

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAÏD TLEMCEM

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE,
ET DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS



LAMAABE
مختبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للأغذية البيطرية والبيئية
www.lamaabe.dz

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE
A L'AGROALIMENTAIRE ET AU BIOMEDICALE
LAMAABE



Département de Biologie

MEMOIRE

En vue de l'obtention du grade de master en Biologie moléculaire et
cellulaire

Option : Microbiologie

Thème

Caractérisation génétique par réaction de polymérisation en chaîne
(PCR) des souches de *Staphylococcus aureus* d'origine hospitalière

Présenté par :

➤ Mlle : BEZZAR Nesrine

Soutenu le 14 septembre 2014 devant les membres de jury suivants :

- | | | |
|------------------------|-------------------------|-----------|
| ➤ Pr. Mourad ARIBI | Professeur | Président |
| ➤ Dr REBIAHI Sid Ahmed | maitre de conférences | Promoteur |
| ➤ Dr AZZI Rachid | maitre de conférences B | Examineur |
| ➤ Dr TEFIANI Choukri | maitre assistant A | Examineur |

2013-2014

Liste des abbreviations

ADN : acide desoxyribonucleotide

ARN: acide ribonucléique

ATCC: American type culture collection

BET: bromure d'ethidium

BHIB: brain heart infusion bouillon

dNTP: désoxyribonucléotides triphosphate

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid

GC : guanine cytosine

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IN : infection urinaire

ISO : infection du site opératoire

Kb: Kilobase

mM: millimole

ng: nanogramme

nuc: nuclease

NaCl : Chlorure de sodium

pb : paire de base

PCR :polymerase chain reaction

RT-PCR : Reverse transcription ou transcription inverse

S. aureus : *staphylococcus aureus*

TAE: Tris, Acétate, EDTA

TAIL-PCR: thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction

Taq: *Thermus aquaticus*

T_m : melting temperature, température de fusion moléculaire

TNase: thermonuclease

UV : ultraviolet

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VHC: VirnetX Holding Corporation (hépatite C)

μg.microgramme

μl: microlitre

μM: micromole

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les maladies causées par les Staphylocoques	08
Tableau2 : Origine et caractéristiques des souches de références utilisées dans ce travail..	22
Tableau 3 : Propriétés des couples d’amorces utilisées pour la détection des gènes de Thermonuclease	32
Tableau 4 : Préparation du mix en volume pour l’amplification	33
Tableau 5 : fréquence d’isolement de <i>S.aureus</i>	41

Liste des figures

Figure 1 : Aspect de <i>S. aureus</i> suite à une coloration de Gram	04
Figure 2 : Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique	06
Figure 3 : Principe de la réaction de PCR	12
Figure 4 : Amplification multiplex de 9 exons dans le gène de la dystrophine humaine	19
Figure 5 : Schéma de RT-PCR montre que l'ARN isolé à partir de cellules ou de tissu est utilisé comme substrat dans le sens inverse de transcription pour la synthèse de l'ADNc qui servira de matrice pour l'amplification par PCR	21
Figure 6: Schéma de l'identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figure 7 : Ensemencement de la galerie Api 20 Staph	29
Figure 8: Schéma représentatif du programme de la PCR utilisé	31
Figure 9 : Marqueur 1 Kb (1), et 100pb (2).....	35
Figure 10 : Répartition des prélèvements selon leur culture	37
Figure 11 : Distribution de l'infection du site opératoire selon le sexe dans le service de chirurgie A.....	37
Figure 12 : Répartition des infections nosocomiales (ISO) dues à <i>S. aureus</i> dans le service de chirurgie A selon l'âge	38
Figure 13: Aspect des colonies de <i>S.aureus</i> sur milieu Chapman	39
Figure 14: aspect microscopique de <i>staphylococcus aureus</i> (1000x)	40
Figure 15 : Mise en évidence de catalase (A) et coagulase (B) libre chez <i>S.aureus</i>	40
Figure 16: Représentation graphique du nombre des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> au sein du service de chirurgie A	41
Figure17 : Gel d'électrophorèse des extraits d'ADN	42
Figure 18: Révélation du gène <i>nuc</i> par l'amplification chez les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> d'origines hospitalières	44

Résumé

Staphylococcus aureus est un agent pathogène majeur de l'homme, impliqué dans 1 à 5% des infections communautaires et jusqu'à 30% des infections acquises en milieu hospitalier (infections nosocomiales). Le traitement des infections à *S. aureus* est de plus en plus difficile en raison de la prévalence élevée des souches multirésistantes aux antibiotiques.

Staphylococcus aureus est l'un des plus importants pathogènes humains associés à l'hôpital et acquis communautaire des infections. En raison de son importance clinique, une mauvaise identification de cet agent pathogène dans des échantillons cliniques peut avoir des conséquences graves telles qu'une augmentation de la morbidité et de la mortalité.

Nous rapportons ici le développement d'un protocole de PCR classique pour le diagnostic d'infection staphylococcique collectés à partir du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Le protocole a été conçu pour détecter toutes les espèces de *Staphylococcus aureus* à l'exclusion d'autres bactéries pathogènes (sur la base des amorces correspondant à des régions spécifiques de *Staphylococcus aureus*, le gène *nuc*).

Des amorces oligonucléotidiques synthétiques, ont été utilisées dans la chaîne de la réaction par polymérase (PCR) pour amplifier une séquence du gène *nuc*, qui code pour la nucléase thermostable de *Staphylococcus aureus*.

Un fragment d'ADN d'environ 282 pb a été amplifié à partir des cellules des souches cliniques de *S. aureus*. L'amplification n'a pas été enregistrée pour une autre espèce (*Staphylococcus hominis*)

La technique PCR combinée avec la méthode d'extraction de l'ADN dans cette étude est un moyen rapide, simple et fiable. Cette stratégie pourrait être utile dans les laboratoires de routine pour évidemment soutenir l'antibiothérapie des infections.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, infections nosocomiales, identification, PCR, amorces, gène *nuc*, extraction de l'ADN.

Abstract

Staphylococcus aureus is a major pathogen of man involved in 1-5% of community infections and up to 30% of hospital-acquired infections (nosocomial infections). Treatment of *S. aureus* is becoming more difficult due to the high prevalence of multidrug-resistant strains to antibiotics.

Staphylococcus aureus is one of the largest hospital-associated and community-acquired infections human pathogens. Because of its clinical importance, misidentification of this pathogen in clinical samples can have serious consequences such as increased morbidity and mortality.

We report the development of a standard PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection collected from the university hospital of Tlemcen .The protocol was designed to detect all species of *Staphylococcus aureus* to the exclusion of other pathogenic bacteria (using primers corresponding to specific regions of *Staphylococcus aureus*, the *nuc* gene)

Synthetic oligonucleotide primers were used in the sequence of the polymerase chain reaction (PCR) to amplify a sequence of the *nuc* gene, which codes for the thermostable nuclease of *Staphylococcus aureus*.

A DNA fragment of about 282 bp was amplified from cells of *S. aureus*. The amplification has not been registered for another species (*Staphylococcus hominis*).

PCR technique combined with the method of extraction of DNA in this study is a fast, simple and reliable .This strategy could be useful in routine laboratories for recess support antibiotic therapy for infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, nosocomial infections, identification, PCR, primers, *nuc* gene, DNA extraction.

ملخص

المكورات العنقودية الذهبية هو الممرض الرئيسي للإنسان بحيث تشارك في 1-5% من العدوى في المجتمع وتصل إلى 30% من العدوى المكتسبة من المستشفيات (عدوى المستشفيات). إن علاج المكورات العنقودية الذهبية أصبح أكثر صعوبة بسبب ارتفاع معدل انتشار السلالات المقاومة للمضادات الحيوية.

المكورات العنقودية الذهبية هي واحدة من أكبر مسببات الأمراض المرتبطة بالمستشفيات والعدوى المكتسبة من المجتمع. بسبب الأهمية السريرية، عدم التعرف على هذا الممرض في العينات له عواقب خطيرة مثل زيادة معدلات الاعتلال والوفيات.

تم تصميم ووضع بروتوكول للكشف عن جميع أنواع المكورات العنقودية الذهبية التي تم جمعها من المستشفى الجامعي لتلمسان. ويهدف البروتوكول لتشخيص عدوى المكورات العنقودية وإقصاء البكتيريا الأخرى المسببة للأمراض (باستخدام بادئات المقابلة لمناطق معينة من المكورات العنقودية الذهبية، وهي الجين *nuc*).

واستخدمت بادئات قليلة النوكليوتيد الاصطناعية في تسلسل تفاعل البوليميراز لتضخيم تسلسل الجين *nuc* والذي يرمز إلى *thermonuclease* للمكورات العنقودية الذهبية.

نقطة أساس من الحمض النووي عن 282 زق (زوج قواعد) تم تضخيمها من خلايا سلالتين سريرية للمكورات العنقودية الذهبية. لم يتم تسجيل أي تضخيم لنوع واحد من البكتيريا غير المكورات العنقودية الذهبية.

طريقة سلسلة رد فعل البلمرة واستخراج الحمض النووي في هذه الدراسة هي استراتيجية سريعة، بسيطة وموثوق بها يمكن أن تكون مفيدة في المختبرات الروتينية لدعم العلاج بالمضادات الحيوية.

كلمات البحث: المكورات العنقودية الذهبية، عدوى المستشفيات، تحديد الهوية، سلسلة رد فعل البلمرة PCR، الجين *nuc* استخراج الحمض النووي

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Liste des Abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Introduction01

Synthèse bibliographique03

Chapitre I : Généralités sur staphylocoque03

I.1 Historique03

I.2 *Staphylococcus aureus*.....03

I.3 Taxonomie04

I.4. Généralités sur le *S. aureus*.....04

I.4.1 Place du *S. aureus* chez les bactéries04

I.4.2 Place du *S. aureus* dans le genre *Staphylococcus*05

I.4.3 Caractères bactériologiques05

a- Morphologie.....05

b- Morphologie des colonies de *S. aureus*.....06

I.5 Pouvoir pathogène06

I.6 Les maladies causées par les Staphylocoques.....07

I.7 Les infections nosocomiales.....09

I.7.1 Définitions des infections nosocomiales.....09

I.7.2 Les différents types d'infections nosocomiales09

Chapitre II : Amplification en chaine par polymerase (PCR)11

II.1 Historique11

II.2. Définition de la PCR.....11

II.3 Principe de la PCR.....	11
II.4.Application de la PCR.....	12
II.5.Étapes de la PCR.....	13
II.5.1 La dénaturation thermique.....	13
II.5.2 Recuit des amorces.....	14
II.5.3 Extension des amorces.....	14
II.5.4 Nombre de cycle.....	16
II.5.5 Performances de la technique PCR	16
II.5.6 types de PCR (Polymerase Chain Reaction)	17
Chapitre III : Matériel et méthodes.....	22
1-Matériels	22
1.1Matériels biologique	22
1.2. Milieux, réactifs et produits	22
2. Méthodes	23
2.1 Prélèvements et population étudiés	23
2.2 Ensemencement.....	25
2.3 Isolement et purification	25
2.4 Identification	25
2.4.1 Coloration de Gram	25
2.4.2 Recherche de la catalase	25
2.4.3 Recherche de la coagulase	26
2.4.4 Identification par plaque API STAPH (BioMérieux)	27
2.4.5 Les techniques de biologie moléculaire	30
Chapitre VI : Résultats et discussion	36
1-Prélèvement	36
2- identifications du genre Staphylococcus	39
3 –Identification de l'espèce.....	40

4-detection du gène <i>nuc</i>	42
Conclusion	46
Références bibliographiques	47
Annexes	54

Introduction

Staphylococcus aureus est à la fois un germe commensal et un agent pathogène majeur de l'homme, impliqué dans 1 à 5% des infections communautaires et jusqu'à 30% des infections acquises en milieu hospitalier (nosocomiales) (Agnieszka *et al.*, 2006).

Pour toutes ces raisons, cette bactérie est considérablement étudiée de nos jours et dans tous les domaines scientifiques : biologie moléculaire, biologie cellulaire, phylogénie, génétique évolutive, etc. Cependant, en raison de son expansion continue, en particulier dans les milieux hospitaliers, chaque étude d'épidémiologie moléculaire analysant une situation particulière permet non seulement de suivre et de comprendre son évolution, mais également de définir des stratégies de lutte au niveau d'un hôpital ou d'un pays.

L'identification classique des souches pathogènes présente des inconvénients tels qu'une caractérisation phénotypique non discriminante et difficile en raison du manque de certains produits et réactifs, la non cultivabilité des bactéries pose aussi un problème, ainsi que la majorité des espèces ne sont jamais décrites avec tels méthodes.

La biologie moléculaire n'a pas encore réussi à s'imposer dans la recherche dans les pays en voie de développement qui enregistrent une carence en matière de données fiables et d'une absence de législation et où la pluridisciplinarité n'est pas encore évidente.

Pour pouvoir constituer un réel progrès par rapport aux méthodes classiques les techniques de réaction en chaîne par polymérase (PCR) en diagnostic ont apporté de nouvelles perspectives dans la précision, la spécificité et la rapidité.

Dans la présente étude, nous nous sommes proposés d'appliquer une analyse par PCR pour pouvoir identifier l'espèce de *S. aureus*, répandue dans les infections nosocomiales en utilisant un protocole d'extraction d'ADN simple et rapide.

Le point de départ de ce travail était de réaliser une analyse génétique et phénotypique d'un échantillon de souches de *S. aureus* isolées pendant une période de 2 mois dans le service de

Introduction

chirurgie A de CHU Tlemcen, le dépistage par PCR a ciblé le gène *nuc* de *S.aureus* codant pour la thermonucléase spécifique à cette espèce.

Etude bibliographique

Chapitre I : Généralités sur staphylocoque

1.1 Historique

Les premières descriptions des staphylocoques (bactéries en forme de coques) isolés à partir de pus d'abcès datent de 1871 mais ce n'est que quelques années plus tard que ces travaux permettront de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1878, Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine. La même année, en Ecosse, Alexander Ogston propose le nom "Staphylococcus" (staphylê : grappe et kokkos : grain) car les bactéries se regroupent en amas irréguliers ressemblant à une grappe de raisin. Ogston différencie ainsi *Staphylococcus* de *Streptococcus*. Enfin, en 1884, en Allemagne, Anton Julius Friedrich Rosenbach donne la première description du genre *Staphylococcus* en cultivant les bactéries sur milieu solide. Il différencie ainsi *S. aureus* de *S. albus* par la coloration des pigments produits par les colonies. **(Hennekinne, 2009)**

1.2 *Staphylococcus aureus*

Le staphylocoque doré ou *Staphylococcus aureus* est toujours une espèce bactérienne importante en pathologie médicale dont les cadres nosologiques ont évolué au cours du temps. Avant l'ère des antibiotiques et de leur usage intensif, les infections cutanées ou cutanéomuqueuses, telles que les panaris, furoncles, impétigo, étaient fréquentes et banales en pratique communautaire.

Ces infections n'étaient pas redoutées en raison de diverses possibilités d'approche thérapeutique, liées au miracle des antibiotiques. Cependant, dans les années 1970, l'émergence continue de souches de *S. aureus* multirésistantes aux antibiotiques a commencé à poser des problèmes de choix thérapeutique, plus particulièrement en milieu hospitalier. Ainsi, la résistance acquise de cette espèce bactérienne vis-à-vis des antibiotiques s'est enrichie au fur et à mesure de leurs introductions en thérapeutique humaine. Il convient de citer les bêta-lactamines, les aminosides, les macrolides ou apparentés (synergistines, lincosamides), acide fusidique ou encore plus récemment, les fluoroquinolones. **(Laurence et al., 2010)**

Etude bibliographique

1.3 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

(Figure 1)

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : Staphylococcus

Espèce : *Staphylococcus aureus* (Prescott *et al.*, 2010)



Figure 1 : Aspect de *S. aureus* suite à une coloration de Gram
(Hennekinne, 2009)

1.4. Généralités sur le *S. aureus*

1.4.1 Place du *S. aureus* chez les bactéries

S. aureus étant un organisme vivant procaryote et une bactérie à Gram positif, il se retrouve donc dans le règne des *bacteria*, dans le phylum des *firmicutes*. En 2001, Garrity et Holt ont proposé de radier *S. aureus* de la famille des *Micrococcaceae* (genre *Micrococcus* et *Stomatococcus*) grâce à l'analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) ainsi que d'autres analyses génétiques (Dworkin ,2006). Sa famille comporte les genres *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macrooccus*, ainsi que le plus

Etude bibliographique

important genre : *Staphylococcus*. On retrouve donc *S. aureus* dans le genre *Staphylococcus*. (Robert, 2013)

1.4.2 Place du *S. aureus* dans le genre *Staphylococcus*

S. aureus est une espèce de staphylocoques qui n'est pas unique dans le genre *Staphylococcus*. Une minorité de staphylocoques a été isolée chez l'espèce humaine, les autres espèces étant exclusivement retrouvées chez des espèces animales. Certaines des 18 espèces staphylococciques isolées chez l'Homme sont pathogènes et peuvent donc entraîner des infections. Le genre *Staphylococcus* regroupe donc des espèces connues comme *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* ou *S. capitis*. A l'heure actuelle, il y a 47 espèces et 24 sous espèces dans le genre *Staphylococcus* (Euzéby, 2013).

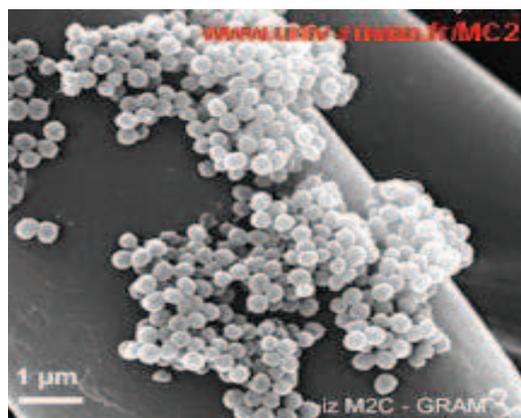
Concrètement, la différence entre ces espèces et *S. aureus* peut s'établir grâce à des kits d'identification ainsi que par des galeries d'identification qui sont basés sur des caractères biochimiques. En effet une absence et/ou une présence d'une activité enzymatique, de facteurs de virulence, de dégradation d'un substrat peut identifier l'une ou l'autre des espèces staphylococciques.

1.4.3 Caractères bactériologiques

a- Morphologie

On retrouve les staphylocoques en amas irréguliers de bactéries ou regroupés par deux (diplocoques) ou par quatre (tétraèdres) (**Figure 2**). Ces petits amas forment souvent des grappes et c'est grâce à l'examen direct que la bactérie a été nommée par Ogston (1884).

Ce sont des cocci Gram positif, d'environ 0,5 à 1 μm de diamètre. Ils sont immobiles, non sporulés. La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture. (Robert, 2013)



**Figure 2 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique
(Hennekinne, 2009)**

b- Morphologie des colonies de *S. aureus*

Le *S. aureus* est une bactérie à croissance aéro-anaérobie facultative, et sa croissance sur milieu ordinaire est facile entre 10 et 45 °C. Sur une gélose profonde en tube, les bactéries cultivent tout au long du tube donc le caractère aéro-anaérobie facultatif est confirmé. Les colonies observées sont alors lisses, opaques, convexes et rondes (à bord net). Leur diamètre est compris entre 1 et 3 mm et elles peuvent être pigmentées. Cette coloration a d'ailleurs donné le nom d' « aureus » à *S. aureus* car la pigmentation est souvent de couleur or (jaune à jaune orangée).

Il faut préciser que *S. aureus* peut également croître en milieu hostile comme sur une gélose Chapman (milieu sélectif hypersalé), ce qui est un avantage pour isoler la souche. Enfin, les colonies cultivant sur gélose au sang peuvent être bêta-hémolytiques. **(Robert, 2013)**

1.5 Pouvoir pathogène

S. aureus n'est ni un pathogène strict ni un germe opportuniste pur. De plus, les infections à *S. aureus* sont très polymorphes allant d'infections cutanées bénignes comme les furoncles et les panaris à des infections mettant en jeu le pronostic vital comme les états de choc, les endocardites, les pneumonies, les infections du système nerveux central **(Corne, 2004)**

Etude bibliographique

On peut classer les infections à staphylocoques dorés en deux groupes :

- les infections suppuratives qui dépendent de la prolifération du germe, le staphylocoque est présent dans le site infectieux et le patient guérit de l'infection après élimination de la bactérie.
- les infections dites toxiques où une toxine sécrétée par le staphylocoque est responsable des symptômes. **(Corne, 2004)**

➤ **Réservoirs**

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires présentes sur la peau, les muqueuses et la sphère rhino-pharyngée chez les animaux à sang chaud (mammifères, volailles) et en particulier chez l'Homme.

Les staphylocoques ont également été isolés de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'Homme (cuisine, réfrigérateur), de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaires et à partir de denrées alimentaires. La peau et les muqueuses de l'Homme et des animaux constituant l'habitat primaire de *S. aureus*, la présence de ce germe dans l'environnement est vraisemblablement due à une contamination par l'Homme ou les animaux **(Bergdoll, 1979)**.

1.6 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 1) (Schaechter et al., 1999)**

Etude bibliographique

Tableau 1: Les maladies causées par les Staphylocoques (Schaechter *et al.*,1999)

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)	
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)

Etude bibliographique

I.7 Les infections nosocomiales

I.7.1 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 **(Dia et al .,2008)**

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 ». **(Ellenberg ,2005)**

-L'infection nosocomiale qui atteint un professionnel travaillant à l'hôpital est dite « Professionnelle » **(Ellenberg, 2005)**

I.7.2 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 : **(Hamza ,2010)**

➤ 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) **(Dia et al.,2008)**

➤ Infections respiratoires : Sont à la première place des infections dans les unités de réanimation et de soins intensifs **(Drancourt et Adekambi, 2004)**. Aux premier 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 **(Dia et al.,2008)**

➤ 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.

(Drancourt et al ., 2004) L'ISO peut se manifester après un délai variable suivant la

Etude bibliographique

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 (**Drancourt et al., 2004**)

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 (**Hamza., 2010**). 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 (**Simon, 2007**)

➤ 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 (**Gayvallet et al., 2002**)

Etude bibliographique

Chapitre II : Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

II.1 Historique

Kary Mullis, chercheur de la jeune firme de biotechnologie californienne Cetus, (**Nicolas, 2014**) En 1983, découvre le concept technologique, la technique PCR (polymerase chain reaction) qui furent développée par HERLICH et al de la compagnie Cetus en 1985. (**Mullis et Falooma ,1986**)

Kary Mullis a obtenu pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993 (**Defortescu et al., 2007**).

II.2. Définition de la PCR

PCR :Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction) ou encore (ACP pour amplification en chaîne par polymérase) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique in vitro qui permet de copier en grand nombre d'une séquence d'ADN connue, présente dans l'échantillon même en très faible quantité (**Méric et Balaruc,2008**)

II.3. Principe de la PCR

La PCR peut être considéré comme une version simplifiée du processus de réplication de l'ADN qui se produit au cours de la division cellulaire. La PCR de base se compose de trois étapes: la dénaturation thermique de l'ADN cible, l'hybridation des amorces oligonucléotidiques de synthèse, et l'extension des amorces hybridées par une polymérase d'ADN (**Figure 3**).

Ce cycle en trois étapes est ensuite répété à plusieurs reprises, à chaque fois environ doubler le nombre de molécules de produit. Le facteur d'amplification est donnée par l'équation $x(1 + E)^n$, où x = quantité initiale de cible, E = efficacité d'amplification, et n = nombre de cycles de PCR. Après quelques cycles, le produit résultant est de la taille déterminée par la distance entre les extrémités 5' des deux amorces. Avec les performances d'une étape de transcription inverse précédente, la PCR peut également être appliquée à l'ARN. (**Dennis et al., 2006**)

Etude bibliographique

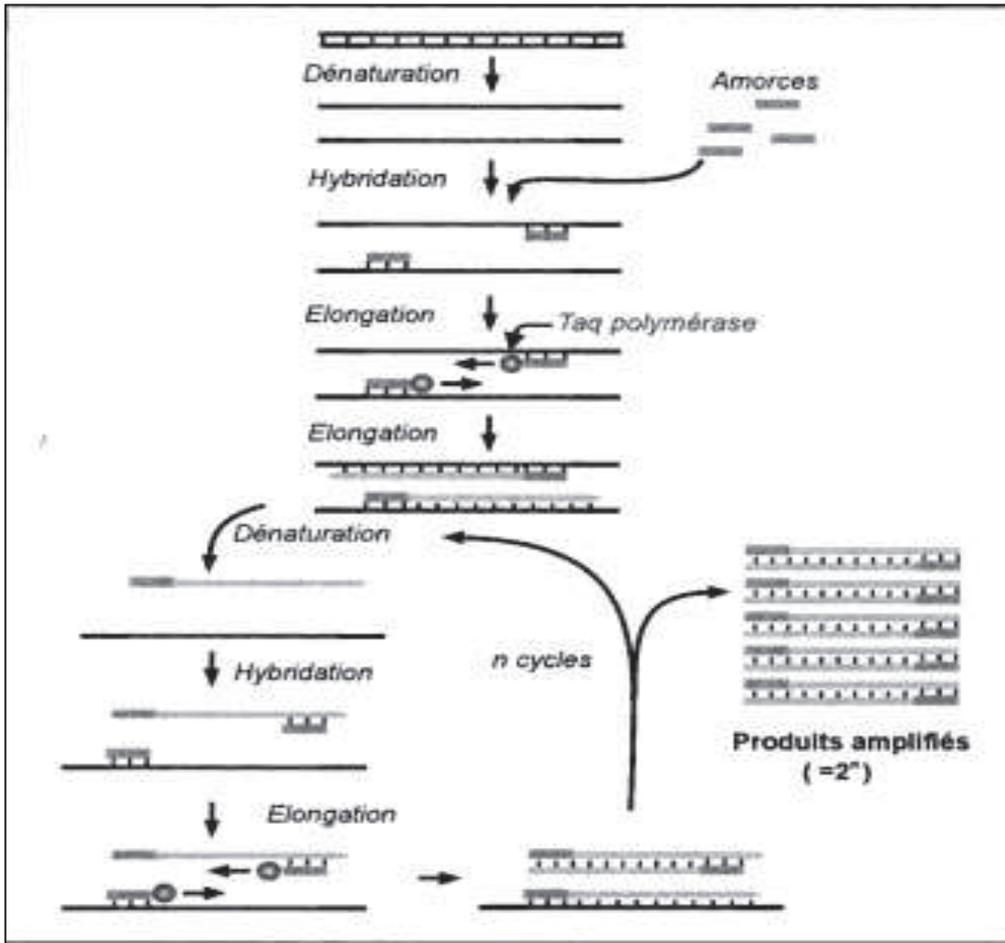


Figure 3 : Principe de la réaction de PCR (Mamette, 2002)

II.4. Application de la PCR

PCR est probablement la seule invention méthodologique la plus importante dans la biologie moléculaire à ce jour. Depuis sa création au milieu des années 1980, il a rapidement devenue une procédure de routine dans chaque laboratoire de biologie moléculaire pour identifier, pour les manipulations du matériel génétique, du clonage, le séquençage, mutagenèse, à la recherche de diagnostic et l'analyse génétique. Ce qui est étonnant à propos de cette invention est que les applications nouvelles et innovantes de PCR ont été générées avec une régularité étonnante, son potentiel n'a montré aucun signe de stabilisation. De nouvelles applications pour la PCR sont littéralement en train de transformer la biologie moléculaire. Dans l'ère post-génomique, en particulier par PCR a devenu le procédé de choix pour cloner des gènes existants et générer une

Etude bibliographique

large gamme de nouveaux gènes par mutagenèse et / ou par recombinaison au sein des gènes d'intérêt. La disponibilité rapide et facile de ces gènes est essentielle pour l'étude de la génomique fonctionnelle, l'expression des gènes, les relations de la fonction de la structure des protéines, des interactions protéine-protéine, l'ingénierie des protéines, et l'évolution moléculaire.

II.5.Étapes de la PCR

D'après **(Dennis *et al.*, 2006)**

Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation (ou anelage) et l'élongation (ou extension des amorces).

II.5.1 La dénaturation thermique

Une cause commune de la PCR est la dénaturation insuffisante de l'ADN cible. Nous utilisons habituellement une température de dénaturation initiale de 94 ° C pendant 8 min. **(Kuiken *et al.*, 2003)**.

La Modification de la Taq polymérase, par exemple. AmpliTaq Gold, peut être activées au cours de ce processus de dénaturation initiale pour obtenir un début de PCR chaud. Pour les cycles suivants, 94 ° C pendant 1-2 min est généralement adéquate. Les objectifs des cycles de PCR ultérieures sont principalement des produits de PCR, plutôt que de l'ADN génomique, il a été suggéré que la température de dénaturation peut être abaissée après les 10 premiers cycles de manière à éviter la dénaturation thermique excessif de la Taq polymérase **(Kuiken *et al.*, 2003)**. La demi-vie de l'activité de la Taq polymérase est supérieure à 2 heures à 92,5 ° C, 40 min à 95 ° C, et 5 min à 97,5 ° C.

II.5.2 Recuit des amorces

La température et la durée du temps nécessaire pour l'hybridation des amorces dépendent de la composition de base et de la longueur et la concentration des amorces. L'utilisation des amorces de 18-30 bases de long avec environ une teneur en GC de 50% et un recuit de 55 ° C pendant 1-2 min est un bon début. Dans certaines paires de matrice d'amorce, une différence de

Etude bibliographique

température aussi faible que 1-2 ° C de recuit fera la différence entre l'amplification spécifique et non spécifique. Si la température de recuit est > 60 ° C, il est possible de combiner l'étape de recuit ainsi que l'étape d'extension dans un cycle de PCR en deux étapes. (Dennis *et al.*, 2006)

II.5.3 Extension des amorces

L'extension d'amorce est typiquement effectuée à 72 ° C, qui est proche de la température optimale de la Taq polymérase. Un temps d'extension de 1 min est généralement suffisant pour les produits jusqu'à 2 kb de longueur. Les plus longues durées d'extension (par exemple, 3 min) peut être utile dans les quelques premiers cycles de l'amplification d'un faible nombre de copies, ou à des cycles plus tard, lorsque la concentration du produit dépasse la concentration de l'enzyme. (Dennis *et al.*, 2006)

➤ **La Taq polymérase**

L'ADN polymérase permet la réplication. On utilise une ADN polymérase purifiée ou clonée à partir d'une bactérie extrêmophile, *Thermus aquaticus*, qui vit dans les sources chaudes et résiste à des températures supérieures à 100°C. Cette polymérase (Taq polymérase) possède la caractéristique remarquable de résister à des températures de l'ordre de 100°C, lesquelles sont généralement suffisantes pour dénaturer la plupart des protéines. *Thermus aquaticus* trouve sa température de confort à 72°C, température optimum pour l'activité de sa polymérase. (Nîmes, 2007)

➤ **Les conditions réactionnelles**

Les volumes de milieu réactionnel varient entre 10 et 100 µl. Il existe une multitude de formules de milieux réactionnels. Il est toutefois possible de définir une formule standard qui convient à la plupart des réactions de polymérisation en chaîne. Cette formule, à peu de chose près, a été choisie par la plupart des fabricants et fournisseurs qui, du reste, délivrent une solution tampon prête à l'emploi avec la Taq polymérase. Concentrée 10 fois, sa formule est à peu près la suivante : 100 mM Tris-HCl, pH 9,0 ; 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl. (Nîmes, 2007)

D'autre part, lorsque sont utilisées de fortes concentrations en dNTP, il convient d'augmenter la concentration en magnésium à cause des interactions stoechiométriques entre magnésium et dNTP qui réduisent la quantité de magnésium libre dans le milieu réactionnel.

Etude bibliographique

Les dNTP (desoxyribonucléotides) fournissent à la fois l'énergie et les nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN lors de la polymérisation en chaîne. Ils sont incorporés au milieu réactionnel en excès, soit environ 200 µM final.

Selon le volume réactionnel choisi, la concentration en amorce peut varier entre 10 et 50 pmol par échantillon. **(Nîmes, 2007)**

➤ **Détection et analyse des produits PCR**

Le produit d'une PCR est constitué d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide). L'ADN est révélé par une coloration au bromure d'éthidium. Ainsi, les produits sont-ils visibles instantanément par trans-illumination aux ultraviolets (280 – 320 nm).

Des produits de très petite taille sont souvent visibles très près du front de migration sous forme de bandes plus ou moins diffuses. Ils correspondent à des dimères d'amorces et parfois aux amorces elles-mêmes. Selon les conditions réactionnelles, il arrive que des fragments non spécifiques d'ADN soient amplifiés en quantité plus ou moins abondante, formant des bandes nettes ou des « traînées » (smear). **(Nîmes, 2007)**

Sur des systèmes automatisés, on utilise aujourd'hui un analyseur de fragment. Cet appareillage utilise le principe de l'électrophorèse capillaire.

La détection des fragments est réalisée par une diode laser. Cela n'est possible que si la PCR est réalisée avec des amorces couplées à des fluorochromes.

II.5.4 Nombre de cycle

Le nombre de cycles d'amplification de PCR devrait être optimisé par rapport à la concentration de départ de l'ADN cible). Innis et Gelfand recommandent 40-45 cycles pour amplifier 50 molécules cibles, et 25 à 30 cycles pour amplifier 3×10^5 molécules à la même concentration **(Innis et Gelfand, 1990)**

Etude bibliographique

Cette non proportionnalité est provoquée par un effet dit plateau, dans lequel une diminution de la vitesse exponentielle de l'accumulation du produit se produit à un stade avancé d'une PCR. Ceci peut être dû à la dégradation des réactifs (dNTP, enzyme); réactif déplétion (amorces, dNTPs); inhibition du produit final (formation de pyrophosphate), la concurrence pour les réactifs en produits non spécifiques, ou la concurrence pour la liaison de l'amorce par ré-hybridation du produit concentré (10 nM). **(Bing et Harry., 2002)**

En supposant qu'on utilise une minute pour chacun de dénaturation, recuit, et extension, l'ensemble du processus peut être complété en environ 2-3 h (avec le temps supplémentaire accordé pour la phase de latence pris par le bloc de chauffage pour atteindre une certaine température). De même, 10^4 , 10^3 , et 10^2 molécules cibles, il faudra 30, 35, et 40 cycles, respectivement. **(Dennis et al, 2006)**

Il est généralement recommandé d'effectuer le nombre minimum de cycles nécessaires pour avoir le produit spécifique souhaité, parce que les produits non spécifiques indésirables seront interférés si le nombre de cycles est excessive **(Bing et Harry, 2002)**

II.5.5 Performances de la technique PCR

La sensibilité des tests varie suivant les études, de 11 à 100 %, et la majorité des publications rapportent des spécificités proches de 100 %. Les performances de la PCR en terme de sensibilité sont très dépendantes du type d'échantillons (prélèvements respiratoires, urines, sérums, etc.) et de l'ancienneté des études, l'amélioration des méthodes d'extraction et l'avènement de la PCR en temps réel ayant contribué à l'augmentation de la sensibilité **(Yang et al., 2010)**.

II.5.6 types de PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'amélioration récente des techniques d'extraction et de purification de l'ADN a permis d'augmenter la sensibilité de la PCR. Plusieurs études ont comparées les performances de diverses méthodes d'extraction appliquées. D'une manière générale, les méthodes automatisées

Etude bibliographique

semblent équivalentes, voire parfois supérieures, aux méthodes manuelles (**Espy et al., 2006**) (**Wilson et al., 2004**).

Plusieurs types de PCR peuvent être utilisés,

Le cycleur thermique initiale utilisée dans les laboratoires qui a une unité de réfrigération pour accélérer la vitesse de refroidissement et n'ont pas eu la technologie de couvercle chauffant (**Lloyd, 2003**)

➤ **PCR en point final (PCR classique)**

En 1985 Saiki et al ont révolutionné les études de biologie moléculaire en développant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR: Polymerase Chain Reaction). Basée sur l'utilisation d'une polymérase thermostable (la Taq polymérase), la méthode consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN afin de le rendre détectable. Ce fragment doit être encadré par deux séquences consensus qui servent d'amorces pour la polymérase.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN (**Bessetti ,2007**)

La PCR en point final nécessite, à la fin des cycles d'amplification, une étape manuelle de révélation des amplicons par électrophorèse en gel d'agarose elle fournit, alors, une estimation qualitative (nature des espèces).

Toutes les études de PCR en temps réel rapportent une spécificité de 100 %. Pour les PCR classiques, la spécificité varie de 93 % à 100 %.(**Bessetti ,2007**)

➤ **PCR en temps réel**

La PCR en temps réel permet de réaliser, en une seule étape, l'amplification et la détection des produits de PCR au fur et à mesure de leur apparition grâce à un système de

Etude bibliographique

génération de fluorescence. Outre le gain de sensibilité et de spécificité, cette technologie a un triple avantage par rapport aux techniques de la PCR en point final (**Espy *et al.*, 2006**):

- elle est encore plus rapide (résultats en 1 heure ou moins) ;
- le risque de contamination est plus faible, puisqu'il s'agit d'un système fermé sans manipulation post amplification
- le produit amplifié peut être quantifié ;
- les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis de la PCR.

Alors le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle (high-throughput) (**Martell *et al.*, 1999**).

La technologie Taqman est toutefois moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel pour la détection des mutations spécifiques (**Bustin ,2000 ; Mackay *et al.*,2002**).

➤ **PCR multiplex**

Les PCR dites multiplex consistant en l'amplification de plusieurs cibles en un seul tube, elle est également largement développée pour des objectifs variés.

Multiplex PCR peut être un système à deux amplicons ou il peut amplifier 13 ou plusieurs régions distinctes de l'ADN. Il peut être le point de fin de l'analyse, ou le préliminaire d'analyses complémentaires telles que le séquençage ou hybridation. Les étapes pour l'élaboration d'une PCR multiplex et les avantages d'avoir de multiples fragments amplifiés simultanément, cependant, sont identiques dans chaque système (**Mary *et al.*, 2014**).

Les propriétés de la PCR multiplex, y compris les contrôles internes, les indications de quantité et la qualité du modèle, et moins de frais de temps et de réactifs, font la technique d'un outil général utile et préférable de Uniplex simultanée PCR dans de nombreux cas.

L'amplification Multiplex est idéale lorsque deux ou plusieurs séquences sont examinés par PCR pour des associations telles que la liaison génétique, associations environnementales, et hôte -

Etude bibliographique

parasite. Le raffinement général de la technique de PCR peut être facilité par une amplification multiplex en ce que chaque amorce supplémentaire prévue par la réaction de dix constitue un défi pour optimiser la technique. Les systèmes de multiplexage de quantification fournissent également l'information sur la technique de PCR en révélant des influences sur la génération exponentielle de produit (Mary *et al.*, 2014). Un exemple de résultat d'une PCR multiplex est dans la figure ci-dessous (figure 4)

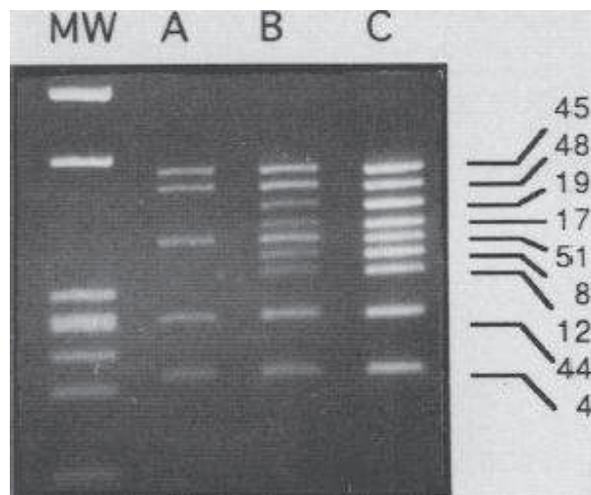


Figure 4 : Amplification multiplex de 9 exons dans le gène de la dystrophine humaine.
(Mary *et al.*, 2014)

➤ **RT-PCR (Reverse transcription ou transcription inverse)**

Le modèle de départ pour une réaction de PCR peut être de l'ADN ou ARN.

L'ADN est généralement le modèle approprié pour étudier le génome de la cellule ou de tissu (comme dans la génétique héréditaire, maladies, mutation somatique dans une tumeur, ou le réarrangement somatique dans les lymphocytes) et pour la détection de l'ADN virusé. (Wright *et al.*, 1990)

Etude bibliographique

Pour plus d'informations sur l'expression génique dans une cellule ou (Telles, 2003) tissu (Garlet *et al.*, 2003, Santos *et al.*,2003), ou la présence de l'ARN génomique dans un rétrovirus comme le VIH, l'ARN est le modèle approprié.

L'ARN peut être mieux que l'ADN génomique pour la détection des changements structurelle dans les gènes de longueur, depuis l'amplification de l'ARN épissé la transcription à la place de la séquence génomique réduit considérablement la longueur de l'ADN pour être manipulé sans rien perdre des régions codantes où les suppressions cliniquement significatives peuvent être attendu. (Wright *et al.*, 1990).

RT- PCR combine la synthèse d'ADNc à partir des matrices d'ARN avec la PCR pour fournir une méthode rapide et sensible pour l'analyse d'expression du gène (Figure 4). RT- PCR est utilisée pour détecter ou quantifier l'expression de l'ARNm, souvent à partir d'une petite concentration de l'ARN cible (Linderman ,2001).

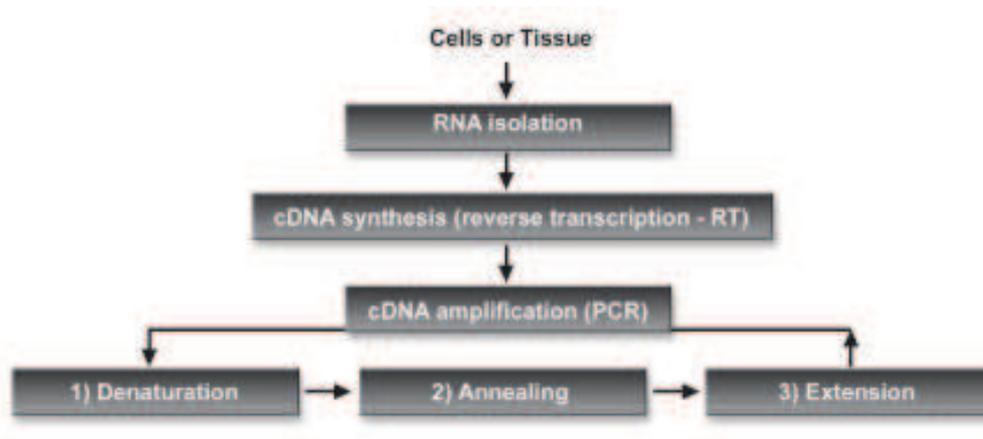


Figure 5 : Schéma de RT-PCR montre que l'ARN isolé à partir de cellules ou de tissu est utilisé comme substrat dans le sens inverse de transcription pour la synthèse de l'ADNc qui servira de matrice pour l'amplification par PCR. (Appl ,2004)

Materiel et methodes

Chapitre III : Matériel et méthodes

1-Materiel

1.1Materiel biologique

Les différentes souches de bactéries utilisées lors de ce travail sont 63 souches bactériennes isolées à partir de service de chirurgie A du CHU Tlemcen.Algerie.

Souche de référence : **Tableau2**

**Tableau 2 : Origine et caractéristiques des souches de références
utilisées dans ce travail**

Origine	Souches de références	Caractéristiques et utilisation
Institut Pasteur d'Alger	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Sensible à la pénicilline
Laboratoire de LAMAABE de Tlemcen	$M^+ N^-$	Résistante à la methicilline

1.2. Milieux, réactifs et produits

- Les différents milieux et produits utilisés pour leur culture des souches bactériennes sont répertoriés dans **l'annexe A**. Ces derniers ont été préparés et stockés selon les indications des fournisseurs.
- Les différents produits et réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN et les analyses PCR (biologie moléculaire) sont illustrés dans **l'annexe B**.

Materiel et methodes

2. Méthodes

2.1 Prélèvements et population étudiés

La population étudiée a été composée de 55 patients opérés au niveau du service de chirurgie A du CHU de Tlemcen pendant deux mois allant du 10 Avril 2014 au 10 juin 2014.

Les prélèvements ont été réalisés le matin (9h-11h) lors du changement des pansements par la technique d'écouvillonnage ciblant des plaies superficiels infectés ou non ; les écouvillons sont ensuite placés dans des tubes contenant 5ml de Giolitti Cantoni additionnés de 5 gouttes de Tellurite de potassium et incubés 18 à 24h à 37°C.

Pour chaque patient, les renseignements suivants étaient recueillis : nom et prénom, sexe, date de naissance, âge, poids, date d'intervention, date d'admission et de sortie, diagnostic présumé et antibiothérapie.

Les étapes suivantes décrivent la démarche suivie pour l'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* (**figure 6**)

Materiel et methodes

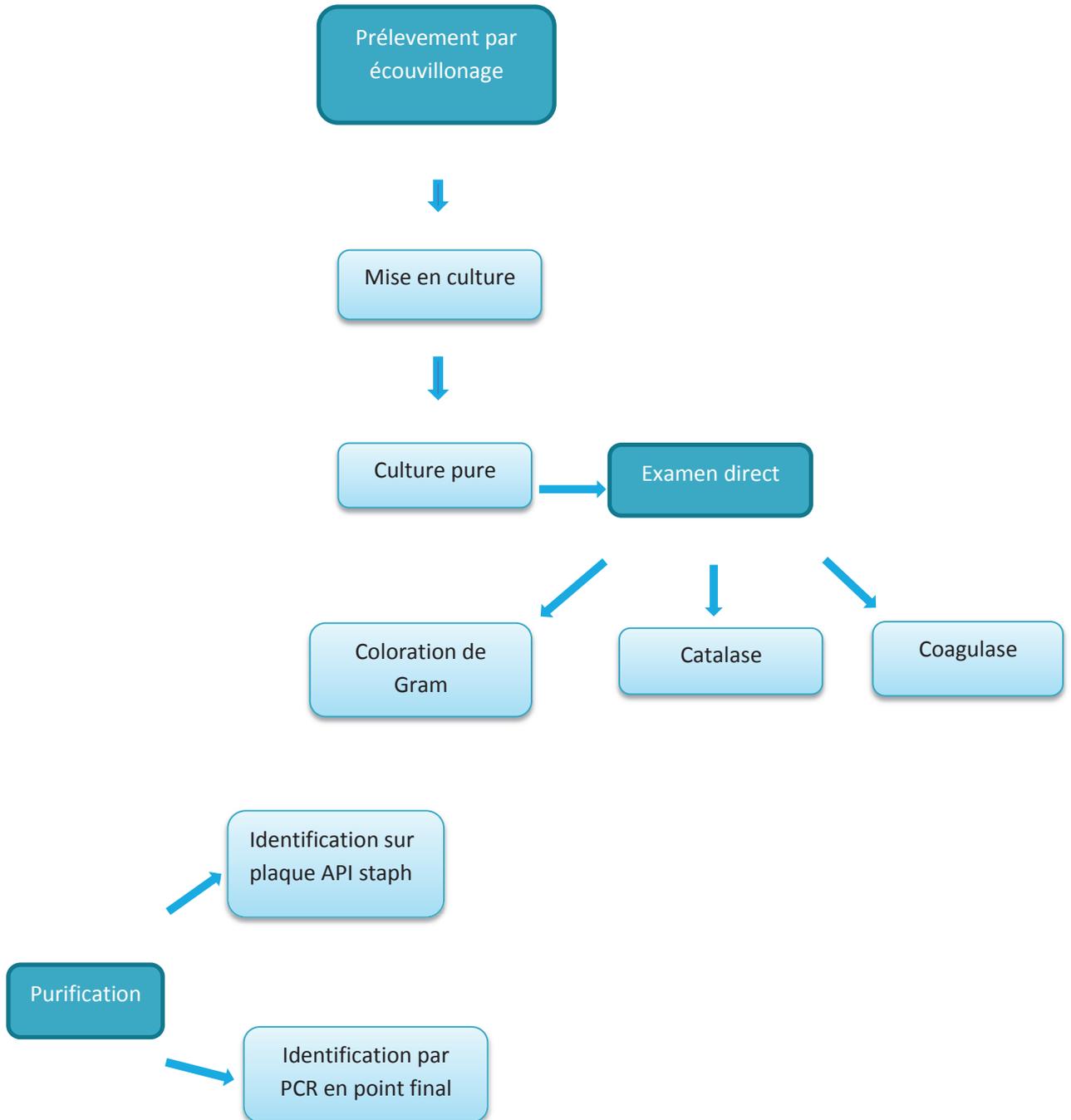


Figure 6: Schéma de l'identification de *Staphylococcus aureus*

Materiel et methodes

2.2 Ensemencement

Il en résulte, en cas de présence de staphylocoques, un dépôt noir, dans le milieu de Giolitti Cantoni dans ce cas, réensemencer les suspensions par technique d'épuisement sur milieu Chapman qui grâce à sa forte concentration en NaCl, il sélectionne que les microorganismes halophiles tel que staphylocoque.

2.3 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).

2.4 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* (BioMérieux).

2.4.1 Coloration de Gram

La coloration de Gram est effectuée à partir des colonies cultivées sur la gélose Chapman, pour confirmer la présence de cocci en diplocoques et en grappes de raisin.

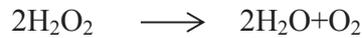
2.4.2 Recherche de la catalase

➤ Principe

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H₂O₂ dont l'accumulation à un effet létal pour les bactéries. (Joffin et Leyral, 2001).

Materiel et methodes

La catalase à la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'O₂ 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 (**Joffin et Leyral, 2001**)

2.4.3 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. (**Joffin et Leyral, 2001**).



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 »).

Materiel et methodes

➤ **Technique**

- Réaliser une culture en bouillon.
- Etuver 24h à 37°C.
- Mettre dans un tube à hémolyse 4 gouttes de bouillon BHIB préalablement ensemencé par *staphylococcus aureus* plus 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 (**Joffin et Leyral, 2001**)

2.4.4 Identification par plaque API 20 Staph (BioMérieux).

Créée en 1970, la gamme API, a représenté une vraie révolution dans le domaine de la bactériologie en miniaturisant et en standardisant les techniques conventionnelles, jusqu'alors très complexes à réaliser et à lire (**BioMérieux France**)

➤ **Technique**

Ensemencement d'une galerie Api (**Figure 7**)

1 - Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. (1)
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel. (2)
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation, (3)

2- Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API Staph Médium ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélose. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). (4)

Materiel et methodes

• Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être inoculée extemporanément. (5)

3- Inoculation de la galerie

- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Médiumensemencé. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant. (6)
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe. (7)
- Renfermer la boîte d'incubation. (8)
- Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

4-Lecture de la galerie

- Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture (**Annexe E**) en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants (9)
 - Test VP ; VP 1 et VP 2.
 - Test NIT : NIT 1 et NIT 2.
 - Test PAL : ZYM A et ZYM B.

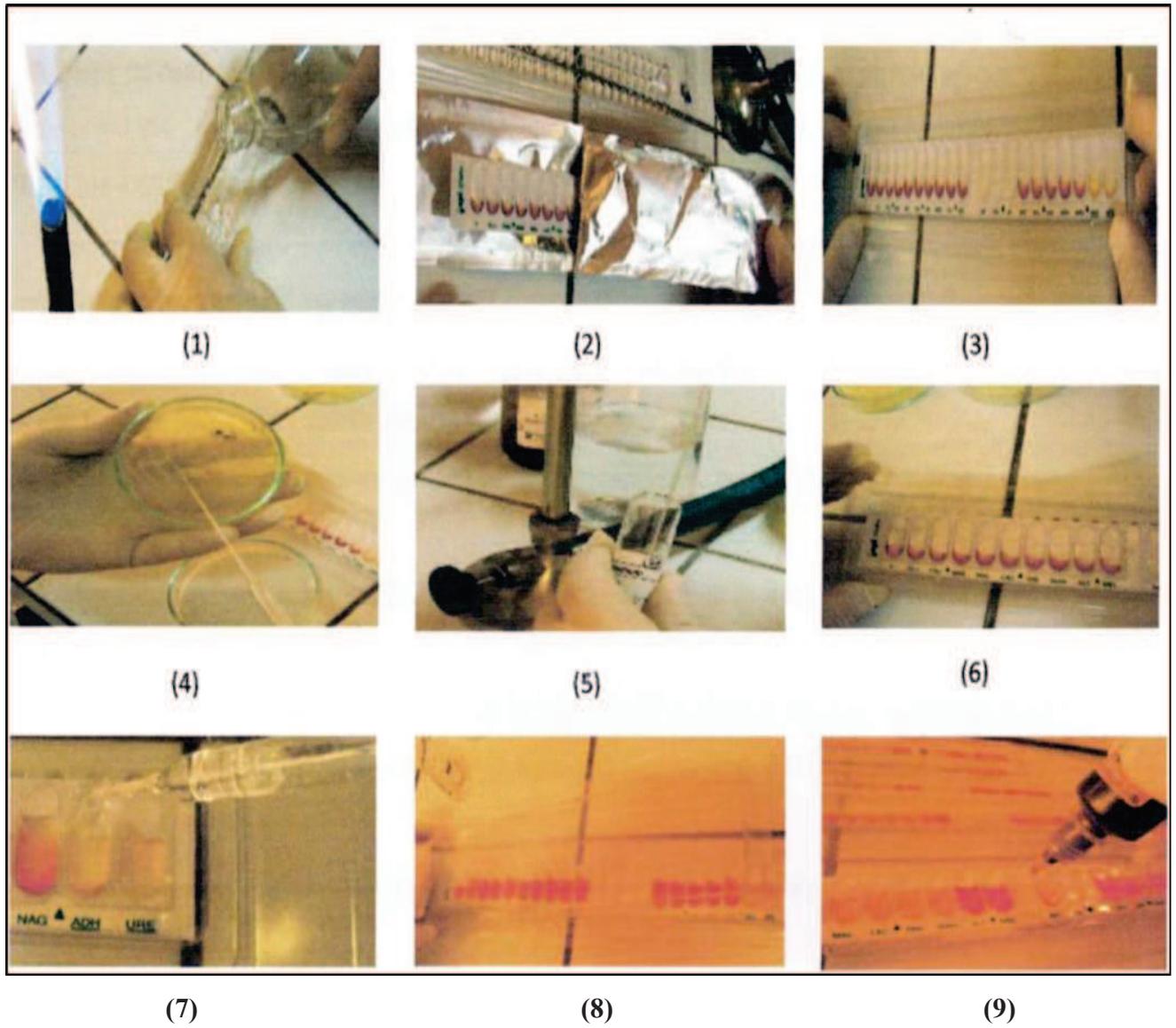
5- Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

6- Identification :

Elle est réalisée à l'aide du Catalogue Analytique ou du logiciel d'identification.

Materiel et methodes



**Figure 7 : Ensemencement de la galerie Api 20 Staph
(Personnelle)**

Materiel et methodes

2.4.5 Les techniques de biologie moléculaire

Les méthodes d'étude de biologie microbienne suivent un schéma commun qui peut être divisé en trois étapes. Chacune doit être la plus performante possible pour assurer le meilleur seuil de détection de la méthode prise dans sa globalité.

Toutes ces méthodes débutent par une extraction de l'ADN. Cette étape est essentielle car la quantité et la qualité de l'ADN microbien récupéré conditionne les deux étapes qui constituent la suite de l'analyse (**Vincent, 2006**) :

- **1ère étape : Extraction de l'ADN**
- **2ème étape : Amplification de l'ADN**
- **3ème étape : Différenciation des produits PCR**

- **Identification par PCR classique**

Différentes PCR peuvent être réalisées pour la détection spécifique d'espèces et l'identification des espèces et des souches sur des colonies isolées ou lors des traitements des mélanges. Elles ont en commun l'appareillage : thermocycler (**Vincent, 2006**)

- **principe**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN. La réaction PCR nécessite 2 amorces oligonucléotidiques entourant la séquence cible d'ADN devant être répliquée, chacune étant complémentaire à un des deux brins d'ADN. Les amorces sont généralement ajoutées en excès par rapport à la quantité d'ADN à amplifier dans le mélange réactionnel. Ce dernier est également composé de l'ADN polymérase, de dNTPs (désoxyribonucléotides triphosphate), de sels (MgCl₂, KCl), d'un tampon et de l'échantillon d'ADN.

La PCR est effectuée à l'aide d'une suite de cycles, comportant trois étapes chacun, la dénaturation, l'hybridation et l'extension (**figure 8**).

Materiel et methodes

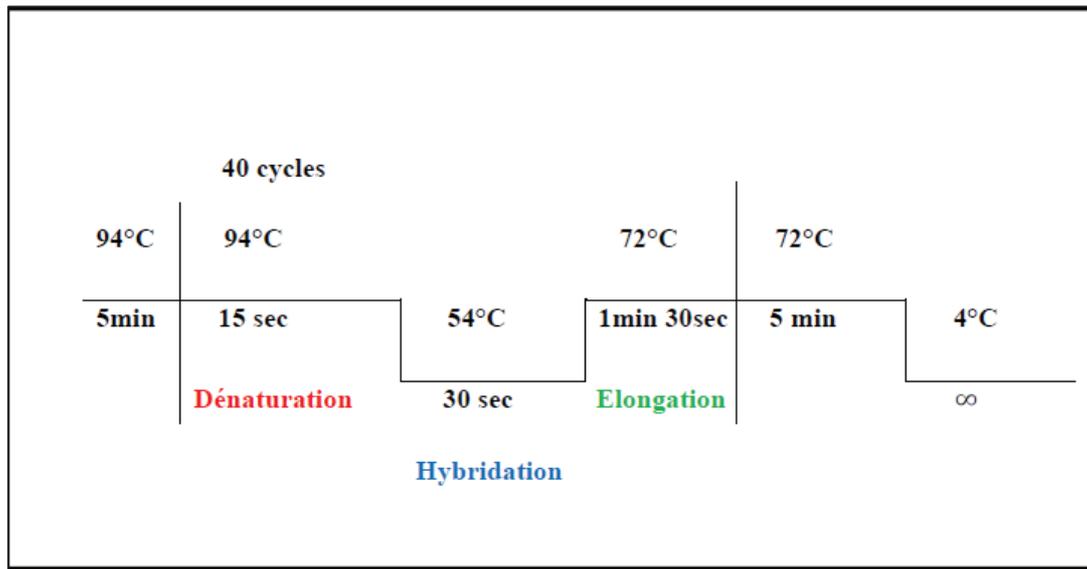


Figure 8 : Schéma représentatif du programme de la PCR utilisé (Personnelle)

La première étape consiste à dénaturer l'ADN double brin en ADN simple brin à l'aide de la chaleur, 94°C. Lors de la deuxième étape, le mélange réactionnel est refroidi à 45-60°C, chacune des amorces reconnaît et se lie à sa séquence complémentaire. Les amorces sont positionnées de manière à ce que leur extrémité 3' soit face à face afin que la synthèse d'ADN ait lieu dans la région se trouvant entre les deux amorces.

Lors de la dernière étape, l'ADN polymérase se lie à l'extrémité 3' de chaque amorce liée et utilise le dNTPs afin de pouvoir synthétiser un nouveau brin d'ADN dans la direction 5' à 3'. Lors de cette étape, l'ADN polymérase possède une température optimale pour la réplication d'ADN de 72°C. (Reece, 2004).

Après un cycle de la réplication PCR, une nouvelle copie de chaque brin d'ADN produit est synthétisée et le nombre de cycle peut varier entre 20 et 40. Le nombre de brins d'ADN répliqués lors de la PCR peut être estimé théoriquement jusqu'à l'application de 40 cycles, il est égal à 2^n (n = nombre de cycle) (Reece, 2004). Une fois la PCR terminée, les résultats peuvent être interprétés, par exemple par une électrophorèse sur gel d'agarose.

Materiel et methodes

➤ technique

A- L'extraction de l'ADN.

Plusieurs techniques d'extraction d'ADN sont possibles. Certaines permettent une extraction rapide et directe de l'ADN à partir des cellules. D'autres indirectes nécessitent de recourir à un protocole en plusieurs étapes. Le choix de ces méthodes dépend de la nature de l'ADN ciblé et de l'objectif de la manipulation (identification interspécifique ou intraspécifique d'une culture pure, résolution de mélange microbien) (Vincent, 2006)

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée sur l'intégralité des souches bactériennes mises en croissance, dans le milieu gélosé Chapman. .

- Préparation de l'échantillon
 - Préparer une culture bactérienne de 24 h des souches à étudier
 - Selon la densité de la culture, prendre 1 colonie de la culture bactérienne et mettre dans 250µl d'eau ultra pure ;
 - passer dans un bain marie à 100°C. Pendant 10 min ;
 - Centrifuger pendant 10 min à 14000 t, jeter le surnageant.

B. Sélection de la méthode PCR pour l'identification des gènes *nuc* de *S. aureus*

Les amorces utilisées dans ce travail sont illustrées dans le **tableau 3**.

**Tableau 3 : Propriétés des couples d'amorces utilisées pour la détection du gène de
Thermonuclease**

Nom de l'amorce	Séquence
<i>nuc 1</i>	5'GCGATTGATGGTGATACGGTT 3'
<i>nuc 2</i>	5'AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAG3'

Materiel et methodes

- Preparation du master mix

Pour chacune des deux enzymes, un master mix est préparé selon le **tableau 4** puis réparti dans des tubes PCR. Les échantillons d'ADN sont ensuite ajoutés et la PCR peut avoir lieu. La préparation du master mix a été effectuée selon les instructions du fournisseur.

Tableau 4 : Préparation du mix en volume pour l'amplification

Produit	Volume pour un tube (µl)	Mix pour 6 tubes (µl)
Eau ultra pure	27,8	166.8
TP 10X taq	5	30
MgCl ₂	1,5	9
dxTP	8	48
Oligo sens <i>nuc1</i>	2,5	15
Oligo anti-sens <i>nuc 2</i>	2,5	15
Taq polymerase (Fermentas)	0,7	4,2
Volume total	48	288

- 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 de type Applied Biosystems (2720thermal Cyclor)
- La taille du fragment amplifié par le couple *nuc1* - *nuc2* : 279 pb.
- Réaliser 40 cycles PCR.

C-Détection des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation de fragments d'ADN de différentes tailles (200-15'000 pb). (**Reece ,2004**) .Le gel d'agarose est un réseau complexe de polymère, composé d'agarose et d'un tampon aqueux. La taille des pores est déterminée par la

Materiel et methodes

composition de ce dernier et par la concentration et le type d'agarose utilisé. Plus les pores du gel sont grands, plus la taille des molécules que le gel peut séparer est grande. Les fragments d'ADN sont séparés par migration sur gel d'agarose à l'aide d'un champ électrique constant. L'ADN qui est chargé négativement migre à travers le gel en direction de l'électrode positive. D'une manière générale, les petits fragments ADN migrent plus vite que les grands.

L'ajout de bromure d'éthidium au gel d'agarose permet de voir apparaître les fragments d'ADN sur le gel. En effet, le bromure d'éthidium est capable de s'insérer entre les paires de bases empilées de l'ADN et permet, lors de l'illumination sous lumière UV du gel d'agarose, l'apparition de l'ADN sur le gel comme une bande de fluorescence (Reece ,2004)

- **Préparation du gel à 5%**

- Peser 5g d'agarose dans un Erlen de 500 ml.
- Ajouter 100 ml de tampon TAE 1X (1 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 (CONSERT type : E8067) sans faire de bulles.
- Placer le peigne.
- Laisser refroidir.

- **Solution de dépôt sur gel d'agarose à 5 %**

- Déposer dans le premier puits 4 µl de marqueur 1Kb.
- Déposer le mélange (20µl de produits PCR+ 2µl de bleu 6X).
- Déposer dans le dernier puit 4 µl de marqueur 100 pb
- Laisser migrer en actionnant le générateur à 120 Volt.

La **figure 9** démontre les deux marqueurs 1Kb et le 100 pb

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1-Prélèvement

Parmi 63 souches prélevés sur des plaies post opératoires de 55 patients ayant subi une intervention chirurgicale et présentant une suppuration après un délai de quarante-huit heures qui suivent l'opération, un résultat de 11 souches de *Staphylococcus aureus* a été obtenu des patients. 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 ; et même parfois gynécologique.

La contamination peut avoir deux origines ; soit au niveau du patient donc au cours du prélèvement lui-même, soit au bloc opératoire au cours de l'intervention chirurgicale. Dans les deux situations, la principale cause est le manque d'hygiène qui engendre l'inoculation des bactéries de l'environnement qui ne sont pas en relation avec l'infection mais qui peuvent coloniser le malade (dans le cas de la contamination chez celui-ci) et provoquer chez lui des infections nosocomiales (**Ahoyo et al., 2006**).

Sur les 63 prélèvements analysés, 73% se sont révélés positifs (développement bactérien), soit un taux de 27% alors que sont négatifs (**figure 10**), nous considérons comme négatifs, les prélèvements qui ne présentent aucun signe de culture au bouillon nutritif BHIB ou bien ne montrent pas de noircissement après culture sur milieu Giolitti Cantoni.

Résultats et discussion

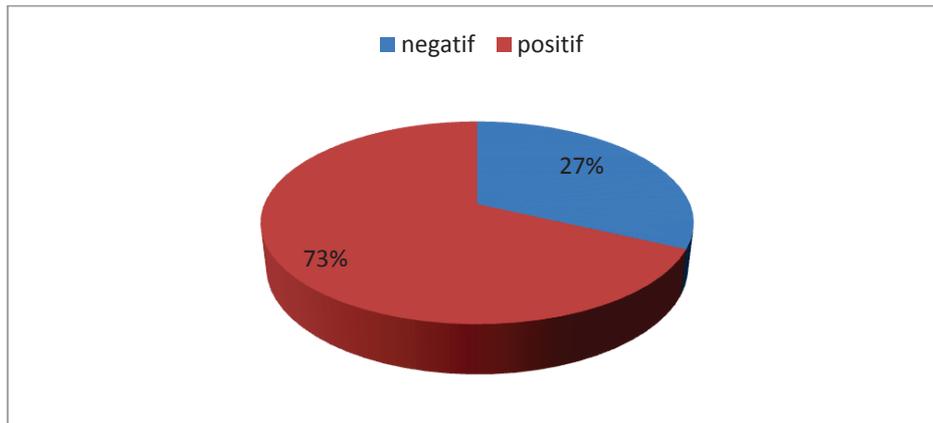


Figure 10 : Répartition des prélèvements selon leur culture

Nous avons constaté lors des prélèvements que les personnels soignants ne changent pas de gant, ne ferment pas la porte ni les fenêtres ce qui pourraient engendrer un risque infectieux et être un facteur de transmission croisée lors du changement des pansements.

L'âge moyen des patients était entre 17 et 85 ans, avec un taux féminin de 52,72% et masculin de 47,27% (**figure 11**). Le sexe est un facteur de risque d'infection, d'après (**Oberholzer et al., 2000**) l'incidence des infections augmente de façon significative chez l'homme (30,7 % versus 17,0 %).

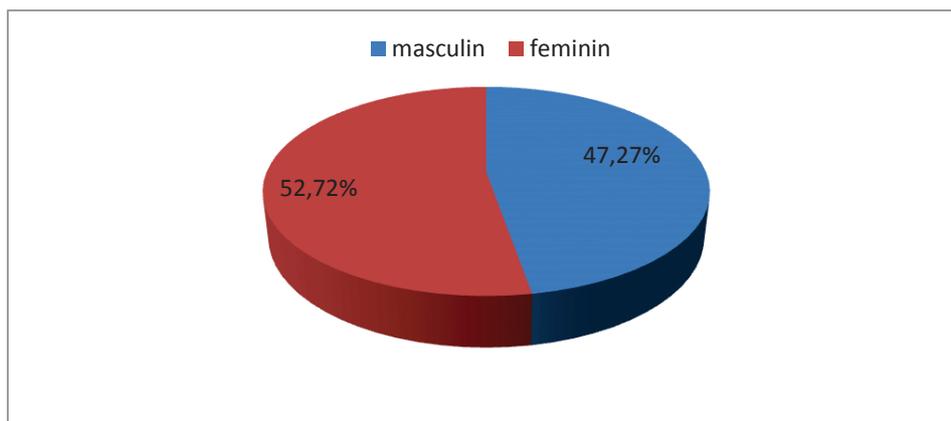


Figure 11 : Distribution de l'infection du site opératoire selon le sexe dans le service de chirurgie A

Résultats et discussion

L'âge constitue un des facteurs de risque importants liés aux patients. Nos résultats montrent que la majorité des patients ayant une infection nosocomiale (36%) ont un âge compris entre 41 et 60 ans, et une proportion non négligeable (24%) a un âge supérieur à 61 ans (**Figure 12**).

Ce résultat ne s'accorde pas avec les données qui ont décrit que l'âge est un facteur de risque infectieux au-delà de 1 an et après 75 ans ou ceci peut aisément s'expliquer par l'importance de la morbidité chez le sujet âgé (**Cruse et Foord, 1980**)

(**Bohicchio et al., 2001**), ont montré chez le polytraumatisé le risque d'infection nosocomiale était multiplié par 2,2 chez les patients de plus de 65 ans.

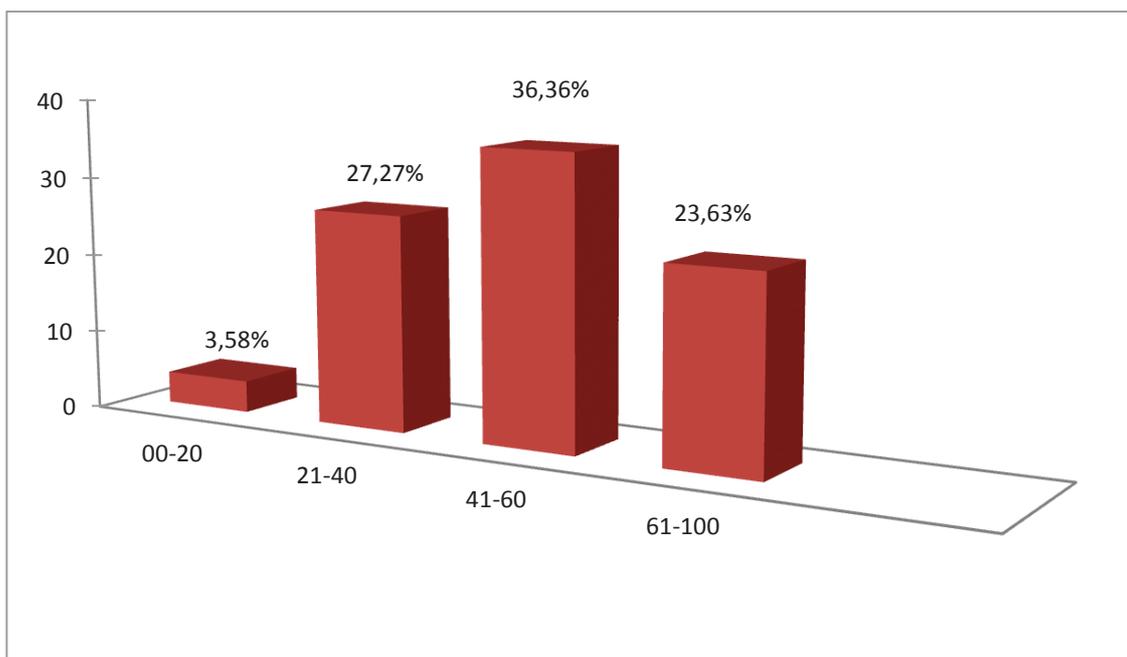


Figure 12 : Répartition des infections nosocomiales (ISO) dues à *S. aureus* dans le service du chirurgie A selon l'âge

Résultats et discussion

La durée moyenne de séjour des 91,30% des patients ayant contracté une infection nosocomiale est de 10 jours. La période d'hospitalisation a été prolongée chez 8,70% des patients qui ont atteint une durée entre 1 et 2 mois.

La durée de séjour préopératoire reste le premier facteur de risque préopératoire. (Migaud *et al.*,2005) a expliqué que 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

2- identifications du genre *Staphylococcus*

Un total de souche a été isolés à partir de 63 prélèvements dont 46 cultures été positives et 20 répondent aux caractéristiques macroscopique et microscopique du genre *staphylococcus*.

Le développement bactérien sur le milieu Chapman ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries (Entérocoques) peuvent y cultiver. Sur ce milieu, les colonies de *staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourés d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, sinon les colonies sont de couleur blanche (**figure 13**)

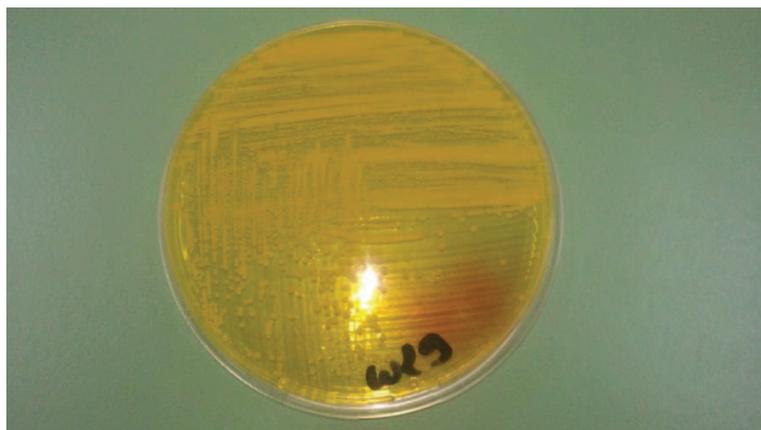


Figure 13: Aspect macroscopique des colonies de *S.aureus* sur milieu Chapman

Résultats et discussion

La coloration de Gram réalisée à partir du milieu de Chapman confirme la présence de cocci à Gram positif en diplocoque et en grappes de raisin (**figure 14**)

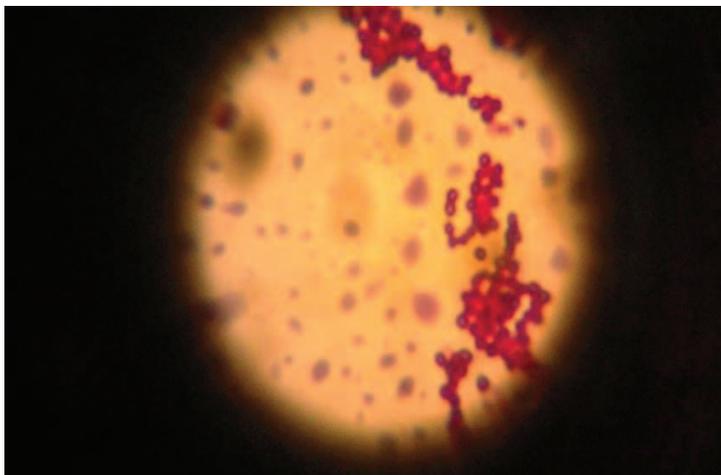


Figure 14: aspect microscopique de *staphylococcus aureus* (1000x)

3 –Identification de l'espèce :

Sur 20 souches appartenant au genre *Staphylococcus* ,11 souches ont été assignées à l'espèce *S.aureus* par la mise en évidence de la catalase qui les différencie des Streptocoques et la coagulase libre qui les distinguent des Staphylocoques a coagulase négative (**figure 15**)



(A)



(B)

Figure 15: Mise en évidence de catalase (A) et coagulase (B) libre chez *S.aureus*

Ce qui représente un taux de 55% sur l'ensemble des souches de staphylocoques isolées et 17,46 % sur la totalité des prélèvements examinés (**tableau 5**)

Résultats et discussion

Tableau 5: fréquence d'isolement de *S.aureus*

prélèvements	Culture du genre staphylococcus	Nombre de souche de <i>S.aureus</i>	% de <i>S.aureus</i> par rapport aux prélèvements	% de <i>S.aureus</i> par rapport aux Cultures du genre staphylococcus
63	20	11	17,46%	55%

Les galeries API Staph miniaturisées reposant sur des tests enzymatiques (zymogramme) et des tests d'acidification ou d'utilisation des sucres (auxanogramme)

L'identification par ces galeries a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de *staphylococcus aureus* et a révélé deux différents biotypes (6336153,6736153) ce qui a permis leur assignation à l'espèce *Staphylococcus aureus*

Notre étude bactériologique nous a permis d'isoler 11 souches à Gram positif, immobile, aero-anaerobies facultatives, possédant une catalase et une coagulase ; et donnant des colonies jaunes dorées sur milieu Chapman ; de biotypes (6336153,6736153) ce qui a permis de les assigner à l'espèce *Staphylococcus aureus*. (Figure 16)

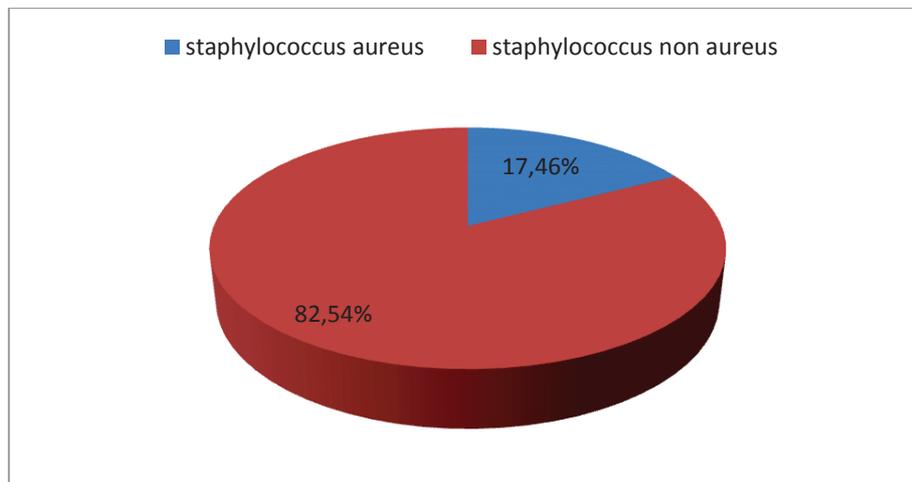


Figure 16 : Représentation graphique du nombre des souches de *Staphylococcus aureus* au sein du service de chirurgie A

Résultats et discussion

4-detection du gène *nuc* :

Une souche autre que *staphylococcus aureus* a été identifiée, plus deux souches de *staphylococcus aureus* (souche de référence), une possédant le gène *nuc* et une ne le possède pas.

Le jeu d'amorces utilisées pour cette étude a permis l'amplification par PCR d'un fragment de gène lorsque les souches utilisées étaient lysées et amplifiées.

La figure 17 montre les résultats obtenus

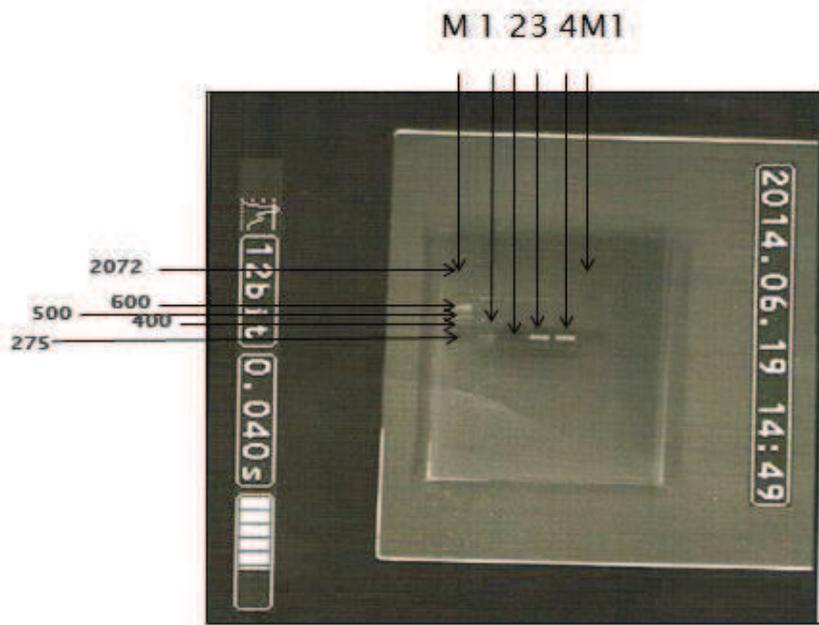


Figure17 : Gel d'électrophorèse des extraits d'ADN

Piste M : Marqueur moléculaire (100 pb), Piste 1 : *staphylococcus aureus* M^+N^- Piste 2: *staphylococcus non aureus*, Piste 3 : *staphylococcus aureus* ATCC 25923 Piste 4 : *staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; piste M1:marqueur 1Kb

Piste 1 : *staphylococcus aureus* M^+N^- (témoin négatif : absence du gène *nuc*)

Piste 2 : *non staphylococcus aureus* (témoin négatif : absence du gène *nuc*)

Piste 3 : *staphylococcus aureus* ATCC 25923 (témoin positif : présence du gène *nuc*)

Piste 4 : *staphylococcus aureus* ATCC 25923 (témoin positif : présence du gène *nuc*)

Résultats et discussion

L'amplification du gène *nuc* chez la souche *S. aureus* de références (témoins positifs) est nettement apparue qui es de 275 pb qui est proche de l'attendu taille de fragment de gène de 279 paires de bases (**Shortle, 1983**). Tandis que la souche de *Staphylococcus non aureus* ne l'était pas.

On remarque qu'il n'y a pas d'amplification chez la souche de référence M^+N^- qui ne possède pas le gène *nuc* (témoin négatif).

L'électrophorèse des extraits d'ADN des quatre souches (contrôle positif et contrôle négatif) a permis de confirmer la présence d'ADN qui reste le point de départ de toute investigation en biologie moléculaire (**figure 17**) En effet, la technique d'extraction se prête très bien à l'utilisation, sa simplicité et sa reproductibilité font de cette technique un excellent outil d'exploration.

Les souches de *staphylococcus aureus*, prélevés à partir du service de chirurgie A de Tlemcen ont donnes le résultat suivant suite à leur identification par méthode PCR (**figure 18**)

Résultats et discussion

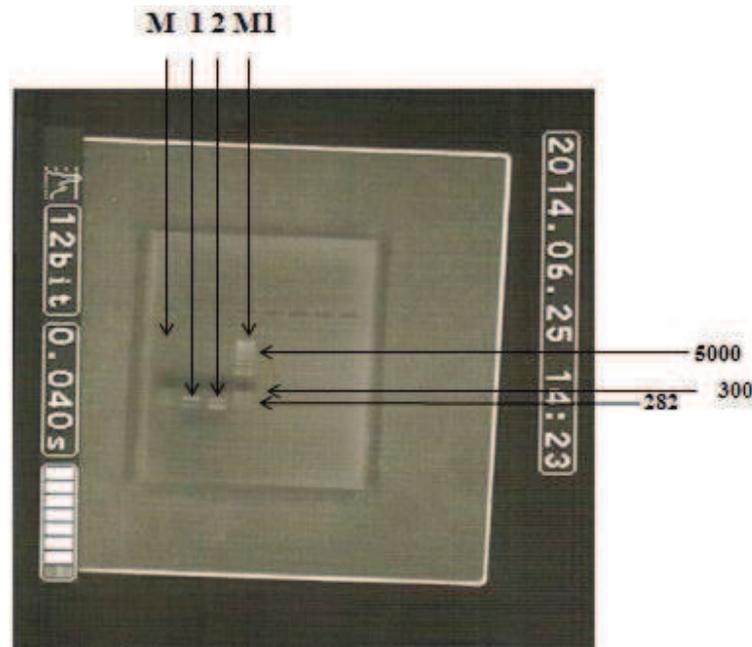


Figure 18: Révélation du gène *nuc* par l'amplification chez les souches de *Staphylococcus aureus* d'origines hospitalières

M : marqueur 100pb, 1 : *S.aureus*, 2 : *S.aureus*, M1 : marqueur 1kb (Invitrogène)

Une méthode simple de la lyse des bactéries a été appliquée dans cette étude. Le jeu d'amorces a déterminé la génération d'un produit PCR d'environ 282pb, (**figure18**).

L'Amplification de l'acide nucléique par PCR a des applications dans de nombreux domaines de la biologie et de la médecine, y compris la détection des virus, des bactéries et d'autres agents infectieux (**Thiele, 1990**). Dans la présente étude, nous avons utilisé une amorce oligonucléotidique qui ensemble reconstruit les séquences du gène *nuc* de *S. aureus*, qui code pour la TNase produites par ces bactéries.

Des précautions strictes doivent être prises pour éviter de faux positifs résultats de PCR en raison de l'amplification d'ADN contaminant (**Kwok, 1989**). Au début de nos expériences, nous avons été confrontés à ce problème ; nous avons éliminé l'ADN contaminant par irradiation tous les équipements utilisés dans les étapes de pré-amplification avec la lumière UV en conformité avec les précautions recommandées par (**Ou et al., 1991**).

Résultats et discussion

Le jeu d'amorces *nuc* était positif par le test direct de la PCR du gène *nuc* dans les deux souches de staphylocoques identifiées comme *S. aureus* par les procédés classiques et de même pour celle de référence, mais était négatif dans la souche staphylococcus non aureus et la souche de référence qui ne possède pas le gène *nuc*. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par d'autres approches méthodologiques (**Brakstad et mealand, 1989** ; **Liebl et al., 1987** ; **Gudding, 1983** ; **Lachica et al., 1979**) qui ont suggéré que le gène *nuc* et ses produits ont des séquences qui, d'une part, se trouve dans tous les *S. aureus* et d'autre part, sont propres à la bactérie de cette espèce.

L'amplification par PCR du gène *nuc* a été rapportée par Wilson et al. (**Wilson et al., 1991**), qui a utilisé un ensemble d'amorces différent de celle utilisée dans la présente étude. Ces chercheurs ont amplifié un segment de 450 pb du gène. Cependant, très peu de données de cette amplification ont été décrites (**Wilson et al., 1991**). La combinaison de la PCR pour l'identification du gène *nuc* des espèces de *S. aureus* et la PCR pour l'identification de gènes codant pour le caractère phénotypique qui définit les caractéristiques des bactéries est donc possible.

Notamment, des améliorations méthodologiques sont nécessaires d'augmenter la sensibilité du test pour la détection rapide des bactériémies de *S. aureus* puisqu'il s'agit d'une situation clinique particulièrement importante pour l'application du test.

En outre, la PCR *nuc* peut être applicable pour tester les échantillons non cliniques, comme la nourriture ou comme un outil de recherche, par exemple, dans les études de la distribution et du sort de *S. aureus* dans divers organes et cellules de l'organisme.

Conclusion

Au terme de ce travail une concordance a été enregistrée entre les tests biologiques classiques et les tests de biologie moléculaire.

Tous les échantillons qui contenaient *S. aureus* prélevés à partir du service de chirurgie A de Tlemcen étaient positifs par le test direct de la PCR *nuc* pour 282 pb Produit de PCR .Ce résultat a été confirmé par l'absence de ce gène chez la souche appartenant à une autre espèce (*Staphylococcus hominis*)

La PCR pour l'amplification du gène *nuc* a le potentiel pour le diagnostic rapide des infections à *S. aureus* par test direct de spécimens cliniques, y compris les échantillons de patients atteints de la thérapie antimicrobienne continue. Nos résultats corroborent les perspectives du diagnostic rapide des infections à *S. aureus* par méthode PCR.

Bien qu'un certain nombre de méthodes classique ont été élaboré pour l'identification des *staphylococcus aureus*, l'utilisation de la PCR est la seule qui donne des résultats cohérents.

Malgré que La technique d'extraction a été simple pour caractériser génétiquement les souches microbiennes, les produits utilisés pour la PCR restent souvent limités.

En perspectives de ce travail, il serait intéressant de pouvoir approfondir notre travail en simplifiant encore plus la technique d'extraction, on travaillant avec des produit moins dangereux comme le cyber green au lieu du BET pour rendre accessible aux personnel soignantet même on utilisant des méthodes PCR plus précise notamment la PCR en temps réel.

Références bibliographiques

A

- **Agnieszka L., Kadlubowska J., Krzyszton R. and Waleria H.(2006)** -Characteristics of Staphylococcus aureus Strains Isolated in Poland in 1996 to 2004 That Were Deficient in Species-Specific Proteins, Journal of clinical microbiology, Vol. 44, No. 11,pp. 4018–4024.
- **Ahoyo AT.,Baba Moussa L.,Makoutode M ., Gbohoun A.,BossouR.,Dramane K.,Sanni A .,Prevost G.(2006)** -incidence de staphylococcus aureus résistant à la miticilline dans le service de neonatologie du centre hospitalier departement de Zou et des Collines au Benin.Archive de pediatrie,Vol 13, pp.1391-1396.
- **Appl J .,Oral Sci .(2004)**-Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry ,12(1),pp.1-11.

B

- **Bergdoll M.S. (1970)**- Enterotoxins. In Microbial Toxins, New York, NY: Academic Press. Ed. Montie, T.C., Kadis, S. & Ajl, S.J, Vol. 3, pp. 265–326.
- **Besetti J. (2007)** - An Introduction to PCR Inhibitors, Profiles in DNA, Promega Corporation, pp. 9-10
- **Bing-Yuan Chen and Harry W. Janes. (2002)**- **PCR Cloning Protocols** .Ed.2.methods in molecular biology, Vol.192, Totowa, New Jersey, p12-3.
- **Bochicchio GV., Joshi M., Knorr KM., Scalea TM. (2001)**-Impact of nosocomial infections in trauma: does age make a difference? J Trauma, Vol.50, pp.612–7.
- **Brakstad O.G., Maeland J.A. (1989)** - Generation and characterization of monoclonal antibodies against staphylococcu aureus Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.Vol .97, pp.166-174.
- **Bustin S. A. (2000)** - Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology Vol. 25, pp.169-193.

Références bibliographiques

C

- **Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N., and Caskey C.T. (1988)** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141-11156.
- **Chevassus N.A.L. (2014)**-polymerase chain reaction (pcr), *Encyclopædia Universalis* [en ligne].URL:<http://www.universalis.fr/encyclopedie/polymerase->
- **Claas H. C., Melchers W. J., de Bruijn I. H., de Graf M., van Dijk W. C., Lindeman J., Quint W. G. (1990)** - Detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens by the polymerase chain reaction, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 9, pp.864-868.
- **Corne philippe. (2004)**- *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de doctorat, Montpellier I, p.18
- **Cruse P.J.E., Foord R. (1980)** - The epidemiology of wound infection. A 10 year prospective study of 62939 wound. *Surg.clin.North Amer*, Vol.60, pp.27-40.

D

- **Defortescu Celine.,ly-chan chai.,youssef Y.,maximilien deberly.(2007)**- Biologie et pathologie moléculaire.la PCR,p.5.
- **Dennis Lo Y. M., Rossa W.K.Chiu., Allen Chan K.C.(2006)**-Clinical Applications of PCR, Ed2, *Methods in molecular biolog*,Vol.336,pp.1
- **Dia N.M., Ka R., Dieng C., Diagne R., Dia M.L., Fortes L. (2008)** - Résultats de l'enquête de prévalence des infections nosocomiales au CHNU de Fann (Dakar, Sénégal). *Med Mal inf*, Vol.38 .pp.270-274.
- **Drancourt M., Adekambi T. (2004)** - L'eau en établissement de soins : les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. *Commission Européenne*, pp.4-38.
- **Drosten C., Gunther S., Preiser W., et al. (2003)** -Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1967–1976.
- **Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schkeufer KH., Stackebrandt E. (2006)**-The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Ed3.Springer, Vol 4, New-York, Chap.1.2.1. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, pp.4-75.

Références bibliographiques

E

- **Ellenberg E. (2005)** -Analyse terminologique des définitions données à l'infection nosocomiale et proposition d'une définition. La revue de médecine interne, Vol. 26, pp.572–577.
- **Espy, MJ, Uhl, JR, Sloan, LM, Buckwalter, SP, Jones, MF, Vetter, EA, Yao, JD, Wengenack, NL, Rosenblatt, JE, Cockerill, FR, et Smith. TF. (2006)**- Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory.
- **Euzéby J.P. (2013)** - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus, Staphylococcus [en ligne],<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>

G

- **Garlet GP., Martins Junior W., Ferreira BR., Milanezi CM., Silva JS. (2003)**- Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. J. Periodont Res; Vol.38, pp. 210-7.
- **Gayvallet-Montredon N., Sauvestre C., Bergeret M., Gendrel D., Raymond J. (2002)**- Bactériémies nosocomiales en pédiatrie. Arch pédiatr; Vol.7, pp.679-84.
- **Gudding R. (1983)** - Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. J. Clin. Microbiol. Vol.18, pp.1098-1101.

H

- **Hamza R. (2010)** -Epidémiologie des infections associées aux soins. Revue tunisienne d'infectiologie, Vol 4, pp. 1-4.
- http://www.invitrogen.com/Content/TechOnline/molecular_biology/manuals_pps/pcrt_echguide.pdf>. Access on: Nov 19 2002. - PCR/RT-PCR applications guide.
- <http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/>
- **Hennekinne J.A. (2009)** - nouvelles approches pour la caractérisation des toxico-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive, thèse de doctorat.Paris, pp.16-17.

I

- **Innes M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. , White T. J., eds.(1990)** - PCR Protocols, A Guide to Methods and Application, Academic, San Diego, CA

Références bibliographiques

J

- **Joffin JN., Leyral G. (2001)** - Microbiologie technique : 1 'Dictionnaire des techniques'. Ed3, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 320 p.
- **Johnson W. M., Tyler S.D., Ewan E.P., Ashton F.E., Pollard D.R., Rozee K.R. (1991)** - Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J.Clin. Microbiol. Vol.29, pp.426-430.

K

- **Kuiken T., Fouchier R. A. M., Schutten M. (2003)** - Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet 362, 263–270-neonatalogie du centre hospitalier département de Zou et des Collines au Benini. Archive de pédiatrie 2006 ; Vol.13 ,pp.1391 – 1396.
- **Kwok S., Higuchi R.. (1989)** - Avoiding false positives with PCR. Nature (London) Vol.339, pp.237-238.

L

- **Lachica R. V. F., Jang S. S., Hoepflich P. D. (1979)** - Thermonuclease seroinhibition test for distinguishing *Staphylococcus aureus* from other coagulase-positive staphylococci. J. Clin. Microbiol. Vol.9,pp.141-143.
- **Laurence A.L., Raymond R., Alain P., Antoine A. (2010)** - l'histoire de staphylococcus aureus st398:Un paradigme médical du 21ème siècle.
- **Lebech A.M., Hindersson P., Vuust J., Hansen K. (1991)** -Comparison of in vitro culture and polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. J. Clin. Microbiol. Vol 29,pp.731-737.
- **Liebl W., Rosenstein R., Gotz F., Schleifer K. H. (1987)** -Use of a staphylococcal nuclease gene as DNA probe for staphylococcus aureus FEMS Microbiol. Lett. Vol 44, pp.179-184.
- **Linderman JR., Greene AS-** Distribution of angiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. Microcirculation 2001 Aug; 8(4): 275-81.
- **Lloyd H., Lauerman. (2003)** -Advances in PCR technology, Washington State University

Références bibliographiques

M

- **Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. (2002)** - Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* # Vol.30, pp.1292-1305.
- **Mamette A. (2002)** - virology medicale, presses universitaire de lyon.
- **Martell M., Gomez J., Esteban J.I., Sauleda S., Quer J., Cabot B., Esteban R. Guardia J. (1999)**- High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology* #Vol 37,pp.327-332.
- **Mary C. Edwards., Richard A. Gibbs. (2014)**-Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Institute for Molecular Genetics,Baylor College of Medicine,Rev Genome Research* Vol.3,pp 65-75
- **Méric., Balaruc L.B. (2008)** -La PCR Usage et intérêt de la technique PCR pour un établissement thermal, *Bulletin d'information N°20 - 2009, AFTH Bagnères de Bigorre* J.F. pp.6
- **Migaud H, Senneville E, Gougeon F, Marchetti E, Amzallag M, Laffargue P. (2005)**- Risque infectieux en chirurgie orthopédique. The risk of infection in orthopaedic surgery *EMC-Rhumatologie Orthopédie; Vol 2,pp151–172.*
- **Mullis K.B., Falooma F.A. (1986)** - Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*Vol.155, pp. 335-350.

N

- **Nîmes M. (2007)** - la réaction de polymérisation en chaîne (pcr)principe et applications,Ecole de l'ADN , Nîmes cedex 1,Vol.30015,France,p.21-23

O

- **Oberholzer A., Keel M., Zellweger R., Steckholzer U., Trentz O., Ertel W. (2000)** - Incidence of septic complications andmultiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma* ; Vol. 48,p.932–7.
- **Ou C.Y., Moore J. L., Schochetman G. (1991)** - Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. *BioTechniques* Vol.10, pp.442-445.

Références bibliographiques

P

- **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D. (2010)** -Microbiologie. Ed 2 Française. De Boeck Université.

R

- **Reece R. J. (2004)** -Analysis of Genes and Genomes, John Wiley & Sons, Ltd, England, p.153-182.
- **Robert D. (2013)** - *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive ,Thèse de doctorat d'état en pharmacie,Univ.Angers.France,p.21.22

S

- **Santos CF., Oliveira EB., Salgado MCO., Greene AS.(2002)** -Molecular cloning and sequencing of the c DNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. J Cardiovasc Pharmacol May; 39(5),p. 628-35.
- **Schaechter M., Medoff G., Eisenstein Barry I. (1999)** -Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Univ. Paris Bruxelles ; p188-189.
- **Shortle D. (1983)** - A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. Gene Vol.22, p181-189.
- **Simon F., Kraemer P., Delina J.J., Demortière E., Rapp C. (2007)** -Le risque nosocomiale en Afrique intertropicale partie 2: Les infections des patients. Médecine tropicale; Vol.67.p.197-203.

T

- **Telles PDS., Hanks CT., Machado MAAM., Nor JE. (2003)** -Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. J Dent Res. June,82(6),p.466-70.
- **Thiele D. (1990)** -The technique of polymerase chain reaction-a new diagnostic tool in microbiology and other scientific fields (review). Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Vol.273,p 434-454.

Références bibliographiques

- **Tokue Y., Shoji S., Satoh K., Watanabe A., Motomiya M.(1991)** - Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) using polymerase chain reaction amplification. *Tohoku J. Exp. Med.* Vol.163, p31-37.

V

- **Van K .R. J., De Wever B., Van Alphen L. (1990)** - Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Med. Microbiol.* Vol.33, p271-276.
- **Vincent R. (2006)** - Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres– relation avec la qualité du vin .Thèse de Docteur de l'institut national polytechnique .Toulouse, p.109-114.

W

- **Wilson D., Yen-Lieberman B., Reischl U., Warshawsky I.,Procop GW. (2004)** - Comparison of five methods for extraction of *Legionella pneumophila* from respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 42(12) p.5913-5916.
- **Wilson I. G., Cooper J. E., a Gilmour A. (1991)** - Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk:use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC* and the thermonuclease gene *nuc*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.57 p.1793-1798.
- **Wright PA., Wynford-Thomas D. (1990)** -The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol*, Oct; 162(2) p.99-117.

Y

- **Yang G., Benson R., Pelish T., Brown E., Winchell JM., Fields B.(2010)** -Dual detection of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. *Clin Microbiol Infect.* Mar; 16(3), p255-61.