

République Algérienne Démocratique et Populaire  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
الوزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
*Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'El Harrach-Alger*  
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

Mémoire  
En vue de l'obtention du diplôme de  
*Magistère en Sciences Vétérinaires*

*Option : Elevage, Pathologie et Industrie des animaux  
de basse-cour*

Thème :

**Dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant  
à la méticilline (MRSA) chez la dinde et le  
poulet de chair: portage et risque zoonotique**

Soutenu par : *Dr BENRABIA Ismahane*

Devant le jury composé de

Dr TEMIM-KESSACI S. Professeur	ENSV Alger	Présidente
Dr OUMOUNA M. Maître de conférences	USDB Blida	Promoteur
Dr KHELEF D. Maître de conférences	ENSV Alger	Examineur
Dr HAMDI M. Maître de conférences classe A	ENSV Alger	Examineur
Dr BOUKHORS Maître de conférences	ENSV Alger	Examinatrice

*Année Universitaire 2010/2011*

## Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur M. OUMOUNA, à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée, sa patience, sa disponibilité, et ses conseils tout au long de ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame THEMIM, Professeur à l'école nationale supérieure vétérinaire pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie également Madame BOUKHERS et Monsieur HAMDI, qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie vivement, Monsieur KHELEF, maître de conférences à l'école nationale supérieure vétérinaire, qui a su rester disponible et pédagogue. J'ai trouvé en lui une incontestable patience et sagesse.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie, Monsieur GOUCEM, enseignant à l'école nationale supérieure vétérinaire, pour ses précieuses aides indispensables à l'élaboration de ce travail. Pour sa gentillesse, sa générosité et pour la qualité de son enseignement.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire vétérinaire de Draa ben khedda sous la direction de madame S. KHECHIH, chef de services de microbiologie, à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour la confiance qu'elle m'a accordée, sa patience, sa disponibilité, et ses conseils tout au long de ce travail. Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire, mes collègues et tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler pour leur sympathie et leur encouragement.

Je remercie également tous mes amis, en particulier GUECHTOULI Sihem, MESSAI Chafik et BELABBAS Rafik

Enfin, je ne pourrai jamais assez remercier mes parents, mes frères et sœurs pour leurs encouragements et soutien tout au long de mes études.

## Dédicaces

Je dédie ce travail à mon père

## *Résumé*

Le but de ce travail est d'isoler des souches de *S. aureus* chez la dinde chair et le poulet de chair, identifier les souches isolées, étudier leur profil de résistance aux autres familles d'antibiotiques et rechercher des *Staphylococcus aureus* méthicilino-résistant (MRSA).

L'évaluation du taux de portage des MRSA chez le poulet de chair et la dinde permet d'estimer le risque de transmission à l'homme.

1000 prélèvements (poumons et prélèvements nasaux) provenant de sujets sains ou non ont été analysés durant six mois d'étude. L'isolement et l'identification des souches de *S. aureus* ont été fondés sur les méthodes conventionnelles. La résistance à la méthicilline de ces souches a été détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton (notamment la mesure du diamètre d'inhibition de la céfoxitine 30µg) accompagné d'un dépistage à l'oxacilline (6µg/ml). Nous avons également étudié la résistance de ces souches à diverses familles d'antibiotiques :  $\beta$ -lactamines, aminosides, macrolides, tétracyclines, quinolones, glycopeptides et sulfamides.

Nous avons confirmé la présence des MRSA dans les filières poulet de chair et dinde de chair avec un taux de portage estimé à 10,5% pour le poulet de chair et 16,75% chez la dinde.

Ces souches SARM exprimaient, en plus, une résistance à d'autres familles d'antibiotique : 96,25% des souches testées sont résistantes à l'érythromycine, 92,75% des souches testées sont résistantes à la tétracycline et 86,25% des souches testées sont résistantes à l'érythromycine à l'enrofloxacin.

L'analyse globale du profil de résistance des SARM aux antibiotiques confirme le caractère multirésistant de ces bactéries aux différentes familles d'antibiotiques.

La multirésistance des souches SARM est non négligeable, d'où la nécessité d'une surveillance régulière.

*Mots clés* : SARM, Multirésistance, phénotype de résistance, volaille, dinde de chair, poulet de chair

## *Abstract*

The aim of this work is to isolate strains of *S. aureus* in turkey and broiler safe, identify strains, study their resistance profile to other families of antibiotics and search for *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA).

The evaluation of the carriage rate of MRSA in the chicken and turkey meat is used to estimate the risk of transmission to humans.

1000 samples (lungs and nasal swabs) from healthy subjects or not were analyzed during six months of study. Isolation and identification of strains of *S. aureus* were based on conventional methods. The methicillin resistance of these strains was detected by the method of agar diffusion with Mueller-Hinton (including the diameter of inhibition of cefoxitin 30µg) with a screening of oxacillin (6µg/ml). We also studied the resistance of these strains to different families of antibiotics.

We confirmed the presence of MRSA in chains broiler and turkey meat with a carrier rate estimated at 10.5% for broilers and 16.75% in turkeys.

These MRSA strains expressing, in addition, resistance to other families of antibiotics: 96.25% of the strains tested were resistant to erythromycin, 92.75% of the strains tested were resistant to tetracycline and 86.25% strains tested were resistant to erythromycin to enrofloxacin. The overall analysis of the profile of antibiotic resistance of MRSA confirmed the nature of these multidrug-resistant bacteria to different antibiotic families.

Multidrug resistance of MRSA strains is not negligible, hence the need for regular monitoring.

*Key words: MRSA, multi-drug resistance, resistance profile, chicken, turkey, poultry.*

## المخلص

الهدف من هذا العمل هو عزل سلالات س. الذهبية في الديك الرومي والدجاج اللحم ، وتحديد السلالات ، ودراسة مقاومتها لعائلات أخرى من المضادات الحيوية ، والبحث عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين methicilino (الجرثومة).

يتم استخدام تقييم معدل نقل الجرثومة في لحوم الدجاج و الديك الرومي لتقدير خطر انتقال العدوى إلى البشر. وتم تحليل 1000 عينة (الرئتين ومسحات الأنف) من الأصحاء خلال ستة أشهر من الدراسة. العزلة وتحديد السلالات س. المذهبة استند على الأساليب التقليدية. تم الكشف عن المقاومة ميثيسيلين من هذه السلالات عن طريقة نشر أجار مع مولر هينتون (بما في ذلك قطر تثبيط سيفوكسيتين 30µg) مع فحص oxacillin (6µg/ml). درسنا أيضا مقاومة هذه السلالات لعائلات مختلفة من المضادات الحيوية. أكدنا وجود الجرثومة في في الديك الرومي والدجاج اللحم بمعدل الناقل تقدر بنحو 5،10 ٪ للدجاجة و 75،16 ٪ في الديوك الرومية.

اختبار 75،92 ٪ من 25،96 ٪ من سلالات اختبار كانت مقاومة للإريثروميسين ، ومقاومة للالتتراسيكلين و 25،86 ٪ : هذه الجرثومة معرّبا عن سلالات ، وبالإضافة إلى ذلك ، ومقاومة للأسر أخرى من المضادات الحيوية اختبار السلالات كانت مقاومة للإريثروميسين إلى enrofloxacin. وأكد تحليل شامل للملف من هذه الجرثومة المقاومة للمضادات الحيوية طبيعة هذه البكتيريا المقاوم للمضادات الحيوية للعائلات مختلفة. المتعددة المقاومة للسلالات هذه الجرثومة لا يمكن تجاهله، وبالتالي الحاجة إلى الرصد المنتظم.

كلمات البحث: النمط الظاهري المتعددة المقاومة، هذه الجرثومة، الديك الرومي والدجاج اللحم

## Liste des figures

Figure 1 : Rôle de la protéine A dans l'évasion des staphylocoques au système immunitaire.....	5
Figure 2 : Rôle des staphylokinases dans l'évasion des staphylocoques au système immunitaire...	7
Figure 3 : LPV, facteur de virulence multifonctionnel.....	9
Figure 4 : Réponse inflammatoire lors d'infection par <i>S. aureus</i> .....	12
Figure 5 : Système de régulation de la virulence.....	13
Figure 6 : Atteinte articulaire par <i>S. aureus</i> .....	17
Figure 7: Atteinte articulaire par <i>S. aureus</i> .....	17
Figure 8 : Foie congestionné, avec points de nécrose.....	18
Figure 9 : Principaux sites d'action des antibiotiques.....	23
Figure 10 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	37
Figure11 : Etapes d'isolement des staphylocoques.....	56
Figure 12 : Etapes d'identification de l'espèce <i>S. aureus</i> .....	57
Figure 13 : Slidex Staph-Plus, bio Mérieux (réf. 73115 et 73 116).....	60
Figure 14 : staphylocoques en grappe de raisin coloration de Gram.....	61
Figure 15 : staphylocoques ensemencés sur milieu Chapman après 24 heures.....	61
Figure 16 : Aspect de <i>S. aureus</i> sur Baird Parker.....	62
Figure 17 : <i>S. aureus</i> Hémolysine +.....	62
Figure 18 : <i>S. aureus</i> DNase+.....	62
Figure 19 : <i>S. aureus</i> Catalase +.....	63
Figure 20 : <i>S. aureus</i> coagulase +.....	63
Figure 21 : hétérogénéité des <i>S. aureus</i> (même souche).....	63
Figure 22 : portage de <i>S. aureus</i> au niveau du poumon.....	64
Figure 23: portage de <i>S. aureus</i> par écouvillon nasal.....	65
Figure 24: portage de <i>S. aureus</i> chez le poulet de chair.....	65
Figure 25: Représentation des résultats de portage de <i>S. aureus</i> par wilaya.....	66
Figure 26 : portage de <i>S. aureus</i> au niveau du poumon.....	67
Figure 27: portage de <i>S. aureus</i> par écouvillon nasal.....	67
Figure 27 : Représentation des résultats de portage de <i>S. aureus</i> chez la dinde par wilaya.....	68
Figure 28: Représentation des résultats de portage de <i>S. aureus</i> chez la dinde de chair.....	68
Figure 29: recherche des MRSA.....	71
Figure 30 : Résistance à l'amoxicilline.....	77
Figure 31 : Résistance à la pénicilline.....	78

Figure 32 : <i>S. aureus</i> non producteur de penicillinase (dinde de chair).....	78
Figure 33 : <i>S. aureus</i> résistant par production de penicillinase (poulet de chair).....	79
Figure 34 : résistance à la cephalothine.....	79
Figure 35 : Résistance à l'Oxacilline.....	80
Figure 36 : Résistance à la céfoxitine.....	81
Figure 37 : Résistance hétérogène et homogène ( <i>S. aureus</i> , poulet de chair).....	82
Figure 38 : Résultats de la recherche des MRSA.....	83
Figure 39 : résistance à la gentamycine.....	84
Figure 40 : résistance à l'erytromycine.....	85
Figure 41: Résistance à la vancomycine.....	86
Figure 42 : Résistance à la tétracycline.....	87
Figure 43 : Résistance aux sulfamides.....	88
Figure 44: Résistance à l'enrofloxacin.....	89
Figure 45 : <i>S. aureus</i> résistante à erythromycine(à gauche), <i>S. aureus</i> résistante à la tetracycline (au milieu) et <i>S. aureus</i> résistante à l'enrofloxacin.....	89
Figure 46 : <i>S. aureus</i> résistante aux sulfamides.....	90
Figure 47 : <i>S. aureus</i> résistante à la gentamycine.....	90
Figure 48 : <i>S. aureus</i> résistante à la penicilline et à l'oxacilline.....	90
Figure 49 : <i>S. aureus</i> résistante à céphalothine.....	91
Figure 50 : <i>S. aureus</i> résistante céfoxitine.....	91
Figure 51: représentation des résultats de résistance des souches de <i>S. aureus</i> chez le poulet chair...	91
Figure 52 : souche de <i>S. aureus</i> sensible à la vancomycine.....	92
Figure 53 : : représentation des résultats de sensibilité des souches de <i>S. aureus</i> chez le poulet de chair.....	93
Figure 54 : antibiogramme de <i>S. aureus</i> sensible aux antibiotiques testés.....	93
Figure 55 : représentation des résultats résistance intermédiaire des souches de <i>S. aureus</i> chez le poulet de chair.....	94
Figure 56 : représentation des résultats résistance des souches de <i>S. aureus</i> chez la dinde de chair...	95
Figure 57: représentation des résultats résistance des souches de <i>S. aureus</i> chez la dinde de chair...	96
Figure 58: représentation des résultats résistance intermédiaire des souches de <i>S. aureus</i> chez la dinde de chair.....	97

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux antibiotiques utilisés en aviculture.....	26
Tableau 2 : Antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire.....	27
Tableau 3 : Classification des antibiotiques par familles.....	32
Tableau 4 : Représentation des échantillons par région.....	55
Tableau 5 : Résultats des prélèvements effectués chez le poulet de chair.....	64
Tableau 6 : Résultats des prélèvements effectués chez la dinde de chair.....	66
Tableau 7 : Liste des antibiotiques testés.....	70
Tableau 8: Phénotypes des souches de <i>S. aureus</i> résistantes aux $\beta$ -Lactamines.....	82

## Liste des abréviations

- $\mu\text{l}$  : microlitre
- $\text{O}_2$  : dioxygène
- $\text{H}_2\text{O}_2$  : eau oxygénée
- $\text{H}_2\text{O}$  : eau
- UFC : unité formant colonie
- U/  $\mu\text{l}$  : unité/microlitre
- ADN : acide désoxyribonucléique
- $\text{CO}_2$  : dioxyde de carbone
- g : gramme
- ml : millilitre
- $\mu\text{g/ml}$  : micro gramme /millilitre
- pH : potentiel hydrogène
- SARM ou MRSA : *Staphylococcus aureus méticillino-résistante*
- CA-MRSA: Community acquired methicillin resistant *S.aureus*
- MH: gélose Mueller Hinlton
- mn: minute
- mm: millimètre
- NaCl : chlorure de sodium
- DO : densité optique
- CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices

## Sommaire

<i>Introduction</i> .....	1
<i>Chapitre I : Synthèse bibliographique sur S. aureus</i>	
I. Définition des MRSA.....	3
II. Généralités sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
III. Facteurs de virulence et physiopathologie.....	5
III.1 Facteurs intervenant dans la colonisation, l'adhésion, l'invasion, la diffusion....	5
III.2 La résistance à la phagocytose.....	8
IV. Pouvoir pathogène.....	12
V. Données épidémiologiques.....	13
• Chez l'animal.....	13
• <i>Staphylococcus aureus</i> et santé publique.....	14
VI. Pathogénie.....	16
VII. Symptômes.....	16
• Atteinte articulaire.....	16
• Septicémie.....	17
• Dermatite gangréneuse.....	18
• Omphalite.....	18
• Chez l'homme.....	18
VIII. Diagnostic.....	19
VIII.1. Isolement et identification.....	19
VIII. 2. Diagnostic différentiel.....	20
IX. Prévention et contrôle de la maladie.....	21
IX.1. Traitement.....	21
IX.2. Prophylaxie sanitaire.....	21
IX.3. Prophylaxie médicale.....	21
<i>Chapitre II : Les antibiotiques</i>	
I. Historique.....	22
II. Définition d'un antibiotique.....	22
III. Mode d'action des antibiotiques.....	22
IV. Effets bactériostatique et bactéricide des antibiotiques.....	23

V. Usage des antibiotiques en médecine vétérinaire.....	24
VI. Antibiotiques utilisés en élevage avicole.....	26
VII. En médecine vétérinaire.....	26
VIII. Classification des antibiotiques.....	28
VIII.1. Critères de classification.....	28
VIII.2. Classification des antibiotiques selon leur origine.....	28
VIII.3. Classification des antibiotiques selon la structure chimique.....	29
VIII.4. Classification des antibiotiques selon la cible bactérienne.....	29
IX. Associations d'antibiotiques.....	35

### *Chapitre III : Etude bibliographique de la résistance de S. aureus*

I. Type de résistance.....	36
II. Etude de la résistance aux bêtalactamines.....	37
III. Étude de la résistance aux aminosides.....	41
IV. Etude de la résistance aux glycopeptides.....	42
IV.1. Mécanismes et définitions de la résistance.....	42
IV.1.1. Souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides.....	42
IV.1.2. Confirmation de la résistance et catégorisation des souches.....	45
V. Etude de la résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines.....	46
V.1. Mécanismes de résistance.....	47
VI. Résistance isolée à l'érythromycine.....	48
VII. Etude de la résistance aux quinolones.....	49
VII.1. Mécanismes de résistance.....	49
VIII. Etude de la résistance aux sulfamides et triméthoprim.....	50
IX. Acide fusidique.....	50
X. Rifampicine.....	51
XI. Oxazolidinones.....	51
XII. Lipopeptide.....	51
XIII. Glycylcycline.....	51
XIV. Les phénotypes associés de résistance (co-résistance).....	52
XV. Conclusion.....	52

## *Partie expérimentale*

### *Chapitre I : Isolement et identification de S. aureus*

I. Objectifs.....	54
II. Conduite de l'étude.....	54
Première partie : Isolement et identification des souches de <i>S. aureus</i> .....	55
I. Matériels.....	55
I.1. Échantillonnage.....	55
I.2. Milieux de culture, tampons et réactifs.....	55
I.3. Matériels de laboratoire.....	55
II. Méthode.....	56
II.1. Isolement.....	56
II.1.1. Pré-enrichissement.....	56
II.1.2 Isolement.....	56
II.2. Identification.....	57
II.2.1. Examen bactériologique.....	57
II.3. Etude biochimique.....	58
II.3.1. Recherche de la catalase.....	58
II.3.2. Recherche de la coagulase.....	58
II.3.3. Recherche d'une DNase ou d'une DNase thermorésistante.....	59
• Principe.....	59
II.3.4. Etude du caractère hémolytique.....	59
II.3.5. Recherche des protéines de surface.....	59
II.3.5. Recherche des protéines de surface.....	59
II.3.5.1. Recherche d'un récepteur du fibrinogène.....	59
• Principe.....	59
II.3.5.2. Recherche de la protéine A.....	60
III. Résultats.....	61
III.1. Observation au microscope.....	61
III.2. Lecture après 24 heures sur Chapman.....	61
III.3. Résultats de la recherche de la DNase.....	62
III.4. Résultats de la recherche de la Catalase.....	63
III.5. Résultats de la recherche de la coagulase.....	63
III.6. Résultats des prélèvements effectués chez le poulet de chair.....	64

III.7. Résultats des prélèvements effectués chez le poulet de chair par organe.....	64
III.8. Résultats des prélèvements effectués Chez la dinde de chair.....	66
III.8. 1. Résultats de portage de s. aureus au niveau du poumon.....	66
III.8. 2. Résultats de portage de s. aureus par écouvillon nasal.....	66
III.8. 3. Résultats de portage de S. aureus chez la dinde par wilaya.....	67
III.8. 4. Résultats de portage de S. aureus sur tous les prélèvements.....	68

## *Partie expérimentale*

### *Etude de l'antibiorésistance de S. aureus et recherche des MRSA*

PREMIERE PARTIE : Etude de l'antibiorésistance.....	69
I. Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme).....	69
I.1. Principe.....	69
I.2. Matériels.....	69
• Milieux.....	69
• Matériels de laboratoire.....	69
I.3. Méthode.....	69
I.4. Contrôle de qualité.....	71
DEUXIEME PARTIE : Recherche des MRSA.....	71
II.1. Recherche de la résistance à l'oxacilline.....	72
II.1.1. Test de diffusion du disque de cefoxitine (30 µg).....	72
II.1.2. Test de screening à l'oxacilline.....	72
II.1.3. Résistance hétérogène de la même souche de S. aureus.....	73
II.1.3.1. Détection de la résistance à l'oxacilline par la mise en évidence de la PLP2a (ou PBP2').....	73
II.1.3.2. Screening test à la vancomycine.....	74
II.1.3.3. Détermination des CMI pour les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine).....	75
<i>Résultats et discussion</i> .....	77
III.1. Sensibilité aux antibiotiques.....	77
III.1.1. Résistance aux β-Lactamines.....	77
III.1.1.1. Résistance à l'amoxicilline.....	77
III.1.1.2. Résistance à la pénicilline.....	77
III.1.1.3. Résistance à la céphalothine.....	79

III.1.1.4. Résistance à l'Oxacilline.....	80
III.1.1.5. Résistance à la céfoxitine.....	80
III.1.2. Recherche de la PLP2a.....	81
III.1.2. 1. Test de screening à l'oxacilline.....	81
III.1.2. 2. Etude de la résistance hétérogène de la même souche de <i>S. aureus</i> testée sur gélose Mueller Hinton hypersalé.....	82
III.1.2. 3. Phénotypes de résistance aux $\beta$ -Lactamines isolées.....	82
IV. Résistance aux aminosides.....	83
V. Résistance à la Gentamycine.....	83
VI. Résistance aux macrolides.....	84
VI.1. Résistance à l'Erythromycine.....	84
VII. Résistance aux glycopeptides.....	85
VII.1. Résistance à la Vancomycine.....	85
VII.2. Screening test à la vancomycine.....	85
VII.3. Détermination des CMI pour les glycopeptides (vancomycine).....	86
VIII. Résistance aux tétracyclines.....	86
VIII.1. Résistance à la Tétracycline.....	86
IX. Résistance aux sulfamides.....	87
X. Résistance à l'Enrofloxacin.....	88
XI. Taux de résistance et de sensibilité chez le poulet de chair.....	89
XI.1. Taux de résistance.....	89
XI.2. Taux de sensibilité.....	92
XII. Résistance intermédiaire.....	93
XIII. Taux de sensibilité des souche de <i>S. aureus</i> chez la dinde de chair.....	95
XIV. Résistance intermédiaire.....	96
XV. Discussion.....	97
<i>Conclusion et perspective</i> .....	104

## Références bibliographiques

## Annexes

# *Introduction*

## Introduction

*Staphylococcus aureus*, une bactérie connue par sa capacité d'adaptation aux conditions humaines et aux innovations médicales, continue d'être un sujet complexe et la cause d'infections émergentes qui menace la santé publique.

Historiquement, *Staphylococcus aureus* a été la cause bactérienne majeure de mortalité lors de la pandémie d'influenza de 1918 (Stevens et al, 2007). L'introduction de la pénicilline G en thérapeutique a révolutionné la prise en charge et le pronostic des patients infectés par *Staphylococcus aureus*.

Cependant, des souches résistantes par production d'une pénicillinase sont apparues dès 1942, rendant nécessaire la recherche de nouveaux antibiotiques. La méticilline, bêtalactamine résistante aux pénicillinases, a été utilisée à partir de 1960. Comme pour la pénicilline, *S. aureus* a développé rapidement des résistances vis-à-vis de cet antibiotique (Lucet et al, 2003).

Ces souches résistantes à la méticilline appelée *Staphylococcus aureus méticillino-résistante* (SARM) se sont très rapidement transmises sur un mode épidémique (première épidémie en 1963). A partir du début des années 1980, des souches de SARM résistantes à la gentamicine sont apparues et ont diffusé rapidement dans le monde (Sexton T *et al*, 2006). Enfin, depuis la fin des années 90, deux phénomènes nouveaux sont émergents : les souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides dont la fréquence reste limitée d'une part, et les souches d'origine communautaire qui sont isolées de plus en plus souvent d'autre part (Guilfoile, 2007).

Une des possibles voies de contamination par des souches communautaires appelée Community acquired methicillin resistant *S.aureus* (CA-MRSA) est la transmission par les animaux. Il a été démontré récemment, que le porc est le réservoir majeur des souches MRSA multilocus séquence type 398. Cette souche a été isolée chez d'autres espèces animales. Il a été aussi démontré que le porc joue un rôle potentiel dans la transmission zoonotique (Rankin et al, 2005)

Si la problématique des MRSA en médecine humaine est devenue infiniment plus complexe, la situation en médecine vétérinaire n'est pas différente, les infections à

staphylocoque chez la volaille, connues depuis plus de 100 ans, causent d'importantes pertes économiques par une diminution du gain de poids, chute de production d'œufs, saisie des carcasses. L'infection est souvent chronique et répond peu aux traitements antibiotiques.

En plus d'être une des maladies les plus répandues dans les élevages, approximativement 50 % des souches typiques et atypiques de *S. aureus* produisent des enterotoxines à l'origine de toxi-infection alimentaire chez l'homme (Shelley et al, 2005). En effet, la recherche des *Staphylococcus aureus*, l'identification des souches isolées et l'étude de l'antibiorésistance chez la volaille est d'une grande importance épidémiologique. Les *S. aureus* étant en constante évolution, cette étude nous permettra de récolter des données sur les différents sérotypes circulants, leurs résistances aux antibiotiques.

L'importance sanitaire et économique des MRSA, ainsi que la difficulté de lutte contre cette bactérie, qui a défié les plus récents des traitements antibiotiques par sa capacité d'adaptation en un temps court et son évolution génétique, impose des recherches chez toutes les autres espèces animales pour l'évaluation du risque zoonotique et l'établissement d'un plan de prophylaxie.

# *Données bibliographique*

# *Chapitre 1*

## *Synthèse bibliographique*

*sur*

*S. aureus*

## **I. Généralités sur *Staphylococcus aureus***

Le genre *Staphylococcus* regroupe plus de 20 espèces, appartenant à la famille des *Micrococcaceae*. Cependant, ces dernières années, l'analyse des séquences d'ARN et d'ADN a conduit à des remaniements importants quant à la position taxonomique du genre *Staphylococcus* (Steinberg *et al*, 1996 ; Claire *et al*, 2000)

Cette nouvelle position taxonomique inclue des critères génotypiques et phénotypiques. L'ADN des staphylocoques contient 30 à 39 mol% de guanine plus cytosine (G + C). L'autre critère de classification est la comparaison des séquences 16S et 23S d'ARNr (Freney *et al*, 2000 ; Hermans *et al*, 2006).

## **II. Définition des MRSA**

Les MRSA, pour Meticillino-Resistant *S. aureus*, appelés aussi SARM pour *S. aureus* Résistant à la Meticilline, sont des souches de *S. aureus* ayant développé une résistance aux pénicillines M (Methicilline, Oxacilline).

## **III. Etude bactériologique**

### **• Microscopie**

Le terme staphylocoque est dérivé du grec "*staphyle*", qui signifie grappe. Après coloration de Gram, les staphylocoques apparaissent comme des cocci à Gram positif, de 0,5 à 1 µm de diamètre.

Ils sont le plus souvent regroupés par deux, par quatre (tétrades caractéristiques à l'examen direct) ou en petits amas (grappes). Ils sont immobiles, non sporulés, la grande majorité des souches sont capsulées, mais les souches peuvent perdre leur capsule en culture (Steinberg *et al*, 1996)

### **• Culture**

Comme tous les germes très répandus dans la nature, *S. aureus* cultive facilement sur les milieux usuels, à des conditions de pH et de température variables. Il est même capable de pousser dans des conditions hostiles, par exemple en présence de 7% de NaCl. Ce caractère est mis à profit dans le milieu de culture sélectif hypersalé de Chapman pour isoler le staphylocoque d'un prélèvement polymicrobien et dans des recherches ciblées (dépistage) (Claire *et al*, 2000).

### **• En bouillon**

*S. aureus* donne un trouble uniforme en quelques heures

- **Sur gélose ordinaire**

Les colonies sont lisses, rondes, bombées, brillantes, opaques, de 1 mm de diamètre. Elles se pigmentent habituellement en jaune doré (*aureus*), parfois en jaune citron, et parfois sont non pigmentées

- **En gélose profonde**

*S. aureus* pousse dans la zone d'aérobiose et dans la zone d'anaérobiose. C'est donc une bactérie aérobie-anaérobie facultative, capable de se multiplier à la surface de la peau, en aérobiose, et dans les tissus mal oxygénés, plaie profonde par exemple.

Les colonies observées après 24 heures d'incubation sur Chapman sont lisses, opaques, convexes et présentent un bord net. La pigmentation jaune à jaune-orangée n'est pas toujours apparente.

Les colonies sont souvent bêta-hémolytiques sur gélose au sang. De rares souches capsulées produisent des colonies d'aspect luisant pouvant devenir coulantes après plusieurs jours de conservation sur milieu gélosé (Freney *et al*, 2000).

#### **IV. Caractères biochimiques**

*S. aureus* a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Il est catalase positive à la différence des bactéries du genre *Streptococcus* qui n'ont pas de métabolisme aérobie.

Il est toutefois capable de fermenter le glucose (métabolisme anaérobie) à la différence des microcoques.

Il est habituellement capable de fermenter le mannitol. Ce caractère est souvent, mais pas obligatoirement, associé à la pathogénicité. Il est utilisé dans le milieu de Chapman. La fermentation se traduit par le virage au jaune du milieu de culture.

Globalement, l'espèce *S. aureus* peut être différenciée des autres staphylocoques par la présence simultanée :

- d'une coagulase (le test de mise en évidence de la coagulase libre est utilisé en routine) ;
- d'une activité catalase positive ;
- d'une DNase
- et par la fermentation du mannitol.

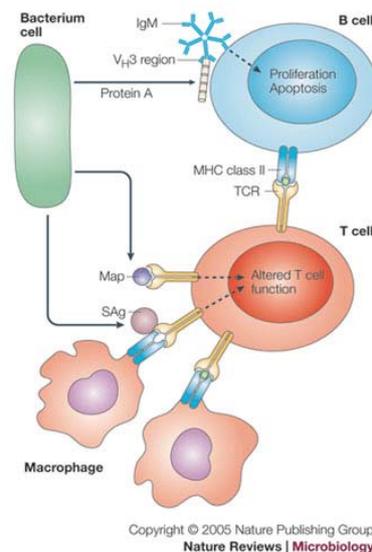
## V. Facteurs de virulence et physiopathologie

*S. aureus* exprime de nombreux facteurs de virulence : protéines de surface qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte, facteurs inhibant la phagocytose, toxines qui lèsent les cellules et provoquent les syndromes pathologiques (Buckingham *et al*, 2004)

### V.1 Facteurs intervenant dans la colonisation, l'adhésion, l'invasion, la diffusion

#### V.1.1 La protéine A

Elle se lie au fragment Fc des immunoglobulines IgG (IgM dans le sérum) (fig. 1) et inhibe l'opsonophagocytose. Elle peut jouer le rôle d'une adhésine au début de l'infection intra-vasculaire (Hermans *et al*, 2006).



**Figure 1 : Rôle de la protéine A dans l'évasion des staphylocoques au système immunitaire**

#### V.1.2 La protéine de liaison au collagène

L'attachement au collagène est nécessaire et suffisant pour l'adhésion de *S. aureus* au cartilage *in vitro*. Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (Buckingham *et al*, 2004).

#### V.1.3 La protéine de liaison à la fibronectine

Les récepteurs pour la fibronectine contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques et aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Ils ont ainsi un rôle important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers (Hermans *et al*, 2006 ; Buckingham *et al*, 2004)

#### **V.1.4 La protéine de liaison au fibrinogène (clumping factor)**

C'est une protéine de surface qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Elle constitue un facteur de virulence pour les plaies et les infections sur corps étrangers (Hermans *et al*, 2006)

#### **V.1.5 Les sidérophores**

Le fer est indispensable à la croissance des staphylocoques et l'une des méthodes de défense de l'hôte est la diminution de la fraction disponible du fer (fixation à la lactoferrine et à la transferrine). *S. aureus* s'adapte en sécrétant des sidérophores capables de capter et de transporter le fer dans la bactérie. La quantité produite dépend de l'origine pathologique des souches. Le niveau de la production de sidérophores est corrélé avec la forte expression de certaines protéines. Certaines souches virulentes de *S. aureus* pourraient produire 2 types de sidérophores : un premier dont la production serait limitée par des gènes chromosomiques et un second synthétisé par des plasmides à des quantités beaucoup plus élevées (Cox *et al*, 1995).

#### **V.1.6 La coagulase**

La coagulase n'est pas une enzyme mais une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte. La thrombine ainsi activée transforme le fibrinogène en fibrine. C'est un marqueur de l'identification de *S. aureus* (test de la coagulase en tube). Il n'existe pas d'argument évident indiquant un rôle de la coagulase dans la virulence des souches (Baggett *et al*, 2004). Cependant, on peut considérer logiquement qu'elle intervient dans la constitution des thrombophlébites staphylococciques et que le caillot permet aux bactéries qu'il contient de se protéger contre les défenses de l'hôte.

#### **V.1.7 Les désoxyribonucléases (ou DNAses)**

Sont des facteurs de destruction des noyaux cellulaires. La DNase thermostable est spécifique de *S. aureus*.

### V.1.8 La staphylokinase

Son action fibrinolytique explique les micro-emboles essaimant à distance, à l'origine de la constitution de métastases infectieuses (Collignon *et al*, 1998) (fig. 2).

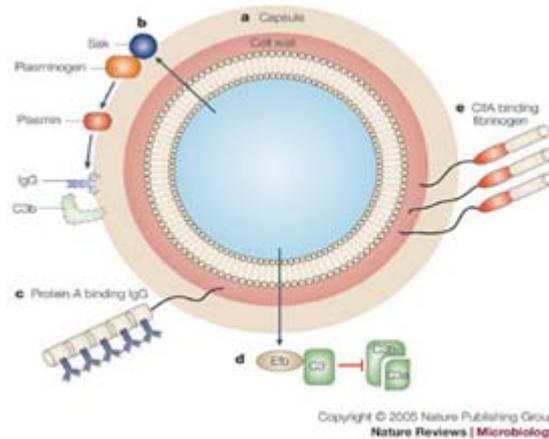


Figure 2 : Rôle des staphylokinases dans l'évasion des staphylocoques au système immunitaire.

La staphylokinase extracellulaire (b) (Sak) active le plasminogène et le clivage des IgG et C3b. La protéine A (c) présente 5 immunoglobulines et se lie au facteur C3 du complément et empêche ainsi sa liaison à la surface de la bactérie.

### V.1.9 La fame

Une enzyme modifiant les acides gras (fatty acid modifying enzyme) est exprimée par 80% des souches de *S. aureus*. Elle semble constituer un facteur de virulence important dans les abcès par modification des lipides antibactériens de l'hôte (Katayama *et al*, 2000).

### V.1.10 La hyaluronidase

La hyaluronidase est une enzyme thermolabile hydrolysant l'acide hyaluronique, substance fondamentale du tissu conjonctif. Elle favorise ainsi la diffusion des staphylocoques dans le tissu conjonctif (Farrell *et al*, 1995).

## V.2 La résistance à la phagocytose

### V.2.1 Les exopolysaccharides capsulaires

Des polysaccharides capsulaires sont trouvés chez 90% des souches de *S. aureus*. Onze types capsulaires sont décrits et les types 5 et 8 sont les plus fréquents. Cette capsule permet une meilleure résistance des souches à l'opsonisation et à la phagocytose. Certaines souches produisent un exopolysaccharide (glycocalyx) qui entraîne la formation d'un biofilm engluant les bactéries et leur permettant d'adhérer aux surfaces extérieures. Certaines protéines ou glycoprotéines sont responsables de la spécificité de type. Il existe 14 sérotypes mis en évidence par réaction d'agglutination au moyen d'immunsérums (Hermans *et al*, 2006).

### V.2.2. L'apoptose des cellules épithéliales

Après avoir adhéré aux protéines de surface d'une cellule épithéliale, *S. aureus* est ingéré. Dès la première heure suivant l'ingestion, la bactérie entraîne des modifications morphologiques du noyau cellulaire avec fragmentation de l'ADN. Elle reste viable dans la cellule pendant 72 heures, sans signe de multiplication. La cellule épithéliale, 24 à 48 heures après avoir phagocyté *S. aureus*, héberge une sous-population de colonies naines de staphylocoques (Merrer *et al*, 2000).

### V.2.3. Les toxines

*S. aureus* élabore des protéines diffusibles douées soit d'activité toxique, soit d'activité seulement enzymatique.

#### V.2.3.1 Toxines à activité membranaire : LPV

Ces toxines ne sont pas toutes retrouvées chez les souches de *S. aureus* responsables d'infections humaines et animales. De plus, leur rôle comme facteur de virulence n'est pas toujours connu. Parmi elles, la leucocidine de Pantone-Valentine (LPV) est en revanche associée à un fort pouvoir pathogène (Matouskova *et al*, 2008 ; Quenon *et al*, 2004). Décrite en 1932, elle porte le nom des chercheurs Pantone et Valentine qui l'ont découverte (Matouskova *et al*, 2008).

La LPV est une toxine synergo-hyménotrope, à deux composants, un composant de classe S (LukS-PV) et un composant de classe E (LukE-PV), non associés mais agissant en synergie. Les gènes codant pour cette protéine ont été clonés et séquencés en 1995. Ils sont contigus, co-transcrits et localisés sur une particule phagique wPVL (Quenon *et al*, 2004).

### V.2.5. Mécanisme d'action de la LPV

Cette toxine est leucotoxique et dermo-nécrotique mais non hémolytique. La LPV détruit les leucocytes en créant des pores dans les membranes plasmiques des cellules eucaryotes. Ceci induit des désordres ioniques majeurs et de perméabilité, le relargage de cytokines, l'activation intracellulaire des protéases, l'induction de l'apoptose et enfin la mort cellulaire (fig. 3).

La perméabilisation des membranes cellulaires intervient en deux étapes. La première est une reconnaissance des récepteurs spécifiques sur les membranes cellulaires par la molécule hydrophile LukS. Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages peuvent lier jusqu'à 10.000 molécules de LukS avec une grande affinité (Vandenesch *et al*, 2008). La deuxième étape est l'incorporation du second composant lipophile LukF qui s'oligomérisse au contact de LukS, permettant la formation d'un complexe moléculaire qui s'intègre dans la double couche phospholipidique. Ceci conduit à la formation de canaux membranaires perméabilisant la membrane des cellules (Francis *et al*, 2005).

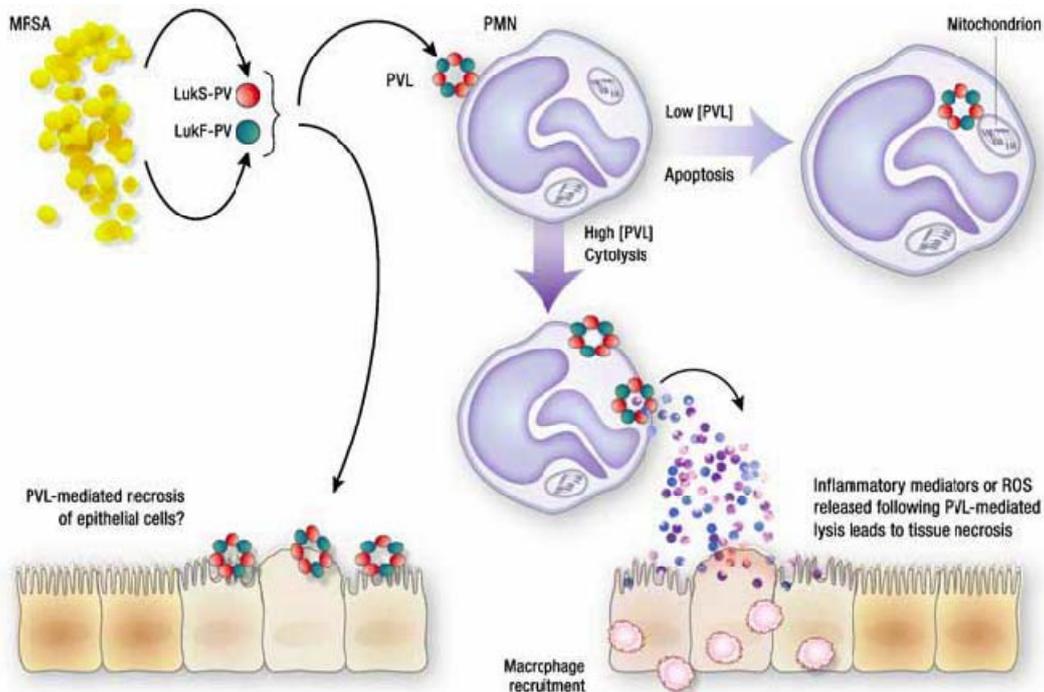


Figure 3 : LPV, facteur de virulence multifonctionnel

### V.2.6. Implication de la LPV en pathologie

L'inhibition des fonctions phagocytaires et la destruction des granulocytes expliquent l'extension des lésions. Les souches productrices induisent la libération par les leucocytes de

médiateurs de l'inflammation (leucotriènes B<sub>4</sub>, interleukine 8 à pouvoir chimiotactique, histamine vaso-dilatatrice). La proportion de souches de *S. aureus* qui produisent la LPV est faible, environ 2%. Elles sont principalement retrouvées dans des lésions dermo-nécrotiques sévères. La LPV est donc un facteur de virulence important des infections nécrosantes cutanées (furuncles, anthrax) et des infections graves à point de départ cutané primaire (Buckingham *et al*, 2004). Elle est retrouvée dans les souches de *S. aureus* responsables de pneumopathies nécrosantes et hémorragiques.

### **V.2.7. Les hémolysines**

Les hémolysines ont une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les globules rouges et les plaquettes. L'hémolysine  $\alpha$ , sécrétée par la quasi totalité des souches de *S. aureus*, est mise en évidence avec des hématies de mouton, de bœuf ou de lapin. La perméabilité membranaire entraîne une fuite osmotique du contenu cellulaire, aboutissant à la mort des cellules. La cytolysse de plaquettes et de monocytes libère des cytokines et d'autres médiateurs de la réaction inflammatoire, expliquant le choc septique des infections sévères à *S. aureus*. La destruction des cellules endothéliales favorise la dissémination des bactéries et les métastases infectieuses (Velasco *et al*, 2005).

### **III.2.8. Les entérotoxines**

Il existe 7 sérotypes différents (A, B, C1, C2, C3, D et E). Ce sont des protéines thermostables, responsables d'intoxications alimentaires (diarrhée, vomissements, douleurs abdominales, rarement un collapsus cardiaque), qui apparaissent 1 à 6 heures après l'ingestion. De 30 à 60% des souches de *S. aureus* produisent une entérotoxine. Il s'agit d'une protéine thermostable, insensible aux enzymes protéolytiques du suc digestif. L'entérotoxine A est de loin la plus fréquente (Francis *et al*, 2005)..

### **III.2.9. Entérotoxines, TSST1 (toxine du choc staphylococcique) et exfoliatines**

Ces différentes toxines sont impliquées dans les toxémies staphylococciques : choc toxique staphylococcique pour la TSST1, syndrome d'exfoliation généralisé (ou syndrome de la peau ébouillantée) pour les exfoliatines (Vandenesch *et al*, 2008).

La toxine responsable du choc toxique staphylococcique (TSST-1) est une protéine antigénique qui entraîne la formation d'anticorps protecteurs présents chez 85% des sujets adultes. Cette toxine, comme les entérotoxines, a un effet pyogène et est un super-antigène qui entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires, ce qui entraîne

la libération de plusieurs médiateurs (interleukine, interféron gamma, TNF alpha et bêta) responsables de la symptomatologie du choc staphylococcique.

L'exfoliatine est une protéine thermostable responsable des lésions d'érythrodermie bulleuse que l'on observe parfois au cours des septicémies à staphylocoques et au cours de l'impétigo. En se fixant à certaines protéines intracellulaires cutanées (profilagrine et filagrine) elle provoque une épidermolyse : décollement intra-épidermique entre le *stratum granulosum* et le *stratum spinosum*. Il y a rupture entre les cellules adjacentes, suivie de celle des ponts intercytoplasmiques (desmosomes) ce qui entraîne des lésions bulleuses (Eveillard et al, 2010).

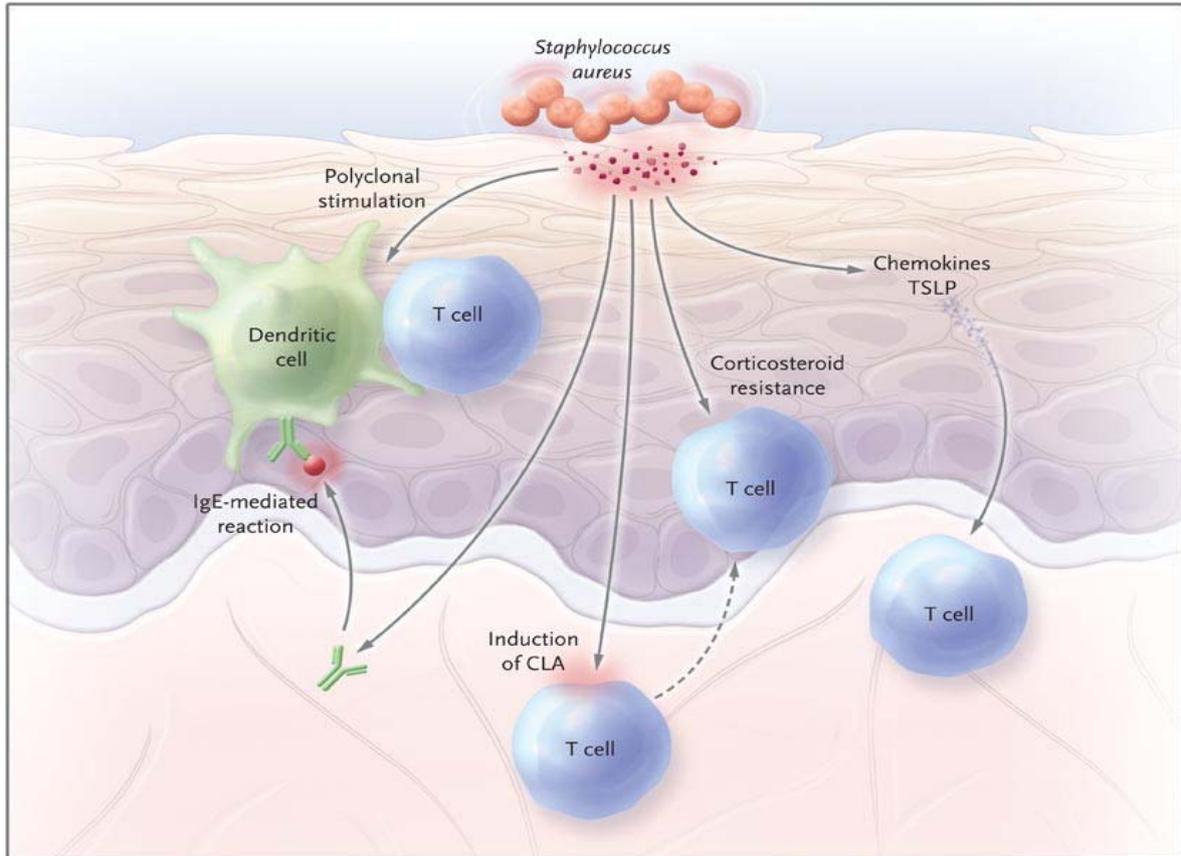
### **III.2.10. Activité super-antigénique**

Les super-antigènes sont des molécules présentant une liaison directe à grande affinité avec les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II des cellules présentant l'antigène, induisant ainsi l'activation polyclonale des lymphocytes. La TSST1 et plusieurs types d'entérotoxines ont une activité super-antigénique. Cette activité est plus controversée pour les exfoliatines (Velasco *et al*, 2005).

### **III.2.11. La réponse inflammatoire**

Plusieurs constituants des staphylocoques (les exopolysaccharides des types capsulaires 5 et 6, le peptidoglycane, les protéines de membrane et les exoprotéines) peuvent activer les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, induisant la production de cytokines (fig. 4).

Les composants de la paroi, comme le peptidoglycane, les acides teichoïques et lipoteichoïques, possèdent des effets biologiques démontrés *in vitro*, notamment la sécrétion de cytokines par les cellules lymphomonocytaires.



**Figure 4 : Réponse inflammatoire lors d'infection par *S. aureus***

Alors que le peptidoglycane est peu immunogène, les acides teichoïques (polymères linéaires du ribitol phosphate) donnent naissance à des anticorps que l'on trouve dans le sérum de malades atteints d'infection récente. Ces acides teichoïques sont les récepteurs de bactériophages (lysotypie des staphylocoques) (Eveillard et al, 2010).

#### IV. Pouvoir pathogène

La fréquence et la gravité des infections à staphylocoques sont liées à trois principaux facteurs :

1. le caractère ubiquitaire du germe,
2. l'abaissement des défenses locales et générales,
3. et la fréquente résistance aux antibiotiques du staphylocoque.

Chez *S. aureus*, l'expression coordonnée des facteurs de virulence extracellulaire et des protéines cellulaires, nécessaire à la colonisation, l'invasion et l'infection, est contrôlée par trois principaux systèmes régulateurs, le système *agr* (accessory gene regulator), *xpr* et *sar* (voir fig. 5) (McNamara et al, 1998).

A faible densité bactérienne, le système *agr* n'est pas activé, permettant l'expression des facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion. La multiplication bactérienne s'accompagne de l'activation du système *agr*, avec une diminution de l'expression des facteurs d'adhésion et une stimulation de l'expression des facteurs d'invasion et de dissémination de l'infection. Ainsi, le système *agr* fonctionnerait comme un *quorum sensor*, informant la bactérie sur la densité de staphylocoques dans son environnement (Ayliffe *et al*, 1971 ; McNamara *et al*, 1998).

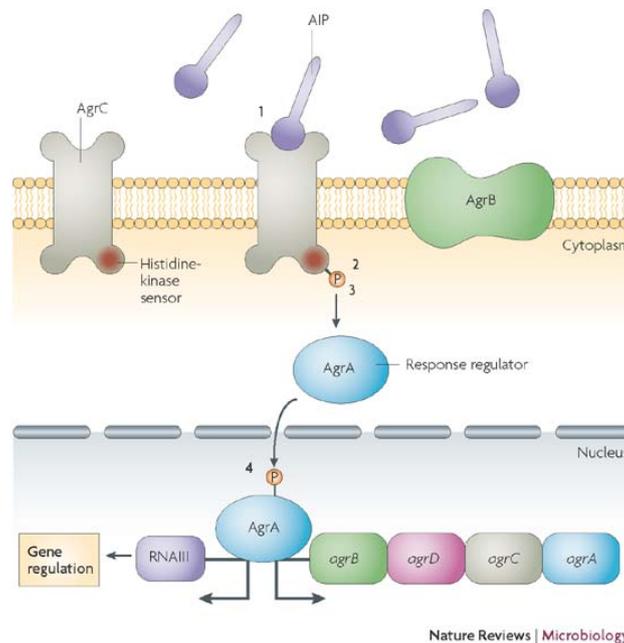


Figure 5 : Système de régulation de la virulence

## V. Données épidémiologiques

### • Chez l'animal

En général, les staphylocoques sont pathogènes facultatifs. Ces organismes appartiennent à la flore commensale cutanée et muqueuse des mammifères et des oiseaux.

Chez la volaille, les conditions d'élevage et l'hygiène de la litière jouent un rôle important dans le développement des infections staphylococciques. En effet, ces infections se manifestent surtout à la faveur d'une hygiène défectueuse. Des études épidémiologiques ont mis en évidence différentes sources de *S. aureus* qui varient en fonction de l'espèce animale.

*S. aureus* est impliqué en nombreuses infections. Cependant, des souches ont été isolées à partir de prélèvement de peau et des narines des poulets de chair et chez des poules pondeuses saines, et aux abattoirs (Madec *et al*, 2010).

Les souches isolées lors d'infections staphylococciques sont similaires aux souches isolées à partir de prélèvements de peau et des narines des poulets apparemment sains (Butterworth, 1999).

L'étude de McCullagh *et al.* (1998) sur la comparaison des souches de *Staphylococcus* isolées en cours d'élevage à des souches isolées dans les incubateurs montre que les souches isolées dans les incubateurs sont présentes en période d'élevage. Ainsi, cette étude permet de démontrer le rôle des incubateurs dans l'incidence des infections chroniques par les staphylocoques.

Deux ou plusieurs souches peuvent coexister au sein du même élevage. Ainsi, la notion d'interférence, qui favorise le développement d'une souche en inhibant la colonisation d'autres souches, est aussi décrite chez le poulet (Devriese, 1980)

D'autres études sur le statut immunitaire des oiseaux montrent le rôle des maladies virales immunosuppressives, bursite infectieuse et anémie virale du poulet, sur l'apparition des infections staphylococciques (Butterworth, 1999 ; McNamee *et al.*, 1999). La vaccination contre la maladie de Gumboro et l'anémie virale du poulet est d'ailleurs recommandée pour réduire les risques d'immunosuppression et d'infection.

- ***Staphylococcus aureus* et santé publique**

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 (Armand-lefevre et al, 2010).

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. La résistance intrinsèque à la méticilline de *S. aureus*, très étudiée en France autour de l'année 1965, est

aussi dénommée SARM pour *S. aureus* Résistant à la Méricilline ou encore MRSA pour Meticillino-Resistant *S. aureus*.

La particularité thérapeutique de cette résistance est d'une part, la résistance croisée entre toutes les bêta-lactamines et d'autre part, la co-résistance à divers antibiotiques d'autres familles déjà évoquées ci-dessus. Si les SARM ont été, jusque dans les années 2000, une menace surtout dans les hôpitaux et certains services comme la chirurgie orthopédique, la réanimation ou encore les brûlés, elles constituent aujourd'hui un réel danger d'infections nosocomiales. Un tel contexte a justifié leur appellation d'une part, d'HA-SARM (Hospitalized-Acquired) et d'autre part, de BMR (Bactérie MultiRésistante), impliquant, au moins en France, des mesures de détection et de prévention rigoureuses à partir de 1995.

Par ailleurs, la résistance de cette espèce aux antibiotiques fait maintenant l'objet d'une surveillance annuelle en France et en Europe. Plus récemment, à la fin des années 1990, une nouvelle menace est apparue avec des souches de SARM en pratique communautaire. L'émergence de ces souches CA-MRSA (Community Acquired), initialement aux USA et maintenant dans les pays industrialisés comme la France, l'Angleterre, l'Allemagne ou les Pays-Bas, fait craindre une nouvelle résurgence (Otter & French, 2010).

Il convient d'indiquer que ces souches sont responsables d'infections sévères chez l'homme, telles que les infections osseuses, pulmonaires... En France, la résistance intrinsèque (SARM) de ces souches a considérablement augmenté, de moins de 2% autour de l'année 1985 à 25% au cours de ces dernières années. La sévérité des infections humaines a corrélée avec la production, par ces souches, de facteurs de virulence telles que la leucocidine de Penton-Valentine (PVL), l'exfoliatine (EFT) ou encore la toxine du shock syndrome (TSS-1). Diverses enquêtes françaises indiquent que ces CA-SARM sont heureusement encore minoritaires. Beaucoup plus récemment, dès les années 2004, a été démontrée une relation directe entre le portage de staphylocoque doré chez l'animal, de préférence le porc, et le personnel qui était en contact, à savoir les éleveurs de porcs (Aubry-Damon *et al.* 2004).

D'autres études, en particulier européennes, ont démontré cette notion de portage préférentiel chez le porc pour le SARM, plus particulièrement en Belgique ou aux Pays-Bas (van Loo *et al.* 2007; Voss *et al.* 2005; Witte *et al.* 2007). Devant cette situation, l'Autorité Européenne de Sécurité Sanitaire (EFSA) a émis, en 2009 un avis relatif au danger du SARM

pour l'homme, suscitant de nouvelles enquêtes de prévalence aussi bien en Europe que dans d'autres pays comme les États-Unis, le Canada, la Chine etc... D'autres études, plus récentes, ont examiné ces souches au plan moléculaire, ainsi que le type d'infections qu'elles provoquent chez l'homme.

En Algérie, les résultats de l'étude de Ramdani et al(2006) montrent un fort taux de SARM-PVL+ aussi bien dans la communauté qu'en milieu hospitalier. Les SARM hospitaliers PVL+ étaient multirésistants aux antibiotiques compliquant leur approche thérapeutique.

L'étude d'Aouati1 et al (2010) sur la fréquence de souche de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), isolées au CHU de Constantine et leur profil de résistance aux autres familles d'antibiotiques a démontré que la multirésistance des souches SARM notamment aux services des urgences est non négligeable, d'où la nécessité d'une surveillance régulière.

## **VI. Pathogénie**

Après l'entrée systémique, les staphylocoques peuvent se déposer dans les vaisseaux sanguins et autour des cartilages de croissance des os, où ils se lient aux des protéines et du collagène. L'occlusion partielle de ces vaisseaux par des colonies bactériennes et l'infiltration des hétérophiles conduit à l'arrêt de la circulation sanguine locale, ce qui entraîne la formation de micro-abcès et nécrose osseuse.

Généralement, la matrice cartilagineuse empêche la propagation dans l'épiphyse (Butterworth, 1999 ; McNamee et Smyth, 2000).

## **VII. Symptômes**

les staphylocoques envahissent différentes parties de l'organisme du poulet et se manifestent sous différentes formes : omphalite, dermite, abcès, arthrite septique et même septicémie (Villate, 2001 ; Zhou *et al.*, 2007).

- **Atteinte articulaire**

L'arthrite, la périarthrite et la synovite sont souvent observées lors d'infection staphylococcique. Les articulations atteintes sont enflées et remplies d'exsudat inflammatoire (ostéomyélite).



**Figure 6 : Atteinte articulaire par *S. aureus***

La spondylarthrite, s'étendant aux vertèbres thoraco-lombaires, entraîne des boiteries par l'atteinte de la moelle épinière, observée dans les élevages industriels de poulets de chair et de dindes.



**Figure 7: Atteinte articulaire par *S. aureus***

Les abcès plantaires sont des infections courantes entraînant gonflement des pieds et boiteries. En élevage avicole, les arthrites de ces Cocci peuvent servir de modèle pour l'étude de maladies humaines, vu leur similitude (Alderson *et al*, 1986).

- **Septicémie**

Des cas de septicémie suite à une infection staphylococcique sont décrits chez le poulet de chair et dans les élevages de dindes. Les oiseaux malades ont les plumes ébouriffées, peuvent présenter des boiteries uni ou bilatérales, retombant d'une ou des deux ailes, la réticence à marcher, et de la fièvre, parfois suivie par la dépression grave et le décès. Les oiseaux survivant à la maladie aiguë ont des articulations enflées, assis sur leurs jarrets et bréchet et sont réticents ou incapables de se lever.

Les lésions macroscopiques d'une septicémie à staphylocoque consistent en une nécrose et une congestion de nombreux organes internes : le foie, la rate, les reins et les poumons.



**Figure 8 : Foie congestionné, avec points de nécrose**

- **Dermatite gangréneuse**

À la suite de traumatismes, des lésions de dermatite gangréneuse se développent sur le bout des ailes des oiseaux (Butterworth *et al*, 1999).

- **Omphalite**

Des études sur des souches de *S. aureus* isolées chez des poussins d'un jour concluent à une possible transmission par les troupeaux parentaux (Devriese, 1980). D'autres études associent ces infections à de mauvaises conditions d'hygiène et à l'immaturation du système immunitaire des poussins (Skeeles, 1991). Ces infections se manifestent par une augmentation du taux de mortalité les premiers jours après l'éclosion. Les poussins sont humides et les sacs vitellins sont hypertrophiés.

En dépit d'une antibiothérapie efficace, les mortalités liées aux complications de *Staphylococcus aureus* peuvent être considérables (Nawaz *et al*, 1999) et atteindre 3-20% (Zhou, 2007). Les infections dues aux staphylocoques peuvent causer d'énormes pertes économiques dans les élevages industriels de volailles (Zhou *et al*, 2007), particulièrement dans la filière poulet de chair, entre 6 et 12 semaines.

- **Chez l'homme**

*S. aureus* est responsable de nombreuses manifestations pathologiques, suppuratives et nécrotiques : suppurations localisées, septicémies et endocardites, ainsi que des toxi-infections alimentaires.

Lors des toxi-infections alimentaires, les toxines sont ingérées avec les aliments contaminés par *S. aureus*. L'incubation est courte (quelques heures). Elle est suivie de signes cliniques digestifs, sans fièvre. L'évolution est rapide et bénigne, sauf en cas de déshydratation importante (nécessité d'hospitalisation). Une étude réalisée sur des souches isolées de TIAC pendant 20 ans au Royaume-Uni montre que la toxine la plus souvent en cause est l'entérotoxine A, seule ou associée (Wooton *et al*, 2004)

## **VII. Diagnostic**

### **VIII.1. Isolement et identification**

Pour les examens à visée diagnostique, les prélèvements sont fait suivant le tableau clinique : exsudat dans les articulations, sac vitellin, intestins.

La culture bactérienne est facile à mettre en œuvre. Des kits d'identification dirigés simultanément contre plusieurs caractères de *S. aureus* sont disponibles et utilisés de manière courante, en complément de la mise en évidence de la coagulase libre. Enfin, des galeries d'identification basées sur les caractères biochimiques sont disponibles en cas de doute.

Le typage de l'isolat est nécessaire, mais n'est possible que dans les laboratoires spécialisés (Naas *et al*, 2005).

Pour le dépistage (recherche spécifique des MRSA), les prélèvements sont faits au niveau des sites habituels de portage (voies respiratoires supérieures, plis cutanés et muqueuses).

En médecine vétérinaire et humaine, des analyses sont réalisées à la demande des laboratoires pour des souches posant des problèmes diagnostiques ou sur des collections de staphylocoques provenant d'enquêtes épidémiologiques (réseaux d'épidémio-surveillance pour le dépistage des MRSA, étude des possibles voies de transmission homme- animal).

L'identification et l'antibiogramme de souches atypiques de staphylocoques se fait par :

- Phénotypage : tests biochimiques, concentrations minimales inhibitrices, phénotype de sensibilité aux glycopeptides (Velasco *et al*, 2003).
- Géotypage : identification des différentes espèces de staphylocoques par séquençage du gène *rpoB*, détection des gènes *nuc* (pour l'identification des *S. aureus*), *mecA* (codant pour la résistance à l'oxacilline), *mupA* (codant pour la résistance à la mupirocine) et des gènes de résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS), aux tétracyclines et aux aminoglycosides (Vandenesch *et al*, 2005)

- Détection des gènes codant pour les toxines : exfoliatines A, B et D, leucocidine de Pantone-Valentine (PVL), Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1) et 17 entérotoxines.
- Typage moléculaire : macro-restriction génomique par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), *spa* sequence typing et typage de la cassette chromosomique *mec* du staphylocoque (*SCCmec*), détermination du groupe *agr*, détermination de la présence du gène *arcA*, marqueur de l'îlot de pathogénicité de l'arginine catabolic mobile element (ACME) (van Belkum *et al*, 1998).

Si la détection de la résistance homogène à la méticilline ne pose pas de problème en général, il n'en est pas de même de la résistance hétérogène à la méticilline. En effet, les tests de diffusion classiques réalisés à l'aide de disques contenant de l'oxacilline ne permettent pas de la détecter à 37°C dans les conditions standards. La sensibilité de la détection de la résistance hétérogène par l'oxacilline après incubation à 30°C ou en milieu hypersalé est meilleure mais certaines souches restent encore faussement identifiées comme des souches sensibles.

Si la recherche du gène *mecA* par amplification génique reste la méthode de référence pour l'identification des souches résistantes à la méticilline, de nombreuses études comparant l'efficacité de différentes méthodes de détection de la méticillino-résistance ont été réalisées au cours des dernières années (Voss *et al*, 1994 ; Fergie et Purcell, 2001 ; Chan *et al*, 2003).

Dans l'étude de Velasco *et al*. (1994), l'utilisation de la méthode de diffusion en milieu gélosé avec des disques de céfoxitine à 30 µg/ml est apparue comme la technique la plus performante, avec une valeur prédictive négative à 100% et une valeur prédictive positive à 98% (Voss *et al*, 1994).

Felten *et al*. (2000) montrent que la détermination des CMI en milieu gélosé (E-test) a une sensibilité particulièrement faible (73,1%) pour la détection des SARM de classe 1, souches hétérogènes ayant la plus faible proportion de bactéries résistantes (Fergie et Purcell, 2001)

## **VIII.2. Diagnostic différentiel**

Il concerne de nombreuses affections. Il faut différencier les infections staphylococciques de :

- L'infection à *E. coli*
- L'infection à *Pasteurella multocida*
- L'infection à *Mycoplasma synoviae*

- L'infection à Reovirus
- A toute cause d'atteinte articulaire, d'omphalite et de septicémie.

## **IX. Prévention et contrôle de la maladie**

### **IX.1. Traitement**

Le traitement est basé sur l'antibiothérapie. L'antibiogramme est nécessaire du fait des nombreuses antibio-résistances observées sur les isolats de terrain. Les antibiotiques utilisés pour le traitement des infections staphylococciques sont : pénicilline, streptomycine, tétracycline, érythromycine, novobiocine, sulfonamides, lincomycine, sulfamides et spectinomycine (Cotter *et al*, 1991 ; Daum *et al*, 1994).

### **IX.2. Prophylaxie sanitaire**

La prévention sanitaire est fondée sur la maîtrise des facteurs de risque et des conditions environnementales :

- Elimination de tout objet pouvant provoquer des lésions cutanées : les lésions cutanées sont les portes d'entrée des *Staphylococcus*.
- Qualité de la litière : le maintien d'une bonne litière réduit les affections articulaires et au niveau du bréchet.
- Hygiène au niveau des incubateurs.
- Prévention des maladies immunosuppressives : maladie de Gumboro et anémie infectieuse du poulet

### **IX.3. Prophylaxie médicale**

L'utilisation de la bactérie comme vaccin est inefficace. L'utilisation des souches non pathogènes par le principe d'interférence permet de prévenir l'adhésion des souches de *S. aureus* au niveau des voies respiratoires (Andreasen, 2000).

## *Chapitre 2*

### *Les antibiotiques*

## **I. Définition d'un antibiotique**

Selon Gogny *et al* (2001), Anonyme (2008) les antibiotiques sont des substances antibactériennes d'origine biologique ou non, c'est-à-dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique. Les antibiotiques sont capables d'inhiber spécifiquement la vitalité d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux.

## **II. Mode d'action des antibiotiques**

les antibiotiques sont des substances agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne (Mevius *et al*, 1999). Cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce sur des sites variés (Cohen et Jaquot, 2001 ; Oxoby, 2002 ; Anonyme, 2005 ; Cuq, 2008) (fig. 9) :

- Sur la paroi bactérienne, en inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane,
- Sur la membrane cellulaire, en désorganisant sa structure et son fonctionnement,
- Sur les ribosomes, ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales.
- Sur l'ADN, en empêchant sa réplication et en inhibant la biosynthèse protéique.

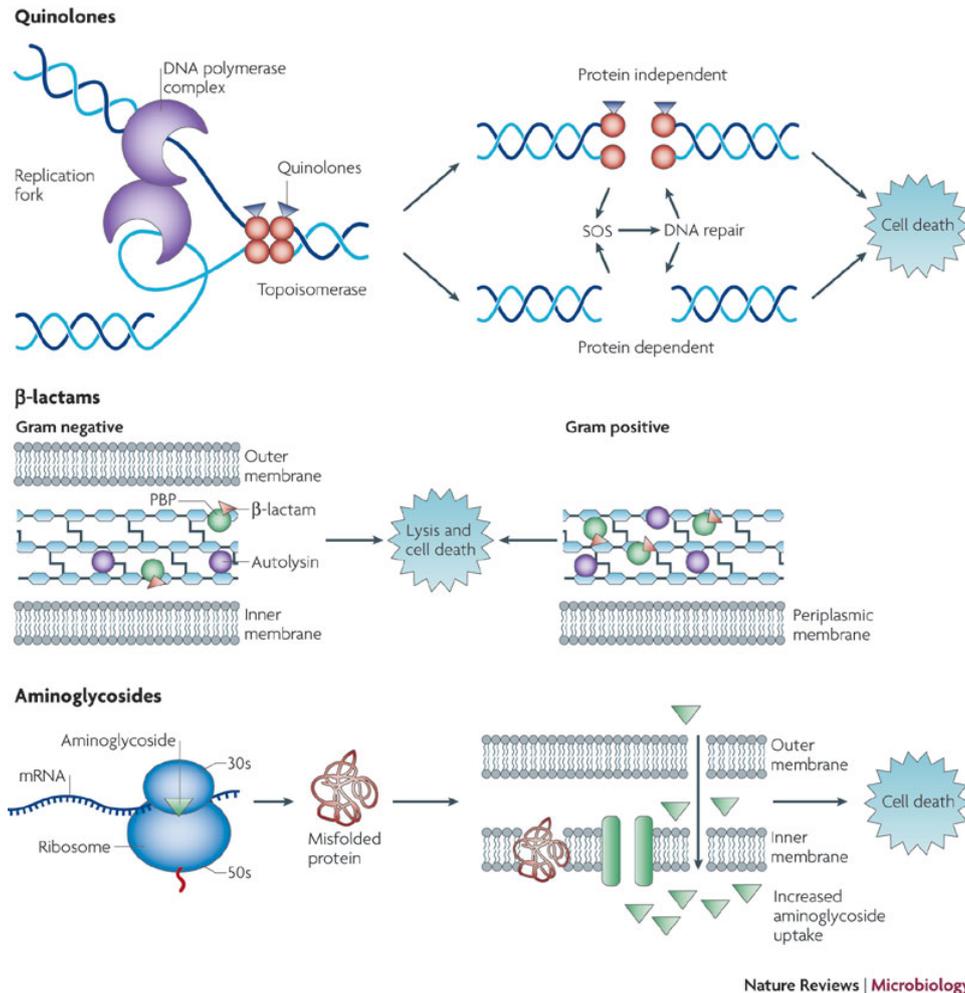


Figure 9 : Principaux sites d'action des antibiotiques

#### IV. Effets bactériostatique et bactéricide des antibiotiques

En fonction de leur type d'activité vis-à-vis des bactéries, on distingue les antibiotiques bactériostatiques et bactéricides (Morin *et al.*, 2005).

#### V. Usage des antibiotiques en médecine vétérinaire

Selon Bezoen *et al.* (1999), Guillemot (2006) et Jacquemin (2006), les antibiotiques peuvent être utilisés de quatre façons différentes, avec des objectifs variables :

##### V.1. Usage thérapeutique :

Antibiothérapie curative : L'objectif majeur est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. Le traitement a aussi pour effet de réduire la souffrance et de restaurer la production (œuf, viande).

**V.2. Usage métaphylactique :**

Les antibiotiques sont utilisés dans des situations épidémiologiques particulières : une infection collective et très contagieuse qui se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. La métaphylaxie est généralement mise en œuvre à partir d'un seuil d'atteinte des animaux au sein du lot de 10-15% de l'effectif.

**V.3. Usage prophylactique :**

Les antibiotiques sont administrés à des périodes critiques de la vie des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue. Dans ces conditions, on parle d'antibio-prévention car le traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique. Cette modalité d'utilisation des antibiotiques est adaptée à une situation sanitaire donnée et doit être provisoire. L'antibio-prophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections bactériennes.

**V.4. Facteur de croissance :**

L'utilisation des antibiotiques dans l'aliment comme d'additifs pour l'amélioration de la croissance a fait l'objet de nombreuses critiques. Il est très limité actuellement, totalement abandonné en Europe depuis fin 2005 (Coli, 2007) et en Algérie depuis janvier 2006 (Rahal, 2007).

Ces antibiotiques régulateurs de flore (ARF) ou antibiotiques promoteurs de croissance (AGP pour antibiotic growth promotors) utilisés à des doses très faibles, non curatives, et sont tous des agents chimio-thérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur.

Les effets bénéfiques de l'utilisation des facteurs de croissance sur la productivité sont clairement observés, sans que les mécanismes à l'origine de l'amélioration de ces performances aient été clairement élucidés. Ainsi, les relations symbiotiques de la microflore avec l'animal seraient modulées au profit de celui-ci, avec pour conséquence une croissance accélérée et une prise de poids de l'ordre de 2 à 5% (McEwan, 2002 ; Dibner, J. D. Richardset al, 2006)

Depuis les années 1950, l'industrie agro-alimentaire s'est mise à utiliser régulièrement des antibiotiques dans l'alimentation animale (volailles surtout) comme facteur de croissance. Elle concerne 68% des poulets de chair et 20% des poules pondeuses (Bastianelli, 2000 ; Dormont, 2000 ; Devie *et al*, 2006).

L'utilisation trop systématique d'antibiotiques en prévention et comme additifs alimentaires a été remise en cause dès 1977 dans les élevages intensifs, à cause de leur surdosage et leur emploi inapproprié, constituant ainsi de réels problèmes pour la santé publique par la présence de résidus d'ATB dans la viande destinée à la consommation (Bastianelli et Le Bas, 2000 ; Devie *et al*, 2006).

Cet usage n'est pas sans conséquences sur la santé humaine : risques toxiques et allergiques pouvant être encourus par le consommateur (Devie *et al*, 2006), émergence de résistance aux ATB de certains germes zoo-pathogènes, dont les staphylocoques qui sont généralement sensibles aux ATB, mais ayant acquis progressivement une ou plusieurs résistances (Bouchardon *et al*, 2006) qui se sont probablement effectuées dans son réservoir principal, l'animal (McEwan, 2002).

Certains pays ont restreint l'utilisation des additifs dans leurs élevages par des pénalités financières (Danemark depuis 1998), et même par des lois interdisant toute administration d'ATB à des animaux sains (Suède depuis 1986). (Copret, 2000)

Cependant, il est important de noter que certains additifs ATB sont encore largement utilisés dans différents autres pays comme les Etats-Unis d'Amérique où l'emploi des molécules réservées à la thérapeutique (Erythromycine, Tétracycline, Tylosine et Virginiamycine) est permis. (Danan, 2006)

## **VI. Classification des antibiotiques**

### **VIII.1. Critères de classification**

outre critères ont permis la classification des antibiotiques (Duval et Soussy, 1990 ; Anonyme, 2006 ; Fontaine, 1992)

- l'origine (bio-synthétisés par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*, issus du génie chimique),
- La composition chimique (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques),
- L'activité (antibactériens, antifongiques, antimétabolites),

- Le mode d'action,
- modalité d'action.

La classification la plus courante est celle par familles possédant un certain nombre de caractères communs : composition chimique ou origine, spectre d'action similaire ou très rapproché, cible bactérienne identique, résistance bactérienne et sensibilisation croisée, effets indésirables rapprochés, etc. (Duval et Soussy, 1990 ; Maur, 1990).

### **VIII.2. Classification des antibiotiques selon leur origine**

Les anti-infectieux peuvent être produits de trois façons : par fermentation naturelle, par semi-synthèse ou par synthèse chimique.

#### **VIII.2.3. Synthèse chimique totale**

Certains antibiotiques dont la structure est assez simple sont produits plus économiquement par synthèse que par fermentation. C'est le cas du florphénicol, du chloramphénicol, des monobactames et tous les agents antibactériens de synthèse : sulfamides, triméthoprim, quinolones, nitrofuranes, etc. Le fait que certains antibiotiques (chloramphénicol, aztréonam, etc.) obtenus au début par fermentation soient actuellement produits par synthèse chimique, fait de plus en plus disparaître la distinction initiale entre antibiotiques et agents antibactériens de synthèse (Maur, 1990 ; Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

### **VIII.3. Classification des antibiotiques selon la structure chimique**

Très variable, souvent une structure de base, comme le cycle  $\beta$ -lactame (famille des  $\beta$ -lactamines) sur laquelle il y a héli-synthèse, donne souvent le nom à la famille (Anonyme, 2006)

### **VIII.6. Classification des antibiotiques par familles**

Les antibiotiques sont regroupés plusieurs familles (Gogny et Puyt, 2001)

#### **1. Bétalactamines**

- Antibiotiques bactéricides,
- actifs par voie orale (à l'exception de la benzylpénicilline ou pénicilline G)
- distribution extracellulaire.

## **2. Aminosides (aminocyclitols)**

- Antibiotiques bactéricides,
- Spectre d'activité : étroit, essentiellement bactéries anaérobies à Gram négatif pour la plupart ; spectre large (bactéries à Gram positif et négatif) pour la gentamicine.
- Résistances se développant rapidement.

## **3. Tétracycline**

- Antibiotiques bactériostatiques, à spectre large, résorbés par voie digestive.
- Tétracycline, Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline

## **5. Macrolides et apparentés**

- Antibiotiques bactériostatiques
- forte distribution intracellulaire et à fortes concentration dans les sécrétions acides (lait dans toutes les espèces, urine et salive des carnivores)
- Érythromycine, Oléandomycine, Spiramycine (également additif), Tylosine (également additif), Josamycine, Tilmicosine

## **6. Sulfonamides antibactériens**

- Dérivés de l'acide para-amino-benzoïque,
- bactériostatiques, à large spectre d'activité antibactérienne (bactéries à Gram positif et négatif) ainsi que parfois anticoccidienne, en majorité résorbés par voie digestive.

## **9. Quinolones**

- Antibactériens bactéricides, dénués d'activité sur les bactéries anaérobies, bien résorbés par voie orale.

## **VII. Associations d'antibiotiques**

Selon Cohen et Jaquot (2001), Puyt (2006), Anonyme (2005) et Guérin-Faublée (2006), en règle générale les antibiotiques doivent autant que possible être utilisés seuls : mono-antibiothérapie. Cependant, en thérapeutique anti-infectieuse, on associe plusieurs antibiotiques, soit :

- Pour retarder l'apparition d'une antibiorésistance microbienne, mais uniquement chromosomique,
- Pour assurer une couverture antibiotique en urgence
- rechercher une synergie,
- de limiter les effets indésirables

## *Chapitre 3*

# *Etude bibliographique de la résistance de S. aureus*

En réponse à la pression de sélection antibiotique, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes conférant la résistance à la bactérie hôte, ainsi que sa capacité de transmission à d'autres bactéries. Ces microorganismes combinent notamment des mécanismes à large spectre de substrats, qui leur permettent de résister simultanément à diverses classes d'antibiotiques et de devenir ainsi multirésistantes. Après l'introduction des antibiotiques, *Staphylococcus aureus* développe une résistance à la pénicilline en 1941 déjà et émerge comme importante cause de sévères infections nosocomiales en 1950. En 1960, environ la moitié des souches isolées étaient résistantes à la pénicilline.

La découverte des  $\beta$ -lactaminases résistantes aux céphalosporines et plus tard des  $\beta$ -lactamines semi-synthétiques (méthicilline, oxacilline et nafcilline) a sauvé des vies durant les 10 à 15 ans qui ont suivi. En 1970, des cas sporadiques de *Staphylococcus aureus* méthicilline résistant sont apparus chez des patients très malades et sous traitement antibiotique intense. En 1996, plus du tiers des souches de *S. aureus* sont résistantes au méthicilline (CourvaIn, 2007).

Ceci conduit à une large utilisation de la vancomycine pour le traitement des infections à *S. aureus*. En 2002, la première souche entièrement résistante à la vancomycine est identifiée. Plusieurs nouvelles classes d'antibiotiques sont approuvées pour le traitement des *S. aureus* multirésistantes. Cependant, il apparaît, suivant l'évolution historique de l'antibiorésistance des *S. aureus*, que la réussite de ces nouveaux traitements n'est que question de temps avant le développement de nouvelles résistances (Depardieu *et al*, 2007).

## **I. TYPES DE RÉSISTANCE**

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

La résistance intrinsèque (ou naturelle ou insensibilité) est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques. Par exemple, la présence d'une membrane externe chez les bacilles à Gram négatif entraîne la résistance à diverses classes de molécules par imperméabilité (glycopeptides, macrolides, lincosamides, streptogramines, etc.).

A l'inverse, la résistance acquise n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre ; dans certains cas, elle peut concerner la grande majorité de ces souches comme, par exemple, la production de pénicillinase chez le staphylocoque qui intéresse plus de 90% des souches. Sur le plan biochimique, les bactéries ont développé quatre grands mécanismes d'acquisition de la résistance (Galimand *et al*, 2005) (figure 10) :

- La modification de la cible, qui entraîne une perte d'affinité de l'antibiotique pour cette dernière ;
- La production d'une enzyme qui va détoxifier l'antibiotique ;
- L'imperméabilité, notamment par diminution du diamètre des porines (pores au niveau de la membrane externe) chez les bacilles à Gram négatif ;
- L'efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes.

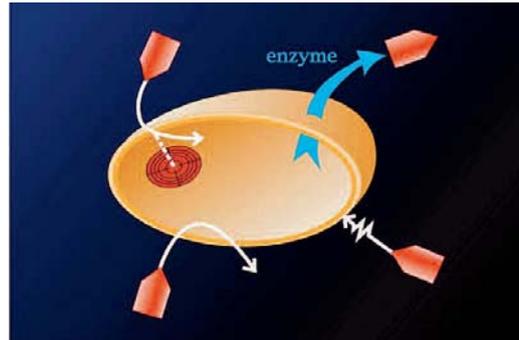


Figure 10 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques

Le motif commun à ces différents mécanismes de résistance est d'empêcher l'interaction de l'antibiotique avec sa cible.

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes : Soit des mutations dans le génome, on parlera alors de transmission verticale à la descendance, soit l'acquisition d'information génétique étrangère, en provenance d'autres bactéries, par transfert horizontal.

## **II. Etude de la résistance aux bêtalactamines**

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 (voir chapitre II)

La sensibilité des souches de *S. aureus* sauvages aux bêtalactamines varie selon la molécule. Actuellement, 80 à 95% des souches de *S. aureus* produisent une pénicillinase qui inactive la pénicilline G et l'ampicilline, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*. Cependant, ces deux bêtalactamines sont très actives sur les souches non productrices de pénicillinase [concentrations minimales inhibitrices (CMI) modales

respectivement égales à 0,03 et 0,06 mg/l]. L'oxacilline et la cloxacilline (qui ont remplacé la méticilline) sont peu sensibles à l'action des pénicillinases acquises, avec des CMI généralement égales à 0,25 mg/l.

Les céphalosporines ne sont pas plus actives, celles de troisième génération sont nettement moins actives. Par exemple, la CMI du céfotaxime est égale à 2 mg/l. L'imipénème a une activité comparable à celle de l'oxacilline (Lacey *et al*, 2001).

## **II.1. Mécanismes de résistance**

Deux mécanismes principaux de résistance sont décrits, la production de pénicillinase et la modification de la cible des bêtalactamines.

### **II.1. 1. Résistance à la pénicilline par production de pénicillinase**

L'expression de la pénicillinase plasmidique est inductible par les bêtalactamines et se traduit par une large dispersion des CMI de la pénicilline G et de l'amoxicilline. L'interprétation de l'antibiogramme peut ainsi être difficile pour des CMI limites.

Par la méthode de diffusion en gélose, la détection de cette résistance se fait en utilisant un disque de pénicilline G chargé à 6 ou 10 µg.

- Les souches sensibles à la pénicilline G ont un diamètre largement > 29 mm, et la zone d'inhibition présente une bordure floue faite de colonies s'amenuisant et devenant transparentes, réalisant une "zone fantôme".
- Les souches résistantes à la pénicilline G ont un diamètre variable (souvent < 25 mm).

La zone fantôme est remplacée par des colonies opaques de grande taille, réalisant une bordure nette, avec parfois des colonies "squatters" occupant la zone d'inhibition. Cet aspect est caractéristique de la présence d'une pénicillinase sans qu'aucun test additionnel ne soit nécessaire (Hisata *et al*, 2005)

La présence de pénicillinase pourrait être vérifiée par un test à la nitrocéfine (méthode enzymatique) en prenant les colonies induites par une pénicilline (colonies en bordure de disque). Les automates testent des concentrations critiques de pénicilline G. Certains incluent un test pénicillinase. Cependant, il existe des faux négatifs (particulièrement pour les staphylocoques à coagulase négative) et il est nécessaire de contrôler les résultats négatifs par un test à la nitrocéfine.

Le comité européen de l'EUCAST considère que dans les pays à forte prévalence de *S. aureus* producteurs de pénicillinase, il est possible de rapporter toutes les souches comme résistantes

à la pénicilline G, à l'ampicilline et l'amoxicilline du fait de la difficulté de détection et du risque de faux négatifs (Ito *et al*, 2004)

- **Interprétation de l'antibiogramme**

Si une résistance à la pénicilline G est détectée, les bêtalactamines suivantes seront inactives : pénicilline G, ampicilline, amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline. En revanche, l'association à des inhibiteurs de pénicillinase (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) restaure une sensibilité pour ces antibiotiques. Les céphalosporines et l'imipénème ne sont pas hydrolysés par la pénicillinase.

### **II.1. 2. Méricillino-résistance par modification de cible**

Cette résistance est due, chez *S. aureus* et chez les staphylocoques à coagulase négative, à la production d'une PLP additionnelle, la PLP2a, qui se surajoute aux PLP normales de *S. aureus*. En présence de bêtalactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes), les PLP sont inhibées, sauf la PLP2a. Cette protéine est codée par le gène d'expression inductible *mecA*. Ce gène est porté par un élément génétique mobile particulier, une cassette chromosomique appelée *SCCmec* insérée dans un locus spécifique.

L'expression de la résistance est variable en fonction des souches. Elle peut être homogène et dans ce cas, pour la souche considérée, la totalité de la population exprime la résistance à la méricilline (Trim *et al*, 2003).

Elle peut être hétérogène, et dans ce cas seule une fraction de la population bactérienne va exprimer la résistance. Le niveau d'hétérogénéité varie. Certaines souches sont très hétérogènes, avec seulement 1/106 bactéries exprimant la résistance. Cette résistance est donc très difficile à détecter alors que ces souches doivent impérativement être considérées comme résistantes. L'expression hétérogène de la résistance est aujourd'hui majoritaire chez les souches de *S. aureus* résistantes à la méricilline (SARM).

Le diagnostic de certitude de la méricillino-résistance repose sur la détection du gène *mecA*. Malheureusement, ce test ne peut être effectué pour l'instant facilement en routine.

L'expression d'une PLP2a peut aussi être recherchée à l'aide de tests au latex commercialisés (Chan *et al*, 2003).

Selon les recommandations du CA-SFM, la détection de la résistance nécessite l'emploi de conditions particulières. Il faut modifier les conditions du test en utilisant un fort inoculum et

un milieu Mueller-Hinton hypersalé incubé à 37 °C (ou un milieu Mueller-Hinton incubé à 30°C).

On peut aussi tester, dans les conditions standardisées de la méthode des disques, des bêtalactamines (céphamycines) pour lesquelles l'expression de la résistance est plus franche, la céfoxitine ou le moxalactam. En pratique, la simplicité et la meilleure sensibilité du test de la céfoxitine le font recommander (Felten *et al*, 2002)

Les critères d'interprétation (disque 30 µg) sont :

- $\geq 27$  mm : sensible à l'oxacilline.
- $< 25$  mm : résistant à l'oxacilline.

Un diamètre inférieur à 25 mm est bien corrélé avec la présence du gène *mecA*. Pour des diamètres de 25 ou 26 mm, le résultat est incertain. Il est alors nécessaire de rechercher la PLP2a par un test au latex (dans les conditions indiquées par le fournisseur) après induction (autour du disque de céfoxitine ou de moxalactam) ou le gène *mecA* par PCR. Certains automates proposent le test automatisé de la céfoxitine en sus du test de l'oxacilline.

- **Interprétation de l'antibiogramme**

Du fait du mécanisme de modification de cible, la résistance est croisée entre les différentes bêtalactamines : Il s'agit d'une résistance à la famille entière. Cependant, des céphalosporines en développement, ceftobiprole et ceftaroline, conservent une certaine activité *in vitro* contre les SARM. La démonstration clinique reste à faire.

### **II.1. 3. Résistance "borderline"**

Les souches BORSA (borderline oxacillin resistant *S. aureus*) montrent une activité diminuée de l'oxacilline (ou une résistance de bas niveau) non due à la présence du gène *mecA*. Elles ont une CMI de l'oxacilline égale à 2 mg/l (sensible mais limite). Cette diminution de sensibilité est liée à l'hyperproduction de la pénicillinase touchant l'oxacilline, sans que l'on puisse la classer résistante (Drugeon *et al*, 2006).

Des CMI "borderline" de l'oxacilline se voient aussi en cas de modification des PLP présentes normalement chez *S. aureus* (surtout la PLP4). Ces souches sont alors appelées MODSA (Drugeon, 2006). Ces résistances sont difficiles à détecter avec le disque d'oxacilline et les disques de céfoxitine ou de moxalactam. La signification clinique de cette diminution de sensibilité n'est pas connue.

## **III. Étude de la résistance aux aminosides**

Les aminosides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien (voir chapitre II). Ils exercent une activité bactéricide rapide qui justifie leur association aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi (oxacilline et vancomycine) pour le traitement des infections graves. La résistance acquise des staphylocoques aux aminosides est surtout due à la production d'enzymes inactivatrices (Conly *et al*, 1989).

Les enzymes sont divisées en trois classes selon la réaction catalysée :

- Aminosite N-acétyltransférase (AAC) : acétylation d'un groupement NH<sub>2</sub> ;
- Aminosite O-phosphotransférase (APH) : phosphorylation d'un groupement OH ;
- Aminosite nucléotidyltransférase (ANT) : nucléotidylation d'un groupement OH.

Chacune de ces classes peut être divisée en sous-classes en fonction de la position du carbone qui porte le groupement aminé ou hydroxyle modifié (chiffre arabe). Certaines enzymes d'une même sous-classe peuvent différer par leur profil de substrats, ce qui se traduit par plusieurs formes isozymiques (chiffre romain).

Chaque enzyme va modifier un certain nombre d'aminosides différents, ce qui va se traduire par un phénotype de résistance spécifique de l'enzyme. Chez les staphylocoques, trois enzymes sont connues (Bismuth, 2006) :

- L'APH(3')-III confère une résistance à haut niveau à la kanamycine et à la néomycine (phénotype K). Cette enzyme phosphoryle lentement l'amikacine, qui conserve une activité bactériostatique mais perd son activité bactéricide et la synergie avec l'oxacilline et la vancomycine ;
- L'ANT(4')(4'')-I confère une résistance à haut niveau à la kanamycine et à la tobramycine (phénotype KT).

L'amikacine est également substrat pour cette enzyme avec les mêmes conséquences que pour l'enzyme précédente. Certaines souches produisant à niveau modéré cette enzyme peuvent apparaître résistantes seulement à la tobramycine. Les CMI de la kanamycine sont en fait augmentées, mais insuffisamment pour catégoriser la souche comme résistante.

Il faut considérer ces souches comme ayant un phénotype KT APH(2'')- AAC(6') : cette enzyme qui possède deux fonctions confère une résistance à haut niveau à la kanamycine, à la tobramycine et à la gentamicine (phénotype KTG). L'activité enzymatique modifie fortement la kanamycine, la gentamicine, la tobramycine et modérément la nétilmicine et l'amikacine (à noter que la streptomycine n'est pas affectée par cette enzyme). Là encore, ces deux dernières molécules restent bactériostatiques mais leur activité bactéricide et la synergie avec les

inhibiteurs de synthèse de la paroi sont supprimées. En pratique, aucun des aminosides usuels n'est utilisable (Coello *et al*, 1994)

- **Détection et lecture interprétative**

En pratique, il suffit de tester les aminosides qui sont les meilleurs substrats pour les enzymes inactivatrices, la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine. Il n'est pas utile de tester l'amikacine et la nétilmicine qui risquent d'induire des réponses faussement sensibles. En cas de résistance à la kanamycine, l'amikacine est aussi considérée comme inactive du fait de la perte des synergies. En cas de résistance à la gentamicine, l'amikacine et la nétilmicine sont inactives. La résistance à la tobramycine répond pour elle-même.

**5.**

**IV. Etude de la résistance aux glycopeptides**

Deux glycopeptides sont commercialisés, la vancomycine et la teicoplanine. Ils agissent sur la synthèse du peptidoglycane. Ils utilisent une caractéristique des précurseurs du peptidoglycane qui est de comporter un acyl-D-alanyl-D-alanine à leur extrémité. Les glycopeptides se lient aux D-Ala-D-Ala terminaux des précurseurs à la surface de la bactérie avec une haute affinité, bloquant ainsi l'addition des précurseurs à la chaîne du peptidoglycane naissant et prévenant les étapes ultérieures de polymérisation. Ces molécules sont lentement bactéricides.

La découverte de souches de sensibilité diminuée est à l'origine de controverses toujours actuelles sur leur définition et les méthodes de détection.

**IV.1. Mécanismes et définitions de la résistance**

Différents termes et acronymes, VISA, GISA, hétéro-VISA, sont utilisés pour définir les souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides, et plus récemment VRSA pour les souches résistantes.

**IV.1.1. Souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides**

Ces souches ont une paroi épaissie résultant d'une réorganisation complexe du métabolisme du peptidoglycane liée probablement à des mutations dans de multiples gènes. Ces réorganisations pourraient empêcher l'accès de la vancomycine à sa cible. Une autre hypothèse non exclusive serait l'hyperproduction de précurseurs du peptidoglycane agissant comme autant de leurres pour les glycopeptides (Hiramatsu, 2001).

Les souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont isolées à des fréquences faibles dans le monde entier et se recrutent essentiellement parmi les SARM.

- **VISA et GISA**

Les termes de VISA (vancomycin intermediate *S. aureus*) et de GISA (glycopeptide intermediate *S. aureus*) regroupent des souches intermédiaires (CMI 8 mg/l) ou résistantes (CMI > 8 mg/l) à la teicoplanine et sensibles (CMI ≤ 4 mg/l) ou intermédiaires (CMI 8 mg/l) à la vancomycine. Le terme de GISA est préférable car il englobe l'ensemble des souches de sensibilité diminuée à l'un ou l'autre des glycopeptides.

- **Hétéro-VISA**

Ces souches de *S. aureus*, initialement isolées au Japon, sont sensibles à la vancomycine (CMI 2-4 mg/L) mais présentent des sous-populations intermédiaires à la vancomycine (CMI 6-8 mg/l). Les sous-populations sont présentes à des fréquences faibles, de l'ordre de 10<sup>-5</sup> à 10<sup>-7</sup>, et ne peuvent être mises en évidence à l'antibiogramme standard.

Ces souches sont, pour leur grande majorité, intermédiaires à la teicoplanine (CMI 8 mg/l), voire résistantes. La définition des souches hétéro-VISA souffre de l'absence d'une technique génétique servant de référence. De plus, leur signification clinique est discutée. Cependant, beaucoup considèrent que les souches hétéro-VISA constituent le réservoir des souches GISA, l'ensemble ne constituant qu'un continuum de souches de diverses sensibilités aux glycopeptides.

- **VRSA**

Plus récemment, de rares souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine et à la teicoplanine (CMI de la vancomycine > 16 mg/l) ayant acquis l'opéron de résistance à la vancomycine *vanA* sont rapportées aux États-Unis.

L'opéron *vanA*, porté par des plasmides, provient de souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides. Jusqu'à maintenant, les VRSA n'ont pas été isolés en Europe (Rao et Wong, 2003).

- **Détection**

La détection des souches qui ne présentent qu'un niveau modéré de résistance aux glycopeptides est importante.

En effet, l'utilisation de la vancomycine ou de la teicoplanine dans les cas d'infections dues aux souches catégorisées intermédiaires (ou à plus forte raison résistantes) au glycopeptide utilisé conduit fréquemment à des échecs. Un certain nombre de difficultés sont inhérentes à l'étude de l'activité *in vitro* des glycopeptides (Leclercq, 2006) :

- La méthode de diffusion en gélose convient mal pour les glycopeptides : ces grosses molécules diffusent médiocrement dans la gélose.
- Les méthodes rapides automatisées ne conviennent pas car l'expression de la résistance nécessite un temps prolongé d'incubation.
- L'effet inoculum important pour la teicoplanine peut amener à surestimer les résistances.

Les difficultés du test des glycopeptides contre les staphylocoques ont conduit à une démarche présentée dans les recommandations du CA-SFM. Une diminution de sensibilité aux glycopeptides peut être suspectée lorsque l'on utilise les méthodes de routine en prêtant attention à certains critères d'alerte ou par un criblage spécifique. Une fois la diminution de sensibilité suspectée, la catégorisation clinique (S/I/R) des souches se fait par détermination des CMI des glycopeptides dans les conditions standardisées.

Parfois, certains tests peuvent être nécessaires en complément.

- **Test des glycopeptides**

Malgré ses performances médiocres, la méthode de diffusion reste utilisée pour tester les glycopeptides. Après une incubation qui doit être de 24 h pleines, un certain nombre de critères doivent alerter sur la possibilité d'une sensibilité diminuée aux glycopeptides :

- Un diamètre < 17 mm pour la vancomycine ou la teicoplanine ;
- Un diamètre d'inhibition de la teicoplanine inférieur ou égal d'au moins 3 mm à celui de la vancomycine ;
- La présence de colonies dans la zone d'inhibition d'un glycopeptide.

Un résultat intermédiaire ou résistant pour la vancomycine ou la teicoplanine doit faire confirmer le résultat.

Les méthodes de routine pouvant être en défaut pour la détection des GISA et ne détectant pas les hétéro-VISA, certaines équipes utilisent une des méthodes suivantes de criblage :

- Le CA-SFM recommande l'utilisation d'une gélose de Mueller-Hinton supplémentée par 5 mg/l de teicoplanine, ensemencée avec 10 µl d'une suspension de turbidité McFarland 2,

incubée à 35-37°C pendant 24 et 48 heures. Le test est positif en cas de présence d'au moins 4 colonies. Cette méthode a l'avantage d'être très sensible, la teicoplanine étant le meilleur marqueur de la résistance, mais elle manque de spécificité.

- Par la méthode E-test® : il fautensemencer par écouvillonnage une gélose cœur-cerveau avec 200 µl d'une suspension lourde (turbidité McFarland 2). La lecture est faite à 24 h et confirmée à 48 h.

Si les concentrations inhibitrices de la vancomycine et de la teicoplanine sont supérieures ou égales à 8 mg/l (ne pas convertir un résultat de 6 mg/l en 8 mg/l) ou bien si la concentration inhibitrice de la teicoplanine seule est supérieure ou égale à 12 mg/l, La souche est vraisemblablement de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Ce test est un test de criblage qui ne permet pas de déterminer la CMI : celle-ci doit être réalisée dans les conditions standardisées. D'autres critères incitent également à vérifier d'emblée la sensibilité aux glycopeptides, au moins dans les infections sévères. Ainsi, une attention est requise envers les souches de SARM résistantes à la gentamicine et à la rifampicine. C'est en effet à ce groupe de souches qu'appartiennent la plupart des VISA/GISA isolés en France (Poutanen *et al*, 2005)

#### **IV.1.2. Confirmation de la résistance et catégorisation des souches**

- **Mesure des CMI**

La mesure de la CMI s'effectue par une méthode de référence ou par la technique E-test® en gélose Mueller-Hinton avec une suspension de turbidité équivalente à McFarland 0,5. Les lectures doivent être effectuées après 24 h pleines d'incubation et les réponses rendues selon les critères de catégorisation clinique.

- **Cas des hétéro-VISA**

Ces souches apparaissent sensibles à la vancomycine et l'hétéro-résistance à la vancomycine ne peut pas être mise en évidence par détermination de la CMI, par définition, puisque l'inoculum bactérien testé est d'environ 10<sup>4</sup> bactéries et que la fréquence de la sous-population intermédiaire à la vancomycine est inférieure à ce seuil.

Il faut suspecter un hétéro-VISA devant :

- Une CMI de la vancomycine égale à 4 mg/l avec la méthode E-test® ;

- Une réponse intermédiaire (CMI = 8 mg/l) pour la teicoplanine avec sensibilité à la vancomycine (CMI = 2 ou 4 mg/l) avec la méthode E-test® ;
- Une positivité à un des tests de criblage.

La technique de référence pour identifier un hétéro-VISA est l'analyse de population. Cette technique consiste à étaler différentes dilutions d'un inoculum fort de la souche sur des milieux gélosés contenant des concentrations croissantes de vancomycine. Les colonies ayant poussé sur ces milieux sont comptées après 48 h d'incubation et l'on calcule le pourcentage de bactéries qui poussent aux différentes concentrations.

Comme cette technique est difficilement réalisable en pratique, certains se contentent des méthodes de criblage utilisant la méthode E-test® ou le milieu Mueller-Hinton avec 5 mg/l de teicoplanine en remplacement, mais avec une spécificité et une sensibilité qui se situent un peu au delà de 80%. Ces méthodes peuvent être utilisées en routine d'emblée ou en seconde intention (Wootton *et al*, 2007).

## **V. Etude de la résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines**

Les macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS) appartiennent au même groupe du fait d'un mode d'action proche (inhibition de la synthèse protéique par fixation sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome bactérien) et d'une résistance fréquemment croisée entre ces antibiotiques. Cependant, ces antibiotiques sont à considérer classe par classe.

Les macrolides présentent une structure chimique commune constituée d'un macrocycle avec des fonctions lactones comprenant un ensemble de 14 (érythromycine, clarithromycine, roxithromycine), 15 (azithromycine) ou 16 atomes (josamycine, spiramycine).

Les lincosamides sont composés de la lincomycine et de la clindamycine.

Les streptogramines sont une association des deux composés, le composé A (pristinamycine IA ou dalfopriline) et le composé B (pristinamycine IIA ou quinupristine). Leur place dans l'arsenal thérapeutique anti-staphylococcique est d'autant plus importante qu'ils sont une alternative en cas d'allergie aux pénicillines. Contrairement aux streptogramines, les macrolides et les lincosamides ne sont pas bactéricides pour *S. aureus*.

### **V.1. Mécanismes de résistance**

- **Méthylation ribosomale (phénotype MLSB)**

Ce mécanisme de résistance est le plus fréquent (Leclercq, 2002). Il est lié à la modification du ribosome, due à la méthylation de l'adénine 2058 de l'ARN ribosomal 23S. Ce groupement méthyle empêche alors toute fixation de l'antibiotique sur sa cible. Cette base étant un site de fixation commun aux macrolides, lincosamides et streptogramines B, la résistance affectera ces trois groupes. Les gènes codant une méthylase sont nommés *erm* (erythromycin ribosome methylase). Chez *S. aureus*, les deux principaux gènes identifiés sont *erm(A)* et *erm(C)*.

L'expression des gènes *erm* peut être inductible ou constitutive. Dans le premier cas, la méthylase n'est synthétisée qu'en présence d'un inducteur. Seuls les macrolides à 14 et 15 atomes sont inducteurs et sont inactifs. En revanche, les macrolides à 16 atomes, les lincosamides et les streptogramines ne sont pas des inducteurs et restent donc actifs.

Ce mécanisme de résistance peut être identifié par diffusion en milieu gélosé. En effet, lorsqu'un disque d'érythromycine (inducteur) est placé à côté d'un disque de clindamycine, de lincomycine, de spiramycine ou de josamycine (non inducteurs), un aplatissement de la zone d'inhibition autour du disque contenant l'antibiotique non inducteur est observé en regard du disque d'érythromycine, formant une zone en forme de D.

Lorsque l'expression des gènes *erm* est constitutive, la méthylase est synthétisée en permanence. Les macrolides, lincosamides et streptogramines B ne sont donc pas actifs.

Cependant, la synergie entre les facteurs A et B des streptogramines est conservée, expliquant l'activité de la pristinamycine. Les CMI des souches d'expression constitutive ne sont augmentées que d'une dilution au maximum par rapport à celles des souches sensibles. En revanche, l'activité bactéricide précoce est supprimée.

- **Efflux (phénotype MSB)**

C'est le deuxième mécanisme de résistance aux macrolides, le plus important chez *S. aureus*. La présence d'une pompe ATP-dépendante codée par le gène plasmidique *msrA* va conférer une résistance par efflux aux macrolides à 14 et 15 atomes ainsi qu'aux streptogramines B (sans conséquence sur l'activité de la pristinamycine). La résistance isolée à l'érythromycine et l'absence de zone en forme de D entre un disque d'érythromycine et un disque de lincomycine permettent de reconnaître ce phénotype.

- **Inactivation des lincosamides (phénotype L)**

Ce phénotype est dû à l'acquisition du gène *lnu(A)*. La production d'une enzyme inactivant les lincosamides se traduit par une diminution franche de l'activité de la lincomycine, alors que la diminution de l'activité de la clindamycine reste modérée.

- **Phénotype LSA**

Le mécanisme de ce phénotype n'est pas complètement élucidé. Les souches résistantes aux lincosamides et aux streptogramines A possèdent parfois les gènes d'efflux du facteur A *vga(A)* et *vga(Ag)*. Les lincosamides (lincomycine et clindamycine) sont souvent catégorisés intermédiaires.

En revanche, la CMI de la streptogramine A est élevée. L'activité de l'association streptogramine A et streptogramine B est diminuée avec une augmentation modérée des CMI (catégorisation sensible ou intermédiaire).

- **Résistance à la pristinamycine (phénotype SAB)**

La résistance isolée à la pristinamycine peut se rencontrer. Elle est due à l'acquisition de gènes conférant la résistance au facteur A (gènes *vat* codant des acétylases ou *vga* codant une protéine de pompe à efflux) associés ou non à des gènes conférant la résistance au facteur B (gènes *vgb* codant des lyases). La résistance à la pristinamycine est souvent associée à la résistance MLSB constitutive.

- **Détection et lecture interprétative**

Le test de l'érythromycine, de la lincomycine et de la pristinamycine permet de reconnaître les phénotypes et d'interpréter les résultats. La distance entre les disques d'érythromycine et de lincomycine, habituellement égale à 24 mm de bord à bord, est généralement suffisante pour observer les interactions ; il peut être nécessaire de rapprocher davantage les disques.

## **VI. Résistance isolée à l'érythromycine**

S'il s'agit d'un phénotype MLSB inductible (zone en forme de D), des mutants constitutifs peuvent être sélectionnés en présence de macrolide ou de lincosamide non inducteur à partir de souches inductibles à la fréquence de  $10^{-7}$

Des cas cliniques d'échec par mutation sont rapportés. Bien que son importance ne soit pas connue, ce risque devrait être signalé au clinicien. Les macrolides à 16 atomes, les lincosamides et la streptogramine B sont actifs mais risquent de sélectionner des mutants résistants. S'il s'agit d'un phénotype d'efflux, il n'y a pas lieu de réinterpréter la sensibilité

aux macrolides à 16 atomes, aux lincosamides et aux streptogramines. Les méthodes automatisées en milieu liquide ne permettent pas encore de distinguer ce phénotype du précédent.

- **Résistance à l'érythromycine et à la lincomycine (phénotype MLSB constitutif)**

Seule la pristinamycine est active mais la modification de l'activité bactéricide fait discuter son utilisation. Lors d'une infection sévère, comme par exemple une infection osseuse, la prudence s'impose dans l'utilisation de cette molécule et il faut s'en référer aux recommandations de bonne pratique. Les méthodes automatisées détectent bien ce phénotype.

- **Résistance isolée à la lincomycine**

Il semble nécessaire de modifier le résultat sensible en intermédiaire pour la clindamycine. Cette résistance n'affecte pas les autres antibiotiques du groupe MLS.

7.

## **VII. Etude de la résistance aux quinolones**

Les quinolones ont pour cible des enzymes essentielles à la survie bactérienne, les topoisomérases de type II incluant la gyrase (composée de deux sous unités, GyrA et GyrB) et la topoisomérase IV (composée de deux sous unités, ParC et ParE) (Hooper, 2002).

Ces enzymes sont responsables du surenroulement de la molécule d'ADN (gyrase), nécessaire à son stockage sous forme compacte ou, inversement, au désenchevêtrement s'opérant lors de la traduction en ARNm (topoisomérase IV).

La liaison des quinolones à leurs cibles entraîne l'arrêt de la réplication et de la transcription de l'ADN bactérien. Les fluoroquinolones sont rapidement bactéricides.

*S. aureus* est naturellement résistant aux quinolones de première génération (acide nalidixique, acide oxolinique et fluméquine), mais sensible aux fluoroquinolones systémiques (ciprofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine, ofloxacine et péfloxacine) ou urinaire (norfloxacine).

### **VII.1. Mécanismes de résistance**

- **Modification de cible**

Le principal mécanisme de résistance est dû à l'apparition de mutations ponctuelles dans la ou les cibles des quinolones (gyrase et topoisomérase IV) (Hooper, 2002). Ces mutations siègent le plus souvent dans une courte région conservée appelée QRDR (quinolone resistance determining region).

Les quinolones n'arrivent alors plus à se fixer à leurs cibles. Chez *S. aureus*, une première mutation sur une cible (en général ParC) va conférer un niveau de résistance de bas niveau. Dans un deuxième temps, une deuxième mutation sur la deuxième cible (ParC, ParE ou GyrA) va conférer une résistance de haut niveau. Les souches de haut niveau auront alors une résistance croisée à la péfloxacin, à la ciprofloxacine, à la lévofloxacine et à la moxifloxacine.

- **Efflux**

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

- **Détection et lecture interprétative**

Il suffit de tester une fluoroquinolone, de préférence parmi les moins actives (péfloxacin, ofloxacine ou norfloxacine). La réponse vaut pour l'ensemble de la classe.

### **VIII. Etude de la résistance aux sulfamides et triméthoprime**

Les acides foliques sont impliqués dans la synthèse des acides nucléiques. En raison de leur activité anti-folique, les sulfamides et le triméthoprime interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques et des protéines. L'association de ces deux molécules est synergique. Cette synergie est maintenue en cas de résistance isolée aux sulfamides, mais pas en cas de résistance isolée au triméthoprime.

Chez *S. aureus*, la résistance aux sulfamides est fréquente (30 à 50% des souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline et 80 à 95% des SARM), souvent par modification de la cible. La résistance au triméthoprime est elle aussi due à une modification de la cible.

### **IX. Acide fusidique**

L'acide fusidique, représentant unique de sa famille, inhibe la synthèse protéique en interférant avec une GTPase, facteur d'élongation G (EF-G), empêchant la progression de la chaîne polypeptidique au niveau du ribosome. Il existe deux mécanismes de résistance à cet antibiotique chez *S. aureus* : mutation dans le gène *fusA* codant le facteur d'élongation G ou diminution de la perméabilité. Les mutants pour le premier type de résistance sont obtenus à une fréquence élevée, de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-8}$ .

### **X. Rifampicine**

La rifampicine inhibe l'ARN polymérase, bloquant ainsi la transcription. Elle est bactéricide. Des mutations au sein du gène *rpoB* codant la chaîne bêta de l'ARN polymérase sont responsables du phénotype de résistance à cet antibiotique.

La plupart des souches présentent un haut niveau de résistance (CMI > 32 mg/l), d'autres sont catégorisées intermédiaires (CMI = 1 mg/l). Ces deux types présentent des mutations différentes.

### **XI. Oxazolidinones**

Le linézolide est le seul représentant de cette famille. C'est un inhibiteur de la synthèse protéique. Il interagit au niveau de la sous-unité 50S du ribosome et bloque une étape précoce de la synthèse protéique. C'est un antibiotique bactériostatique très actif sur *S. aureus*, incluant les SARM (Dutronc *et al.*, 2005). La détection de la résistance s'effectue selon les méthodes standardisées. Parfois, les méthodes de diffusion peuvent surestimer la résistance. Les résultats intermédiaires ou résistants doivent être vérifiés par la détermination de la CMI (méthode de référence ou E-test®). Il existe de rares souches de *S. aureus* résistantes au linézolide.

### **XII. Lipopeptide**

La daptomycine est le seul représentant de cette famille. Le mécanisme d'action de cet antibiotique n'est pas encore complètement élucidé. Son insertion dans la membrane cytoplasmique (mécanisme calcium dépendant) crée une dépolarisation de la membrane et une fuite d'ions potassium. La bactérie arrête alors toute synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines. C'est un antibiotique bactéricide. Cependant, des mutants résistants sont isolés *in vivo*. Les CMI de la daptomycine augmentent parallèlement à celles de la vancomycine (Cui *et al.*, 2006). En effet, l'épaississement de la paroi observé chez les VISA gênerait l'accès de la daptomycine à la membrane cytoplasmique.

### **XIII. Glycylcycline**

La tigécycline est le seul représentant de cette sous-classe dérivée des tétracyclines. Cet antibiotique à spectre large est actif contre les souches de staphylocoques hébergeant les classiques mécanismes de résistance aux tétracyclines par protection du ribosome ou efflux actif. Les souches de staphylocoques résistantes sont exceptionnelles (Rodloff *et al.*, 2008).

#### **XIV. Les phénotypes associés de résistance (co-résistance)**

Dans la co-résistance, plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun confère (par résistance croisée) la résistance à une classe d'antibiotiques, ce qui entraîne *in fine* un large phénotype résistant de la bactérie hôte. Là encore, la conséquence de cette organisation génétique est la co-sélection. Dans ce cas, une classe d'antibiotiques à laquelle la bactérie est résistante pourra sélectionner la résistance à des classes d'antibiotiques non reliées.

Les phénotypes associés de résistance se voient surtout chez les SARM. La résistance à la méticilline chez *S. aureus* est longtemps restée strictement hospitalière, résultant de la diffusion mondiale de 5 principaux clones. Pour ces clones, il existe une résistance associée à de multiples antibiotiques (fluoroquinolones, macrolides, aminosides...).

Les combinaisons de résistance ont beaucoup varié dans le passé. Actuellement, la résistance à la méticilline est associée dans environ 90% des cas à la résistance aux fluoroquinolones et au phénotype de résistance aux aminosides KT. La résistance MLSB constitutive est présente chez plus de 50% des souches. La fréquence de la résistance à la gentamicine, à la rifampicine, à la fosfomycine ou à l'acide fusidique est proche de 10% (Onerba., 2008).

Par ailleurs, depuis quelques années, on observe l'apparition de souches communautaires de SARM : CA-MRSA (communities-acquire MRSA). Elles sont rares en France bien qu'en fréquence croissante. Ces staphylocoques sont surtout isolés chez l'enfant ou bien au sein de certaines collectivités (équipes de sport collectif, prisonniers). Dans presque tous les cas, ils possèdent les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine qui leur confère un pouvoir pathogène particulier. Ces souches sont responsables d'infections sévères de la peau et des tissus mous. Les SARM communautaires sont résistants, outre à la méticilline, à la kanamycine, à l'acide fusidique (intermédiaire) et souvent aux tétracyclines (Vandenesch *et al*, 2007). Ce profil typique doit faire suspecter l'origine communautaire du staphylocoque étudié.

#### **XV. Conclusion**

Il existe une multiplicité de mécanismes biochimiques et de systèmes génétiques permettant aux *S. aureus* d'échapper à l'activité des antibiotiques. Cette diversité, combinée à l'utilisation extensive et fréquemment abusive des antibiotiques, rend compte de l'évolution vers la résistance observée, principalement, au cours des dernières décennies. Cependant, l'étude de cette résistance a permis d'intéressantes découvertes, tant au niveau de

l'organisation de l'information génétique des procaryotes (transposons, conjugatifs, intégrons) que du contrôle de son expression (Depardieu *et al.* 2007).

L'antibiogramme de *S. aureus* présente quelques difficultés maintenant bien connues pour la détection des résistances. L'interprétation est facilitée par l'existence de règles interprétatives. Malgré cela, certains antibiotiques comme les glycopeptides nécessitent une attention particulière car certaines souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée sont difficiles à détecter.

# *Partie expérimentale*

*Partie expérimentale*

*Chapitre I : Isolement et identification  
de S. aureus*

## **I. Objectifs**

La sélection de bactéries résistantes dans la flore commensale des animaux peut avoir un impact en termes de santé publique lorsque ces bactéries sont transmises à l'homme.

Le développement de nouvelles molécules pour contrecarrer les mécanismes de résistance est toujours suivi de l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance.

Dans ce contexte, il serait judicieux de développer une stratégie qui permette de limiter l'excrétion et la dissémination de bactéries résistantes d'origine animale lors d'administration des antibiotiques, afin de préserver l'efficacité des molécules existantes.

Les objectifs de notre travail sont :

- Isoler des souches de *S. aureus* chez la dinde et le poulet de chair sains,
- Identifier les souches isolées,
- Etudier l'antibiorésistance des souches de *S. aureus*,
- Recherche des MRSA,
- Evaluer le taux de portage des MRSA chez le poulet de chair et la dinde,
- Etudier le risque de transmission à l'homme.

## **II. Conduite de l'étude**

Dans la première partie de cette étude, 1.000 prélèvements (poumons et écouvillons des muqueuses nasales), provenant de sujets sains, sont analysés. Les prélèvements sont effectués à différentes périodes d'élevage.

L'isolement et l'identification des souches de *S. aureus* sont fondés sur la méthode conventionnelle standardisée depuis 1999 à l'échelle nationale en Médecine Vétérinaire.

Dans une deuxième partie, la résistance à la méthicilline de ces souches est étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton (notamment la mesure du diamètre d'inhibition de la céfoxitine 30 µg) accompagné d'un dépistage à l'oxacilline (6 µg/ml). Nous étudions également la résistance de ces souches à diverses familles d'antibiotiques.

## **Première partie : Isolement et identification des souches de *S. aureus***

### **I. Matériels**

#### **I.1. Échantillonnage**

Les prélèvements de poumon et les écouvillons nasaux sont réalisés sur des poulets et des dindes de chair ne présentant aucun signe de maladie.

Les prélèvements sont effectués dans différents établissements avicoles : abattoirs et bâtiments d'élevage (situés à Alger, Boumerdes et Tizi Ouzou) (tableau 4).

Le port de gants pour toutes les manipulations est nécessaire pour éviter la transmission de germes des mains aux prélèvements.

Les échantillons sont étiquetés soigneusement et transportés dans une glacière pour les analyses bactériologiques le jour même au laboratoire vétérinaire de Draa ben khedda service de microbiologie médical.

Tableau 4 : Représentation des échantillons par région

Région	Poulet de chair	
	Poumon	Ecouvillon nasal
Alger	120	50
Boumerdes	200	50
Tizi Ouzou	130	50
Région	Dinde de chair	
	Poumon	Ecouvillon nasal
Alger	100	50
Boumerdes	100	50
Tizi Ouzou	50	50

#### **I.2. Milieux de culture, tampons et réactifs**

Les milieux de culture et les solutions utilisés sont présentés en annexe.

#### **I.3. Matériels de laboratoire**

Matériels usuel du laboratoire de microbiologie.

## II. Méthode

La méthode directe est adoptée pour isoler les staphylocoques. L'identification biochimique est réalisée pour confirmer le résultat.

### II.1. Isolement

Pour l'isolement des staphylocoques dans les poumons, la méthode comporte deux étapes : pré-enrichissement et isolement (figure 11).

#### II.1.1. Pré-enrichissement :

C'est une phase non sélective utilisant un milieu riche dans lequel l'échantillon est dilué au 1/10. Après cautérisation de la surface du poumon, 25 g sont immergés dans un flacon contenant 225 ml de bouillon Chapman préalablement ramené à la température du laboratoire, broyés dans un stomacher et incubés pendant 16 à 30 mm à 37°C dans un récipient fermé.

#### II.1.2 Isolement

Après incubation, le contenu est homogénéisé et 0,1 ml de la suspension est ensemencé sur milieu Chapman. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures.

Les écouvillons nasaux sont ensemencés directement sur milieu Chapman.

Ce milieu contient une concentration en sel de 7,5%, ce qui inhibe la croissance de la majorité des bactéries autres que les staphylocoques. Le milieu Chapman contient du rouge de phénol et du mannitol. Si le staphylocoque fermente le mannitol, le changement de pH provoquera un jaunissement du milieu. Cette information aidera à l'identification de l'espèce en cause (*Staphylococcus aureus*).

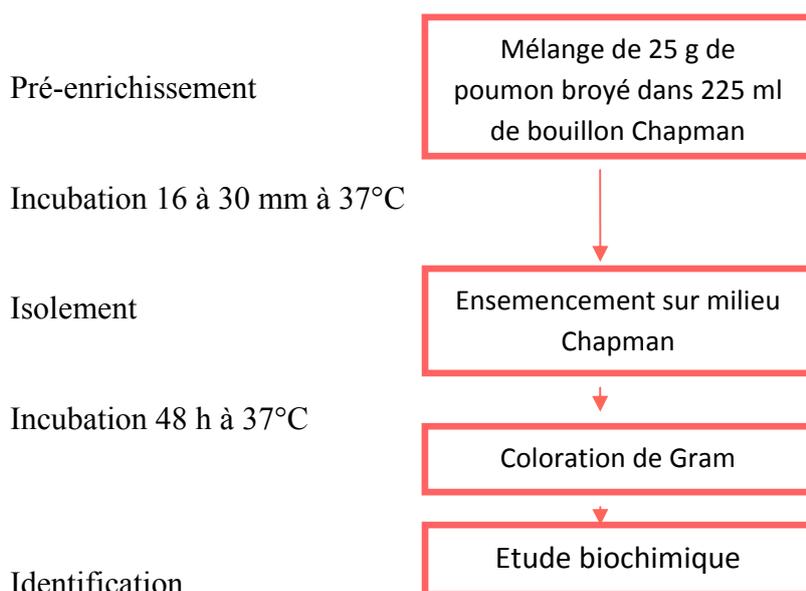


Figure11 : Etapes d'isolement des staphylocoques

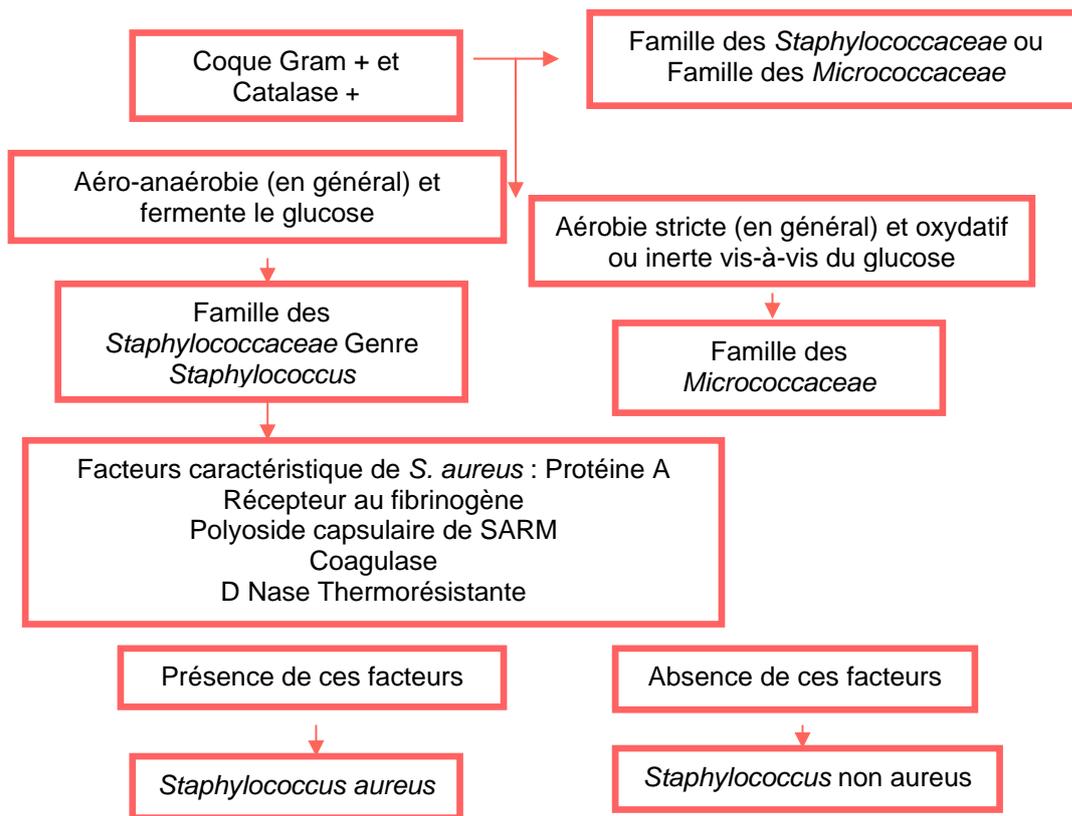


Figure 12 : Etapes d'identification de l'espèce *S. aureus*.

## II.2. Identification (figure11)

### II.2.1. Examen bactériologique

- **Etude macroscopique**

Les colonies de *S. aureus* sont lisses, opaques, convexes et présentent un bord net. Une coloration jaune à jaune orangé sur milieu Chapman.

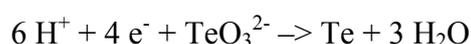
- **Etude microscopique**

Consiste en l'observation microscopique des cellules bactériennes après coloration différentielle de Gram.

- **Purification**

Pour l'étude biochimique, au minimum 2 à 3 colonies caractéristiques sont repiquées sur milieu de Baird Parker puis incubées à 37°C pendant 48 heures.

Le milieu de Baird Parker (milieu au tellurite-lithium et au jaune d'œuf) est un milieu riche qui permet la mise en évidence classiquement de la lécithinase et de la lipoprotéinase. Les colonies peuvent de plus devenir noires par réduction du tellurite de potassium en tellure noir :



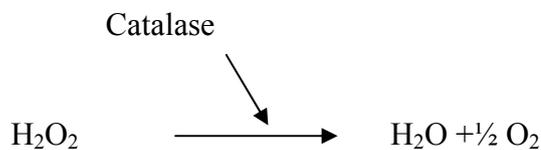
*Staphylococcus aureus* est lécithinase +, lipoprotéinase + et réduit le tellurite en tellure.

### II.3. Etude biochimique

Les tests biochimiques reposent sur la recherche d'enzymes responsables de certaines réactions biochimiques, l'utilisation d'un substrat particulier ainsi que les produits intermédiaires issus du métabolisme bactérien.

#### II.3.1. Recherche de la catalase

La catalase décompose l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau (H<sub>2</sub>O) et en oxygène, selon la réaction suivante :



- **Principe**

Démontrer la présence de l'enzyme catalase.

- **Technique**

- A l'aide d'une anse de platine, transférer, à partir de la gélose, une partie d'une colonie si les colonies sont moyennes et plus d'une colonie si les colonies sont petites , sur une lame de verre propre.

- Ajouter une goutte de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) sur la colonie placée sur la lame.

- **Interprétation**

Réaction positive : effervescence (bulles de gaz) immédiate dans le peroxyde.

Réaction négative : absence d'effervescence dans le peroxyde.

#### II.3.2. Recherche de la coagulase

- **Principe**

Ce test sert à déterminer si la bactérie est capable de coaguler le plasma par l'action de la coagulase.

- **Technique**

##### 1. En tube

- Dans un tube contenant 0,5 ml de plasma de lapin dilué, faire une suspension de la culture bactérienne en prenant, à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies sur la gélose au sang.

- Incuber à 37°C. La réaction se produit en 3 à 4 heures.

Réaction positive : plasma coagulé.

Réaction négative : plasma liquide.

### **2. Sur lame**

- Sur une lame propre, mettre une goutte d'eau distillée.
- Suspender un fort inoculum du micro-organisme à identifier (1 colonie d'une culture pure de 18-24 heures) dans la goutte d'eau ou de saline (vérifier l'auto-agglutination).
- Si non auto-agglutiné, mélanger le tout avec une anse de plasma de lapin.

Réaction positive : formation d'un précipité blanc (5 à 20 secondes)

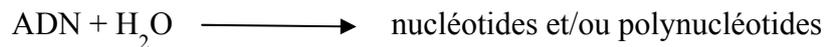
Réaction négative : aucune coagulation (précipité) entre 3 et 4 minutes.

Tout test de coagulase sur lame négatif doit être confirmé par un test de coagulase en tube.

### **II.3.3. Recherche d'une DNase ou d'une DNase thermorésistante**

#### **• Principe**

La gélose à l'acide désoxyribonucléique (ADN) est un milieu solide qui permet la recherche de la désoxyribonucléase ou DNase qui reste active après un chauffage de 15 minutes à 100°C. Comme toutes les DNases, celle-ci catalyse l'hydrolyse de l'ADN selon la réaction :



Seul *Staphylococcus aureus* possède cette thermonucléase.

### **II.3.4. Etude du caractère hémolytique**

La recherche du type d'hémolyse se fait sur une gélose enrichie au sang de mouton.

- Si les globules rouges sont entièrement dégradés, on observe un halo clair autour des colonies, la bactérie est dite  $\beta$ -hémolytique.
- Si les globules rouges sont entourés d'un halo verdâtre, les globules rouges sont partiellement dégradés, la bactérie est dite  $\alpha$ -hémolytique.
- S'il n'y a pas formation de halo autour des colonies, les globules rouges ne sont pas dégradés et la bactérie est non hémolytique.

### **II.3.5. Recherche des protéines de surface**

#### **II.3.5.1. Recherche d'un récepteur du fibrinogène**

##### **Principe**

La majorité des souches de *S. aureus* (98%) possède au niveau de leur paroi des récepteurs capables de se lier au fibrinogène. La mise en évidence de ces récepteurs spécifiques

s'effectue grâce à une réaction d'agglutination sur lame. Des particules porteuses de fibrinogène (particules sensibilisées) sont agglutinées en présence de *S. aureus*

### **II.3.5.2. Recherche de la protéine A**

La protéine A est une protéine de surface retrouvée chez 90% des souches de *S. aureus*. Elle présente une grande affinité pour les IgG (anticorps). Sa mise en évidence est basée sur une réaction d'agglutination sur lame entre des particules sensibilisées (porteuses d'IgG) et *S. aureus*.



Figure 13 : Slidex Staph-Plus, bio Mérieux (réf. 73115 et 73 116).

Pour la recherche de ces facteurs agglutinants : les réactifs commercialisés sont à base de particules de latex sensibilisées principalement par du fibrinogène associé à d'autres constituants, protéine A, antigènes capsulaires ou des antigènes de surface spécifiques de *S. aureus*. Le kit utilisé est Slidex Staph, bio Mérieux (réf. 73112) ou Slidex Staph-Plus, bio Mérieux (réf. 73115 et 73 116).

### III. Résultats

#### III.1. Observation au microscope

Aspect caractéristique des staphylocoques : bactéries Gram +, regroupées en grappes de raisin.

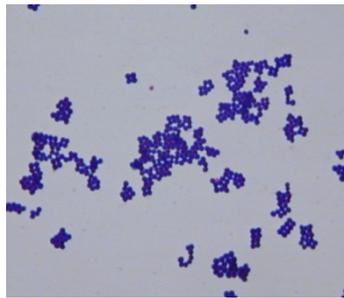
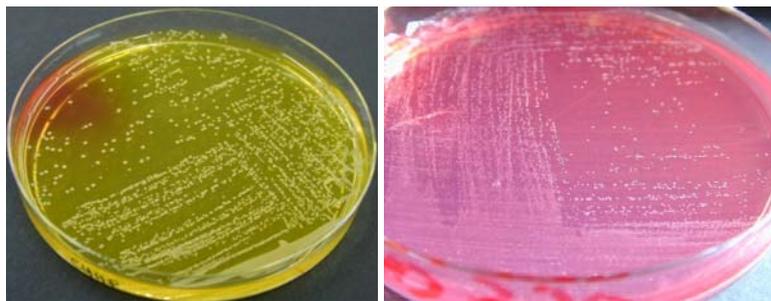


Figure 14 : staphylocoques en grappe de raisin coloration de Gram

#### III.2. Lecture après 24 heures sur milieu Chapman

Les colonies observées après 24 heures d'incubation sur milieu Chapman sont lisses, opaques, convexes et présentent un bord net. La pigmentation est jaune à jaune orangé (figure 15: boîte1).

La bactérie fermente le mannitol : virage du milieu au jaune.



Boîte 1

Boîte 2

Figure 15 : staphylocoques ensemencés sur milieu Chapman après 24 heures

On peut observer sur Baird Parker les caractères suivants :

- Recherche de la lipoprotéinase : on observe un halo transparent autour des colonies : lipoprotéinase +.
- Recherche de la lécithinase : on observe un halo trouble sous les colonies : lécithinase +.

- Recherche de la réduction du tellurite en tellure : coloration noire de la colonie : tellurite +.



Figure 16 : Aspect de *S. aureus* sur Baird Parker

Colonie tellurite +, lecithinase +, lipoprotéinase +

Etude du caractère hemolytique : colonie entourée d'un halo verdâtre, les globules rouges sont dégradés. Les souches étudiées sont  $\alpha$  hémolytiques.



Figure 17 : *S. aureus* Hémolysine +

### III.3. Résultats de la recherche de la DNase

Une réaction positive est déterminée par l'apparition d'une teinte autour des colonies. Ceci révèle la libération des polynucléotides résultant de l'hydrolyse de l'ADN du milieu (le témoin est négatif).



Figure 18 : *S. aureus* DNase+

### III.4. Résultats de la recherche de la Catalase

La réaction catalase + est déterminée par l'effervescence immédiate dans le peroxyde : les bactéries sont dite catalase +



Figure 19 : *S. aureus* Catalase +

### III.5. Résultats de la recherche de la coagulase :

Réaction positive observée par coagulation de plasma de lapin dans les 4 à 16 h qui suivent.



Figure 20 : *S. aureus* coagulase +

*S. aureus* présente une stabilité génétique limitée. On peut voir en macroscopie, dans un isolement réalisé à partir d'une colonie, les tailles variées des colonies ainsi que les variations de pigmentation à un taux de 90%.



Figure 21 : hétérogénéité des *S. aureus* (même souche)

### III.6. Résultats des prélèvements effectués chez le poulet de chair

Tableau 5 : Résultats des prélèvements effectués chez le poulet de chair

Région	Résultats de portage de <i>S. aureus</i> au niveau du poumon			
	Nb de prélèvements	<i>S. aureus</i> %	<i>Staph non aureus</i> %	
Alger	120	118 98,33	2	1,67
Boumerdes	200	195 97,5	5	2,5
Blida	130	125 96,15	5	3,85
Total prélèvements par organe (poumon)	450	438 97,33	12	2,67
	Résultats de portage de <i>S. aureus</i> par écouvillon nasal			
	Nb de prélèvement	<i>S. aureus</i> %	<i>Staph non aureus</i> %	
Alger	50	48 96	2	4
Boumerdes	50	47 94	3	6
Blida	50	47 94	3	6
Total prélèvements par organe (Ecouvillon nasal)	150	142 94	8	5,3
<b>Total</b>	600	580 96,67	20	3,33

### III.7. Résultats des prélèvements effectués chez le poulet de chair par organe

#### III.7.1. Résultats de portage de *S. aureus* au niveau du poumon

Sur un total de 450 prélèvements étudiés, 438 prélèvements sont positifs, ce qui représente un taux de 97,33%. 12 prélèvements seulement sont négatifs, soit un taux de 2,66%.

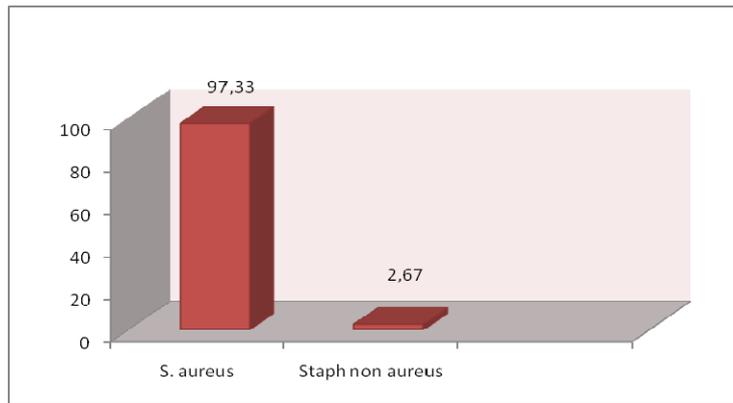


Figure 22 : portage de *S. aureus* au niveau du poumon

### III.7. 2. Résultats de portage de *S. aureus* par écouvillon nasal

Sur un total de 150 écouvillons nasals, 142 prélèvements sont positifs, ce qui représente un taux de 94,67%, et 8 prélèvements sont négatifs (5,33%).

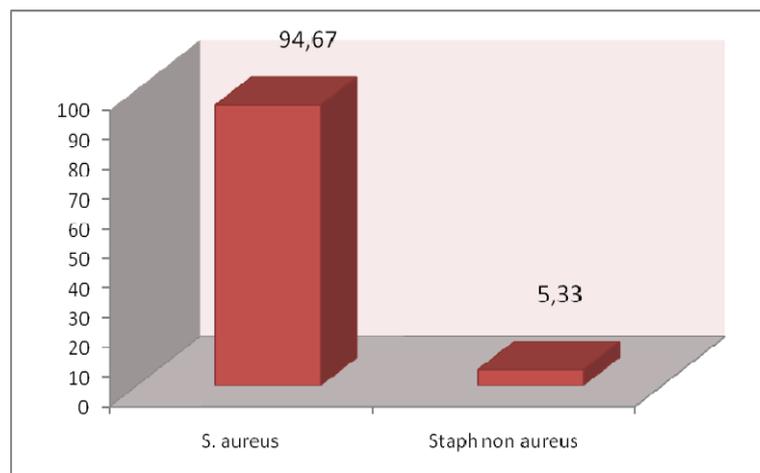


Figure 23: portage de *S. aureus* par écouvillon nasal

Chez le poulet de chair, sur un total de 600 prélèvements, 20 sont négatifs, soit un taux de 3,33% des prélèvements. 580 prélèvements sont positifs, soit un taux de 96,67%

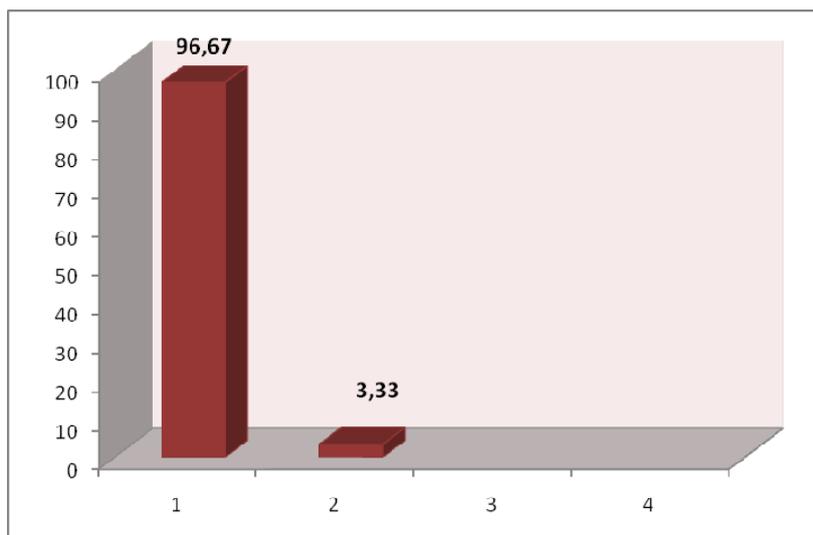


Figure 24: portage de *S. aureus* chez le poulet de chair

### III.8. Résultats des prélèvements effectués Chez la dinde de chair

Tableau 6 : Résultats des prélèvements effectués chez la dinde de chair

<b>Région</b>	Résultats de portage de <i>S. aureus</i> au niveau du poumon			
	Nb de prélèvements	<i>S. aureus</i> %		<i>Staph non aureus</i> %
Alger	100	82	82	18 18
Boumerdes	100	91	91	9 9
Blida	50	47	94	3 6
Total prélèvements par organe (poumon)	250	220	88	30 12
	Résultats de portage de <i>S. aureus</i> par écouvillon nasal			
	Nb de prélèvements	<i>S. aureus</i> %		<i>Staph non aureus</i> %
Alger	50	45	90	5 10
Boumerdes	50	43	86	7 14
Blida	50	46	92	4 8
Total prélèvements par organe (Ecouvillon nasal)	150	134	89,33	16 10,67
<b>Total</b>	400	354	88,5	46 11,5

### **III.8. 1. Résultats de portage de s. aureus au niveau du poumon**

Sur un total de 250 prélèvements étudiés, 220 prélèvements étaient positifs ce qui représente un taux de 88%. 30 prélèvements étaient négatifs soit un taux de 12%.

### **III.8. 2. Résultats de portage de s. aureus par écouvillon nasal**

Sur 150 écouvillons nasals, 134 prélèvements étaient positifs ce qui représente un taux de 89,33%. 16 prélèvements étaient négatifs avec un taux de 10,67%.

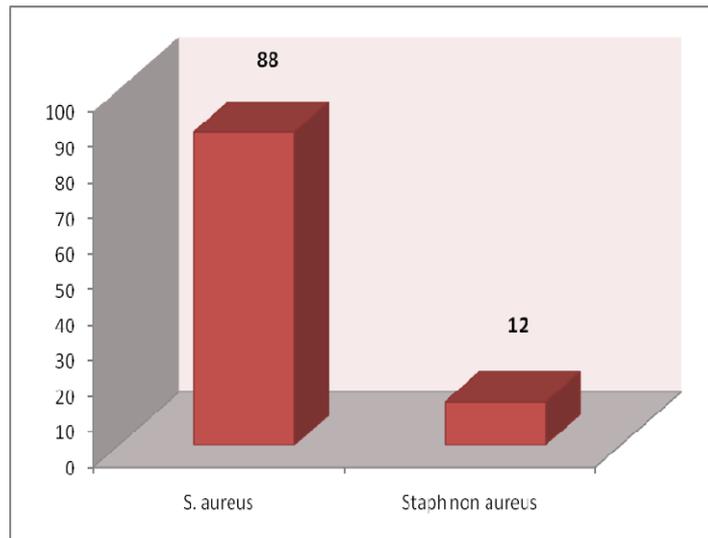


Figure 26 : portage de S. aureus au niveau du poumon

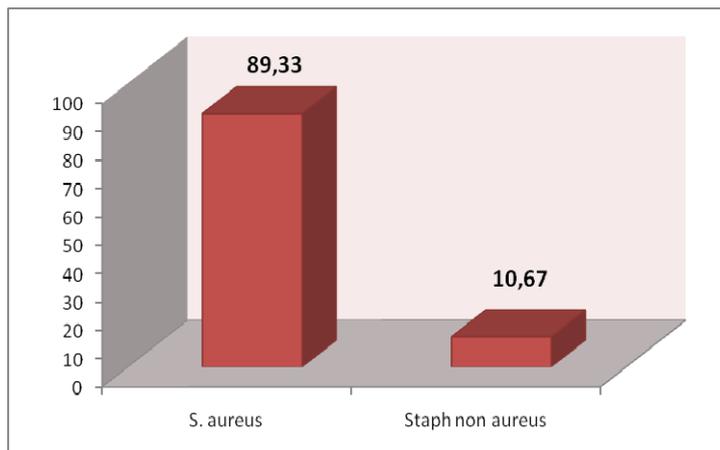


Figure 27: portage de S. aureus par écouvillon nasal

### **III.8. 4. Résultats de portage de *S. aureus* sur tous les prélèvements**

Chez la dinde de chair, sur les 400 prélèvements, 46 était négatifs soit un taux de 11,5% de prélèvements négatifs. 354 prélèvements était positifs soit un taux de 88,5%

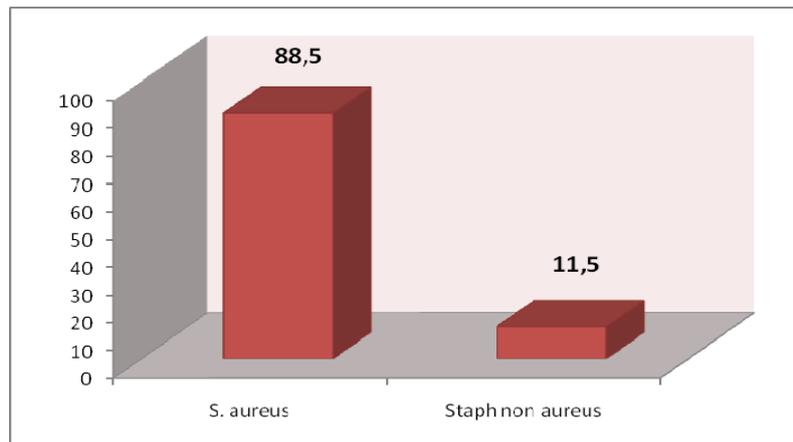


Figure 28: Représentation des résultats de portage de *S. aureus* chez la dinde de chair

*Partie expérimentale*

*Chapitre II : Etude de l'antibiorésistance  
de S. aureus et  
recherche des MRSA*

## PREMIERE PARTIE : Etude de l'antibiorésistance

### I. Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)

L'antibiogramme permet de mettre en évidence *in vitro* la sensibilité des germes vis-à-vis des antibiotiques dans des conditions particulières, qui ne correspondent toutefois pas toujours aux conditions physicochimiques retrouvées au niveau du foyer infectieux (Eberlin *et al*, 1994). Nous avons adopté la méthode recommandée par l'OMS en suivant les critères définis et standardisée depuis 1999 à l'échelle nationale en médecine vétérinaire.

#### I.1. Principe

Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu de culture préalablement ensemencé avec une dilution calibrée de la bactérie à tester. Un gradient de concentration s'établit dans la gélose et après 18 heures d'incubation à 37°C, la croissance de la bactérie dessine des halos d'inhibition autour des disques d'antibiotiques. 12 antibiotiques appartenant à 10 familles distinctes sont utilisés.

#### I.2. Matériels

- **Milieus**

- Gélose Mueller Hinton (MH) coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.
- Les solutions utilisées sont présentés en annexe

- **Matériels de laboratoire**

Matériel usuel du laboratoire de microbiologie.

#### I.3. Méthode

- **Inoculum**

A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

L'anse est déchargée dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

La suspension bactérienne bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

L'ensemencement est fait dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

- **Ensemencement**

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en le pressant fermement (en tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. L'ensemencement se fait en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. A la fin l'ensemencement, l'écouvillon est passé sur la périphérie de la gélose.

- **Application des disques d'antibiotiques**

Les antibiotiques utilisés sont répartis en deux boîtes pour chaque souche étudiée, à raison de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques sont espacés de 24 mm, centre à centre. Après application, chaque disque d'antibiotique est pressé à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.

- **Incubation :**

- 18 h à 35°C.
- La durée d'incubation peut être prolongée dans certains cas : oxacilline, glycopeptides et macrolides.

- **Lecture :**

La lecture de l'atibiogramme se fait comme suit :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture jointe.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

Tableau 7 : Liste des antibiotiques testés

Antibiotiques testés	Charge des disques
<b><u>β-Lactamines</u></b>	
Amoxiciline + ac. clavulanique	20/10 µg
Pénicilline	10 µg
Oxacilline	1 µg
Cefoxitine	30 µg

Cephalothine	30 µg
Ceftazidime	
Cefazoline	
<b><u>Aminosides</u></b>	
Néomycine	30 µg
Gentamycine	10 µg
<b><u>Macrolides</u></b>	
Erythromycine	10 µg
<b><u>Glycopeptides</u></b>	
Vancomycine	30 µg
<b><u>Quinolones</u></b>	
Enrofloxacin	5 µg
<b><u>Tétracyclines</u></b>	
Tétracycline	30 µg
<b><u>Sulfamides</u></b>	
Triméthoprime/ sulfaméthoxazole	1.25/23.75 µg

#### I.4. Contrôle de qualité

La souche de contrôle ATCC 25923 est testée dans les mêmes conditions.

#### DEUXIEME PARTIE : Recherche des MRSA

Pour la recherche des MRSA, les étapes suivantes sont menées :

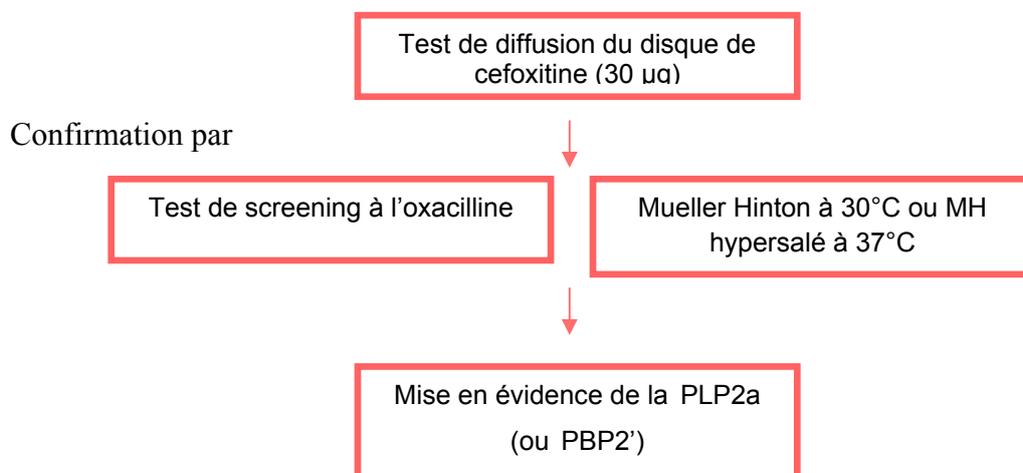


Figure 29: recherche des MRSA

## II.1. Recherche de la résistance à l'oxacilline

### II.1.1. Test de diffusion du disque de cefoxitine (30 µg)

- **Technique**

La résistance des staphylocoques aux isoxazolyl-pénicillines (oxacilline) est recherchée à l'aide d'un disque de cefoxitine (30 µg) dans les conditions standards.

- **Lecture**

La lecture du diamètre d'inhibition doit se faire à l'aide d'un pied à coulisse.

- Si le diamètre de la cefoxitine est  $\leq 19$  mm, la souche est dite résistante à l'oxacilline.
- Si le diamètre de la cefoxitine est  $\geq 20$  mm, la souche est dite sensible à l'oxacilline.

Devant tout problème d'interprétation, faire un test de confirmation par la technique du screening à l'oxacilline (test MRSA).

### II.1.2. Test de screening à l'oxacilline

- **Milieu**

- Gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl et de 6 µg/ml d'oxacilline.

La préparation de la solution d'oxacilline se fait de la manière suivante :

- Diluer 6 mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1 g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis faire une dilution au dixième.
- Répartir la solution obtenue à raison de 2 ml par tube ; ainsi conditionnées ces solutions peuvent être conservées à - 20°C pendant une semaine, au bout de laquelle elles doivent être renouvelées.
- Mettre 2 ml de cette solution dans une boîte de 90 mm de diamètre, ajouter 18 ml de gélose Mueller 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 être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

- **Ensemencement**

- L'ensemencement se fait par spot, en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne (ou ensemercer un cadran entier).

- Les souches de référence sont testées dans les mêmes conditions (*S. aureus* ATCC 29213, souche sensible à l'oxacilline, et *S. aureus* ATCC 43300, souche résistante à l'oxacilline).

- **Incubation**

- 24 h à 35°C en atmosphère normale.

- **Lecture**

- La culture de plus d'une colonie de la souche test suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines.

### **II.1.3. Résistance hétérogène de la même souche de *S. aureus***

Pour la recherche de la résistance hétérogène de la même souche de *S. aureus*, on réalise un antibiogramme dans des conditions particulières :

- Mueller Hinton à 30°C ou MH hypersalé à 37°C : ralentissement de la culture permettant aux colonies mutantes, de croissance plus lente, d'émerger. Dans le cas contraire, les souches normales, cultivant plus rapidement, occupent le terrain en "étouffant" les mutants.

- Inoculum plus lourd permettant d'avoir plus sûrement les quelques mutants possédant la PLP adéquate.

**II.1.3.1.** Détection de la résistance à l'oxacilline par la mise en évidence de la PLP2a (ou PBP2')

**Réactifs** : Slidex MRSA detection (bioMérieux).

- **Extraction**

- Mettre 4 gouttes du réactif d'extraction 1 dans un tube pour microcentrifugeuse

- Prélever 3 öses pleines de culture (öse calibrée à 1  $\mu$ l).

- Décharger ces öses dans le liquide d'extraction 1.

- Fermer le tube à l'aide d'un bouchon.

- Mettre ce tube dans un bain-marie bouillant à température comprise entre 95 et 100°C pendant 3 mn.
- Retirer le tube et laisser refroidir à température ambiante.
- Ajouter une goutte du second réactif d'extraction puis homogénéiser la suspension.
- Centrifuger à 1.500 g pendant 5 mn.
- L'agglutination se fera à partir du surnageant.

- **Agglutination**

- Ajouter une goutte de latex sensibilisé (par un anticorps monoclonal anti-PBP2') dans le cercle test puis déposer 50 µl du surnageant (extrait de culture).
- Bien mélanger le tout à l'aide d'un bâtonnet, en étalant le mélange sur toute la surface.
- Répéter cette technique d'agglutination pour le latex contrôle négatif.
- Donner à la carte un léger mouvement de rotation manuellement ou à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 3 mn.
- Observer l'apparition d'une éventuelle agglutination.

- **Lecture**

- Présence d'agglutination : le test est positif = présence de PBP2' (MRSA +).
- Absence d'agglutination : le test est négatif = absence de PBP2' (MRSA -).

### **II.1.3.2. Screening test à la vancomycine**

- **Milieu**

Gélose à base d'infusion de cœur cervelle (BHIA) additionnée de 6 µg de vancomycine.

- **Préparation de la boîte de vancomycine**

- Diluer 6 mg de vancomycine dans 100 ml d'eau distillée stérile (la solution d'antibiotique étant à 60 µg/ml).
- Prendre 2 ml de la solution d'antibiotique dans une boîte de Pétri stérile.
- Ajouter 18 ml de BHIA ramené à 45°C.
- Homogénéiser par des mouvements rotatoires.
- Laisser la gélose se solidifier puis sécher les boîtes.

- **Inoculum**

- A partir d'une culture jeune de 18 heures, préparer une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique d'une opacité égale à 0,5 Mc Farland.

- **Ensemencement**

- Déposer un spot de 10 µl de la suspension bactérienne sur la surface de la gélose ou ensemencer par stries.

- **Contrôle de qualité**

- Sur la même boîte, inclure une souche témoin négatif (*S.aureus* ATCC 29213) et une souche témoin positif (*S. epidermidis* WHO 6 résistante aux glycopeptides).
- Une boîte BHIA témoin sans antibiotiques doit être ensemencée avec les mêmes souches.

- **Incubation**

A 35°C en atmosphère ordinaire.

- **Lecture et interprétation**

La culture du témoin positif et l'absence de culture du témoin négatif valident le test. La culture de la souche à tester indique une sensibilité diminuée à la vancomycine qui doit être confirmée par une détermination de la CMI.

### **II.1.3.3. Détermination des CMI pour les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine)**

- **Milieu**

Gélose MH.

- **Inoculum**

0,5 Mc Farland en bouillon MH ou en solution de NaCl 0,85%.

- **Ensemencement**

- Il se fait de la même manière que pour l'antibiogramme.
- Sécher les boîtes à 35-37°C pendant 10-15 mn.
- Déposer les bandelettes E-test vancomycine et teicoplanine à l'aide d'une pince.

- **Contrôle de qualité**

Il est réalisé dans les mêmes conditions que les souches à tester avec les souches suivantes :

- *S. aureus* ATCC 29213 sensible à la vancomycine.

- *S. epidermidis* WHO 6 résistante aux glycopeptides.

- **Incubation**

24 heures à 35°C.

- **Lecture**

Lire la valeur de la CMI correspondant à l'intersection des 2 ellipses.

- **Interprétation : CMI (mg/l)**

- $CMI \leq 4 \text{ mg/l}$  : la souche est sensible
- $8 \text{ mg/l} \leq CMI \leq 16 \text{ mg/l}$  : la souche est intermédiaire
- $CMI > 16 \text{ mg/l}$  : la souche est résistante

- **Contrôle de qualité : *S. Aureus* ATCC 29213 ( $0,5 \text{ mg/l} \leq CMI \leq 2 \text{ mg/l}$ )**

## *Résultats et discussion*

### III. Résultats

#### III.1. Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la résistance des souches de *S. aureus*, isolées chez le poulet de chair a permis d'obtenir les résultats suivants :

##### III.1.1. Résistance aux $\beta$ -Lactamines

##### III.1.1.1. Résistance à l'amoxicilline

La résistance à l'amoxicilline déterminée par disque d'amoxicilline à 20  $\mu$ g :

Chez le poulet de chair, 230 souches sont résistantes à l'amoxicilline, soit un taux de résistance de 57,5% et un taux de sensibilité de 42,5%.

Chez la dinde, le taux de résistance est de 56,75%, le taux de sensibilité est de 42,25%.

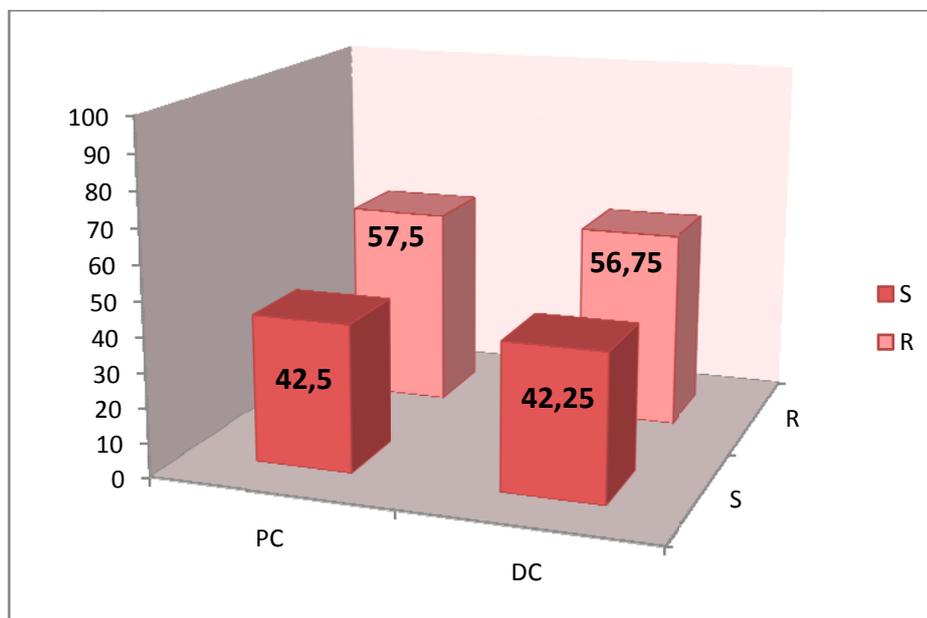


Figure 30 : Résistance à l'amoxicilline

##### III.1.1.2. Résistance à la pénicilline

- Résistance enzymatique par production d'une pénicillinase :

Cette production est mise en évidence grâce à un disque de pénicilline G (10  $\mu$ g).

193 des souches de *S. aureus* isolées chez le poulet de chair sont résistantes à la pénicilline par production d'une pénicillinase, ce qui représente un taux de 48,25% tandis que 51,75% des souches sont sensibles. Chez la dinde, le taux de résistance est de 49%, le taux de sensibilité est de 51%.

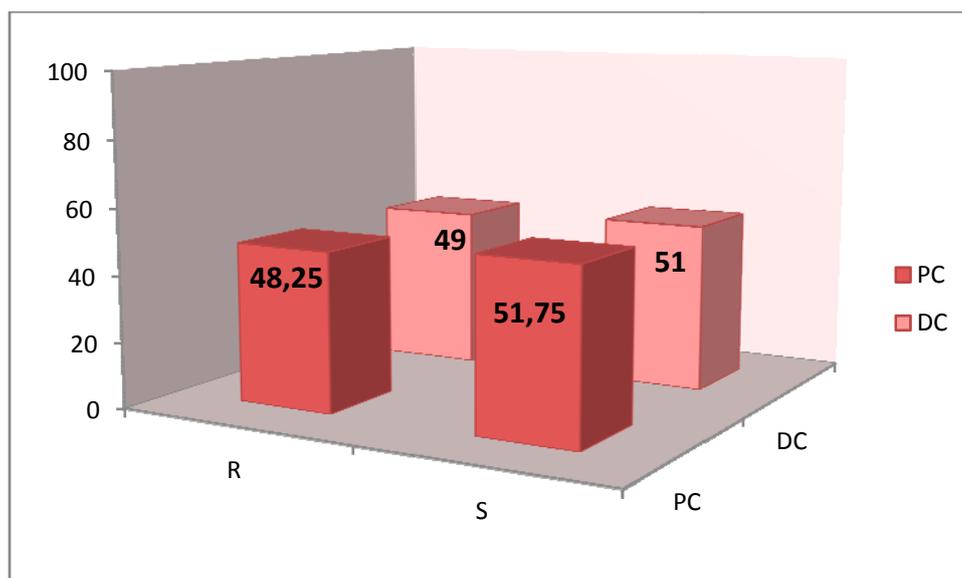


Figure 31 : Résistance à la pénicilline

Les souches de *S. aureus* sensibles à la pénicilline G (51,75% chez le poulet de chair et 51% chez la dinde de chair) présentent des zones fantômes à la bordure de la zone d'inhibition autour du disque de pénicilline G, typiques des souches de *S. aureus* non productrices de pénicillinase.

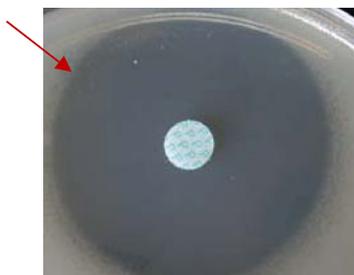


Figure 32 : *S. aureus* non producteur de penicillinase (dinde de chair)  
(photo personnelle)

L'antibiogramme des souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline par production de pénicillinase montre un aspect d'arrêt net de croissance, avec de grosses colonies.

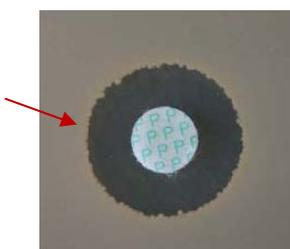


Figure 33 : *S. aureus* résistant par production de penicillinase (poulet de chair)  
(photo personnelle)

### III.1.1.3. Résistance à la céphalothine

Sur les 400 souches étudiées chez le poulet de chair :

- 160 souches sont résistantes à la céphalothine
- 200 souches sont sensibles
- 40 souches ont une résistance intermédiaire

L'antibiogramme des souches de *S. aureus* chez le poulet montre une résistance à la céphalothine à un taux de 40%. 50% des souches sont sensibles et 10% des souches montrent une résistance intermédiaire.

Chez la dinde, le taux de résistance est de 45,75%, le taux de sensibilité est de 42,5% et 11,75% des souches montrent une résistance intermédiaire.

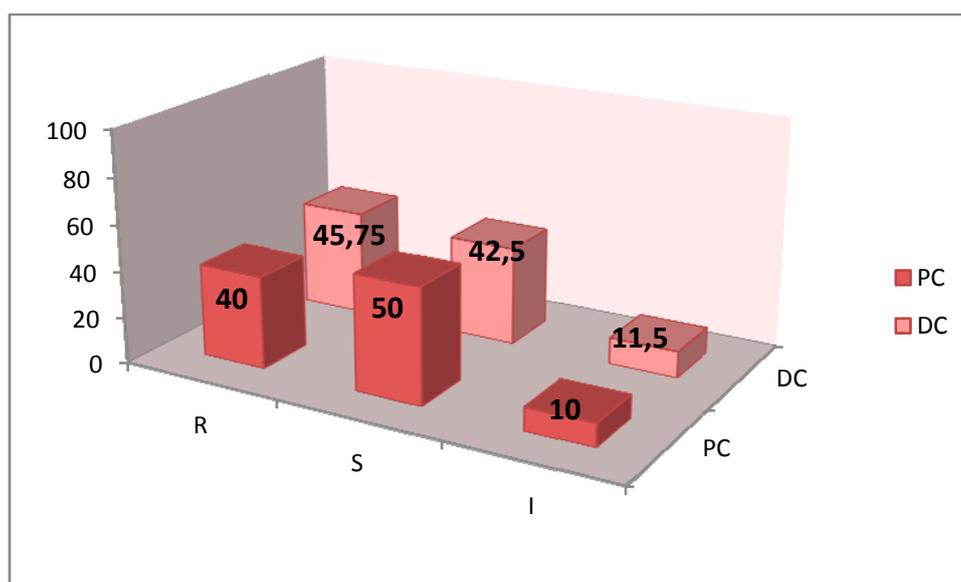


Figure 34 : résistance à la cephalothine

### III.1.1.4. Résistance à l'Oxacilline

40 des souches étudiées chez le poulet de chair sont résistantes à l'oxacilline, soit un taux de 10%. 342 souches sont sensibles, ce qui représente un taux de sensibilité de 85,5%. 4,5% des souches présentent une résistance de bas niveau à l'oxacilline et sont dites "Bordiline".

Chez la dinde, le taux de résistance est de 13,5%, le taux de sensibilité de 81% et 5,5% des souches ont une résistance de bas niveau à l'oxacilline et sont dites "Bordiline".

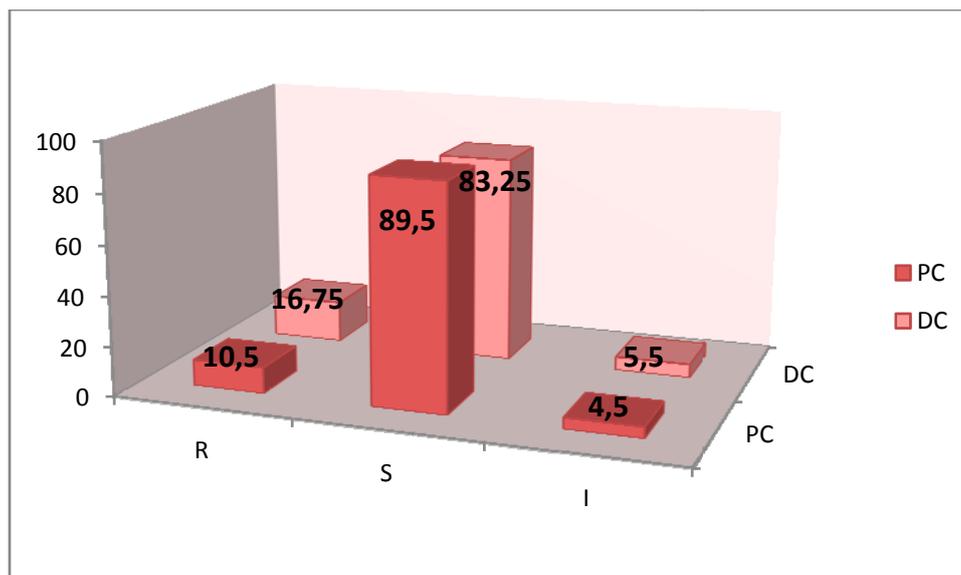


Figure 35 : Résistance à l'Oxacilline

### III.1.1.5. Résistance à la céfoxitine

Les souches résistantes à la céfoxitine sont interprétées résistantes à toutes les bêta-lactamines : pénicillines (associées ou non à un inhibiteur de bêta-lactamase), céphalosporines et carbapénèmes.

Chez le poulet de chair, le taux de résistance à la céfoxitine est de 10,5%. Ces souches sont résistantes à toutes les  $\beta$ -Lactamines. 89,50% des souches testées sont sensibles à la céfoxitine.

Chez la dinde, le taux de résistance est de 16,75% et le taux de sensibilité de 83,25%.

Ces souches résistantes à la céfoxitine sont suspectées MRSA. Ce diagnostic est confirmé par test de screening à l'oxacilline et mise en évidence de la PLP2a.

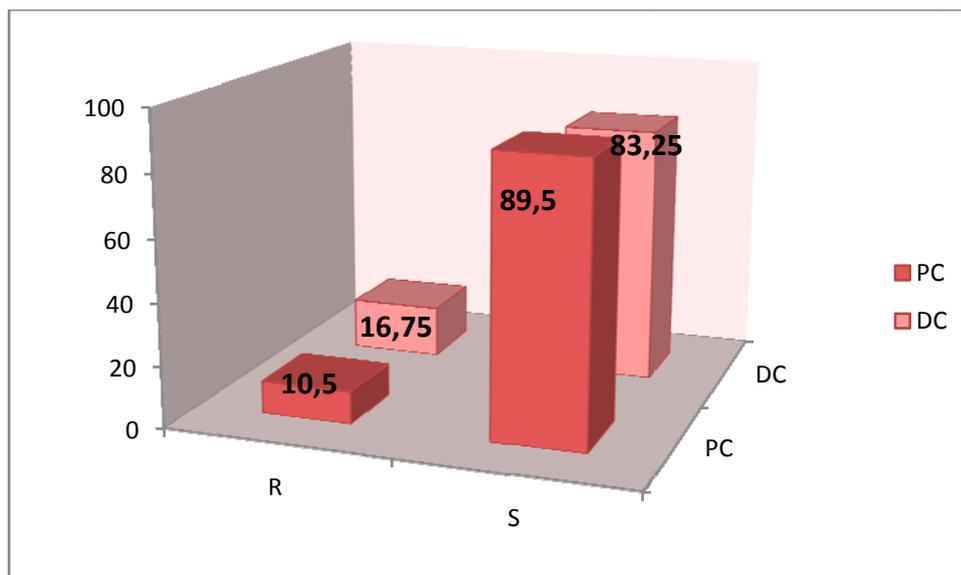


Figure 36 : Résistance à la céfoxitine

Ces résultats sont confirmés par deux tests selon la méthode recommandée par l’OMS en suivant les critères définis par le CLSL, et standardisée depuis 1999 à l’échelle nationale en médecine vétérinaire.

### III.1.2. Recherche de la PLP2a

La recherche immunoenzymatique de la protéine PLP2a permet de confirmer le taux des MRSA à 100% avec 42 tests positifs (présence de PBP2’) chez le poulet de chair et 67 tests positifs chez la dinde de chair.

#### III.1.2. 1. Test de screening à l’oxacilline

Le test est positif s’il y a présence de plus d’une colonie de la souche test après 24 h d’incubation.

Les 42 souches isolées chez le poulet de chair et 67 souches isolées chez la dinde de chair sont positives, indiquant une résistance à l’oxacilline et impliquant une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### III.1.2. 2. Etude de la résistance hétérogène de la même souche de staphylocoque testée sur gélose Mueller Hinton hypersalé

Cette résistance aux pénicillines est dite intrinsèque et hétérogène car dans une même population seule certaines bactéries l'expriment.

L'utilisation de la gélose Mueller Hinton à 30°C ou MH hypersalé à 37°C et un inoculum plus lourd ralentit la culture bactérienne, permettant aux colonies mutantes une croissance plus lente. La résistance hétérogène est déterminée par la présence de colonies isolées dans la zone d'inhibition autour du disque (photo 36, à gauche). L'antibiogramme d'une résistance homogène montre une très petite ou pas de zone d'inhibition, sans colonies isolées.

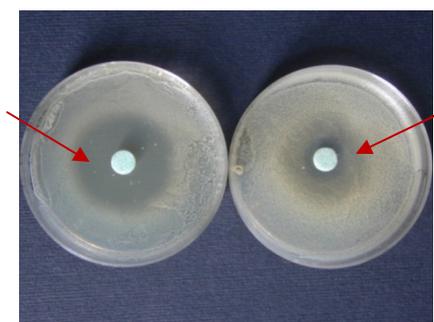


Figure 37 : Résistance hétérogène et homogène (*S. aureus*, poulet de chair)

Photo personnelle

### III.1.2. 3. Phénotypes de résistance aux $\beta$ -Lactamines isolées

Tableau 8: Phénotypes des souches de *S. aureus* résistantes aux  $\beta$ -Lactamines

Mécanisme	Pénicilline G Pénicilline A	Amoxicilline + ac. calvulinique	Pénicilline M	Céphalosporines
Pénicillinase	R	S	S	S
Modification de PLP2a	R	R	R	R

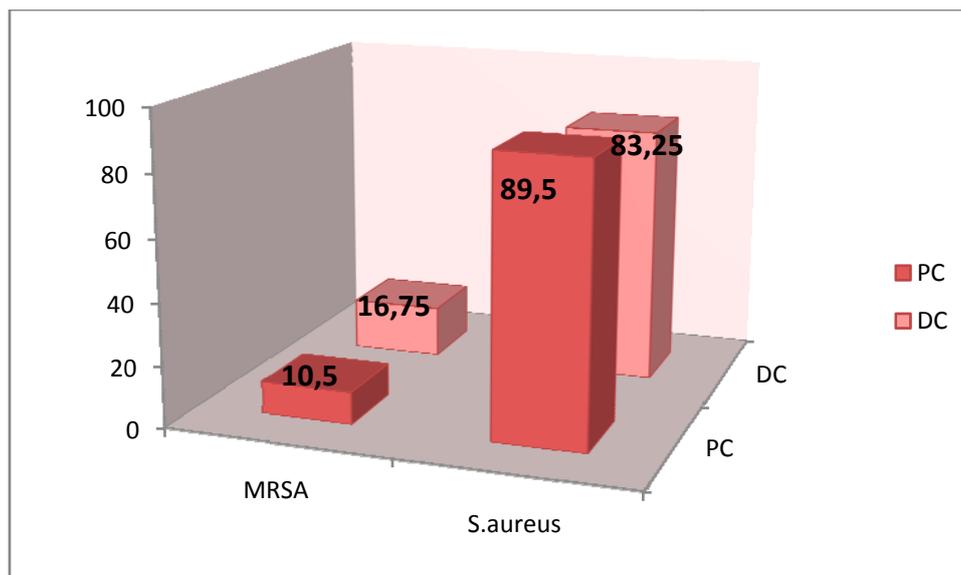


Figure 38 : Résultats de la recherche des MRSA

Le taux des MRSA est déterminé par le test de diffusion à la céfoxitine et confirmé par deux tests :

- Test de screening à l'oxacilline
- Recherche de la PLP2a

Le taux de portage des MRSA chez le poulet de chair est estimé à 10,5% et 16,75% chez la dinde de chair.

#### IV. Résistance aux aminosides

Pour l'étude de la résistance aux aminosides, le test à la Gentamycine 30 µg est appliqué. Les souches résistantes à la gentamicine sont résistantes à l'ensemble des aminosides (résistance croisée).

#### V. Résistance à la Gentamycine

L'étude des 400 souches isolées chez le poulet de chair détermine un taux de résistance à la gentamycine de 66%, un taux de sensibilité de 30,75%. 3,25% des souches montrent une résistance intermédiaire.

Chez la dinde le taux de résistance est de 67,5%, le taux de sensibilité est de 30% et 2,5% des souches montrent une résistance intermédiaire.

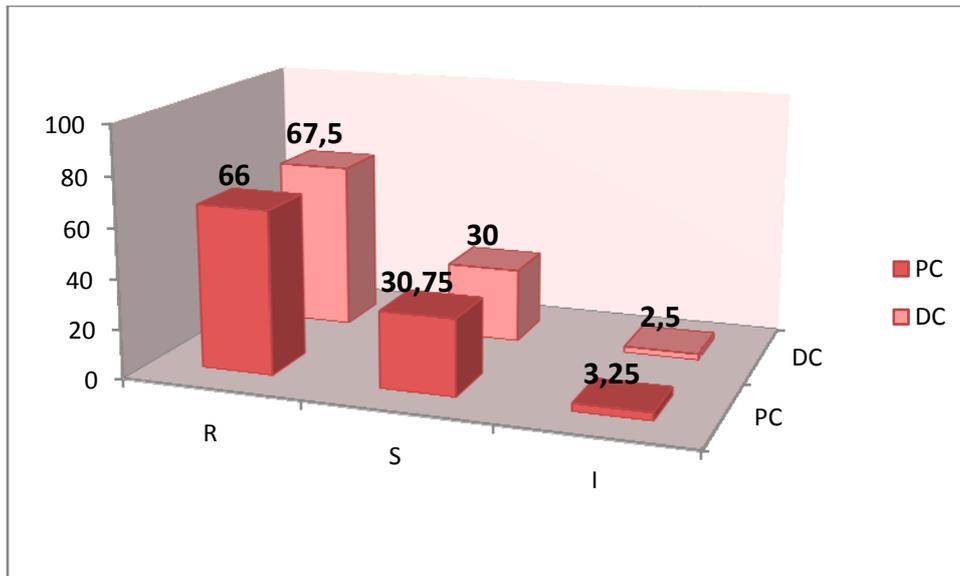


Figure 39 : résistance à la gentamicine

## VI. Résistance aux macrolides

La résistance aux macrolides est déterminée par le test à l'Erythromycine 15 µg.

### VI.1. Résistance à l'Erythromycine

Chez le poulet de chair, 385 des souches sont résistantes à l'Erythromycine, ce qui représente un taux de 96,25%. 2,75% des souches sont sensibles et 1% des souches montrent une résistance intermédiaire.

Chez la dinde, le taux de résistance est de 97%, le taux de sensibilité est de 1,75% et 1,25% des souches montrent une résistance intermédiaire.

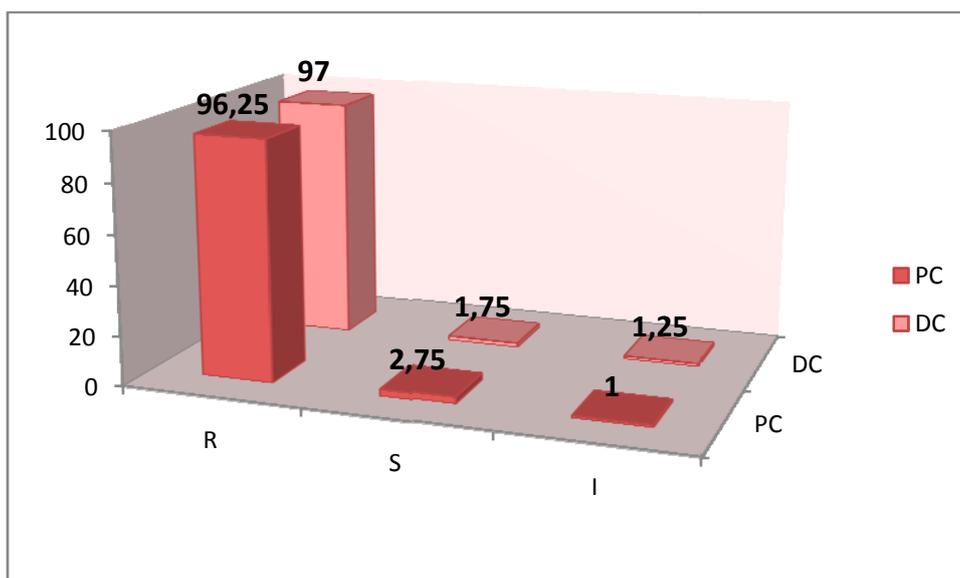


Figure 40 : résistance à l'erythromycine

## **VII. Résistance aux glycopeptides**

La résistance aux macrolides est déterminée par le test à la vancomycine 30 µg.

### **VII.1. Résistance à la Vancomycine**

Chez le poulet de chair, 397 souches sont sensibles à la vancomycine, soit un taux de 99,25%.

3 souches montrent une diminution de sensibilité à la vancomycine, soit un taux de 0,75% .

Chez la dinde, le taux de sensibilité est de 99,25%. 0,75% des souches montrent une diminution de la sensibilité à la vancomycine.

L'évaluation de cette diminution de sensibilité est déterminée par le screening test à la vancomycine.

### **VII.2. Screening test à la vancomycine**

Chez le poulet de chair, 2 souches sont positives au screening test à la vancomycine, montrant une sensibilité diminuée à la vancomycine qui doit être confirmée par une détermination de la CMI.

Chez la dinde de chair, les 3 souches sont positives au screening test à la vancomycine. Dans ce cas la détermination de la CMI est obligatoire.

### **VII.3. Détermination des CMI pour les glycopeptides (vancomycine)**

Les deux souches isolées chez le poulet de chair ont une CMI de 3 µg/ ml et sont donc sensibles à la vancomycine.

Les trois souches isolées chez la dinde de chair ont une CMI de 3 µg/ ml et sont donc sensibles à la vancomycine.

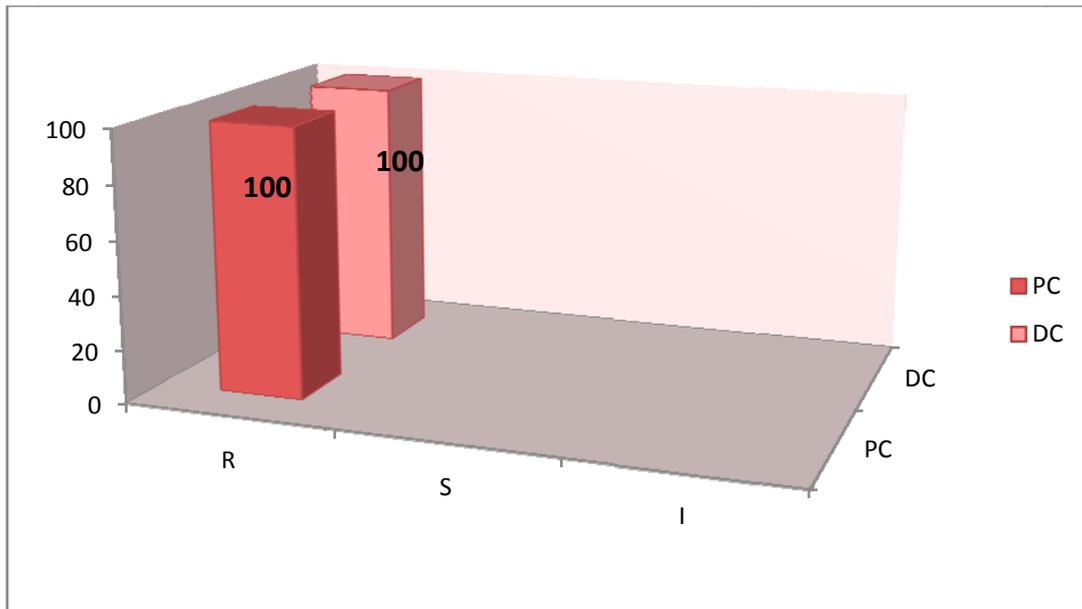


Figure 41: Résistance à la vancomycine

### VIII. Résistance aux tétracyclines

#### VII.1. Résistance à la Tétracycline

Chez le poulet de chair, le taux de résistance à la tétracycline est de 92,75% et 2,25% des souches sont sensibles alors que 5% des souches montrent une résistance intermédiaire à la tétracycline.

Chez la dinde, le taux de résistance est de 92%, le taux de sensibilité de 2,25% et 5,75% des souches montrent une résistance intermédiaire.

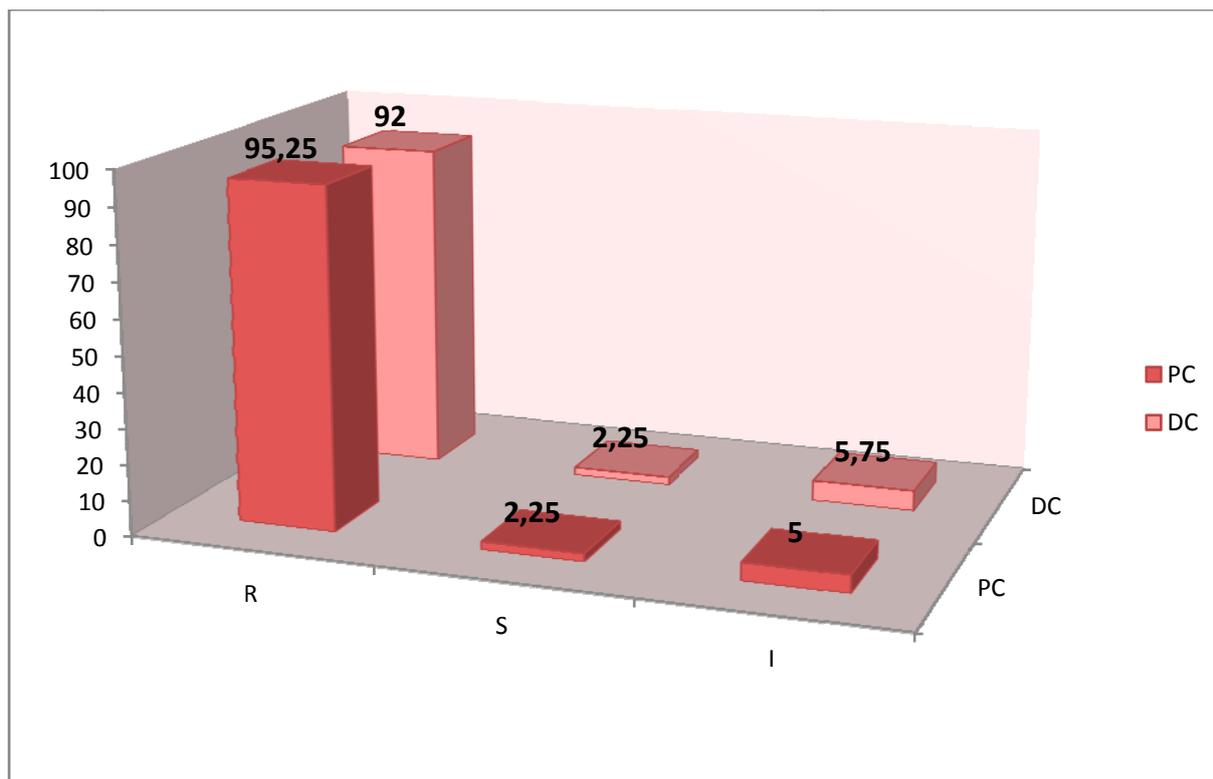


Figure 42 : Résistance à la tétracycline

### IX. Résistance aux sulfamides

Chez le poulet de chair, 75,25% des souches sont résistantes au Triméthoprime-sulfaméthoxazole, 17,25% des souches sont sensibles et 7,5% des souches montrent une résistance intermédiaire.

Chez la dinde, le taux de résistance est de 77,5%, le taux de sensibilité de 15% et 7,5% des souches montrent une résistance intermédiaire.

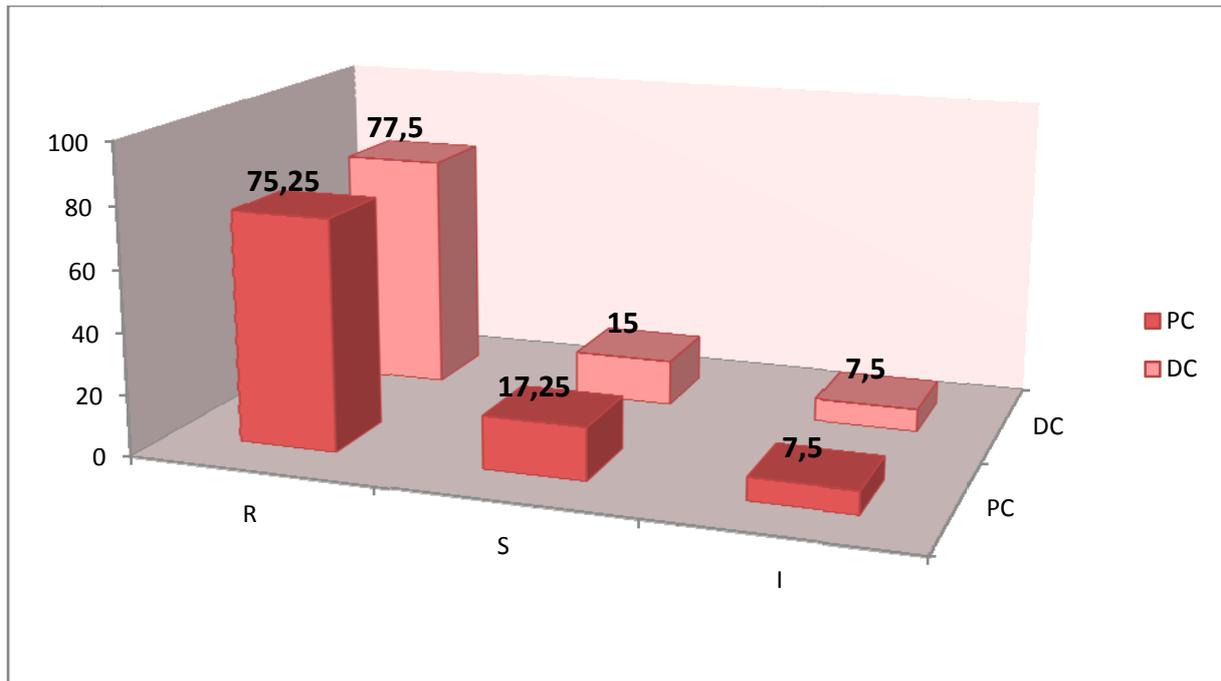


Figure 43 : Résistance aux sulfamides

### X. Résistance à l'Enrofloxacin

Chez le poulet de chair, 86,25% des souches sont résistantes à l'Enrofloxacin, 2% sont sensibles et 11,75% des souches montrent une résistance intermédiaire.

Chez la dinde, le taux de résistance est de 85%, le taux de sensibilité de 2,25% et 12,75% des souches montrent une résistance intermédiaire.

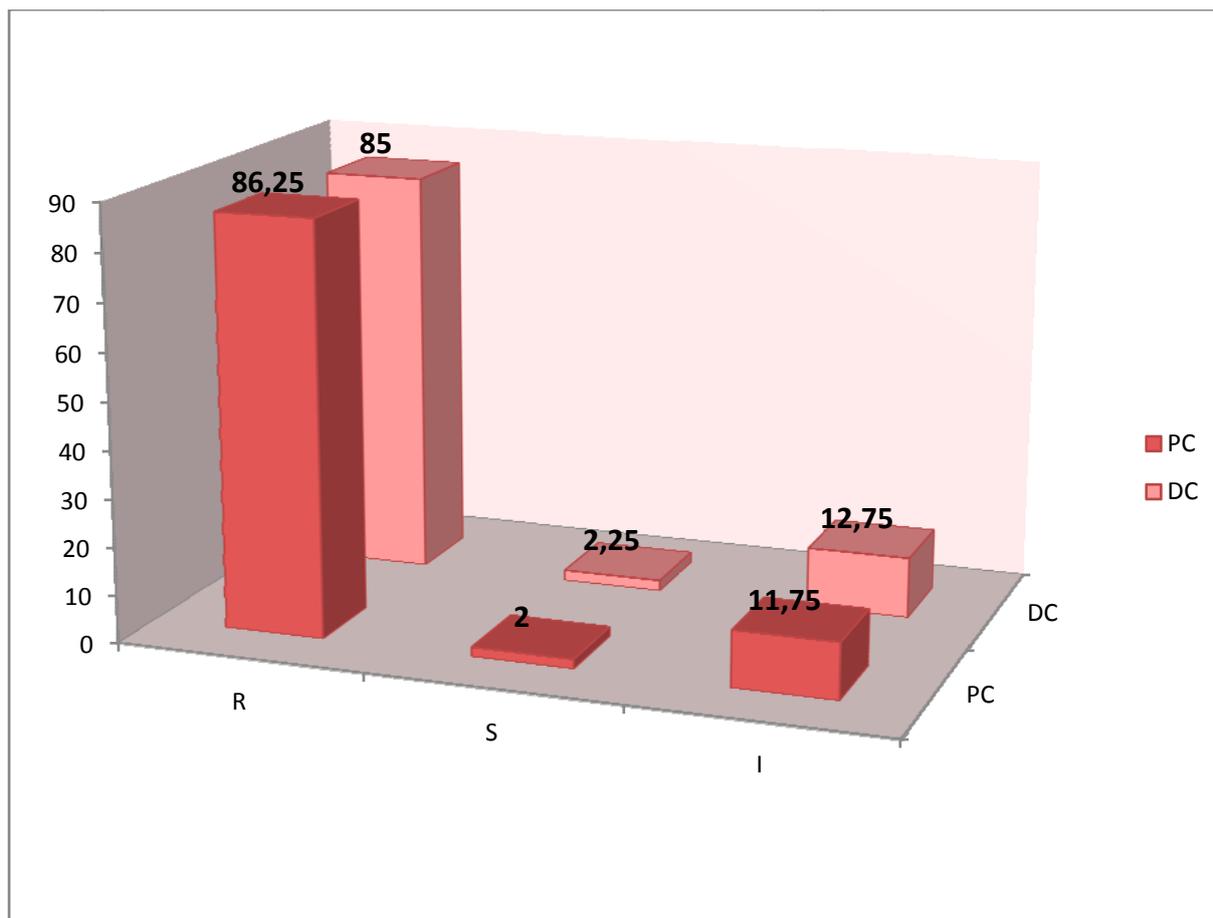


Figure 44: Résistance à l'enrofloxacin

## XI. Taux de résistance et de sensibilité chez le poulet de chair

### XI.1. Taux de résistance

Les résultats obtenus chez le poulet de chair montrent un taux élevé de résistance des souches de *S. aureus* à plusieurs familles d'antibiotiques. Ainsi, les souches testées sont résistantes à l'érythromycine (96,25%), à la tetracycline (92,75%) et à l'enrofloxacin (86,25%).

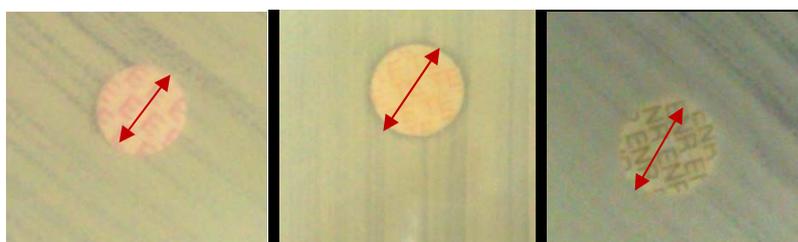


Figure 45 : *S. aureus* résistante à erythromycine(à gauche), *S. aureus* résistante à la tetracycline (au milieu) et *S. aureus* résistante à l'enrofloxacin.

Les souches de *S. aureus* isolées chez le poulet de chair sont résistantes aux sulfamides à un taux de 75,25%.

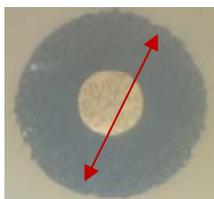


Figure 46 : *S. aureus* résistante aux sulfamides

66% des souches sont résistantes à la gentamycine et sont donc résistantes à tous les aminosides (résistance croisée).



Figure 47 : *S. aureus* résistante à la gentamycine

L'étude de la résistance aux  $\beta$ -Lactamines permet de déterminer un taux de résistance de 57,5% à l'amoxicilline et de 48,25% à la pénicilline G. Cette résistance est dite enzymatique et est due à la production de pénicillinase.

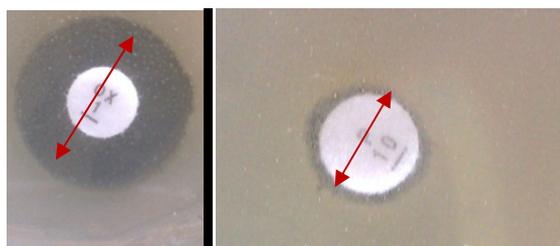


Figure 48 : *S. aureus* résistante à la pénicilline et à l'oxacilline

Le test à l'oxacilline évalue le taux de résistance à 10%. Ce test permet aussi de déterminer l'hétérogénéité de la résistance des souches de *S. aureus*.

Les souches isolées sont résistantes aux  $\beta$ -Lactamines de troisième génération (céphalothine) avec un taux de 40%.

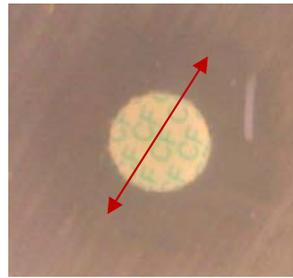


Figure 49 : *S. aureus* résistante à céphalothine

Le test à la céfoxitine pour la recherche des MRSA permet d'estimer le taux de résistance non enzymatique à 10,5% ; ces souches sont résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines. Le taux de portage des MRSA chez le poulet de chair est donc de 10,5%.



Figure 50 : *S. aureus* résistante céfoxitine

Aucune des souches étudiées chez le poulet de chair n'est résistante à la vancomycine.

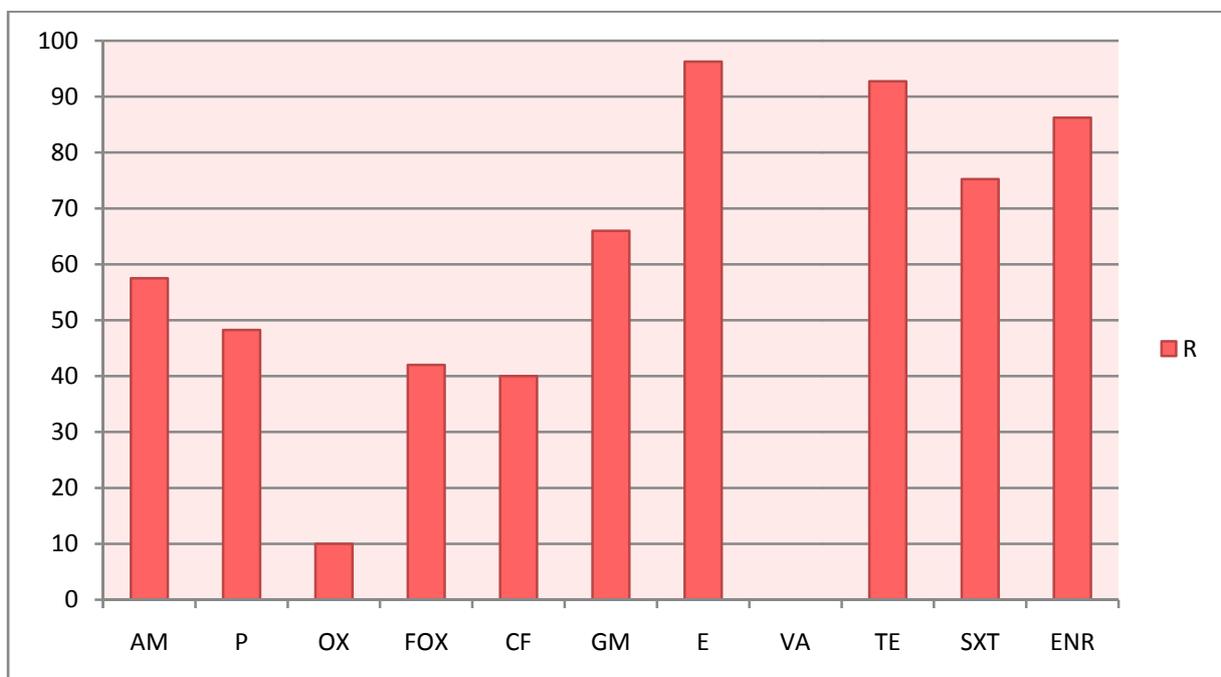


Figure 51: représentation des résultats de résistance des souches de *S. aureus* chez le poulet de chair

### XI.2. Taux de sensibilité

Les souches de *S. aureus* testées sont sensibles à la vancomycine (taux de sensibilité de 100%), 89,5% des souches sont sensibles à la céfoxitine et 85,5% des souches sont sensibles à l'oxacilline.

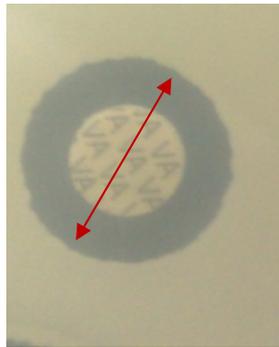


Figure 52 : souche de *S. aureus* sensible à la vancomycine

Le taux de sensibilité à la pénicillines est de 51,75%, celui de la céphalothine est de 50% et la sensibilité à l'amoxicilline est estimée à 42,5%.

L'étude de la résistance aux aminosides par le test à la gentamycine évalue un taux de sensibilité de 30,75%.

Ces souches de *S. aureus* isolées chez le poulet de chair sont sensibles aux sulfamides à un taux de 17,25%.

Les résultats montrent que les plus faibles taux de sensibilité aux antibiotiques sont de 2% pour l'enrofloxacin, 2,25% pour la tétracycline et 2,75% pour l'érythromycine.

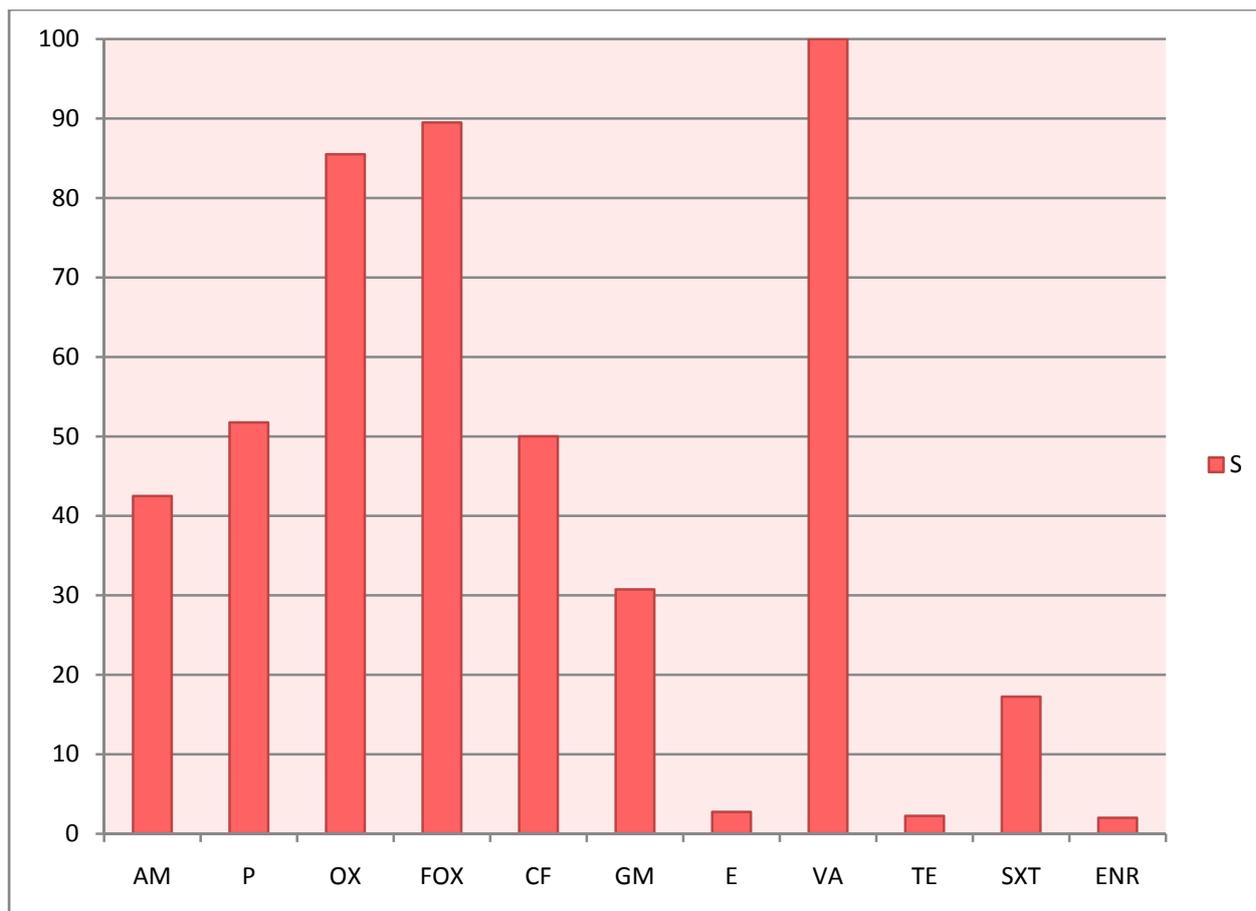


Figure 53 : : représentation des résultats de sensibilité des souches de *S. aureus* chez le poulet de chair

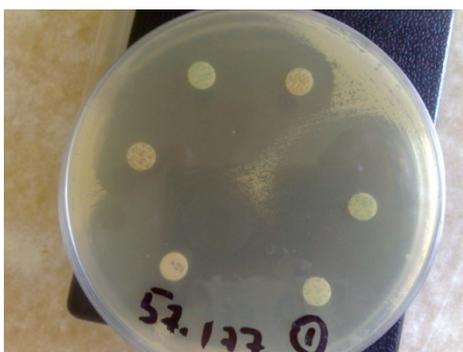


Figure 54 : antibiogramme de *S. aureus* sensible aux antibiotiques testés

## XII. Résistance intermédiaire

Des taux variables de résistance intermédiaire sont retrouvés : 11,75% des souches testées montrent une résistance intermédiaire à l'enrofloxacin, 10% ont une résistance intermédiaire

à la céphalothine et 4,5% des souches présentent une sensibilité diminuée à l'oxacilline et sont dites "souches bordilines".

1% des souches testées ont une résistance intermédiaire à l'erythromycine. Ce taux est de 5% pour les tétracyclines, 7,5% pour les sulfamides et 3,25% pour la gentamycine.

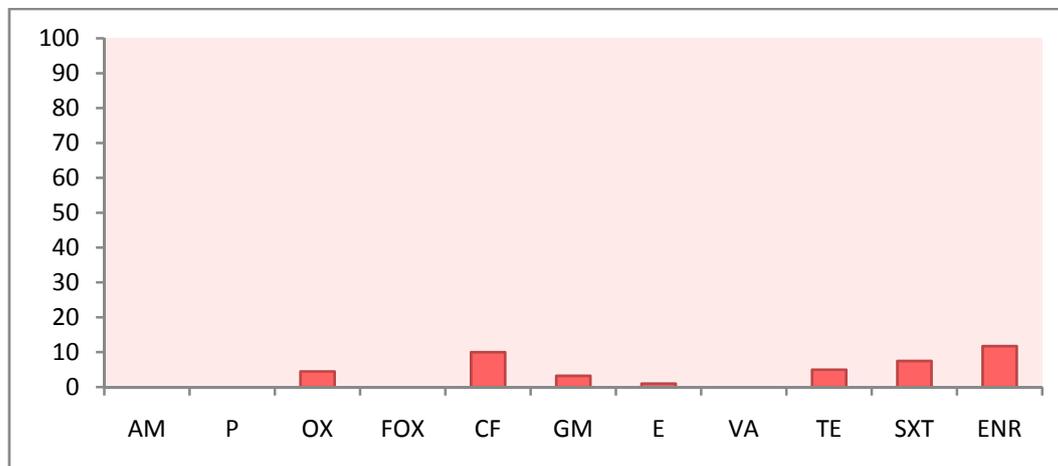


Figure 55 : représentation des résultats résistance intermédiaire des souches de *S. aureus* chez le poulet de chair

### Chez la dinde de chair

Les résultats obtenus chez la dinde montrent des taux de résistance élevés : Les plus hauts niveaux de résistance sont de 97% pour l'erythromycine, de 92% pour la tétracycline et de 85% pour l'enrofloxacin.

Le taux de résistance à la pénicillines est de 49%, celui de la céphalothine est de 45,75% , le taux de résistance à l'amoxicilline est estimé à 56,75%. Le test à l'oxacilline évalue le taux de résistance à 13,5% et un taux de résistance à la céfoxitine à 16,75%.

L'étude de la résistance aux aminosides par le test à la gentamycine évalue un taux de résistance de 67,5%.

Ces souches de *S. aureus* isolées chez la dinde de chair sont résistantes aux sulfamides à un taux de 77,5%.

Aucune des souches étudiées chez la dinde de chair n'est résistante à la vancomycine.

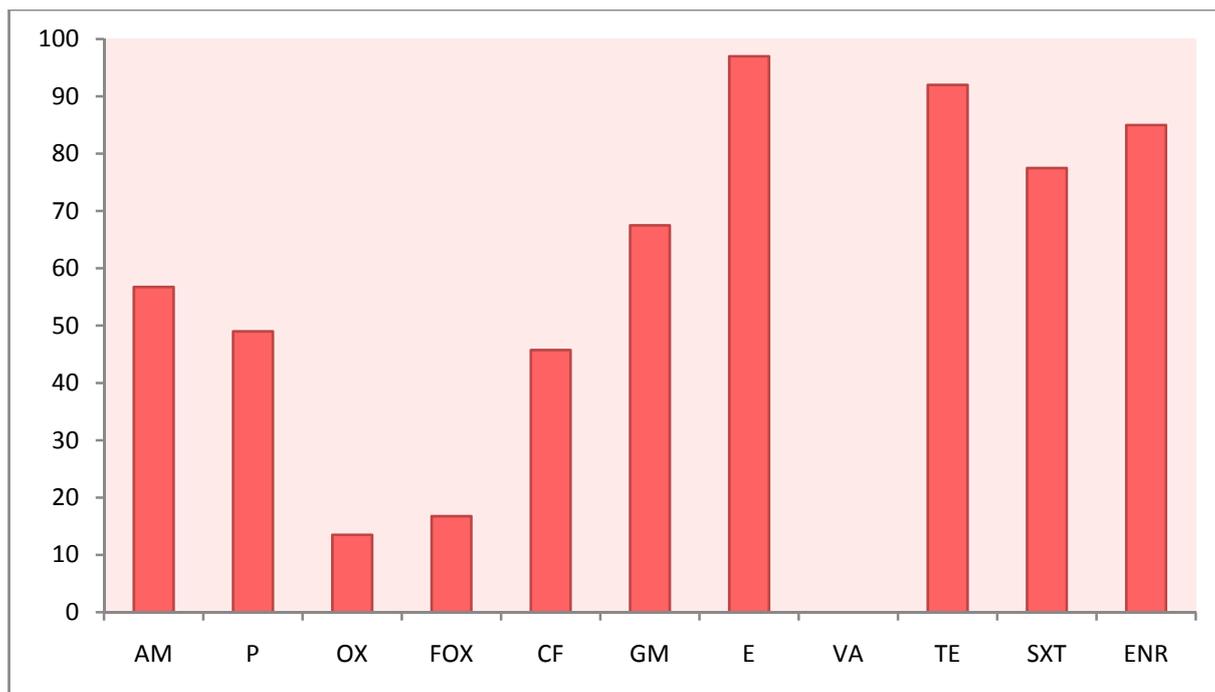


Figure 56 : représentation des résultats résistance des souches de *S. aureus* chez la dinde de chair

### XIII. Taux de sensibilité des souche de *S. aureus* chez la dinde de chair

Toutes les souches de *S. aureus* testées sont sensibles à la vancomycine (taux de sensibilité de 100%), 83,25% sont sensibles à la céfoxitine et 81% sont sensibles à l'oxacilline.

Le taux de sensibilité à la pénicilline est de 51%, celui de la céphalothine est de 42,5% et la sensibilité à l'amoxicilline est estimée à 42,25%.

L'étude de la résistance aux aminosides par le test à la gentamycine évalue un taux de sensibilité de 30%.

Les souches de *S. aureus* isolées chez la dinde de chair sont sensibles aux sulfamides à un taux de 15%.

Les résultats montrent que les plus faibles taux de sensibilité aux antibiotiques sont de 2,25% pour l'enrofloxacin, 2,25% pour la tétracycline et 1,75% pour l'érythromycine.

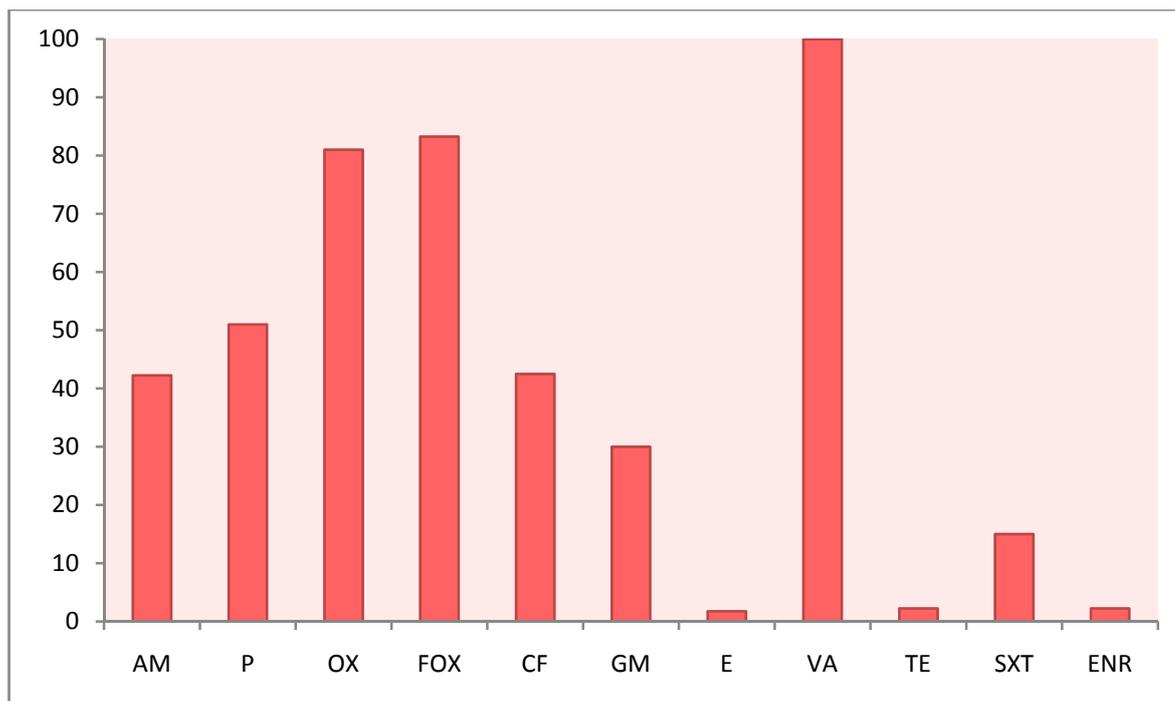


Figure 56: représentation des résultats résistance des souches de *S. aureus* chez la dinde de chair

#### XIV. Résistance intermédiaire

L'évaluation de la résistance des souches isolées chez la dinde de chair montre que 12,75% des souches testées présentent une résistance intermédiaire à l'enrofloxacin, 11,75% ont une résistance intermédiaire à la céphalothine et 5,5% des souches présentent une sensibilité diminuée à l'oxacilline et sont dites "souches bordiline".

Chez la dinde, 1,25% des souches testées ont une résistance intermédiaire à l'érythromycine. Ce taux est de 5,75% pour les tétracyclines, 7,5% pour les sulfamides et de 2,5% pour la gentamycine.

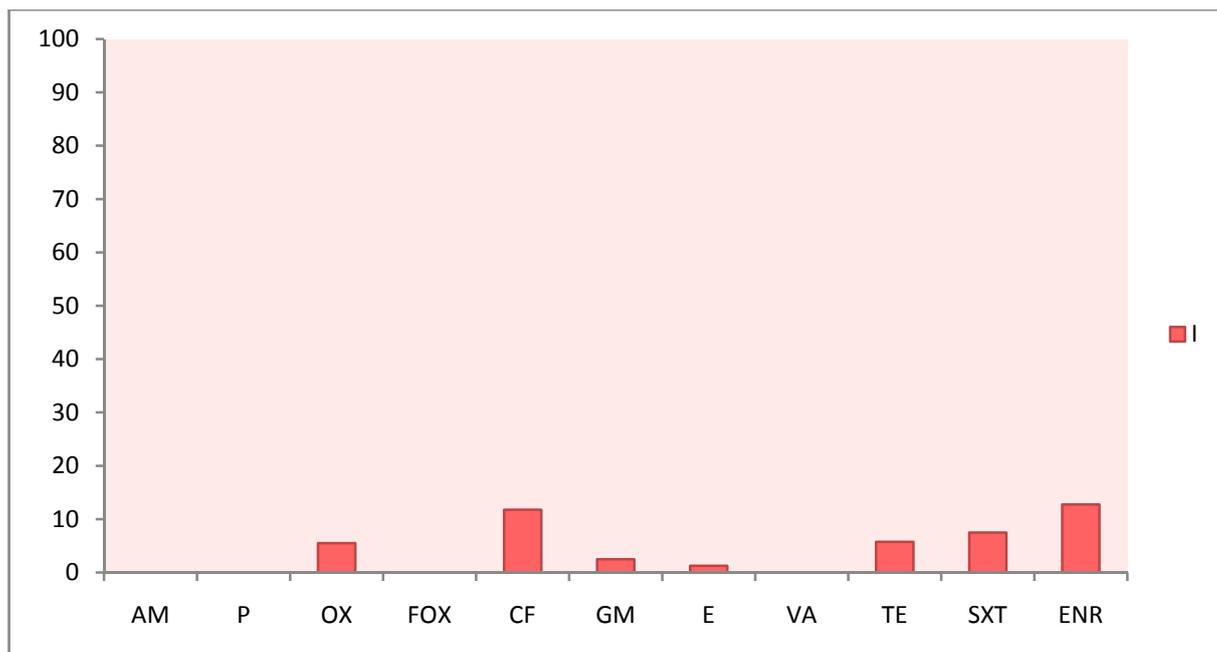


Figure 58: représentation des résultats résistance intermédiaire des souches de *S. aureus* chez la dinde de chair

### III. Discussion

La première description d'une résistance à la méticilline chez une souche de *S. aureus* animale remonte à 1972, isolée en Belgique d'une infection mammaire bovine.

Depuis, d'autres souches de SARM sont décrites dans l'espèce bovine au Pakistan (2004), en Corée (2007), en Hongrie (2007) et aux Pays-Bas (2008) pour les plus récentes (Cuny *et al.*, 2010).

Chez les chevaux, les premières descriptions de SARM l'ont été simultanément au Japon et aux USA (1996). Plus récemment, des cas sont rapportés en Grande-Bretagne (2005), en Irlande (2005), en Autriche (2006) et en Allemagne (2006), ainsi que chez le chien pour la première fois en Angleterre en 2005.

C'est surtout chez le porc que la description de souches de SARM a fait prendre conscience à la communauté médicale humaine de l'existence de ce pathogène en filière animale (Armand-Lefevre *et al.*, 2005).

Enfin, c'est la description d'infections humaines par des souches porcines aux Pays Bas (2006), qui a, à l'évidence, marqué le point de départ d'un large questionnement scientifique sur le risque de transmission à l'homme de SARM d'origine animale (Krziwanek *et al.*, 2009).

Chez les volailles, des souches MRSA sont rapportées dès 2003, dans divers pays dont la Corée et le Japon. Des souches de SARM ont également été décrites récemment en Belgique (Cuny *et al.*, 2010).

Dans la première partie de notre étude expérimentale, l'espèce *S. aureus* est recherchée au niveau du poumon et des écouvillons nasaux chez le poulet de chair et la dinde. L'isolement et l'identification des souches de *S. aureus* sont réalisés par les techniques conventionnelles : examen direct, isolement sur milieu gélosé de Chapman, caractères morphologiques, présence de catalase et mise en évidence de la coagulase libre.

Chez le poulet de chair, sur un total de 600 prélèvements, 20 sont négatifs, soit un taux de 3,33% (*Staphylococcus non aureus*) et 580 prélèvements sont positifs, soit un taux de 96,67%. Chez la dinde de chair, sur les 400 prélèvements, 46 sont négatifs, soit un taux de 11,5% de prélèvements négatifs (*Staphylococcus non aureus*). 354 prélèvements sont positifs, soit un taux de 88,5% (*S. aureus*). Ces résultats s'expliquent par le fait que les staphylocoques sont pathogènes facultatifs et appartiennent à la flore commensale cutanée et muqueuse des mammifères et des oiseaux. Ces organismes sont donc fréquemment isolés à partir de prélèvement de peau et des narines des poulets apparemment sains (Butterworth, 1999).

Dans la deuxième partie de cette étude, l'antibiorésistance des souches de *S. aureus* isolées chez le poulet de chair et la dinde de chair est étudiée pour la recherche de bactéries multi-résistantes et le portage des MRSA. Huit cents souches de *S. aureus* (400 isolées chez le poulet de chair et 400 isolées chez la dinde de chair) sont testées.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH), selon les normes préconisées par CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). La détection de la résistance à la méthicilline est déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition d'un disque de céfoxitine chargé à 30 µg. La résistance des souches SARM détectées est confirmée par un criblage sur gélose de Mueller-Hinton contenant 6 µg/ml d'oxacilline (normes CA-SFM).

Dix autres antibiotiques sont également testés pour la détection de phénotypes de résistance associés (CA-SFM). Une souche de référence (souche *S. aureus* ATCC 25923) sert de témoin de contrôle interne.

Nous avons confirmé la présence des MRSA dans les filières poulet de chair et dinde de chair avec un taux de portage estimé à 10,5% pour le poulet de chair et 16,75% chez la dinde. Ces taux sont comparativement inférieurs aux taux rapportés en 2003 dans divers pays : la Corée (40%) et le Japon (38%).

Cette résistance est surtout observée chez le poulet de chair plutôt que chez la poule pondeuse. Les souches isolées présentent les mêmes caractéristiques que les souches humaines (Nemati *et al.*, 2008 ; Persoons *et al.*, 2009).

L'étude de Hermans *et al.* (2007) sur le portage des MRSA chez la poule pondeuse conclue que le taux des MRSA est soit nul dans ce type d'élevage soit très faible. Ceci est dû, selon la même étude, à l'utilisation limitée des antibiotiques dans ce type d'élevage.

Selon Dewaele *et al.* (2007), l'utilisation de certains antibiotiques chez l'être humain est un facteur à risque d'infection par MRSA.

L'étude de Hermans *et al.* (2007) sur le portage de MRSA chez le poulet de chair évalue celui-ci de 20% à 100%. Ce taux variable de portage des MRSA est expliqué par l'utilisation de certains antibiotiques : tylosine, amoxicilline, triméthoprime-sulphaméthoxazole, érythromycine, lincomycine, tétracycline et enrofloxacin. Ces taux de portage sont comparativement proches des taux trouvés dans l'étude de Kitai *et al.* (2005) et Lee (2003),

Une étude sur le portage du SARM chez le porc, conduite en Europe en 2008 dans vingt-quatre pays membres, estime le taux de portage des MRSA à 43,5% en Allemagne, 34,9% en Italie et 46% en Espagne, la principale souche de SARM identifiée étant la lignée ST398 (souche transmise à l'homme) qui représente 92,5% des isolats.

Chez les chevaux, une étude rétrospective française récemment publiée s'est intéressée à la description de souches de *S. aureus* responsables d'infections sévères ayant conduit à la mort ou à l'euthanasie de l'animal (Haenni *et al.*, 2010). Sur un total de 59 souches de *S. aureus*, trois d'entre elles se sont révélées résistantes à la méticilline. Ces trois souches de SARM, isolées en 2003, 2004 et 2006, appartiennent toutes au groupe clonal ST8 décrit en premier lieu chez l'homme, puis découvert chez les animaux, et présentent plusieurs résistances associées.

À l'évidence, cette étude n'avait pas vocation à constituer une enquête de prévalence du SARM chez les équins, mais elle démontre néanmoins que de telles souches circulent sporadiquement depuis plusieurs années chez cette espèce animale en France, y compris avec un phénotype de multi-résistance. Elle permet, par ailleurs, d'éveiller l'intérêt des chercheurs pour cette filière puisqu'elle est le point de départ d'une étude de portage de plus large envergure, actuellement en cours de réalisation. Par ailleurs, le clone ST398 est identifié dans plusieurs pays européens (Autriche, Belgique, Allemagne, France). Ses principales caractéristiques (*spa*-typing, séquence *SSCmec*, antibiogrammes, gènes de résistance) sont identiques à celles connues chez le porc (Denis *et al.*, 2009 ; Van den Eede *et al.*, 2009 ; Witte *et al.*, 2007).

Chez les bovins, les mammites cliniques et subcliniques constituent les principales infections à staphylocoques. Pour autant, une récente étude sur la prévalence des staphylocoques isolés d'infections mammaires montre que près d'un tiers sont des staphylocoques à coagulase négative. Parmi les souches de *S. aureus* restantes (tous les staphylocoques à coagulase positive isolés sont des *S. aureus*), aucune d'entre elles ne présente de résistance à la méticilline. Ces résultats soulignent donc la très faible prévalence de SARM responsables d'infections chez les bovins en France, estimée à 1% (Botrel *et al.*, 2010).

Les données récentes publiées sur le portage des MRSA chez les animaux de compagnie montrent que *S. aureus* reste très peu impliqué dans les infections, en particulier canines, laissant la place à un autre représentant des staphylocoques à coagulase positive, *S. pseudointermedius* (Perreten *et al.*, 2010).

Néanmoins, quelques rares cas de SARM sont rapportés en Europe, dont un SARM ST398 récemment identifié en portage chez un chien, probablement transmis par son propriétaire (de profession vétérinaire), lui-même l'ayant acquis au contact de porcs (Nienhoff *et al.*, 2009). Ces données soulèvent clairement la question du sens de la transmission des SARM : homme-animal ou animal-homme ?

L'analyse globale du profil de résistance des SARM aux antibiotiques confirme le caractère multirésistant de ces bactéries aux différentes familles d'antibiotiques (Leclercq, 2002)

Pour les aminosides, le taux de résistance à la gentamicine constaté dans notre étude est de 37,5%. Cette résistance est élevée comparativement à la situation en Tunisie (18%) et en France (10%). Ce taux est par contre moins important que celui obtenu lors d'une étude à Abidjan (77,6%). La résistance à la kanamycine et à la tobramycine est respectivement de 100 et 40%. Ces taux sont plus élevés que ceux retrouvés en Tunisie, où la résistance est respectivement de 78% et 21%. On note que le taux de résistance à l'érythromycine est de 42,5%, taux comparable à celui observé dans la même étude tunisienne (49%). Mais il reste moins important que celui constaté aux USA (66%). D'autre part, il est à souligner que le faible taux de résistance à la lincomycine (2,5%) dans notre étude est nettement plus bas que celui rapporté par l'étude tunisienne (21%). Vancraeynest *et al.* (2004)

Nous trouvons un taux de résistances associées de 43%. Ces résultats sont comparables à ceux de Myllys *et al.* (1998) qui rapportent un taux de résistances associées de 49,7% chez les souches de *S. aureus* isolées chez le bovin. L'étude de Vancraeynest *et al.* (2004) sur l'antibiorésistance des souches de *S. aureus* isolées chez le lapin évalue ce taux à 45%.

Concernant la résistance à la tétracycline, nous enregistrons des pourcentages de résistance très élevés, 82% chez la dinde et 92,75% chez le poulet de chair. Ces résultats corroborent les résultats trouvés par Geornaras et von Holy (2001) rapportant un taux de résistance de *S. aureus* chez le poulet de chair de 92%. Ce taux est par contre très différent de celui rapporté par Myllys *et al.* (1998) qui l'évalue à 20% chez le lapin.

L'étude de l'antibiorésistance des souches de *S. aureus* isolées chez le lapin rapporte un taux de résistance à l'érythromycine et à la lincomycine de 20% alors que ces antibiotiques ne sont pas utilisés chez le lapin à cause de leur toxicité (Burgmann, 2000 ; Fesce *et al.*, 1977 ; Schröder *et al.*, 1982 ; Maiers et Mason, 1984). Selon Leclercq et Courvalin (1991), cette résistance est portée par le gène *ermC* qui détermine la résistance de ces souches aux lincosamides, macrolides et streptomycine.

Plus récemment, des souches du groupe ST398 ont été identifiées chez le poulet de chair en Belgique, dont la résistance aux antibiotiques est à nouveau marquée vis-à-vis des tétracyclines, plus rarement des macrolides et du triméthoprim (Nemati *et al.*, 2008 ; Persoons *et al.*, 2009).

L'étude de l'antibiorésistance des souches isolées par Kitai *et al.* (2005) et Lee (2003) rapporte un taux de résistances associées de 100% à l'érythromycine, gentamycine, tétracycline, lincomycine, tylosine et triméthoprim-sulfaméthoxazole.

Les souches de SARM porcins présentent quasi constamment certaines résistances associées, comme aux tétracyclines par exemple, mais restent globalement peu multi-résistantes (sensibilité aux fluoroquinolones), à l'exception des macrolides (résistance d'environ 50%) (Jouy *et al.*, 2008).

Pour plusieurs études européens (Belgique, Pays-Bas et Danemark), si la co-résistance aux tétracyclines est observée à des taux très élevée, il convient d'y ajouter la co-résistance à d'autres familles d'antibiotiques comme les macrolides et apparentés (lincosamides), moins souvent les aminosides (kanamycine, gentamicine, tobramycine), voire le triméthoprim mais plus rarement le co-trimoxazole, association d'un sulfamide avec le triméthoprim (de Neeling *et al.*, 2007 ; Denis *et al.*, 2009 ; Guardabassi *et al.*, 2007). Divers gènes de résistance sont identifiés tels que *tetM* et *tetK* pour les tétracyclines, *ermC* et *ermA* pour le groupe des macrolides, lincosamides et synergistines.

La co-résistance aux antibiotiques des souches SARM d'origine porcine ou humaine est variable, elle est surtout rapportée vis-à-vis des seuls antibiotiques de la famille des tétracyclines, plus rarement de ceux de la famille des macrolides (van Loo *et al.*, 2007 ; Cuny *et al.*, 2009 ; Denis *et al.*, 2009).

Dans l'enquête conduite dans plusieurs régions d'Allemagne entre septembre 2007 et janvier 2009, 921 souches de SARM sont isolées respectivement chez des porcs et leurs éleveurs (47 fermes). 100% des souches sont résistantes à l'oxytétracycline (OT). Le pourcentage de souches OT-R est de 18% contre 30% pour les souches OT.Erythromycine.Clindamycine-R. D'autres phénotypes de résistance (< 11% des souches) sont rapportés tant vis-à-vis du co-trimoxazole que d'un aminoside comme la gentamicine, la résistance vis-à-vis des fluoroquinolones comme la ciprofloxacine ou la moxifloxacine restant faible (< 4%) (Cuny *et al.*, 2009).

Quelques données concernent l'identification de plusieurs gènes de résistance tels *tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermC* ou encore *ant4'* et *aph2-aac6'* (Witte *et al.*, 2007 ; Denis *et al.*, 2009). Enfin, l'ensemble de ces souches sont sensible aux antibiotiques ou agents antibactériens suivants : acide fusidique, fosfomycine, linézolide, rifampicine, glycopeptides (daptomycine, téicoplanine, vancomycine) et enfin mupirocine.

L'étude de Devriese *et al.* (1997) montre des taux de résistance à l'érythromycine chez le bovin comparativement très proches de nos résultats et des résultats trouvés par Werckenthin *et al.* (2001).

Dans l'étude de Botrel *et al.* (2010), les souches SARM ST5 isolées chez les bovins présentent une unique résistance associée (100%) aux tétracyclines.

L'étude de Mercier *et al.* (2003) sur l'antibiorésistance des souches de *S. aureus* isolées de lait de chèvre entre 1997 et 2000 évalue le taux de résistances associées à la spiramycine (39%), la dihydrostreptomycine (26%), la pénicilline (19%), l'oxacilline (6%) puis la lincomycine, l'érythromycine, la bacitracine et l'oxytétracycline (2%). Par rapport à une étude précédente datant de 1989, l'antibiorésistance de *S. aureus* d'origine caprine a augmenté.

Chez le cheval, la résistance des souches est associée en particulier aux tétracyclines, aux macrolides/lincosamides, à l'association sulfamide/triméthoprime et aux aminosides (kanamycine, tobramycine, gentamicine) (Haenni *et al.*, 2010).

Comme pour les souches d'origine animale, la co-résistance des SARM aux autres antibiotiques est moindre que celle de souches appartenant aux clones humains d'origine hospitalière, mais peut varier d'un pays à l'autre (van Loo *et al.*, 2007; Denis *et al.*, 2009). L'étude montre clairement la résistance des souches SARM ST398 d'origine humaine aux tétracyclines (78%), aux macrolides et apparentés (38-46%), la faible résistance aux fluoroquinolones comme la ciprofloxacine (3%) et aux aminosides comme la gentamicine (6%) ou la tobramycine (13%) et enfin, la sensibilité à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (co-trimoxazole), rifampicine ou encore à la mupirocine. Le traitement des infections invasives fait le plus souvent appel et avec succès aux glycopeptides (vancomycine, teicoplanine). En revanche, les souches SASM ST398 d'isolement humain sont le plus souvent sensibles (< 10% de souches résistantes) aux divers agents antistaphylococciques habituellement prescrits, à savoir les aminosides, les tétracyclines, les macrolides et apparentés, les fluoroquinolones ou encore le co-trimoxazole (Denis *et al.*, 2009). Plus récemment, une étude montre que la majorité des souches ST398 isolées dès 2006 reste sensible aux bêta-lactamines et aux autres antibiotiques, à l'exception des tétracyclines et des macrolides (Krziwanek *et al.*, 2009 ; Hartmeyer *et al.*, 2010).

En Algérie, les études de RAMDANI *et al.*, 2006 sur la prévalence des MRSA dans des hôpitaux du centre d'Alger ont conclu à une forte prévalence de portage de MRSA portant le gène *mec*.

L'étude d'Aouati *et al.* (2010) sur la prévalence des MRSA à l'est du pays évalue le taux chez l'homme à 32,78%.

Ces souches SARM expriment en plus une résistance à d'autres familles d'antibiotiques, essentiellement les macrolides (42,5%) et les aminosides (32%).

Dans une autre étude menée par Antri *et al.* (2009) sur la prévalence des infections communautaires et nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et portant le

gène de la leucocidine de Panton-Valentine dans l'Algérois, un fort taux de SARM-PVL+ aussi bien dans la communauté qu'en milieu hospitalier est trouvé. Les SARM hospitaliers PVL+ sont multirésistants aux antibiotiques, compliquant leur approche thérapeutique.

Selon ces études, l'Algérie se situe à un niveau de pays à forte prévalence de SARM, comme les USA et la France qui ont des taux respectifs de 53 et 33% (Onerba, 2005 ; Pillar *et al*, 2008). En revanche, ce taux de résistance reste moins élevé que celui de certains pays d'Europe : Grèce (44%), Italie (38%), Espagne (38%), Grande Bretagne (44%) et Irlande (42%) (Onerba, 2005). D'autres pays européens gardent une faible prévalence de SARM, comme la Belgique (13%) et l'Allemagne (5%) (Pillar *et al*. 2008). Et même en dessous de ce seuil pour la Hollande, le Danemark, la Suède et la Finlande (Onerba, 2005).

En Afrique, le taux de SARM en Tunisie est de 10% (Saidani *et al.*, 2006). Cette situation s'explique par l'importance de l'engagement des hôpitaux de ce pays dans des programmes conséquents de lutte anti-SARM (Onerba, 2005 ; Pillar *et al*, 2008). Ces programmes sont développés et mis en pratique depuis fort longtemps. Ils concernent la surveillance des infections nosocomiales et leur prévention, d'où une meilleure gestion du risque de leur survenue et une meilleure maîtrise de l'utilisation des antibiotiques (Antri *et al*, 2009).

## *Conclusion et perspectives*

## CONCLUSIONS

Au total, l'analyse microbiologique démontre que les souches de *S. aureus* isolées chez le poulet de chair et la dinde de chair sont multi résistantes. Un petit nombre d'entre elles sont résistantes à la méticilline.

La transmission de souche *MRSA* à l'homme a fait craindre la survenue d'une nouvelle zoonose dont l'ampleur et les conséquences pourraient être importantes notamment si les souches étaient multirésistantes aux antibiotiques. Ceci a justifié une réponse coordonnée et la mise en place de réseaux de surveillance. Actuellement, la situation apparaît toutefois comme relativement rassurante sans dissémination importante de ces souches dans la population générale. Il convient néanmoins de rester vigilant car les modifications génétiques des souches et une meilleure adaptation à l'homme sont toujours possibles, pouvant en modifier les caractéristiques épidémiologiques et celles de virulence. L'utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage doit par ailleurs être vivement encouragée, afin de mieux maîtriser l'évolution des souches vers la résistance et préserver l'activité des antibiotiques.

S'agissant des résistances associées chez les souches de SARM animales, il convient, là encore, de les analyser avec la plus grande prudence en raison du faible nombre de souches rapportées à ce jour dans la littérature, et plus particulièrement en France. Il peut sans doute être admis qu'une résistance associée aux tétracyclines est très classique, que des résistances aux macrolides/lincosamides sont décrites mais que ces souches restent encore sensibles aux fluoroquinolones. Comme on l'a vu, d'autres résistances ont également été rapportées chez certaines souches (sulfamides/triméthoprime), dont il conviendra d'affiner la représentativité.

Il convient, avant toute chose, de reconnaître et de déplorer la réalité de l'existence d'infections humaines dues à des souches de SARM d'origine animale. Au-delà de ce constat, l'analyse de risque doit également prendre en compte la nature des facteurs d'exposition. À ce stade des connaissances scientifiques sur le SARM animal, il peut sans doute être conclu que celui-ci est présent chez la plupart des espèces animales, avec une prévalence la mieux connue dans l'espèce porcine.

Nos résultats rappellent la place centrale du dépistage des animaux porteurs dans la lutte contre les SARM. Les conclusions à tirer doivent également tenir compte du peu de données

encore disponibles sur les niveaux de prévalence du SARM animal dans les filières autres que la filière volaille.

Ce travail devrait permettre, au fil du temps, de mieux documenter le risque global du SARM animal pour l'homme. Les données préliminaires sont néanmoins en faveur d'une prévalence très faible et donc, d'un risque limité.

## *Références bibliographiques*

***Référence:***

**AFSSA.** 2006. FARM 2003-2004 Rapport du programme français de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale.

AFSSA. 2006. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne.

**AFSSA.** 2007. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2006.

Arias C, *MRSA USA300 Clone and VREF — A U.S.–Colombian connection?* [archive], N Eng J Med, 2008;359:2177-2179

Arias C, *MRSA USA300 Clone and VREF — A U.S.–Colombian connection?* [archive], N Eng J Med, 2008;359:2177-2179 .

Armand-Lefevre, L., Ruimy, R., Andremont, A. 2005. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. Emerg Infect Dis. 11 :711–714.

Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods Question number: EFSA-Q-2008-300 Adopted: 5 March 2009 et étude d'évaluation (Avis de l'EFSA) [archive], 3 juin 2010

Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods Question number: EFSA-Q-2008-300 Adopted: 5 March 2009 et étude d'évaluation (Avis de l'EFSA) [archive], 3 juin 2010.

Aouati<sup>1</sup>, Arafa<sup>1</sup>, K. Benlabed<sup>1</sup>, Boulahrouf, Bousseboua et al. METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS AT UNIVERSITY HOSPITAL CENTER BEN BADIS OF CONSTANTINE-ALGERIA. Revue Tunisienne d'Infectiologie 2010; Vol.4, N°4 : 129 - 133

Ayliffe GAJ. The progressive intercontinental spread methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1997;24:S74-79.

## Références bibliographiques

Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, *et al.* Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton- Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis* 2004;189:1565-1573

Bryskier, A. 1999. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses, Paris.

Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, *et al.* Emergence of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:619-624

Chan R, Molassiotis A, Chan E, *et al.* Nurses' knowledge of and compliance with universal precautions in an acute care hospital. *Int J Nurs Stud* 2003;39:157-163

Charbonneau P, Parienti JJ, Thibon P, Ramakers M, Daubin C, du Cheyron D *et al.* Fluoroquinolone use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolation rates in hospitalized patients: a quasi experimental study [archive], *Clin Infect Dis*, 2006;42:778-84

Claire B. Andreasen *et al.* Staphylococcosis. *Poltry diseases* 2000 :797-804

Collignon P, Gorbell I, Vickery A, *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *Lancet* 1998;352:146-147.

Cooper BS, Stone SP, Kibbler CC, *et al.* Isolation measures in the hospital management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the literature [archive], *BMJ*, 2004;329:533

Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN *et al.* Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis [archive], *Clin Infect Dis*, 2003;36:53-59

Cotter, P. F. and R. L. Taylor, Jr. 1991. Differential resistance to *Staphylococcus aureus* challenge in two related lines of chickens. *Poult Sci* 70:1357—1361.

## Références bibliographiques

- Cox RA, Conquest C, Mallaghan C, *et al.* A major outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage type (EMRSA-16). *J Hosp Infect* 1995;29:87-106.
- Cuny, C., Friedrich, A., Kozytska, S., Layer, F., Nübel, U., Ohlsen, K., Strommenger, B., Walther, B., Wieler, L., Witte, W. 2010. Emergence of methicillin-resistant.
- Daum, R. S., A. Fattom, S. Freese, and W. Karakawa. 1994. Capsular polysaccharide serotypes of coagulase-positive staphylococci associated with tenosynovitis, osteomyelitis, and other invasive infections in chickens and turkeys: Evidence for new capsular types. *Avian Dis* 38:762—771.
- De San N, Denis O, Gasasira MF, De Mendonca R, Nonhoff C, Struelens MJ, *Controlled evaluation of the IDI-MRSA assay for the detection of colonization by methicillin-resistant Staphylococcus aureus in diverse mucocutaneous specimens* [archive], *J Clin Microbiol*, 2007;45:1098-101
- Dennis Stevens. Genetics of MRSA: The United States and Worldwide: livre MRSA.2007 ; 228 : 31
- Dibner, J. J., and J. D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 84:634-43.
- Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL *et als.* *Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with Staphylococcus aureus surgical site infection* [archive], *Clin Infect Dis*, 2003;36:592-8
- Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL *et als.* *Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with Staphylococcus aureus infection* [archive], *Clin Infect Dis*, 2006;38:992-0
- Fergie J, Purcell K. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:860-863 C-CLIN Paris-Nord. Enquête nationale de prévalence 1996.

## Références bibliographiques

Fergie J, Purcell K. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:860-863

Francis JS, Doherty MC, Lopatin U. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton- Valentine leukocidin gene. *Clin Infect Dis* 2005;40:100-107

<http://www.cclinparisnord.org/ENP/ENP1996/resumpreval96.pdf>

[http://www.onerba.org/download/guide\\_onerba.pdf](http://www.onerba.org/download/guide_onerba.pdf)

J.S. Weese , H. Dick , B.M. Willey ,A. McGeer c, B.N. Kreiswirth ,B. Innis , D.E. Low. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. 2006

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec* encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1549-1555.

Klevens M, Morrison MA, Nadle J, *Invasive methicillin-resistant staphylococcus aureus infections in the United States* [archive], *JAMA*, 2007;298:1763-1771

Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC et Als. *Changes in the epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in intensive care units in U.S. hospitals, 1992-2003*, *Clin Infect Dis*, 2006;42:389-391

Kluytmans J, Struelens M, *Meticillin resistant Staphylococcus aureus in the hospital* [archive], *BMJ*, 2009;338:b364

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H, *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks* [archive], *Clin Microbiol Rev*, 1997;10:505-20

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H, *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks* [archive], *Clin Microbiol Rev*, 1997;10:505-20

## Références bibliographiques

Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, and J. J. Collins. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130:797-810.

Lacey S, Flaxman D, Scales J, *et al.* The usefulness of masks in preventing transient carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by healthcare workers. *J Hosp Infect* 2001;48:308-311.

Laupland KB, Ross T, Gregson DB, *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000-2006 [archive], *Clin Infect Dis*, 2008;198:336-43

Loeb M, Main C, Walker-Dilks C, Eady A, *Antimicrobial drugs for treating methicillin resistant Staphylococcus aureus colonisation* [archive], *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(3):CD003340

Lucet JC, Chevret S, Durand-Zaleski I, *et al.* Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit. *Arch Intern Med* 2003;163:181-188

Martinez, M., P. Toutain, and R. Walker. 2006. The pharmacokinetic Pharmacodynamic (PK/PD) relationship of antimicrobial agents, p. 81-106. In S. Giguère, J. Prescott, J. Desmond Baggot, R. Walker, and P. Dowling (ed.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Blackwell Publishing, Oxford

Merrer J, Santoli F, Appéré-De-Vecchi C, *et al.* « Colonization pressure » and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:718-72

Naas T, Fortineau N, Spicq C, *et al.* Three-year survey of community-acquired *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a French university hospital. *J Hosp Infect* 2005;6:321-329.

Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques. Recommandations méthodologiques pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques dans les laboratoires de microbiologie.

## Références bibliographiques

Patrick G. Guilfoile, Ph.D. ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA.2007; 467: 76

Quenon JL, Eveillard M, Vivien A, *et al.* Evaluation of current practices in surgical antimicrobial prophylaxis in primary total hip prosthesis- a multicentre survey in private and public French hospitals. *J Hosp Infect* 2004;56:202-207.

Ramdani, Bes, Mengnier, Forey et al. Detection oh Mthecillin Resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the panton valentine leukocidin genes in an Algerians hospital.2006; 50(3):1083-1086

Richard G. Wax, Kim Lewis Abigail A. Salyers, Harry Taber. Bacterial Resistance to Antimicrobials.2008 ;466 :291

Schwarz, S., C. Kehrenberg, and T. R. Walsh. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* 17:431-7.

Shelley Rankin , Scott Roberts , Kathleen O'Shea , Donna Maloney ,Marianne Lorenzo , Charles E. Benson. Panton valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. 2005

Soulsby, L. 2007. Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus. *J Antimicrob Chemother* 60 Suppl 1:i77-8.

Stan Deresinski. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey.2000

*Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol.* 300: 109–117

Steinberg J, Clark C, Hackman B. Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980-1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect Dis* 1996;23:255-259.

## *Références bibliographiques*

Tipper, D. J. 1985. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther.* 2000;36:1653-1659

van Belkum, A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, *et al.* Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 1998;36:1653-1659

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9:978-984.

Velasco D, del Mar Tomas M, *et al.* Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:379-382.

Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:50-55.

Wooton SH, Arnold K, Hill HA, *et al.* Intervention to reduce the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections in a correctional facility in Georgia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:402-407.

*Annexe*

## I. VERRERIE ET AUTRE MATERIEL

- Boite de Petri
- Pipettes pasteurs
- Pipettes automatiques
- Tubes Eppendorfs
- Portoirs en plastique
- Eprouvette

## II. APPAREILLAGE

- Fourneau
- Bain marie
- Buc bunsen
- vortex
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Congélateur
- Stérilisateur
- Incubateur

## III. REACTIFS ET SOLUTIONS

- Sang de mouton
- eaux filtrée et stérilisée
- eau distillée
- disques d'antibiotiques
- Slidex MRSA detection (bioMérieux)

- **Milieux CHAPMAN**

### Usage

Il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus*. Dans les pays anglo-saxons, une variante de ce milieu est appelée MSA (mannitol-salt-agar = gélose au mannitol et au sel).

### Caractéristiques

- Une base nutritive ordinaire.
- Une teneur élevée en NaCl qui permet la sélection des bactéries halophiles (comme les *Staphylococcus*) et inhibe la grande majorité des autres bactéries.
- Un critère de différenciation : la fermentation du mannitol révélé grâce au virage de l'indicateur coloré de pH : le rouge de phénol qui permet une orientation vers certaines espèces (comme l'espèce *Staphylococcus aureus*).

Composition pour la préparation d'un litre de milieu.

- Peptone :.....10,0 g
- Extrait de viande de bœuf :.....1,0 g
- Chlorure de sodium :.....75,0 g
- Mannitol :.....10,0 g
- Rouge de phénol :.....0,025 g
- Agar-Agar :.....15,0 g
- Eau distillée :.....qsp 1 Litre

$$pH = 7,4$$

### Préparation

111 g par litre de milieu Autoclavage classique.

### • Gélose Baird Parker

#### Usages

Numération de *Staphylococcus aureus* en microbiologie alimentaire. Isolement des *Staphylococcus aureus*. Il peut être aussi utilisé pour l'identification de *S. aureus* en complément d'autres tests (Thermonucléase et Staphylocoagulase)

#### Composition

Composition pour la préparation d'un Litre de milieu.

- Peptone :..... 10,0 g
- Extrait de viande de bœuf :..... 4,0 g
- Extrait de levure :..... 2,0 g
- Pyruvate de sodium : .....10,0 g
- Glycocolle.....12,0 g
- Chlorure de lithium :..... 5,0 g
- Agar-agar :..... 20,0 g

A ajouter en conditions stériles juste avant l'ensemencement (sinon détruit par l'autoclavage) :

- Émulsion de jaune d'œuf (*stérile*) : .....50,0 ml
- Tellurite de potassium (*stérile*):.....0,1 g

$$pH \text{ du milieu} = 7,2$$

### Préparation

63 g par litre. Le milieu de base est autoclavé. Le tellurite de potassium et jaune d'œuf sont ajoutés ensuite à raison de 1 ml pour 20 ml de milieu de base

### • Gélose ADN-Bleu de toluidine

La gélose à ADN au bleu de toluidine est utilisée pour déterminer la présence d'une activité nucléase chez un micro-organisme.

En routine, on l'utilise pour identifier l'expression d'une DNase thermorésistante (ou thermonucléase) caractéristique de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

#### Composition

- ADN ..... 0,3 g
- Solution de Bleu de toluidine (0,1 mol/μL) ..... 3 mL
- Tampon TRIS pH 9 (50 mmol/μL) ..... 1 μL
- Solution de chlorure de calcium (10 mmol/μL) ... 1 mL
- Chlorure de sodium ..... 10 g
- Agar-agar..... 10 g

(pH = 9)

#### Recherche de la DNase thermostable ou Thermonucléase

La DNase thermostable est une enzyme qui résiste à la chaleur (100 °C pendant 15 minutes) et qui dégrade l'ADN selon la réaction :



Ensemencer un bouillon cœur-cervelle pendant 24 heures à 37 °C avec la souche à étudier.

En placer, une partie 15 min au bain-marie (100 °C) et conserver le reste.

Percer la gélose de 3 trous. Inoculer quelques gouttes :

- De bouillon stérile dans le premier puits. (contrôle négatif)
- De bouillon chauffé le second puits.
- De bouillon non chauffé dans le troisième. (facultatif - contrôle positif)

Incuber 4 heures à 37 °C.

- Columbia au sang / ANC

#### Composition

- Amidon 1,0 g
- chlorure de sodium 5,0 g
- agar 10,0 g
- sang 50,0 ml
- acide nalidixique 15,0 mg
- colimycine 15,0 mg
- pH = 7,3

### **Préparation**

42,5 g par litre. Stérilisation classique. Le sang est ajouté après retour de la gélose à 45 °C.

#### **• Plasma de Lapin lyophilisé**

Le Plasma de Lapin, recueilli sur EDTA et lyophilisé, est utilisé pour la mise en évidence de la staphylocoagulase. La coagulase, enzyme capable de coaguler le plasma sanguin.

### **Mode d'emploi**

- Reprendre le lyophilisat en y ajoutant aseptiquement 6 mL d'eau distillée stérile.
- Agiter le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse.
- Dans un tube à hémolyse introduire successivement :  
0,3 mL de Plasma de Lapin reconstitué.  
0,1 mL d'une culture de 24 heures pratiquée sur un bouillon coeur-cervelle (BK015), à partir du staphylocoque à tester.
- Bien homogénéiser.
- Incuber les tubes au bain d'eau thermostaté à 37°C.