, F. Apport du kit Servitex Staphylocoque MRSA dans le diagnostic rapide des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline, *Méd Mal Infect* 2002; 32 : 107-14.
- [60] Bemer-Melchior. P, Drugeon. H.B. Choix de la concentration en NaCl pour optimiser la détection de la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus* par la méthode de diffusion en gélose. *Pathol Biol* 2001; 49 : 216-21.
- [61] Katayama, Y., Zhang, H., Hong, D., Chambers, H. Jumping the barrier to b-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2003;185 : 5465–72.
- [62] Quincampoix, J C et Mainardi J L. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation* 2001; 10 : 267-75.
- [63] Hamdad, F., Donda, F., Laurans, G., Canarelli, B., Rousseau, F., Biendo, M., Thomas D. Performances des différentes méthodes de détection de la résistance à l'oxacilline de souches atypiques de *Staphylococcus aureus*, *Pathologie Biologie* 2006 ; 54 : 447–452.
- [64] Forestier E., Rémy, V., Mohseni-Zadeh, M., Lesens, O., Jaulhac B., Christmann D. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : aspects épidémiologiques et thérapeutiques récents. *Rev Med Interne* 2006; 11:014.
- [65] Katayama T, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec, encode methicillin resistant in *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1549–55.
- [66] Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* : a new model of antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases* 2001, 1: 147-155
- [67] Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1323–36.
- [68] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 357:1225–40.

- [69] Shlaes D, Gerding D, John J, Craig W, Bornstein D, Duncan R, et al. guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clin Infect Dis* 1997; 25:584–99.
- [70] Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *S. aureus* N3. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 : 1449–58.
- [71] Jemili-Ben Jomaa, M., Boutiba-Ben Boubaker, I., Ben Redjeb, S. Identifications des cassettes chromosomiques *mec* codant pour la résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus* isolés à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis, *Pathologie Biologie* 2006; 54 : 453–455.
- [72] Hougardy, N., Louahabi, A., Goffineta, P. Détection directe et rapide du portage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline par extraction automatisée de l'acide nucléique et PCR en temps réel, *Pathologie Biologie* 2006 ; 54 : 477–481.
- [73] Hiramatsu K, Ito T, Hanaki H. Evolution of methicillin and glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus* In: Finch RG, Williams RJ, eds. *Bailliere's Clinical Infectious Disease*. London: Bailliere Tindall, 1999: 221–42.
- [74] Jonas D, Grundmann H, Hartung D, et al. Evaluation of the *mecA femB* duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:643–647.
- [75] Salisbury SM, Sabatini LM, Spiegel CA. Identification of methicillin-resistant staphylococci by multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Clin Pathol* 1997; 107:368–73.
- [76] Bergeron MG, Ouellette M. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2169–72.
- [77] Louie, L., Matsumura, SO., Choi, E., Louie, M., Simor, AE. Evaluation of 3 rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2170–3.
- [78] Tenover F. C. Implications of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *journal of Hospital Infection* 1999; 43 (Supplement): S3-S7.
- [79] Cuny and C. Witte .W. PCR for the identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCC*mec* elements and the neighbouring chromosome-borne *orfX*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 834–837.
- [80] Lindsay JA, Holden MT. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol* 2004; 12:378–385.
- [81] Raad, I., Al Rahwan A, et Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clinical Infectious Diseases*, 1998; 26 (5): 1182-1187.
- [82] National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470.
- [83] Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *Intern J Antimicrob Agents* 2000; 16:S3–S10.
- [84] Ambroise M, Reverdy ME, Koeck JL. Mécanismes et détection de la résistance de *Staphylococcus aureus* aux glycopeptides. *Revue Française de Laboratoire* 2003; 352:31-39.

- [85] Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th informational supplement M100-S16. Clinical and laboratory standards institute. U S A: Wayne, PA; 2006.
- [86] Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 30: 398–408.
- [87] Hanaki H, Hososaka Y, Otsuka YC, Nagasawa Z, Sunakawa TN. Occurrence of vancomycin-intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Infect Chemother* 2007; 13:118–121.
- [88] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1, 2010-04-27.
- [89] Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM). Communiqué 2010.
- [90] Centers for disease control and prevention (CDC). Vancomycin-Intermediate/Resistant *Staphylococcus aureus* Laboratory Testing Algorithm. Novembre 2010. http://www.cdc.gov/hai/organisms/vrsa/visa_vrsa.html
- [91] Fridkin SK. Vancomycin-intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. *Clin Infect Dis* 2001; 32:108–15.
- [92] Tacconelli E., Cataldo MA. Antimicrobial therapy of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 2505-2518.
- [93] Walsh T., Howe RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistant in *Staphylococcus aureus* . *Microbiol*, 2002; 56:657–675.
- [94] Hiramatsu K., Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350:1670-1673.
- [95] Tenover FC., James W, Biddle LE, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*, *Emerging Infectious Diseases*, 2001; 7 (2): 327-332.
- [96] Mesures de contrôle et de prévention des infections à *Staphylococcus aureus* ayant une sensibilité réduite à la vancomycine au Québec. 2^{ème} Edition. Santé et Services Sociaux, Québec 2002 ; p 21.
- [97] Ariza J, Pujol J, Cabo C, Pena N, Fernandez J, Linares J, Gudiol F. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* 1999; 353: 1587-1589.
- [98] Charles P, Ward BP, Johnson DR, Howden B, Grayson L. Clinical Features Associated with Bacteremia Due to Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 2004; 38:448–451.
- [99] Trakulsomboon S., Danchaivijitr S., Rongrungruang Y., Dhiraputra C., Susaemgrat W., Ito T., Hiramatsu K. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. *J. Clin. Microbiol*, 2001; 39:591-595.
- [100] Reverdy ME, Jarraud S, Bobin-Dubreux S, Burel E, Girardo P, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in two French hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:267-272.

- [101] Guérin F, Buu-Hoi A, Mainardi JL, Kac G, Colardelle N, Vaupré S, et al. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2985-8.
- [102] Joly-Guillou M. Le point sur les staphylocoques dorés de moindre sensibilité aux glycopeptides *Réanimation* 2004 ; 13:185-189.
- [103] Cosgrove M, Carroll K, Perl T. *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *Clinical Infectio Disease* 2004; 39:539-45
- [104] Appelbaum PC. Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 45:S165-7
- [105] Smith, T.L, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, et al . Emergence of vancomycine resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *New Engl. J. Med.* 1999; 340 (7): 493-501.
- [106] Hanaki H. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 42: 199.
- [107] Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and its gultamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2276-285.
- [108] Boyle-Vavra S, Labischinski H, Ehlert K, Daurin R. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide intermedaite clinical *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents chemoter* 2001; 45:280-287
- [109] Sieradzki K, Pinho MG, Tomasz A. Inactivated *pbp4* in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1999; 274: 18942-18946.
- [110] Ploy MC, Grélaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* 1998; 351 : 3-1212
- [111] Pierard D, Vandebussche H, Verschraegen I, Lauwers S. screening for *Staphylococcus aureus* with a reduced susceptibility to vancomycin in: a Belgian hospital. *Pathol.Biol* 2004; 52:486-488.
- [112] Girard-Blanc C. et Courvalin P. Evaluation of non-automated techniques for phenotypic detection of VanA-type *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 562-565
- [113] Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th informational supplement M100-S16. Clinical and laboratory standards institute. U S A: Wayne, PA; 2006.
- [114] CA SFM. (2005).Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
- [115] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Severe methicillinresistant *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia associated with influenza: Louisiana and Georgia, December 2006—January 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 56:325-29.

- [116] Tenover FC, Robert C, Moellering JR. The rationale for revising the clinical and laboratory standards institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. *clin. Infect Dis* 2007; 44: 1208-15.
- [117] Grattard F. Electrophorèse en champ pulsé. In: Précis de bactériologie clinique. Ed. Freyney. ESKA, Paris 2000; pp 267-277.
- [118] Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003; 41 :1574-1585.
- [119] Welsh J, Mc Clelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7213-7218.
- [120] Williams G, Kubelik R, Livak J, Rafalski A, Tingey V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.
- [121] Van Belkum A, Verbrugh H. 40 years of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Bmj*, 2001; 323: 644-645;
- [122] Palladino S, Kay I.D, Costa A.M, Lambert E.J, Flexman J.P. Real-time PCR for the rapid detection of Van A and Van B genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003; 45: 81-84.
- [123] Bismuth .R, Leclercq R. *Staphylococcus aureus* et antibiotiques, in Précis de Bactériologie clinique. Ed ESKA 2000 ; P 611-616.
- [124] Shaw .K.J, Rather P.N, Hare R.S, Miller G.H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationship of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbial. Rev.* 1993; 57: 138-163.
- [125] Bismuth R, Caillon J. Staphylocoques. In Bactéricidie, aspects théoriques et thérapeutiques. Paris, Maloine 1990, pp 187-212.
- [126] Lelièvre H, Lina G, Jones ME, Olive C, Forey F, Roussel-Delvallez M. Emergence and spread in French Hospitals of *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamycin and other antibiotics. *J.Clin Microbiol* 1999; 37: 3452-7.
- [127] Daurel C, Leclercq R. l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires* ; 2008, N°407 : 81-90.
- [128] Weisblum .B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 ; 39 : 577-85.
- [129] Leclercq R., Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35 : 1267-72.
- [130] Wondrack L, Massa M, Yang B.V, Sutcliffe J. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 992-8.
- [131] Ross J.I., Eady E.A., Cove J.H., Cunliffe W.J., Baumberg S., Wootton J.C. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport supergene family. *Mol Microbiol.* 1990; 4 : 1207-14.

- [132] Ross J.I., Eady E.A., Cove J.H., Cunliffe WJ, Baumberg S. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin transporter MsrA may interact. *Gene*. 1995; 153: 93-8.
- [133] Tankovic J, Aubry-Damon H. et Leclercq R. Résistance aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. *Méd Mal Infect* 1997; 27 Spécial : 207-16.
- [134] Zilhao R., Courvalin P. - Nucleotide sequence of the *fosB* gene conferring fosfomycin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 56 : 267-72.
- [135] Etienne J, Gerbaud G, Fleurette J, Courvalin P. Characterization of staphylococcal plasmids hybridizing with the fosfomycin resistance gene *fosB*. *FEMS Microbiol Lett*. 1991; 68: 119-22.
- [136] Dia N.M, Ka R, Dieng C, Diagne R, Dia M.L, Fortes L. Résultats de l'enquête de prévalence des infections nosocomiales au CHNU de Fann (Dakar, Sénégal). *Med Mal inf* 2008 ; 38 :270-274.
- [137] Ellenberg E. Analyse terminologique des définitions données à l'infection nosocomiale et proposition d'une définition. *La revue de médecine interne* 2005; 26 : 572-577.
- [138] Togo A, Coulibaly Y, Keita M, Traoré A, Kante L, Diakite I, *et al.* Infections nosocomiales en chirurgie pédiatrique au Mali. *Journal de pédiatrie et puériculture* 2009; 22 : 273-277.
- [139] Hamza R. Epidémiologie des infections associées aux soins. *Revue tunisienne d'infectiologie* 2010 ; Vol 4 : 1-4.
- [140] Traore B et Diallo G. Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie générale du CHU Gabriel TOUR. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en médecine ; Université de Bamako, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie, Mali, 2007 ; N°143.
- [141] Butrau-Lemaire M, Botto H. Nosocomial urinary infections. *Prog Urol* 1997; 7(4): 674-82.
- [142] Razafimpanario M, Rakotoarivony S.T, Andrianarivelo A.M, Rafalimanana C *et al.* Un cas de surinfection urinaire à *Escherichia coli* monosensible contractée en réanimation au CHU d'Antananarivo, Madagascar. *Revue d'anesthésie-réanimation et de médecine d'urgence* 2009; 1(2) :14-16.
- [143] Drancourt M, Adekambi T. L'eau en établissement de soins : les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. *Commission Européenne* 2004 ; 4-38.
- [144] Simon F, Kraemer P, Delina J.J, Demortière E, Rapp C. Le risque nosocomiale en Afrique intertropicale partie 2: Les infections des patients. *Médecine tropicale* 2007; 67 : 197-203.
- [145] Gayvallet-Montredon N, Sauvestre C, Bergeret M, Gendrel D, Raymond J. Bactériémies nosocomiales en pédiatrie. *Arch pédiatr* 2002; 7 :679-84.
- [146] Botterel F, Faibis F, Chevalier C, Deliss C, Fiacre A, Dubois A. Intérêts et limites de la surveillance des infections nosocomiales à partir du laboratoire de microbiologie : Expérience du CHG de Meaux. *Pathol Biol* 2004 ; 52 : 469-473.
- [147] La Force F.M. The controls of infections in hospitals : 1750 to 1950. In Wenzel R.P. *Prevention and control of nosocomil infections*. Baltimore, Williams and Wilkins; 1987.

- [148] Aujard Y, Bedu A, Bingen E, Bonacorsi S. Infections nosocomiales en pédiatrie. *Med Mal Infect* 1995; 25 :36-43.
- [149] Ducel G. Les infections nosocomiales, surveillance par incidence ou prévalence, position de l'OMS. *Agressologie* 1987; 27 :415-416.
- [150] Giard M, Debeaudrap P et Vanhems P. Incidence et prévalence. *Hygiènes*. 2005, Volumes XIII, N°1.
- [151] C.Clin Sud Ouest. « Prévalence des infections nosocomiales dans les hôpitaux du Sud-Ouest », B.E.H., 1994 ; 46 : 217-218.
- [152] Leyral G et Joffin JN. *Microbiologie technique : 2 'Documentation technique'*. 2^{ème} Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 1998 ; 299 p.
- [153] Joffin JN, Leyral G. *Microbiologie technique : 1 'Dictionnaire des techniques'*. 3^{ème} Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 2001 ; 320 p.
- [154] Denis, F, Cécile, P, Martin, C, Bingen, E, Quentin, R. *Bactériologie Médicale technique usuelles*. Masson. 2007; P 254-260.
- [155] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18 (ISBN 1-56238-653-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.
- [156] Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J, editors. *L'antibiogramme*. Paris: Mpc vidéo; 1985. pp. 199–218.
- [157] Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol*. 2006; 36: 1020-1027.
- [158] Ji Y. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. *Methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2007; p 264.
- [159] Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma* 2000;48:932–7.
- [160] Migaud H, Senneville E, Gougeon F, Marchetti E, Amzallag M, Laffargue P. Risque infectieux en chirurgie orthopédique. The risk of infection in orthopaedic surgery *EMC-Rhumatologie Orthopédie* 2005; (2): 151–172.
- [161] Manian FA, Meyer PL, Sezter J, Senkel D. Surgical site infections associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: do post-operative factors play a role? *Clin Infect Dis* 2003;36:863–8.
- [162] Whitehouse JD, Friedman D, Kirkland KB, Richardson WJ, Sexton DJ. The impact of surgical site infections following orthopaedic surgery at a community hospital and a university hospital: adverse quality of life, excess length of stay, and extra cost. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 183–8.
- [163] Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, et al. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36:592-598.

- [164]Cruse P.J.E, Foord R. The epidemiology of wound infection. A10 year prospective study of 62939 wound .Surg.clin.North Amer 1980; 60:27-40
- [165] Bochicchio GV, Joshi M, Knorr KM, Scalea TM. Impact of nosocomial infections in trauma: does age make a difference? J Trauma 2001; 50:612-7.
- [166] Gruson D, Hilbert G, Vargas F, Valentino R, Cardinaud J.P, Gbikpi-Benissan G. Impact des nouvelles stratégies d'utilisation des antibiotiques en réanimation Réanimation 2002 ; 11 : 200-8.
- [167] Mastouri M, Nour M, Ben Nejma M, Bouallegue O. et al. Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie. Pathologie Biologie ; 54 : 33-36.
- [168] Martres P, Thibault M, Lémann F. Surveillance des bactéries multirésistantes : diminution significative du taux et de l'incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) dans un centre hospitalier général entre 1999 et 2001. Pathologie Biologie 2003 ; 51 : 474-478
- [169] Bussy-Malgrange V, Jebabli M. Surveillance des bactériémies nosocomiales en France. Résultats 2002. Institut de Veille Sanitaire; 2003.
- [170] van der Mee-Marquet N, Domelier AS, Girard N, Quentin R. Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. J Clin Microbiol 2004;42:5650-7.
- [171] Lyon BR, Skurray. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*. Genetic Basis. Microbial Rev 1987; 51: 88-134.
- [172] Drugeon H. β -lactamines et staphylocoques. In: Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. (Eds). AntibioGramme, ESKA, Paris, 2006:117-24.
- [173]Ahoyo A.T, Baba-Moussa L, Makoutode M et al. Incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal care unit of departmental hospitalcenter of Zou Collins in Benin. Archives de Pédiatrie 2006; 13 : 1391-1396.
- [174] Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, Couturier M, Riegel P, Hai`kou N, et al. Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. J Hosp Infect 2008; 68:32-8.
- [175] Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:1083-5.
- [176]Bekhoucha S N, Cady A, Gautier P, Itim F, Donnio PY. A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean sea: molecular characteristics of isolates from Western Algeria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28:553-5.
- [177] Awad S, Elhabash S, Lee L et al. Increasing incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections: reconsideration of empiric antimicrobial therapy. The American Journal of Surgery 2007; 194 606-610.
- [178]Seydi M., Sow A.I., Soumaré M., Diallo H.M. et al. *Staphylococcus aureus* bacteremia in the Dakar Fann university hospital. Médecine et maladies infectieuses 2004 ; 34 : 210-215
- [179] Borg M A, De Kraker M, Scicluna E, Van de Sande-Bruinsma N, Tiemersma E,

Monen J, et al. Prevalence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1310–1315.

[180] Akoua-Koffi C, Guessennnd N, Gbonon V , Faye-Ketté H, Dosso M. Methicillin-resistance of *Staphylococcus aureus* in Abidjan (1998–2001): a new hospital problem. *Médecine et maladies infectieuses* 34 (2004) 132–136.

[181] Elhamzaoui S, Benouda A, Allali F, Abouqual R, Elouennass M. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans deux hopitaux universitaires à Rabat, Maroc. *Med Mal* 2009 : (in press).

[182] Belabbès H, Elmdaghri N, Hachimi K et al. Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* isolé des infections communautaires et hospitalières à Casablanca. *Méd Mal Infect* 2001; 31:25–28.

[183] Bertrand X, Costa Y, Pina P. Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les bactériémies : données de l’observatoire national de l’épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Med Mal Inf* 2005; 35:329–34.

[184] Lagier JC, Letranchant L, Selton-Suty C. *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis. *Annales de Cardiologie et d’Angéiologie* 2008; 57 : 71–77.

[185] Abbanat D, Macielag M, Bush K. New agents in development for the treatment of bacterial Infections. *Current Opin Pharmac* 2008; 8:582–592.

[186] Antri K, Rouzic N, Boubekri I, Dauwalder O, Beloufa A, Ziane H. High prevalence of community and hospital acquired infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin gene in Algiers. *Pathologie Biologie* 2010 ; 58: e15–e20.

[187] Ben Jemaa Z, Mahdjoubi F, Ben Hadj H’mida Y, Hammami N, Ben Ayed M, Hammami A. Profil bactériologique des bactériémies et sensibilité aux antibiotiques des bactéries en cause dans la region de Sfax (1993-1998). *Path Biol* 2004 ; 52 :82-88.

[188] Elouennass M, Sahnoun I, Zrara A, Bajjou T, Elhamzaoui S. Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d’hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005). *Méd Mal Inf* 2008 ; 38 : 18–24.

[189] Saidani M, Boutiba I, Ghozzi R, Kammoun A, Ben Redjeb. Profil bactériologique des bactériémies à germs multirésistants à l’hôpital Charles-Nicolle de Tunis. *Med Mal Inf* 2006 ; 36 :163-166.

[190] Hamze M, Dabboussi F, Daher W, Izard D. Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* au Nord du Liban : place de la résistance à la méticilline et comparaison des méthodes de détection. *Pathol Biol* 2003 ; 51 : 21–26.

[191] Ouchenane Z, Smati F, Rolain J-M, Raoult D. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. *Pathol Biol* 2011; 59:e129-e132.

[192] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992; 257: 1064–72.

[193] Udo EE, Grubb WB. Genetic analysis of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* from a Nigerian hospital. *J Med Microbiol* 1993; 38: 203–8.

- [194] Gus W, Krucke M, Deanna E, Grimes PH, Richard M, Thai D, Dang MD. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*—containing cutaneous abscesses of patients with HIV. *American Journal of Emergency Medicine* 2009; 27: 344–347.
- [195] Bryskier A. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses Edition Marketing S.A 1999 ; p 947-970.
- [196] Picot S, Rakotomalala R.S, Farny K, Simac C, Michault A. Évolution de la résistance aux antibiotiques de 1997 à 2005 à la Réunion. *Médecine et maladies infectieuses* 2010 ; 40 : 617–624.
- [197] Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP and Gaastra W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 601–604.
- [198] Ender M, McCallum N, Adhikari R, and Berger-Bachi B. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:2295–2297.
- [199] Patel JB, Huskins WC, Zhu W, Jernigan JA, Clark NC, Anderson KF, McDougal LK, C. *et al.* Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 2008; K-668.
- [200] Kleinschmidt SL, Munckhof WJ, Nimmo GR. In vitro exposure of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains to vancomycin: does vancomycin resistance occur? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006 ; 27 : 168–170.
- [201] Zribi M, et al. Detection of the first strain of glycopeptide intermediary *Staphylococcus aureus* in Tunis Rabta hospital. *Pathologie Biologie* 2009 ; xxx : xxx–xxx
- [202] Mainardi JL. Les glycopeptides: stop ou encore? The glycopeptides: Stop or else? *La Revue de médecine interne* 2010 ; xxx : xxx–xxx.
- [203] Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *n engl j med* 2003, 348;14.
- [204] Stahl JP. Actualités sur les infections sévères à gram positif. *Médecine et maladies infectieuses* 2010 ; 40 : 1–6.
- [205] Binoy J, Antoci V, Zeiger AR, Wickstrom E, and Hickok NJ. Vancomycin Covalently Bonded to Titanium Beads Kills *Staphylococcus aureus* *Chemistry & Biology* 2005; 12 : 1041–1048.
- [206] Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptides antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8:943-950.
- [207] Snowden MA, Perkins HR. Peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem* 1990; 191: 373-377
- [208] Hiramatsu K. Vancomycin resistance in Staphylococci. *Drug Resistance Updates* 1998; 135-150.
- [209] Mariani-Kurkdjian P., Nebbad H, Aujard Y., Bingen E. Surveillance des taux sériques de vancomycine dans le traitement des infections à staphylocoque en pédiatrie. *Archives de Pédiatrie* 2008;15:1625-1629.
- [210] Bingen E, Mariani-Kurkdjian P, Nebbad B. Comment optimiser le taux sérique de vancomycine dans le traitement des infections à *Staphylococcus aureus* ? *Médecine et maladies infectieuses* 2006 ; 36 : 439–442

- [211]Kato Y, Suzuki T, Ida T, Maebashi K, Sakurai M,1, Shiotani J, Hayashi I. Microbiological and clinical study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying VraS mutation: changes in susceptibility to glycopeptides and clinical significance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008; 31: 64–70.
- [212] Vidailac C, Leonarda, S, Rybaka, Michael J. In vitro evaluation of ceftaroline alone and in combination with tobramycin against hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) isolates *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010; 35: 527–530
- [213] Hidayat LK, Hsu DI, Quist R, Shriner KA, Wong-beringer A. High-dose vancomycine therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Arch Intern Med* 2006; 166:2138–44.
- [214]Pajot O, Regnier B. Échec de l'antibiothérapie en réanimation. Failure of antibiotic therapy in the intensive care unit. *Reanimation* 2007; 16: 179–192.
- [215]Cohen R. Apport de la pharmacocinétique pharmacodynamie au traitement des infections bactériennes de l'enfant. *Archives de pédiatrie* 2008 ; 15 : S53- S58
- [216]Garraffo R, Lavrut T. Signification clinique des corrélations pharmacocinétique / pharmacodynamie des antibiotiques chez les patients de réanimation. *Réanimation* 2005 ; 14 : 264–275.
- [217]Jehl F, Koebel C. Antibiotiques-Bactéries: Une relation (pharmaco) dynamique. *Revue Francophone des Laboratoires* 2011 ; N°434.
- [218]Hessen MT, Kaye D. Principles of use of antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am* 2004; 18:435–50.
- [219]Jehl F. Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides. *Antibiotiques* 2003 ; 5: 89-98.
- [220] Potel G. Associations d'antibiotiques dans les infections à staphylocoque doré : les arguments pour. *Ann Fr Anesth Reanim* 2002;21:406–9.
- [221] Albanese J, Bourgouin A, Martin C. Associations d'antibiotiques dans les infections à staphylocoque doré : les arguments contre. *Ann Fr Anesth Réanim* 2002 ; 21 : 399-405.
- [222] Daurel C, Leclercq R. Faut-il abandonner la vancomycine ? Vancomycin, what else? *Archives de Pédiatrie* 2010; 17: S121-S128.
- [223] Goldstein FW, et al. Vancomycin– Aminoglycosides: An Inappropriate Combination for the Treatment of GISA and other MRSA Infections, Rochon-Edouard; 2000.
- [224] Oshiro T, Nagasawa Z, Hanaki H , Ikeda-Dantsuji Y, Nagayama A. The antagonistic effects of a combination of vancomycin and minocycline in *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycine. *J Infect Chemother* 2008 ; 14:15–22.
- [225] Novales GM, Leaños-Miranda BE, Vilchis-Pérez M, Fortino Solórzano-Santos. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycine and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. Strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2006, 5:25.

- [226] Rochon-Edouard S, Pestel-Carnon M, Lemeland JF, Carnon F. In Vitro Synergistic Effects of Double and Triple Combinations of β -Lactams, Vancomycin, and Netilmicin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antimicrob Agents and Chemother* ; 2000,44 : 3055–60.
- [227]Totsuka, K., M. Shiseki, K. Kikuchi, and Y. Matsui. Combined effects of vancomycin and imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother*1999; 44: 455–460.
- [228] Climo M W, Patron RL, Archer GL, Combinations of Vancomycin and β -Lactams are Synergistic against Staphylococci with Reduced Susceptibilities to Vancomycin. *Antimicrob Agents and Chemother*, 1999; 36: 1747–53.
- [229] Fox, PM., Lampert RJ, Stumpf KS, Archer GL, and Climo MW. Successful therapy of experimental endocarditis caused by vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* with a combination of vancomycin and beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50 :2951–2956.
- [230] Périchon, B., and P. Courvalin.. Synergism between beta-lactams and glycopeptides against VanA-type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and heterologous expression of the *vanA* operon. *Antimicrob. Agents Chemother* 2006; 50:3622–3630.
- [231] Georges B., Roche C., Archambaud M., Decun J.F., Cougot P., Conil J.M., et al. Intérêt de l'association cefpirome-vancomycine sur la cinétique de bactéricidie dans les infections sévères à SAMR en réanimation. *Pathol Biol* 2002 ; 50 : 161-8.
- [232] Goldstein FW , Atoui R , Ben Ali A, Nguyen JC , Ly A , Kitzis MD. False synergy between vancomycin and beta-lactams against glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) caused by inappropriate testing methods. *Clin Infect Microbiol*. 2004; 4: 342-5.
- [233] Denes E, Hidri N. Synergie et antagonisme en antibiothérapie. *Antibiotiques* 2009; 11:106–15.
- [234] Paul M, Benuri-Silbiger I, Soares-Weiser K, Leibovici L. Beta-lactam monotherapy versus beta-lactam-aminoglycoside combination therapy for sepsis in immuno competent patients : systematic review and meta-analysis of rando-mised trials. *BMJ* 2004; 328:668.
- [235] Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Thomsen KM, Eckel-Passow JE, Vetter EA, et al. Beta-lactam and fluoroquinolone combination antibioticotherapy for bacteremia caused by gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1386–94.
- [236] Utsui Y, Ohya S, Magaribuchi T, Tajima M, Yokota T. Antibacterial activity of cefmetazole alone and in combination with fosfomycin against methicillin- and cephemresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:917—22.
- [237]Auboyer C, Beaucaire G, Drugeon H, Gouin F, Ie. Granry, Jarlier et al., Associations d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgicale et en chirurgie. Recommandations de la Société française d'anesthésie et de réanimation. *Med Mal infect* 2000; 185-90.
- [238]Park J, Gyo Lee W, Shin JH, Won Lee K, and Woo GJ. *VanB* Phenotype-*vanA* Genotype *Enterococcus faecium* with Heterogeneous Expression of Teicoplanin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46 (9): 3091–3093.
- [239]Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin.Infect.Dis*, 2006; 42:S25-S34

- [240]Périchon, B., and P. Courvalin. Heterologous expression of the enterococcal *vanA* operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48:4281–4285.
- [241]Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistant genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 93: 195–98.
- [242]Curtis G. Glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: is it real threat. *J Infect Chemother*, 2004; 10: 69-75.
- [243]Clark C, Weigel L, Patel B, Tenover C. Comparison of *Tn1546*-Like Elements in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005; 49: 470–472.
- [244] Courvalin P. Dual mode of action of telavancin against *Staphylococcus aureus*, 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 19 avril 2008, Barcelona. Spain ESCMID.
- [245] Lefort A. (2008). Les nouveaux antibiotiques anti staphylococciques [en ligne].
- [246]Lesens O. Vancomycin resistant Enterococci (VRE). *Nephrol Ther.* 2009; 5 (4) : S261-4.
- [247]Guillemot D, Carbon C, Balkau B, et al. Low dosage and long treatment duration lactam risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *JAMA* 1998; 279: 365–70
- [248] Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptideresistance in enterococci. *Trends Microbiol* 1996; 4: 401–07.
- [249]Gonzales-Zorm B., Courvalin P. Van A-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. *The Lancet* 2003; 3:67–68.
- [250]Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin.. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20:79–114.
- [251]Bert V, Leflon-Guibout J, Le Grand N, Bourdon M.-H, Chanoine N. Émergence d'entérocoque dépendant de la vancomycine à la suite d'un traitement par glycopeptides : cas clinique et revue. *Pathologie Biologie* 2009 ; 57 : 56–60.
- [252]Périchon B and Courvalin P. VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nov. 2009, p. 4580–4587.

Annexes

Annexe I

Valeurs des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus spp* (CLSI 2008)

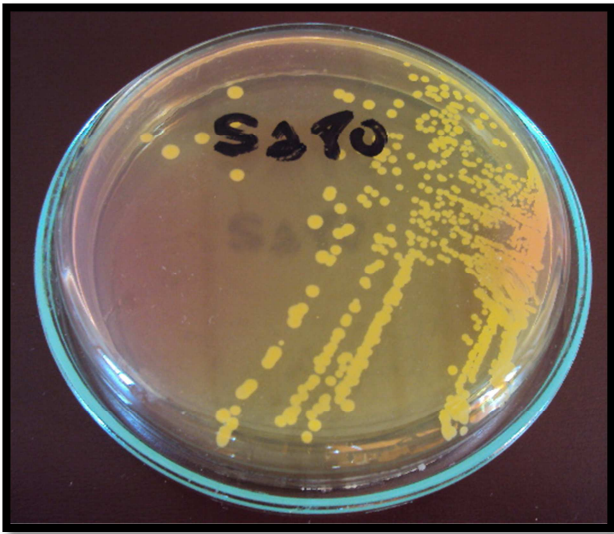
Antibiotiques testés	Sigle	Charge de disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Concentrations critiques (µg/ml)	
			S	I	R	S	R
Pénicilline	P	10 U	≥ 29	-	≤28	≤0.12	
Céfoxitine	FOX	30	≥22	-	≤21	≤2	≥4
Oxacilline	OX	1	≥13	11-12	≤10	≤2	≥4
Carbapénèmes Imipenème	IPM	10	≥16	14-15	≤13	≤4	≥16
Aminosides Gentamycine	GN	10	≥15	13-14	≤12	≤4	≥8
Kanamycine	K	30	≥18	14-17	≤13	≤6	≥25
Tobramycine	TOB	10	≥15	13-14	≤12	≤4	≥8
Macrolides Erythromycine	E	15	≥23	14-22	≤13	≤ 0,5	≥8
Lincosamides Clindamycine	CM	2	≥21	-	≤14	≤0,5	≥4
Glycopeptides Vancomycine	VA	30	≥15	-	-	≤2	-
Fluoroquinolones Ofloxacin	OFX	5	≥18	15-17	≤14	≤1	≥4
Ansamycine Rifampicine	RA	5	≥20	17-19	≤16	≤1	≥ 4

Annexe II

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif		Jaune
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydre		
MNE	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 mn	
			Incolore/rose	Rouge
PAL	β-naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 mn	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			Incolore/ rose	Violet/rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydre	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α-méthyl-D- glucosamine			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

Annexe III : Photos personnelles



Aspect de *S. aureus* sur milieu Chapman

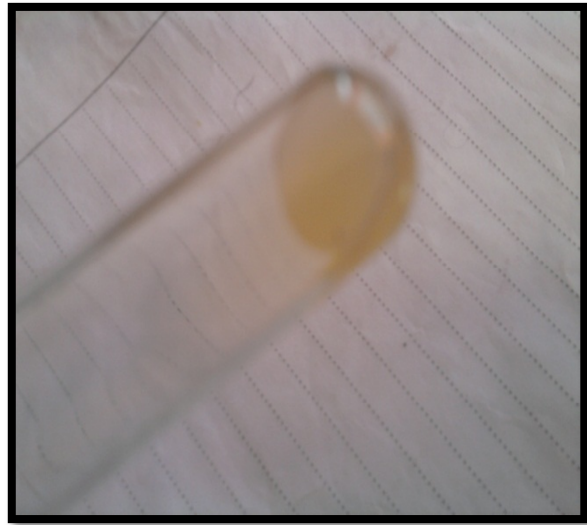


Illustration de la production de la thermonucléase

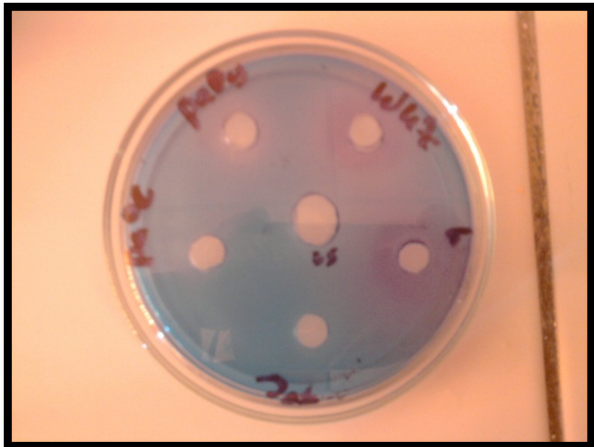
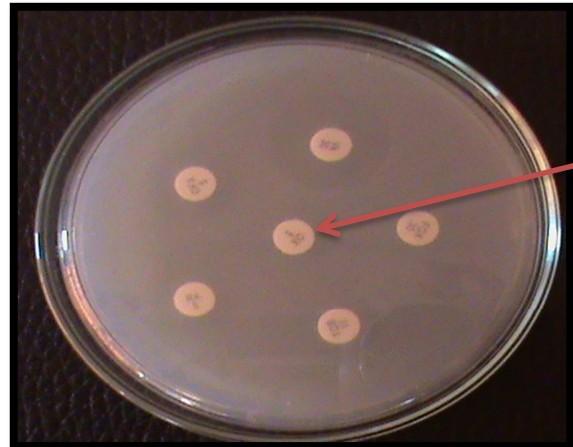
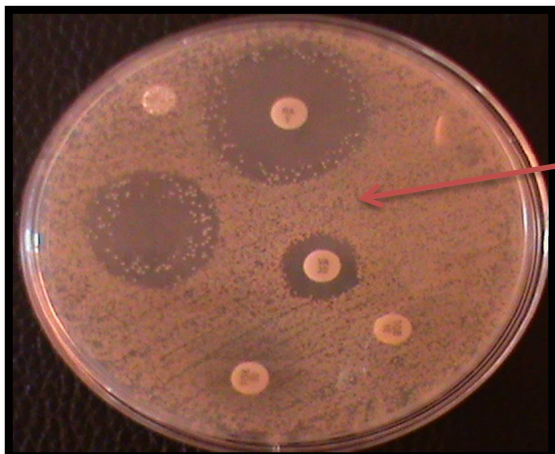


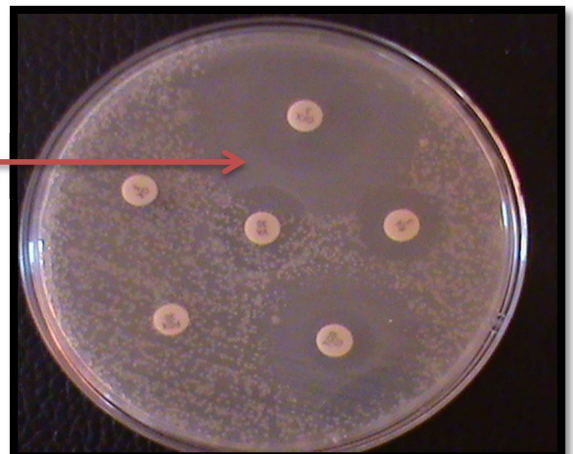
Illustration de la production d'une coagulase



Aspect de la résistance à la vancomycine



Diminution significative du diamètre d'inhibition de la vancomycine (11mm)



Aspect de la résistance hétérogène à la vancomycine

Résumés

Résumé

Les infections nosocomiales constituent un véritable problème de santé publique mondiale. Et même si la lutte contre ces infections est bien orchestrée dans les pays développés elle demeure primitive chez les pays en voie de développement qui enregistrent souvent une carence en matière de données fiables et d'une absence de législation.

A l'origine de ces infections un certain nombre de microorganismes se sont individualisés, dont *Staphylococcus aureus* qui reste un très bon indicateur de la qualité des soins. L'objectif de ce travail était de caractériser phénotypiquement cette bactérie, de connaître l'incidence et la prévalence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dans le centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Algérie). Le recueil des données a également concerné l'évaluation du niveau de résistance aux antibiotiques tout en mettant l'accent sur la mise en évidence du phénomène de multirésistance qui ne cesse de s'étendre pour atteindre aujourd'hui des molécules considérées comme ultimes remparts.

Nos résultats mettent en avant une incidence alarmante de SARM dans le service de chirurgie avec un taux atteignant 9% journée d'hospitalisation. Ces souches qui ont exprimé un niveau de résistance inacceptable au vue des CMI retrouvées, ont également manifesté une multirésistance, caractérisée par l'apparition d'une résistance à la vancomycine. Ces souches qui pourraient être les premières isolées en Algérie se caractérisent par différentes CMI (16 µg/ml, 64 µg/ml et 128 µg/ml. Ces résultats ont été confirmés par technique d'amplification (PCR) qui a révélé la présence du gène *vanA*.

Devant le phénomène de résistance, les associations d'antibiotiques demeurent une excellente alternative thérapeutique, en permettant à la fois la prévention de l'émergence des résistances et l'élargissement du spectre d'action qui peut atteindre des foyers polymicrobiens profonds.

Mots clés : antibiorésistance, Association d'antibiotiques, caractérisation, Infections nosocomiales, *Staphylococcus aureus*, Vancomycine.

Summary

Nosocomial infections constitute a major public health problem worldwide. And even if the fight against these infections is well orchestrated in developed countries remains primitive in developing countries who often deficient in terms of reliable data and a lack of legislation.

The origin of these infections a number of microorganisms are individualized, including *Staphylococcus aureus*, which is a very good indicator of quality of care. The aim of this study was to characterize phenotypically the bacteria, to know the incidence and prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in the university hospital of Tlemcen (Algeria). Data collection has also assessed the level of antibiotic resistance while focusing on the discovery of the phenomenon of multidrug resistance that continues to grow and now stands molecules considered as ultimate walls.

Our results highlight an alarming incidence of MRSA in the surgical ward with a rate of up to 9% day of hospitalization. These strains that have expressed an unacceptable level of resistance to the MIC found, also expressed multidrug resistance, characterized by the development of resistance to vancomycin. These strains which could be the first isolated in Algeria, are characterized by different MIC (16 μ / ml, 64 μ g / ml and 128 μ / ml), these result had been confirmed by polymerase chain reaction ,and showed the presence of *vanA* gene.

Before the phenomenon of resistance, antibiotic combinations remains an excellent therapeutic alternative, allowing both the prevention of the emergence of resistance and expanding the spectrum of action that can reach deep polymicrobial homes.

Keywords: antibiotic resistance, antibiotics Association, characterization, Nosocomial infections, Staphylococcus aureus, Vancomycin

ملخص

تشكل عدوى المستشفيات الصحية في جميع أنحاء العالم مشكلة هامة، و إن كانت الدول المتقدمة تدير بإحكام مكافحة هذه الأمراض، تبقى بعض البلدان النامية تعاني من نقص في البيانات و الأرقام و التشريعات الخاصة بهذا الموضوع.

أصل هذه الالتهابات عدد من الكائنات الحية الدقيقة بما فيها المكورات العنقودية الذهبية التي تبقى مؤشرا قويا عن جودة الرعاية الصحية (*Staphylococcus aureus*).

كان الهدف من هذه الدراسة التوصيف الخارجي لهذه البكتيريا و التعرف على نسبة مقاومة البكتيريا للمضاد الحيوي "الميتيسلين" على مستوى المستشفى الجامعي لتلمسان (الجزائر).

إن سجل البيانات قد سلط الضوء على تقييم مستوى هذه المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي لا تزال تنتشر حتى خصت جزيئات تعتبر حتى الآن من آخر وسائل المكافحة.

بينت نتائج هذه الدراسة عن نسبة مخيفة تصل إلى 5 في الألف يوم في المستشفى، لوجود المكورات العنقودية الذهبية المضادة للميتيسلين (SARM) في جناح العمليات الجراحية.

بعض العزلات التي تم اكتشافها لأول مرة في الجزائر أظهرت مستوى مقاومة للفانكوميسين يقدر بنسبة 16 µغ/مل، 64 µغ/مل، 128 µغ/مل. هذه النتائج تم تأكيدها بواسطة تقنية التضخيم التي بينت وجود الجين *vana* المسؤول عن مقاومة هذه البكتيريا للفانكوميسين.

لمقاومة هذه الظاهرة، تبقى المضادات المزدوجة بديلا ممتازا للعلاج حيث تسمح في نفس الوقت الوقاية من ظهور جديد للمقاومة و توسيع لنطاق فعاليتها مع الوصول إلى أعماق المواضع متعددة البكتيريا.

كلمات البحث : مقاومة المضادات الحيوية، المضادات الحيوية المزدوجة، التوصيف، عدوى المستشفيات، المكورات العنقودية الذهبية، فانكوميسين.