

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'obtention du diplôme de Master Complémentaire en Médecine Vétérinaire

**Etude de l'antibiorésistance de *Staphylococcus aureus* isolées du lait
cru de citernes.**

Présenté par : Mlle. LEBDJIRI kaouther.

Soutenu le : jeudi 21 décembre 2017.

Devant le jury composé de :

- | | | | |
|-----------------|------------------|-------------------------------|--------------|
| - Président : | Dr. BOUAYAD L | Maitre de conférence classe A | ENSV d'Alger |
| - Promoteur : | Dr. MATALLAH A.M | Maitre-assistante classe A | ENSV d'Alger |
| - Examineur 1 : | Dr.Zenad W | Maitre-assistante classe A | ENSV d'Alger |
| - Examineur 2 : | Dr.Ferhat L | Maitre-assistante classe A | ENSV d'Alger |

Année universitaire :

2016-2017

Remerciement

Je remercie dieu le tout puissant qui m'a donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Qu'il me soit permis de remercier tous ceux qui d'une manière ou d'une autre, de près ou de loin, y ont contribué.

A madame **BOUAYAD L**, maitre de conférence classe A

, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury, hommage respectueux.

A madame **MATALLAH A.M**, maitre assistante classe A de l'ENSV,

Qui m'a fait l'honneur d'encadrer mon travail, qu'elle trouve ici l'expression de mon respect et de ma reconnaissance.

A madame **FERHAT L**, et madame **ZENAD W**, maitres assistantes classe A de l'ENSV,

Qui m'ont fait l'honneur de prendre part à ce jury, sincères remerciements.

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à :

Mon père et ma mère qui m'ont toujours entouré et motivé à sans cesse devenir meilleure ;

Mes sœurs et mon frère

Qui m'ont assisté dans ces moment difficiles et m'ont servi d'exemple.

Dédicace

A mon père,

« L'épaule solide, l'œil attentif, compréhensif, la personne la plus digne de mon estime et de mon respect »

Pour avoir fait de moi ce que je suis, sans ton soutien à tous niveaux, je n'y serais jamais arrivée.

A ma mère,

« La plus belle des créatures que dieu créa sur terre... la source de tendresse, de patience et de générosité... »

Avec courage et dignité tu as subi les souffrances du monde, espérant édifier un avenir meilleur à tes enfants, ton courage et ton dévouement resteront gravés en moi. Que dieu te garde longtemps auprès de nous.

A mes sœurs et mon frère,

Pour vous dire que mon souhait ardent est la compréhension, l'entente, la solidarité et enfin une famille unie.

A mes grands-parents,

Ce travail est le prix de vos prières

A mon encadreur DR.MATALLAH Asmaa Manel

Pour sa confiance, ses conseils et l'attention portée à mon travail, ainsi que pour tous ses encouragements pendant toute la durée de ce travail et pour les nombreuses discussions fructueuses que j'ai eu. Qu'elle trouve dans ce mémoire l'expression de ma profonde gratitude.

A mes amis d'ici et d'ailleurs,

Pour ces années pleines d'amitié, pour votre compagne tout au long de mon chemin

A mes camarades de promotion,

Pour avoir partagé ensemble les joies et les peines.

Abréviations

- AA : acide aminé
- ADH : Arginine-dehydrolase
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AG : acides gras
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ARNr : acide ribonucléique
- ARNt : acide ribonucléique de transfert
- ATB : antibiotique
- Aw : activité d'eau
- BP : Baird-parker
- CMI : concentration minimale inhibitrice
- *S.aureus* : *Staphylococcus aureus*
- ENSV : école nationale supérieure vétérinaire
- G+C : contenu en guanine et cytosine de l'ADN
- GISA : Glycopeptides Intermediate *Staphylococcus aureus*
- GN : gélose nutritive
- HIDAOA : hygiène et industrie des denrées alimentaire d'origine animale
- IS : séquence d'insertion
- MG : matière grasse
- MLS : Macrolides, Lincosamides. Streptogramine
- Opt : optimal
- PLP : Protéines de liaison à la pénicilline
- SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
- SCC : Staphylococcal Chromosomal Cassette
- VISA : Vancomycine Intermediate *Staphylococcus aureus*
- μ : micron

Liste des figures

Figure1 :	Mode d'action des antibiotiques	Page 13
Figure2 :	Schéma illustrant le développement de la résistance aux antibiotiques	Page 15
Figure3 :	Différents moyens pour le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques	Page 17
Figure4 :	Mécanisme de résistance par altération (ou modification) des sites de liaison	Page 19
Figure5 :	Voies possibles de la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques origines animales aux humains	Page 22
Figure6 :	Exemple de la détermination de la CMI par la méthode des dilutions sériées	Page 29
Figure7 :	Exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés	Page 30
Figure8 :	Exemple de courbe de concordance avec détermination des diamètres discriminants à partir des CMI discriminantes	Page 30
Figure9 :	Pourcentage des souches de <i>S.aureus</i> multirésistantes	Page 43
Figure 10 :	Sensibilité des souches de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques	Page 45

Liste des tableaux

Tableau1 :	Caractéristiques physiques du lait de vache	Page 3
Tableau2 :	Composition moyenne du lait de différentes espèces animales	Page 4
Tableau3 :	Différents caractères bactériologiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	Page 8
Tableau4 :	Principaux mécanismes, supports et phénotypes de résistances acquises aux aminosides	Page 25
Tableau5 :	Pourcentage des souches de <i>S.aureus</i> multirésistantes	Page 43
Tableau6 :	Résultats de l'antibiogramme des souches de <i>S.aureus</i> (n = 20)	Page 44
Tableau7 :	Liste des antibiotiques à tester	
Tableau8 :	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Staphylococcus aureus</i>	
Tableau9 :	Résultats de l'antibiogramme de 20 souches de <i>S.aureus</i>	

Liste des photos

Photo 1 :	Micropipette de 0,1 Ml	Page 32
Photo 2 :	Embouts de précision de 0,1 Ml	Page 32
Photo 3 :	Tube de dilution stérile	Page 32
Photo 4 :	Vortex	Page 32
Photo 5 :	Pipette pasteur	Page 32
Photo 6 :	Incubateur	Page 32
Photo 7 :	Cartouches des disques d'antibiotiques	Page 33
Photo 8 :	Souche conservée sur Gélose nutritive inclinée	Page 34
Photo 9 :	Pipette pasteur boulée	Page 34
Photo 10 :	Boite de pétri après poussée des bactéries	Page 34
Photo 11 :	Poussée de la colonie caractéristique sur GN	Page 35
Photo 12 :	Résultat positif du test de catalase	Page 36
Photo 13 :	Résultat positif du test de coagulase	Page 37
Photo 14 :	Prélèvement des colonies	Page 38
Photo 15 :	Dépôt d'un disque d'antibiotique	Page 40
Photo 16 :	Dépôt de 5 antibiotiques sur la boite de Pétri	Page 41
Photo 17 :	Boite de Pétri après incubation	Page 42

Table des matières

Introduction	Page 1
Etude bibliographique	
CHAPITRE I : Généralités sur le lait	
I. Définition	Page 3
II. Caractéristiques du lait cru	Page 3
III. Constituants du lait	Page 4
IV. Modes de contamination du lait	Page 4
V. Mammites	Page 5
V.1. Importance des mammites à <i>S.aureus</i>	Page 5
V.2. Classification des mammites à <i>S.aureus</i>	Page 5
V.2.1. La mammite clinique	Page 5
V.2.2. La mammite subclinique	Page 6
CHAPITRE II : <i>Staphylococcus aureus</i>	
I. Introduction	Page 7
II. Taxonomie	Page 7
III. Etude bactériologique	Page 8
IV. Habitat. Rôle pathogène	Page 9
V. Substances élaborées par les staphylocoques pathogènes « <i>S .aureus</i> »	Page 10
V.1. Des toxines	Page 10
V.2. Des enzymes	Page 11
CHAPITRE III : La résistance aux antibiotiques	
I. Les antibiotiques	Page 12
I.1. Définition	Page 12
I.2. Mode d'action des antibiotiques	Page 12
I.3. critères de classification des antibiotiques	Page 13
I.4. La résistance aux antibiotiques	Page 14
II. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique	Page 15
II.1. Résistance naturelle	Page 15

II.2.	Résistance acquise	Page 16
II.3.	Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	Page 18
II.3.1.	Résistance par inhibition enzymatique	Page 18
II.3.2.	Réduction de la perméabilité cellulaire	Page 18
II.3.3.	Altération (ou modification) des sites de liaison	Page 19
II.3.4.	Pompes (transporteurs) à efflux	Page 20
III.	Diffusion des bactéries résistantes entre l'animal et l'Homme	Page 20

CHAPITRE IV : l'Antibiorésistance de *Staphylococcus aureus*

I.	Résistance à la pénicilline	Page 23
II.	Résistance à la méticilline	Page 23
III.	Résistance aux aminosides	Page 24
IV.	Résistance aux glycopeptides	Page 25
V.	Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramine (MLS)	Page 26
VI.	Résistance aux fluotoquinolones	Page 27
VII.	Autres résistances	Page 28
VIII.	Evaluation de l'antibiorésistance	Page 28
VIII.1.	Méthodes de test de la sensibilité bactérienne	Page 28
VIII.2.	Etablissement de la courbe de concordance	Page 30

Etude expérimentale

	Objectif	Page 31
I.	Matériel et méthode	Page 31
II.	Résultats et discussion	Page 42
III.	Conclusion	Page 47
IV.	Recommandations	Page 48

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Les zoonoses sont des infections et des maladies qui sont naturellement transmissibles de l'animal à l'Homme et inversement. La gravité de ces maladies chez l'homme peut varier selon l'origine principale de l'infection (EFSA, 2008). La surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale permet de collecter un ensemble de données afin de caractériser les tendances, de détecter de nouveaux événements à l'origine d'une alerte, de documenter le niveau de résistance de différentes espèces bactériennes et enfin d'étudier l'émergence de nouveaux sérotypes dotés de profils de résistance aux antibiotiques (Chardon et al, 2014).

Les agents antimicrobiens, en particulier les antibiotiques, sont des médicaments vétérinaires utilisés dans les élevages laitiers pour le traitement et la prévention de diverses maladies. Ils sont également utilisés pour améliorer les aliments et augmenter la production laitière. Ils sont aussi utilisés comme un promoteur de croissance (Sharma et al, 2011). Néanmoins, des bactéries zoonotiques développent une résistance à ces agents antimicrobiens. L'émergence de ces bactéries résistantes aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique mondiale qui touche la médecine humaine et vétérinaire (Chardon et al, 2014).

De nombreux auteurs ont observé que l'administration d'antibiotiques aux animaux laitiers constitue un facteur majeur de sélection de bactéries multi résistantes (Resapath, 2013).

La flore bactérienne commensale peut former un réservoir de gènes de résistance et elle peut être augmentée considérablement par le transfert horizontal d'éléments génétiques tels que des plasmides par conjugaison (EFSA, 2008). Parmi ces flores commensales, *Staphylococcus aureus* et les entérobactéries peuvent être à l'origine d'infections chez l'homme et les animaux d'élevage (Ben hania et al, 2017).

Le lait cru peut contenir des microorganismes pathogènes et il peut occasionnellement jouer un rôle dans la transmission de ces bactéries pathogènes à l'homme. Parmi les bactéries pathogènes les plus isolées du lait qui provoquent des maladies, nous pouvons citer *Salmonella*, *Echerichia coli*, *Brucella*, *S.aureus* et *Listeria* (Abera et al, 2016). Ces souches pathogènes pour l'homme et l'animal, pouvant avoir acquis des résistances aux multiples antibiotiques (Bashir, 2014).

Cependant, la contamination du lait cru par des bactéries multi résistantes aux antibiotiques peut constituer un risque potentiel pour la colonisation des consommateurs et des professionnels (Marshall et al, 2011). En raison de ce risque, l'évaluation de la qualité sanitaire et hygiénique du lait cru destiné à la consommation ou à la transformation est essentielle et doit être sévèrement contrôlée. Elle indique aussi si l'animal producteur est en bonne santé, et si la traite a été faite dans des conditions hygiéniques (Chazi et al, 2011).

S.aureus est un microorganisme présent comme un commensal sur la peau, le nez et les muqueuses de l'Homme et des animaux en bonne santé, y compris les animaux d'élevage (**Lozano et al, 2016**). Cependant, il existe également des souches virulentes de *S.aureus* qui sont attribuées à la présence de facteurs de virulence incluant des protéines de surface, des toxines et des enzymes.

En outre, ces souches ont la capacité de développer rapidement une résistance à n'importe quel antibiotique (**Sabouni, 2014**). Les infections causées par cet agent peuvent varier d'une infection cutanée relativement mineure à des maladies mortelles. Il constitue également un agent pathogène principal de la mammite (**Teshome et al, 2016**).

L'épidémiologie de *S.aureus* chez les animaux a suscité de l'intérêt ces dernières années, non seulement en raison de leur importance dans la médecine vétérinaire mais aussi, en raison de l'augmentation des épisodes infectieux causés par ce pathogène (en particulier par des souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline (SARM).

Cette étude a été réalisée afin de déterminer la résistance de 20 souches de *S.aureus* préalablement isolées du lait cru vis-à-vis de 13 molécules d'antibiotiques les plus utilisés en médecine vétérinaire, elle est constituée de deux parties :

- Une partie bibliographique ;
- Une partie expérimentale qui comprend :
 - ❖ l'échantillonnage ;
 - ❖ Matériel et Méthode ;
 - ❖ Résultats et Discussion ;
 - ❖ Conclusion ;
 - ❖ Recommandations ;

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE1 : Généralités sur le lait

I. Définition :

- ❖ Le lait est le produit des glandes mammaires des mammifères femelles. C'est un liquide biologique comestible généralement de couleur blanchâtre, il a aussi été défini par le 1^{er} congrès international pour la répression des fraudes alimentaires tenu à Genève en 1908 comme étant : « le produit de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum ».
- ❖ Selon la réglementation algérienne, la dénomination « lait » est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenue par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction et n'ayant pas été soumis à un traitement thermique (**Anonyme 1**).

II. Caractéristiques du lait cru :

- ❖ C'est un liquide blanc au goût légèrement douceâtre de haute valeur nutritive aussi bien pour l'homme que pour les mammifères.
- ❖ Le lait est un liquide opaque, blanc mat, plus ou moins jaunâtre, due à une suspension colloïdale formée par la matière grasse et les protides.

Le tableau ci-dessous montre les caractéristiques physiques du lait

Tableau1 : caractéristiques physiques du lait de vache (Larpen, 1990).

Paramètres	Valeurs
PH (20°)	6,5 à 6,7
Acidité titrable (D°)	16 à 18° D
Densité (20°c)	1.023 à 1.040
Point de congélation	-0.518°C à -0.534°C
Point d'ébullition	100.17°C
1 litre de lait	1032g

III. Constituants du lait :

Le lait est un complexe nutritionnel qui contient plus de cent substances différentes qui sont en solution, en émulsion ou en suspension dans l'eau qui représente environ 90% de sa composition (Wattiaux, 2001).

Les principaux constituants du lait sont :

- De l'eau, très majoritaire.
- Des glucides, principalement représentés par le lactose.
- Des lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras.
- Des protéines, caséines rassemblés en micelles, albumines et globulines solubles.
- Des sels et des minéraux à l'état ionique et moléculaires.
- Des éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important : enzymes, vitamines, oligoéléments ... (Kuzdzal et al, 1980).

Le tableau suivant montre la composition moyenne du lait de différentes espèces animales

Tableau2 : Composition moyenne du lait de différentes espèces animales (Vignola, 2002).

Animaux	Eau (%)	Matière grasse(%)	Protéines (%)	Glucides (%)	Minéraux (%)
Vache	87.5	3.7	3.2	4.6	0.8
Chèvre	87.0	3.8	2.9	4.4	0.9
Brebis	81.5	7.4	5.3	4.8	1.0
Chamelle	87.6	5.4	3.0	3.3	0.7
Jument	88.9	1.9	2.5	6.2	0.5
Femme	87.1	4.5	3.6	7.1	0.2

IV. Modes de contamination du lait :

- ✓ Contamination par l'animal :

Lorsque l'animal est sous médication, son lait renferme des résidus d'antibiotiques qui sont à l'origine de perturbations importantes des processus de fermentation et de maturation des produits laitiers (Ben mahdi et al, 2009).

Le canal du trayon est toujours contaminé, même chez un animal sain ; de ce fait, les premiers jets de lait obtenus lors de la traite doivent être éliminés. L'extérieur de la mamelle est

toujours chargé en germes ; l'importance de la charge, qui est liée aux conditions de la propreté de la stabulation, représente une source de contamination majeure du lait (**Boudier et al, 1987**).

✓ Contamination au cours de la traite :

C'est en surface des trayons que l'on retrouve la plus grande diversité de groupes microbiens. Dans le lactoduc et l'air de traite, la diversité microbienne est moindre puisque seuls quelques groupes microbiens sont systématiquement présents (**Lemire, 2007**).

✓ Contamination au cours du transport :

Une altération au cours du transport par une mauvaise réfrigération, peut avoir un impact grave sur la qualité du lait et engendrer des pertes financières importantes (**Jacob et al, 2011**).

✓ Contamination du lait cru au stade de la production :

Le lait cru doit être toujours maintenu au froid. La durée de conservation de ce lait est courte en raison de la possibilité du développement des germes psychrotrophes et psychrophiles (quelque jours) (**Guinard et al, 1980**).

V. Mammites :

Les mammites sont définies comme des conditions inflammatoires de la glande mammaire en réponse à une blessure, qui servent à détruire et neutraliser les agents infectieux et à promouvoir la guérison et le retour à un fonctionnement normal de la glande mammaire.

V.1. Importance des mammites à *S.aureus* :

Staphylococcus aureus est considéré comme étant l'agent pathogène mammaire causant les plus grandes pertes économiques au niveau de l'industrie des bovins laitiers. Les infections causées par *S.aureus* sont plus dommageables pour le tissu sécrétoire suite à la production de toxine par cet organisme (**Akers, 2002**). Les mammites causées par *S.aureus* peuvent devenir chroniques étant donné la capacité de la bactérie à se localiser à l'intérieur des cellules empêchant ainsi le système immunitaire de la reconnaître et de l'éliminer (**Akers, 2002 ; Barkema et al, 2006**).

V.2. Classification des mammites à *S.aureus* :

V.2.1. La mammitte clinique :

Une mammitte clinique est définie comme l'inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle associée à des signes cliniques. Il est possible de différencier les mammites aiguës, voire suraiguës, caractérisées par des symptômes généraux très marqués (inflammation violente du quartier, hyperthermie, choc toxinique) des mammites subaiguës où seule la modification macroscopique du lait est observée (**Serieys, 1995**).

- La mammite suraigüe gangréneuse : Dans quelques rares cas, on peut observer une mammite suraigüe, dont le déclenchement est très brutal. Les vaches présentent initialement une température rectale élevée (41- 42 °C). Le quartier atteint est fortement enflé et douloureux, le lait est très modifié (séreux voire sanguinolent) Le quartier manifeste peu après des signes de gangrène ischémique, avec des plaques bleuâtres visibles à la surface cutanée. La mort de l'animal est possible, sinon un sillon nécrotique se développe, ce qui aboutit à la perte physique de la glande atteinte. Dans les formes suraigües gangréneuses, un œdème sous cutané avec une forte congestion vasculaire sont présents. Le tissu mammaire, ferme et ischémique, ne sécrète plus le lait, le liquide qui envahit les canaux et les citernes est séreux, sanguinolent avec des flammèches de fibrines (**Rainard et al, 2010 ; Prescott et al, 2011**).
- La mammite clinique aigüe : Le quartier infecté est chaud, enflé, sensible. Des grumeaux sont visibles dans le lait, dont la concentration cellulaire est fortement augmentée. Il peut y avoir des symptômes généraux, avec hyperthermie, ralentissement ruminal et perte d'appétit (**Rainard et al, 2010 ; Prescott et al 2011**).
- La mammite chronique : Le passage à la chronicité est l'issue la plus fréquente. Les infections à *S.aureus* de la mamelle sont notoirement difficiles à traiter, ce qui conduit à la formation d'une infection chronique avec une fibrose extensive et une induration de la mamelle (**Prescott et al, 2011**). Environ 80% des nouvelles infections persistent pendant toute la lactation, sans traitement l'infection n'est pas éliminée pendant le tarissement. Elle est retrouvée lors de la lactation suivante et pourrait persister des années en l'absence de traitement ou de réforme (**Rainard et al, 2010**).

VI.2.2. La mammite subclinique :

Dans la grande majorité des cas, la phase clinique de courte durée est suivie d'un passage à un état subclinique sans symptômes généraux ; celle-ci est associée à des perturbations locales peu ou pas détectables par l'éleveur. Seule l'élévation de la concentration cellulaire du lait persiste, avec des fluctuations généralement entre 200 000 et 2 millions de cellules/MI (**Rainard et al, 2010**).

Il convient de signaler que, le nombre de cellules présentes dans le lait est étroitement associé à l'inflammation et la santé de la glande mammaire. La mammite subclinique est 2 à 3 fois plus fréquente que la mammite clinique selon le type de l'agent pathogène présent dans le troupeau (**Levesque, 2006**).

CHAPITRE 2 : *Staphylococcus aureus*

I. Introduction :

S. aureus appartient à la famille des *Micrococcaceae* et au genre *Staphylococcus* qui regroupe 41 espèces reconnues jusqu'à présent (**Gillaspy et al., 2009**).

C'est en l'an 1880 que la première description d'une infection suppurative par un staphylocoque a été observée en Écosse et a été nommée par le chirurgien Alexander Ogston (**Ogston, 1984**). L'adjectif *aureus* (ou "or" en latin) lui a été attribué en 1884 par Anton J. Rosenbach suite à la couleur formée par les colonies sur milieu nutritive (sang) (**Rosenbach, 1884**).

S. aureus est une coque à Gram positif d'environ 0,7 à 1,2 micromètre de diamètre qui se trouve seul, en paires ou en grappe dans divers milieux liquides et solides. Cette bactérie aérobie ou anaérobie facultative a une température optimale de croissance de 37 °C lui conférant le caractère de mésophile.

S. aureus est considérée avant tout comme une bactérie commensale. En effet, elle fait partie de la microflore normale de la peau, du tractus intestinal et du nasopharynx. Certaines souches infectent les mammifères incluant l'humain. C'est le staphylocoque à coagulase positif le plus isolé des infections humaines, il est capable de produire l'enzyme menant à la coagulation du plasma sanguin. Lorsque cette bactérie se transmet d'un individu malade à l'autre, change d'habitat normal ou est exposée à une situation de stress, elle s'attache, colonise et déchaîne ses facteurs de virulence multiples. De ce fait, *S. aureus* présente un danger de santé publique, que ce soit au niveau médical ou alimentaire (**Lynn, 2014**).

II. Taxonomie :

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

- ✓ **Classe** : Bacilli
- ✓ **Ordre** : Bacillales
- ✓ **Famille** : Staphylococcaceae
- ✓ **Genre** : Staphylococcus
- ✓ **Espèce** : *Staphylococcus aureus* (**Prescott et al, 2010**).

III. Etude bactériologique :

Tableau 3 : Différents caractères bactériologiques de *Staphylococcus aureus* (Prescott et al, 2010)

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

❖ **Caractères cultureux :**

- Sur gélose nutritive : on obtient des colonies arrondies, bombées, luisantes, opaques, à contours nets, pigmentés après 24 à 36h, pouvant alors présenter :
 - une coloration ocre-jaune ; c'est le cas de la majorité des souches de *S.aureus* ;
 - une teinte blanche, porcelainée : il peut s'agir alors de *S.aureus*, de *S.epidermitis* ou de *S.saprophyticus*
- En bouillon nutritif : on observe en 24h, un trouble uniforme abondant, puis un dépôt et un voile
- pelliculaire en surface
- Sur milieu Chapman : Les *S.aureus* fermentent le mannitol (virage de l'indicateur de couleur).

➤ Sur milieu Baird Parker au tellurite : présence de colonies noires avec halo clair.

S.aureus est capable de croître sur une large gamme de milieux de culture, sélectifs ou non sélectifs. Sur une gélose au sang, les souches « typiques » de *S.aureus* donnent des colonies lisses, convexes avec des diamètres de 1~3 mm, de couleur jaune dorée due aux caroténoïdes, et sont souvent hémolytiques (Fereney, 2007)

IV. Habitat. Rôle pathogène :

Les staphylocoques sont des bactéries très répandues dans la nature, aussi bien dans l'air que dans le sol ou dans l'eau.

Ce sont des commensaux extrêmement fréquents de la peau et des cavités naturelles de l'homme et des animaux (avec une prédominance pour les fosses nasales et le périnée) : la plupart des espèces rencontrées sont opportunistes (*S.epidermidis*, *S.saprophyticus*) ; d'autres peuvent être occasionnellement pathogènes (*S.aureus*).

En **pathologie humaine et animale** leur rôle est très important :

➤ **Chez l'Homme**, les infections staphylococciques sont fréquentes et très variées.

Ces bacilles peuvent être responsables :

- De **suppuration** : furoncle (Pasteur découvrit le staphylocoque dans le pus d'un furoncle en 1880), anthrax (résultant du groupement de plusieurs furoncles), abcès superficiels ou profonds (périphériques ou pulmonaires), phlegmons, pleurésies, péritonites, arthrites, infections osseuses (ostéomyélites), etc. Certaines de ces lésions suppurées ont un aspect nécrotiques ;
- **De septicémies** (thrombo-emboliques ou vasculaires).

➤ **D'atteintes intestinales d'origine alimentaire (toxi-infection d'évolution aigue)**. Seuls les staphylocoques capables d'élaborer une toxine protéique peuvent déclencher une toxi-infection (Pilet et al, 1983).

➤ **Chez les animaux,**

- Le cheval : suppurations diverses, maux de garrot, botriomycose (notamment sur les plaies de castration).
- Les bovins : mammites, métrite, septicémie chez les jeunes.
- Les moutons et les chèvres : mammite gangréneuse, lymphadénie caséuse.
- Le porc : suppurations banales, mammite.
- Le chien : dermites suppurées rebelles (staphylo-démodicose), mammite gangréneuse.

- Les oiseaux : synovites, arthrites, septicémie (**Pilet et al, 1983**).

➤ **En bactériologie alimentaire**, l'intérêt des staphylocoques est également élevé, grâce au rôle joué par leur toxine protéique dans le déterminisme des toxi-infections.

- Les toxi-infections alimentaires staphylococciques :

La toxi-infection alimentaire d'origine staphylococcique, appelée également « maladie des banquets », se caractérise par un temps d'incubation très court. Les symptômes apparaissent en moyenne deux ou trois heures après l'ingestion de l'aliment contaminé (**Chavaux et al, 1992**).

La symptomatologie est la suivante : nausées, vertige, céphalées suivis rapidement par des vomissements incoercibles, une diarrhée hydrique accompagnée de douleurs intenses.

Du point de vue pathogénique, même si les modalités d'absorption intestinale restent peu connues, le mode d'action des entérotoxines est bien compris.

Les entérotoxines possèdent deux zones fonctionnelles distinctes (**Balaban et al, 2000**) :

- Une zone est responsable d'une action neurotoxique. Elle entraîne une stimulation des terminaisons du nerf vague présentes au niveau du tube digestif et est responsable de l'effet émétique.
- L'autre zone est responsable d'une action immunotoxique.

Les toxines jouent le rôle de superantigènes et sont à l'origine d'une cascade de réponses immunitaires.

V. Substances élaborées par les staphylocoques pathogènes « *S. aureus* » :

V.1. Des toxines :

➤ Les hémolysines : trois variétés principales sont décrites :

- Hémolysine (active sur les hématies de lapin à 37°C). Dermo-nécrotique et létale vis-à-vis du lapin, c'est une exotoxine authentique ; excrétée au fur et à mesure de sa formation, elle est élaborée par les souches pathogènes pour l'homme.
- Hémolysine active sur les hématies du mouton à +4 °C ; moins toxique, elle est élaborée par les souches d'origine animale.
- Hémolysine active sur les hématies de lapin, de mouton, d'homme et de cheval. Elle serait produite par les souches de staphylocoques coagulases négatives.
- Hémolysine : différente de la précédente car sans action sur les hématies du cheval, elle est constituée par deux fractions distinctes inactives séparément.

Ces toxines possèdent tous les caractères des toxines protéiques. Elles sont, en particulier, transformables en anatoxines (**Pilet et al, 1983**).

- Les leucocidines, altérant les leucocytes : ce terme est actuellement réservé à une toxine formée de deux composés cristallisables (F et S), bien que les hémolysines et puissent être également considérées comme des leucocidines (**Pilet et al, 1983**).
- Les entérotoxines : des techniques immunologiques permettent de distinguer cinq variétés (de A à E). Ces exotoxines protéiques sont thermostables et résistent aux enzymes digestives (**Pilet et al, 1983**).

VI.2. Des enzymes :

- Les coagulases : on distingue deux types de coagulase :
 - Libre : spécifique de *S.aureus*, libérée hors des corps bactériens, elle agit sur une globuline plasmatique voisine de la prothrombine ; elle coagule le plasma de l'homme et du lapin, aussi bien in vitro qu'in vivo ; elle peut jouer alors un rôle dans la pathogénie des septicémies ;
 - liée aux corps bactériens : commune au genre *Staphylococcus* et *Micrococcus*, elle interviendrait in vivo en protégeant les staphylocoques de l'action phagocytaire (**Pilet et al, 1983**).
- La fibrinolysine : (staphylokinase) intervient dans la physiopathologie des septicémies en dissociant les caillots colonisés par les bactéries, permettant ainsi l'envoi dans la circulation d'embolies septiques. Elle n'est pas élaborée par les souches -hémolytiques (**Pilet et al, 1983**).
- La hyaluronidase : dissocie la substance fondamentale du tissu conjonctif et favorise l'extension de l'infection (**Pilet et al, 1983**).
- La désoxyribonucléase : pourrait entraîner des lésions tissulaires.
- La pénicillinase : est capable d'empêcher l'activité antibiotique de la pénicilline en ouvrant son cycle -lactame (**Pilet et al, 1983**).

CHAPITRE 3 : La résistance aux antibiotiques

I. Les antibiotiques :

I.1. Définition :

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (**Gony et al, 2001**). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (**Ogawara, 1981**).

I.2. Mode d'action des antibiotiques :

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne, cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés. (**Figure1**), (**Mevius et al, 1999 ; Oxoby, 2002**).

Les antibiotiques peuvent agir sur :

- La paroi bactérienne : Bacitracine, Penicilline et Céphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane au cours de la multiplication cellulaire. La nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne (**Zeba, 2005**).
- La membrane cellulaire : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.
- L'ADN : certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomyce bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques (**Flandrois et al, 1997**), les quinolones et les fluoroquinolones inhibent l'ADNgyrase (**Chopra, 1998**).
- Le ribosome bactérien : sur les ribosomes, ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales. Les aminoglycosides ou aminosides, empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes (**Hermann, 2005**). Les phenicols bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la petite sous-unité (**Flandrois et al, 1997**) les macrolides et les kétolides bloquent l'élongation de la chaîne peptidique (**Nilius et Ma, 2002**). La puromycine copie l'extrémité d'un ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaîne peptidique.

- Autres : en agissant en tant qu'anti métabolites bactériens (c'est-à-dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries).

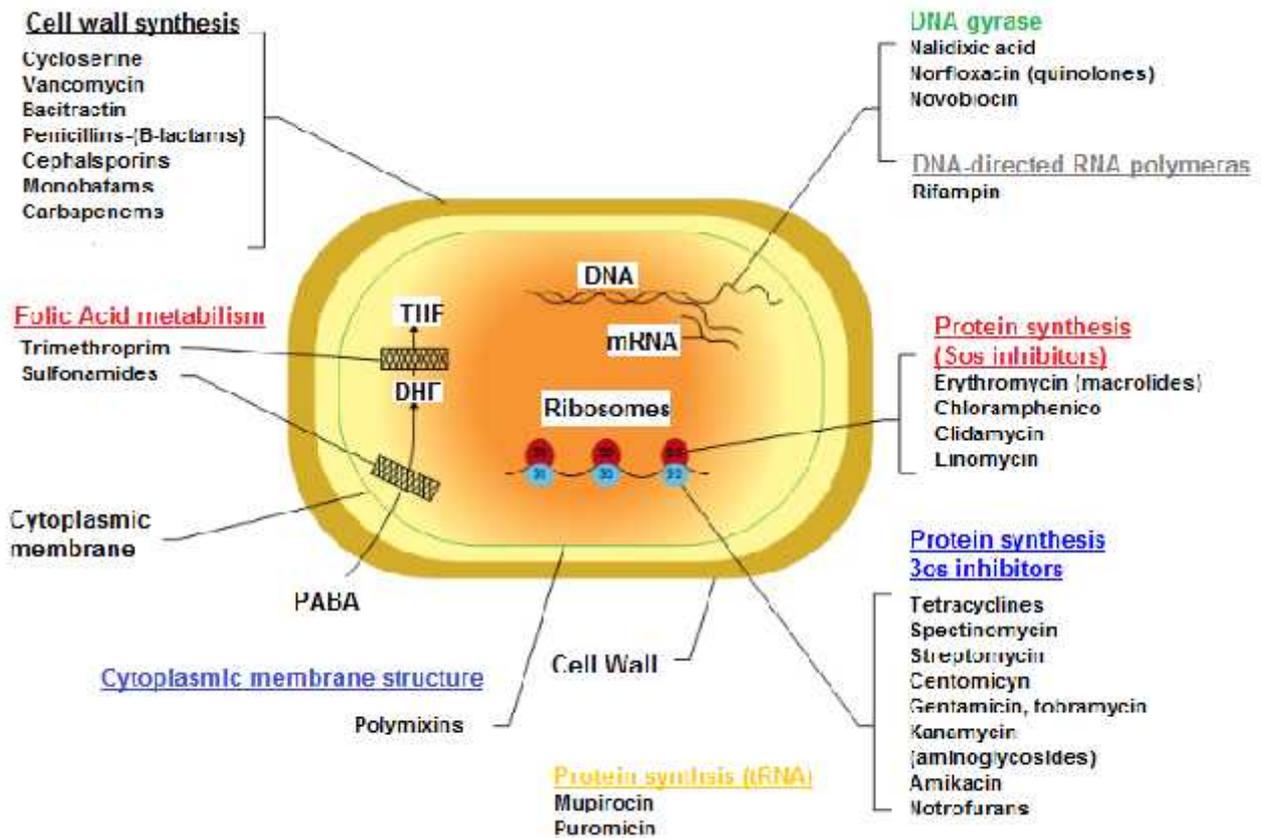


Figure1 : mode d'action des antibiotiques (Madigan et al, 2000).

I.3. critères de classification des antibiotiques :

La classification des antibiotiques peut se faire selon : (Bennabou, 2012)

- **L'origine** : élaborer par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)
- **Le mode d'action** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.
- **Le spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)
- **La nature chimique** : très variable, elle est basée sur une structure de base sur laquelle il y a ensuite hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique permet de classer les antibiotiques en familles : bêta-lactamines, aminosides, tétracyclines...etc.

I.4. La résistance aux antibiotiques :

Dans la nature, des bactéries peuvent disposer de mécanismes de résistance contre des molécules auxquelles elles sont naturellement confrontées dans leur environnement, en particulier certains antibiotiques sécrétés par les plantes ou champignons pour leur propre défense (la pénicilline et de nombreux antibiotiques sont initialement issus de plantes ou champignons). La sécrétion d'antibiotiques (contre laquelle la bactérie doit donc résister) est aussi une stratégie développée par certaines bactéries pour éliminer leurs compétitrices de leur environnement. Ces bactéries productrices d'antibiotiques ont développé plusieurs enzymes et mécanismes leur permettant de résister à la molécule qu'elles produisent. **(Bennabou, 2012)**

De manière générale, la résistance aux antibiotiques résulte d'une évolution par sélection naturelle, les antibiotiques exerçant une pression sélective très forte, en éliminant les bactéries sensibles. On suppose que le cas le plus fréquent est une adaptation rapide des bactéries sensibles à un nouvel écosystème, qui naît de mutations génétiques aléatoires **(Carattoli, 2001)** leur permettant d'y survivre, et de continuer à se reproduire, en transmettant à leur descendance leurs gènes de résistance (transfert vertical), ou qui se fait suite à des échanges de gènes de résistances entre des bactéries (transformation génétique, transduction ou conjugaison) qui habitent dans divers écosystèmes, y compris les humains, les animaux et l'environnement. Ce phénomène de changement génétique, soit par mutation ou après acquisition des gènes de résistance par transfert horizontal, est appelé *antibiorésistance* qui est définie selon **Avorn et al, (2001)** par la capacité permettant à un microorganisme de croître en présence d'une concentration qui inhibe la majorité des souches de la même espèce.

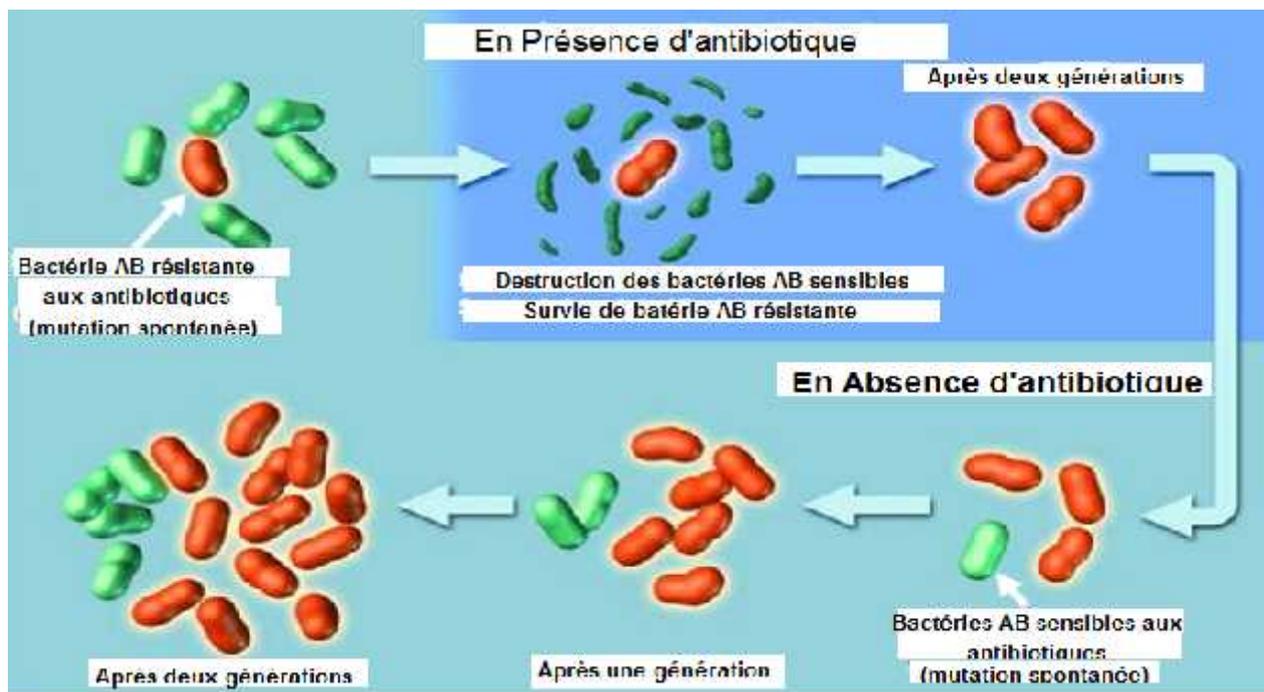


Figure2 : Schéma illustrant le développement de la résistance aux antibiotiques (George et al, 1998)

II. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique :

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans des éléments mobiles, comme plasmides, éléments transposables ou intégrons (résistance extra-chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (Mandell et al, 2009)

II.1. Résistance naturelle :

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie, la résistance est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. Par exemple, la résistance des entérobactéries et *Pseudomonas* aux macrolides ou des bactéries à Gram- à la vancomycine est naturelle. La résistance intrinsèque est permanente, stable et transmissible à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale). (Mandell et al, 2009)

II.2. Résistance acquise :

Les bactéries, préalablement sensibles à un antibiotique, peuvent développer une résistance à cet antibiotique, ce qui implique des changements génétiques chromosomiques. Elles ne concernent que quelques souches, d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique donné. La résistance acquise possède généralement un faible risque de transmission horizontale lorsque la résistance est la suite d'une mutation chromosomique. En revanche, la résistance acquise est considéré comme ayant un potentiel plus élevé pour la diffusion horizontale de résistance aux antibiotiques, lorsque les gènes de résistance sont présents sur des éléments génétiques mobiles (plasmides et transposons). (**Khachatourians, 1998**)

II.2.1. Mutation chromosomique :

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20% des bactéries. Elle se produit environ une fois pour chaque milliard de divisions cellulaires (**Pallasch, 2003**). Ces mutations sont associées à des erreurs non corrigées survenant pendant la réplication d'ADN ou par réarrangements génomiques spontanés provoqués par des éléments génétiques tels que les pages tempérés, les transposons conjugatifs, les séquences IS, ainsi que des séquences répétées qui peuvent être substrats pour des réactions de recombinaison homologues.

Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action. L'utilisation d'une association de deux ou plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. Par exemple, la résistance à la rifampicine et aux quinolones résulte toujours d'une mutation chromosomique (**Yamashita et al, 2000**) et on peut rencontrer des cas où une seule mutation chromosomique aboutit à une élévation de résistance très importante ; par exemple, la CMI vis-à-vis de la streptomycine peut être multipliée par 1000 par une unique mutation chromosomique. (**Prescott et al, 2000**)

II.2.2. Acquisition de gènes de résistance (évolution horizontale) :

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à Gram+ qu'à Gram-. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'ADN bactérien situé à l'extérieur et sur certains éléments mobiles du chromosome, tels les transposons. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à

l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes. Le transfert d'un seul plasmide augmente aussi le risque d'une résistance à plusieurs antibiotiques. (Benabbou, 2012)

Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, transduction ou conjugaison. (Carattoli, 2001)

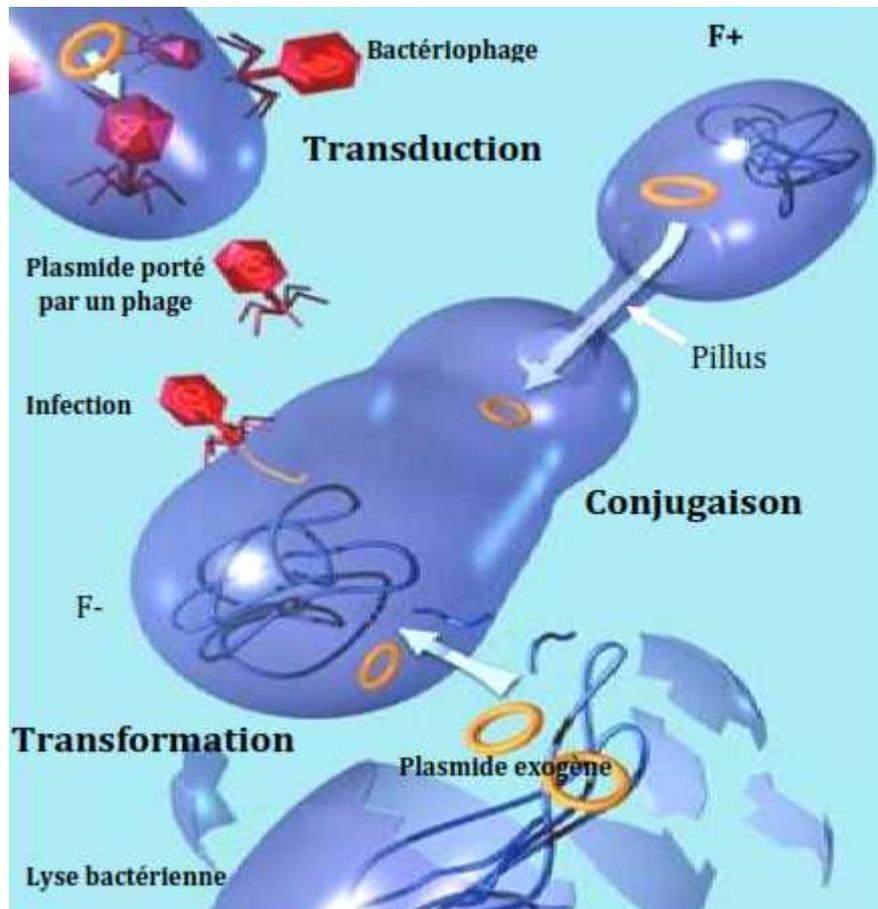


Figure3 : Différents moyens pour le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques (George et al, 1998).

❖ Résistance par les biofilms :

Une place à part est conférée à la résistance par les biofilms. Dans des environnements alimentaires particuliers, le *S. aureus* peut développer des mécanismes particuliers de résistance aux antibiotiques comme la formation d'un biofilm en tant que réponse adaptative de protection des colonies. Ce type de résistance s'observe également lors des circonstances qui mettent en jeu des processus physiques pour la conservation alimentaire comme les traitements acides et les processus d'irradiation (Faye, 2005).

II.3. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques :

II.3.1. Résistance par inhibition enzymatique :

Le micro-organisme produit une enzyme qui détruit ou inactive l'antibiotique. La production enzymatique peut être induite par un facteur externe (un antibiotique) ou constante (non affectée par des stimuli externes). On appelle inductible une résistance qui se produit à la suite d'une exposition à un agent d'une classe pharmacologique donnée et constitutive lorsque les gènes à l'origine de la résistance s'expriment en permanence, même en l'absence de tout antibiotique. **(Benabbou, 2012)**

Les bêta-lactamases sont des enzymes produites par les bactéries et transmises par des chromosomes ou des plasmides. Elles constituent un mécanisme de résistance très efficace. Les bêta-lactamases inactivent les lactamines en détruisant le lien amide sur le cycle lactame. Puisque ce sont les antibiotiques les plus prescrits au monde, il n'est pas étonnant que la résistance à cette importante classe d'antibiotiques pose un problème inquiétant. **(Benabbou, 2012)**

II.3.2. Réduction de la perméabilité cellulaire :

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires : une membrane cytoplasmique sépare leur cytoplasme du milieu externe. Les bactéries à Gram- sont également munies d'une enveloppe additionnelle, la paroi externe, qui sert de barrière et protège les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) du milieu externe. Les nutriments et les antibiotiques doivent traverser cette enveloppe pour pénétrer dans la bactérie. Le passage se fait par diffusion passive à travers les canaux qui forment les protéines caniculaires nommées porines. **(Knothes et al, 1983)**

La réduction de la perméabilité cellulaire se produit par diminution de l'entrée de l'antibiotique sur son site, provoquée par une modification de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie. Une altération des porines dans la paroi des bactéries à Gram- peut réduire ou bloquer la pénétration de l'antibiotique jusqu'à son site d'action. **(Benabbou, 2012)**

Les mutations des porines joueraient un rôle important dans l'émergence d'une résistance, particulièrement à la suite d'une réduction du calibre des canaux ou du nombre de porines. **(Benabbou, 2012)**

L'imperméabilité liée aux porines s'associe souvent à la synthèse de bêta-lactamases pour conférer une résistance à la bactérie. Il arrive à l'occasion qu'une bactérie ne devienne résistante que lorsque deux phénomènes se produisent simultanément : modification de la perméabilité cellulaire et hausse de la synthèse des bêta-lactamases chromosomiques **(Pitout et al, 2004)**

II.3.3. Altération (ou modification) des sites de liaison :

Phénomène engendré par des chromosomes ou des plasmides, ce mécanisme de résistance produit une baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action (Yamashita et al, 2000 ; Pitout et al, 2004).

La figure ci-dessous illustre les différents mécanismes permettant l'altération (ou modification) des sites de liaisons.

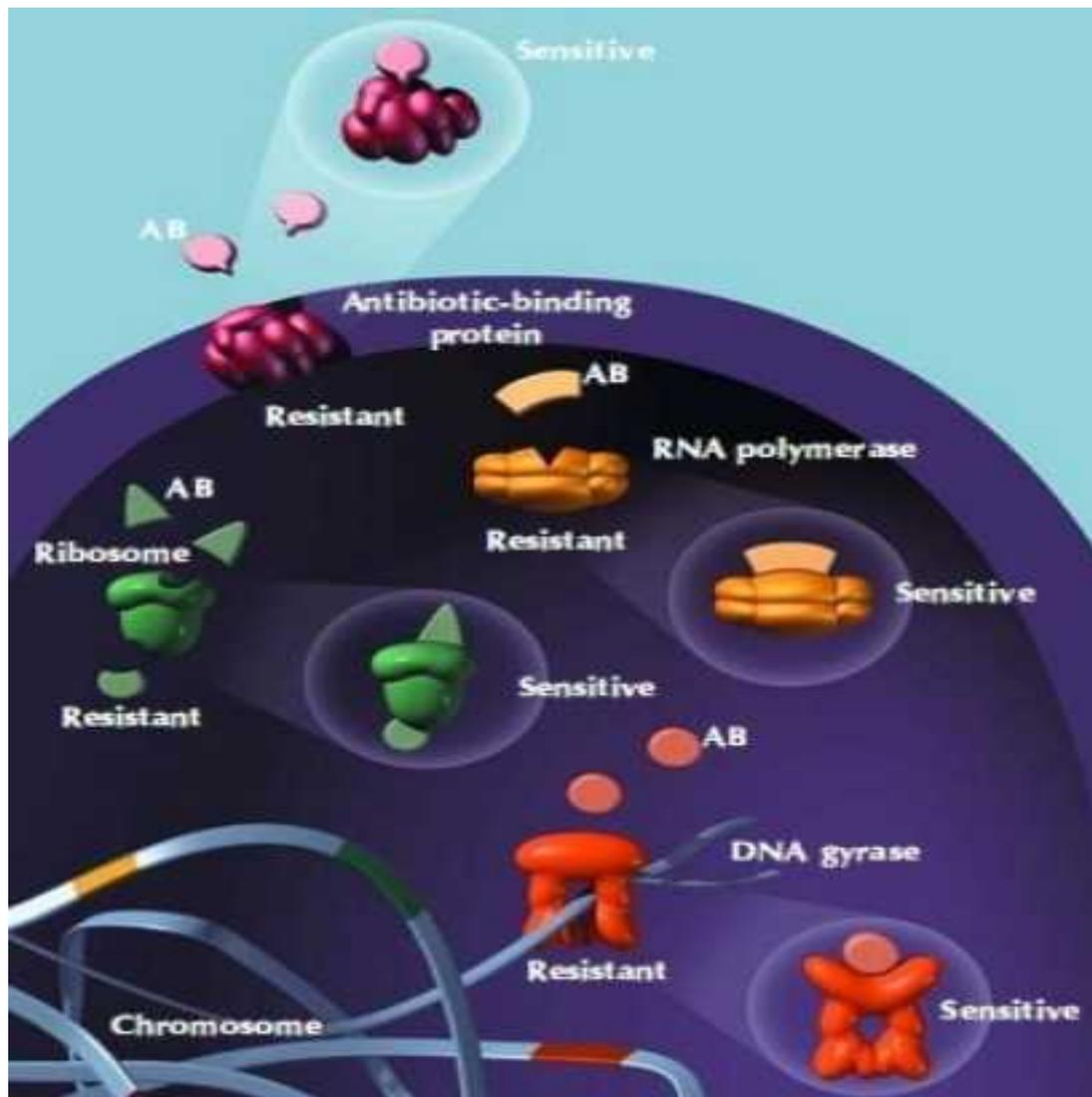


Figure4 : Mécanisme de résistance par altération (ou modification) des sites de liaison (George et al, 1998)

Les mutations chromosomiques dans les bactéries peuvent altérer les sites de fixation des antibiotiques(ATB), les cibles sont des protéines de liaisons aux antibiotiques, ribosomes, l'ARN polymérase et l'ADN-gyrase.

II.3.4. Pompes (transporteurs) à efflux :

L'antibiotique ne peut atteindre son site d'action par pompage actif de l'antibiotique vers l'extérieur de la bactérie (efflux). Les transporteurs d'efflux de plusieurs antibiotiques sont des composants normaux des cellules bactériennes et contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens. Ces pompes ont besoin d'énergie. L'exposition aux antibiotiques favorise une surexpression par mutation de transporteurs, entraînant une hausse de la résistance bactérienne. Il est également possible qu'une résistance par efflux apparaisse à cause de l'exposition à un antibiotique d'une autre classe. Ainsi, on sait que la ciprofloxacine peut favoriser l'émergence d'une résistance à la céphalosporine et aux macrolides par la voie de ce mécanisme.

III. Diffusion des bactéries résistantes entre l'animal et l'Homme :

Les agents microbiens couramment utilisés chez les animaux appartiennent essentiellement aux mêmes classes de composés que ceux utilisés en médecine humaine. Chez les animaux, les antibiotiques sont utilisés pour trois différentes raisons : pour le traitement des infections bactériennes (usage thérapeutique), pour prévenir les infections chez les animaux (utilisation prophylactique) et utilisés comme promoteur de croissance dans l'alimentation animale à titre d'additif en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux (facteur de croissance) (**Singer et al, 2003**). L'utilisation inappropriée d'antibiotiques chez les animaux et surtout comme facteur de croissance a facilité la propagation des résistances acquises. Ce phénomène d'antibiorésistance est constaté comme l'un des problèmes mondiale de santé public (**Normak et al, 2002 ; Levy et al, 2004**). De plus, les bactéries isolées chez les animaux et celles chez l'homme, que ce soit lors d'une infection ou en situation de colonisation, partagent les mêmes mécanismes de résistance. Cela est un argument extrêmement solide de l'absence d'étanchéité entre le monde animal et les populations humaines.

Les animaux de rente et les animaux de compagnie, tout comme les humains, peuvent être réservoirs de bactéries résistantes, et le développement de ces germes résistants peut se produire aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. (**Bates et al, 1994**)

La dissémination de ces bactéries résistantes entre les différents hôtes peut se produire par contact direct avec des matières contenant des bactéries (salive, fèces,...) mais peut également se produire par la contamination de la nourriture, de l'air ou de l'eau. Lorsqu'elle atteint un nouvel hôte, la bactérie peut coloniser ou infecter, elle peut alors disséminer ses gènes de résistance aux

autres bactéries mais également recevoir elle-même des gènes de résistance présents chez d'autres bactéries. **(Bennabou, 2012)**

La diffusion des bactéries résistantes aux antibiotiques de l'animal à l'homme est donc non seulement possible, mais de nombreux arguments attestent de sa réalité pour certains pathogènes. Dès 1969 un rapport de Swann au Royaume Uni a attiré l'attention sur le potentiel de dissémination des bactéries résistantes issues d'animaux traités par des antibiotiques via la chaîne alimentaire **(Swann et al, 1969)**. Depuis, différentes études ont mis en évidence des transferts de bactéries résistantes de l'animal à l'homme via la chaîne alimentaire ou par contact direct, conduisant à l'établissement d'un réservoir de gènes de résistances. **(Levy et al, 1976 ; Van Den et al, 1999)**

Cependant, les bactéries zoonotiques résistantes sont les seules dont on peut dire avec certitude qu'elles passent de l'animal à l'homme, principalement via la chaîne alimentaire car il n'y a pas de contamination « inter-humain » pour ces pathogènes.

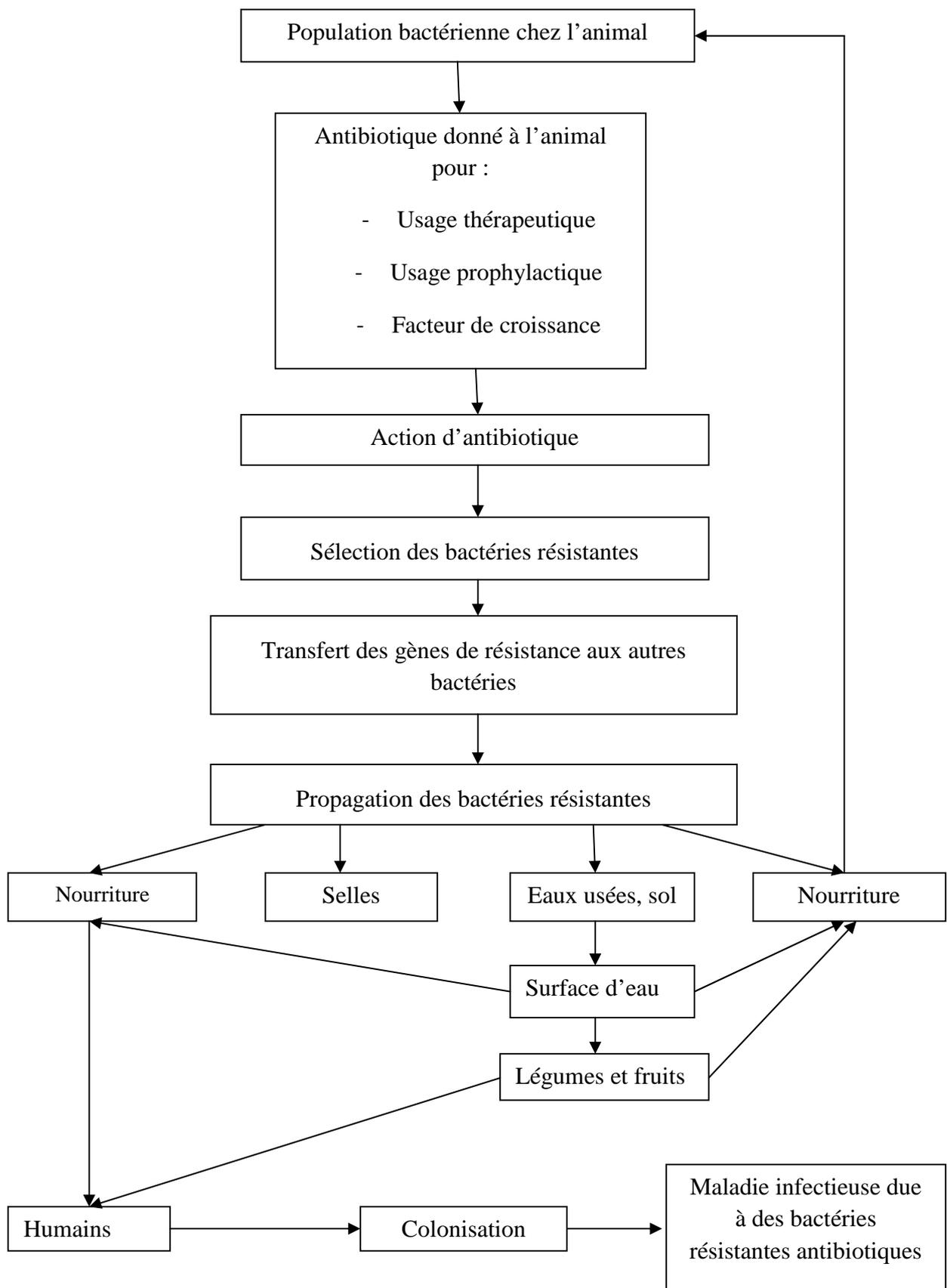


Figure5 : voies possibles de la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques origines animales aux humains. Modifiés par **Khachatourians, (1998)**.

CHAPITRE 4 : l'Antibiorésistance de *Staphylococcus aureus*

I. Résistance à la pénicilline :

La pénicilline était le premier antibiotique découvert en 1929 par Alexander Fleming.

Introduit dans le début des années 1940, pratiquement toutes les souches de *S. aureus* étaient sensibles à la pénicilline G, mais en 1944, la première preuve de résistance de *S. aureus* à la pénicilline avait déjà paru. Aujourd'hui presque toutes les souches de *S. aureus* sont résistantes aux pénicillines naturelles, celle-ci implique aussi une résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline, la ticarcilline, la pipéracilline et à l'aminopénicilline (**Rice ,2006**).

Le mécanisme de résistance à la pénicilline repose sur la synthèse par la bactérie d'une enzyme appelée β -lactamase ou pénicillinase. Cette enzyme plasmidique inductible hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines A et G et les rend inactives (**Korta et al, 1998**). La production de cette enzyme est inactivée par les inhibiteurs de pénicillinase (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) (**Eveillard, 2007**).

II. Résistance à la méticilline :

La méticilline, l'oxacilline et d'autres pénicillines résistants à l'action de la pénicillase sont introduites dès les débuts des années 1960 pour le traitement des infections causées par les *S. aureus* résistants à la pénicilline. Cependant, au fil du temps des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) commencent à apparaître et à se répandre au sein du milieu hospitalier et plus récemment au sein de la communauté (**Pesavento et al, 2007**).

La résistance à la méticilline est croisée vis-à-vis des autres bêta-lactamines, ce qui implique que les souches méticillino-résistant doivent toujours être considérées comme résistantes à toutes les β -lactamines y compris aux céphalosporines de 3^{ème} génération (**Katayauma et al, 2000**).

La résistance des *S.aureus* à la méticilline est principalement due à la modification de la cible des β -lactamines, enzymes appelées aussi protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP interviennent dans la synthèse de la paroi bactérienne en catalysant la formation des ponts peptidiques entre les chaînes glycaniques (**Ghuysen ,1994**). Les β -lactamines se fixent à ces enzymes et bloquent la polymérisation de la paroi bactérienne, altérant ainsi sa structure et provoquant la lyse de la bactérie. *S.aureus* produit naturellement 4 PLP, les β -lactamines doivent en inhiber plus d'une pour obtenir une activité anti bactérienne efficace (**Korta et al, 1998**).

Les SARM synthétisent une 5^{ème} PLP modifiée appelée PLP2a, qui a une faible affinité pour les β -lactamines (**Berger, 1999**). Cette dernière est autonome, et peut réaliser à elle seule la synthèse de la paroi bactérienne, même lorsque les quatre autres PLP sont inhibées (**Garner, 1988**).

La PLP2a est codée par un gène chromosomique appelé *mecA* (Chambers, 1997). Il est transporté dans un élément génétique appelé Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC). SCC*mec* est un fragment de 21-67 kb qui s'intègre dans un site unique proche de l'origine de réplication du chromosome de *S. aureus* (Hiramatsu *et al*, 2002).

Selon les critères du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, une souche est considérée comme méticillino-résistante si la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'oxacilline est supérieure à 2 mg/l (Escobar, 2009).

III. Résistance aux aminosides :

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides utilisés en thérapeutique pour obtenir une synergie bactéricide avec un inhibiteur de la paroi bactérienne (glycopeptide ou bêtalactamine) (Tankovic *et al*, 1997).

Les aminosides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous unité 30S du ribosome bactérien (Ramirez *et al*, 2010). Les CMI de la gentamicine, nétilmicine et tobramycine sont égales à 0,1 ou 0,2 mg /l et celle de l'amikacine à 0,5mg/l (Taber *et al*, 1987). La résistance aux aminosides est rarement due à des mutations affectant les cibles ribosomales des antibiotiques. Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine, nétilmicine) est surtout dû à la production par les staphylocoques d'enzymes modifiant la cible ribosomale.

Il existe trois enzymes de résistance, chacune d'entre elles conférant un phénotype de résistance spécifique aux aminosides. Ces enzymes (acétyltransférases, nucléotidyl-transférases et phosphotransférases) sont codées par des gènes plasmidiques ou transposables (Tankovic *et al*, 1997).

Les trois phénotypes de résistance sont (Bismuth *et al*, 2000 ; Leclercq, 2002) :

- Aminoglycoside phosphotransférase (3')-III : cette enzyme confère la résistance à la kanamycine et l'amikacine (phénotype K). Cette enzyme est présente chez moins de 10% des souches méticillino- sensibles.
- Aminoglycoside nucléotidyltransférase (4'-4'') : cette enzyme confère la résistance à la kanamycine, à l'amikacine et à la tobramycine (phénotype KT).

Cette résistance est présente chez environ 1/3 des souches résistantes à la méticilline.

- Aminoglycoside acétyltransférase (6') - aminoglycoside phosphotransférase (2'') : cette enzyme bifonctionnelle confère la résistance à la kanamycine, L'amikacine, la tobramycine,

la nétilmicine et à la gentamicine (phénotype KTG). Cette enzyme est détectée chez 2/3 ou plus des souches méticillino-résistantes.

Le tableau suivant récapitule les principaux mécanismes de résistances aux aminosides.

Tableau4 : Principaux mécanismes, supports et phénotypes de résistances acquises aux aminosides (Quincampoix et al, 2001).

Enzymes	Support génétique	Phénotypes	K	AN	TM	GM	Net
Aph3'	<i>aph3'a</i>	K	R	R	S	S	S
Ant4'	<i>ant4'a</i>	KT	R	R	R	S	S
Aph2'' – aac6'	<i>aph2''a</i> <i>aac6'e</i>	KTG	R	R	R	R	R

K: kanamycin; **An**: amikacine; **Tm**: tobramycine; **Gm**: gentamicine; **Net**: nétilmicine. **S**: Sensible; **R**: Résistant.

IV. Résistance aux glycopeptides :

Les glycopeptides (teicoplanine et vancomycine), sont utilisés en alternative aux bêtalactamines dans le traitement des infections à staphylocoques dorés méticillino-résistants. Ces antibiotiques ont un effet bactéricide s'exerçant lentement. Ils agissent sur la synthèse de la paroi bactérienne à un stade plus précoce que les bêta-lactamines, en ciblant le résidu D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane pour se fixer (Tankovic *et al*, 1997). Les souches sont identifiées comme sensibles à la vancomycine si la CMI = 2 à 4 mg/l, mais les populations de sensibilité diminuée présentent une CMI de 6 à 8 mg/L (McCallum *et al*, 2006).

En 1997, Hiramatsu *et al*, (1997) décrivent le premier *S. aureus* cliniques isolé avec une résistance intermédiaire à la vancomycine. Depuis, d'autres souches de *S.aureus* avec une sensibilité réduite, voire résistantes à la vancomycine (VISA, CMI =6 à 8 mg/l) ont été identifiés au Japon et aux Etats-Unis. Ces souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont désignées comme GISA : Glycopeptides Intermediate *Staphylococcus aureus* (Pesavento *et al*, 2007).

Le mécanisme de résistance à la vancomycine est lié à un épaissement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé (McCallum *et al*, 2010). Cette résistance est due à des mutations de *S. aureus*, obtenues après transfert conjugatif de l'opéron de gène *vanA* codant pour la résistance à la vancomycine chez les entérocoques résistants aux glycopeptides (Tankovic *et al*, 1997 ; McCallum *et al*, 2006).

V. Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramine (MLS) :

Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse protéique en stimulant la dissociation entre ribosome et ARN de transfert. Les macrolides (érythromycine, josamycine, spiramycine) et les lincosamides (clindamycine) exercent une activité bactériostatique vis-vis des staphylocoques et ont de ce fait un usage thérapeutique limité aux infections peu sévères, dues à ce germe.

La résistance aux MLS est due à trois mécanismes :

➤ La modification de la cible des antibiotiques qui est le mécanisme le plus répandu et confère un spectre de résistance croisé entre macrolides, lincosamides et streptogramines B. d'où son nom de MLS_B, car ces antibiotiques ont des sites de fixation communs. En effet les souches résistantes produisent une enzyme, une méthylase d'origine plasmidique (codée par le gène *emr*) qui modifie la cible ribosomale par méthylation (Cristino, 1999). La résistance MLS_B est dite inducible quand la méthylase est produite seulement en présence de macrolide inducteur (comme l'érythromycine), ou constitutive, lorsque la production est permanente, et indépendante de l'antibiotique.

La production de méthylase inducible n'entraîne de résistance qu'aux antibiotiques inducteurs, qui sont les macrolides à noyau de 14 et 15 atomes (érythromycine, roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine, azithromycine) alors que les macrolides à noyau de 16 atomes (josamycine et spiramycine), les lincosamides (clindamycine et lincomycine) et les streptogramines B (pristinamycine I et quinupristine) restent actifs car sont non inducteurs. La production constitutive de méthylase induit une résistance croisée à tous les antibiotiques de la famille, à l'exception des streptogramines. En effet, pour ces dernières, l'effet synergique des composants A et B permet le maintien de l'activité *in vitro*. Le marqueur de la résistance de type constitutif est la résistance à la clindamycine. La plupart des SARM présentent une résistance MLS_B constitutive (Leclercq, 2002).

Le mécanisme le plus fréquemment en cause est la modification de la cible: le phénotype associant la résistance aux macrolides, aux lincosamides et au composé B des streptogramines

(phénotype MLS_B constitutif) prédomine chez les SARM est lié au gène *ermA* de nature transposable ; la résistance isolée aux macrolides à 14 ou 15 atomes de carbone (phénotype MLS_B inducible) se retrouve aussi plus souvent chez les SARM et est liée au gène *ermC* d'origine plasmidique (**Cristino, 1999**).

➤ Les mécanismes d'efflux actif ne touchent que les antibiotiques de structure apparentée. Les macrolides à noyau de 14 et 15 atomes (érythromycine, roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine, azithromycine) codés par le *msr* et les streptogramines A codés par le gène *vga*, peuvent subir un efflux actif par mécanismes ATP-dépendant alors que les macrolides à noyau de 16 atomes (josamycine et spiramycine), les lincosamides (clindamycine et lincomycine) et les streptogramines B (pristinamycine I et quinupristine) restent actifs car sont non inducteurs (**Ross et al, 1990**).

➤ L'inactivation enzymatique est due à diverses enzymes spécifiques. Les lincosamides peuvent être inactivée par une acétylase codée par un gène plasmidique *linA* (**Leclercq, 2000**). Les streptogramines sont touchées par une hydrolase codée par le gène *vgb*. Le gène *vat* est responsable d'acétylation des streptogramines A. Ce gène est très souvent associé au gène *vgb* sur le même plasmide (**Tankovic et al, 1997**).

VI. Résistance aux fluoroquinolones :

Les fluoroquinolones (ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin) inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la synthèse de l'ADN. Cette action est secondaire à l'inhibition de deux topomérases bactériennes : l'ADN gyrase, qui catalyse le surenroulement de l'ADN, et l'ADN topomérases IV qui est responsable de la décaténation des chromosomes au cours de la réplication (**Child et al, 1995**). La résistance aux fluoroquinolones est due à une modification de la cible, soit la topo-isomérase IV par mutation des gènes chromosomiques *griA* ou *griB* soit les sous-unités de la gyrase par une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*. Cette résistance touche essentiellement les staphylocoques hospitaliers, en particulier le staphylocoque doré résistant à la méticilline (**McCallum et al, 2006**).

Autres résistances :

- ✓ La résistance aux sulfamides est de nature chromosomique, liée à une hyperproduction d'acide paraaminobenzoïque.
- ✓ La résistance aux tétracyclines est due soit à un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire codée par les gènes *tetK* ou *tetL* d'origine plasmidique soit une protection de la cible par une protéine codée par le gène transposable *tetM*.
- ✓ La résistance à la rifampicine est liée à la sélection de mutants résistants au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN dépendant.
- ✓ La résistance à la fosfomycine est due à la sélection de mutants au niveau du système de transport de la molécule dans la bactérie (gènes *glgT* et *uhp*).
- ✓ La résistance à l'acide fusidique est secondaire soit à la sélection de mutants résistants au niveau du facteur d'élongation intervenant dans la synthèse protidique soit à une modification de la perméabilité d'origine plasmidique (**Bismuth et Leclercq, 2000**).

VII. Evaluation de l'antibiorésistance :

Considérant que la résistance des bactéries aux antibiotiques est très variable et semble en augmentation, l'isolement et l'identification ne suffisent souvent plus pour mettre en œuvre une antibiothérapie efficace (**Rennie et al, 2008**). Alors faire appel aux laboratoires de bactériologie pour réaliser des tests de sensibilité semble être nécessaire.

VIII.1. Méthodes de test de la sensibilité bactérienne :

Les tests de sensibilité bactérienne les plus répandus ont pour but d'étudier l'effet bactériostatique des antibiotiques. Pour chaque souche bactérienne, on peut définir une concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe. Elle est donc associée à un phénomène macroscopique, ce qui explique sa relative facilité d'obtention et son universalité (**Jorgensen, 1997**).

Cette CMI est obtenue grâce à trois méthodes. Notons que ces méthodes sont expérimentales et applicables selon les laboratoires et les conditions de faisabilités.

VIII.1.1. Méthode par dilutions successives :

❖ Dilution en bouillon :

L'ensemencement est réalisé sur des milieux de cultures liquides contenant des concentrations décroissantes d'antibiotiques. On détermine alors par une méthode turbidimétrique la CMI du germe étudié comme la concentration la plus faible pour laquelle les bactéries ne se sont pas développées en 24 h (**Jorgensen, 1997 ; Rennie *et al.*, 2008**).

Ce type de méthode, initialement réalisé par une méthode de macrodilution (plus de 2mL de milieu de culture), a été remplacé par des méthodes de microdilution (moins de 500µL) et a été largement automatisé. Cependant, compte tenu de sa lourdeur, cette méthode est aujourd'hui peu utilisée en pratique dans les laboratoires d'analyse mais elle constitue la méthode de référence (**Kahlmeter *et al.*, 2006**).

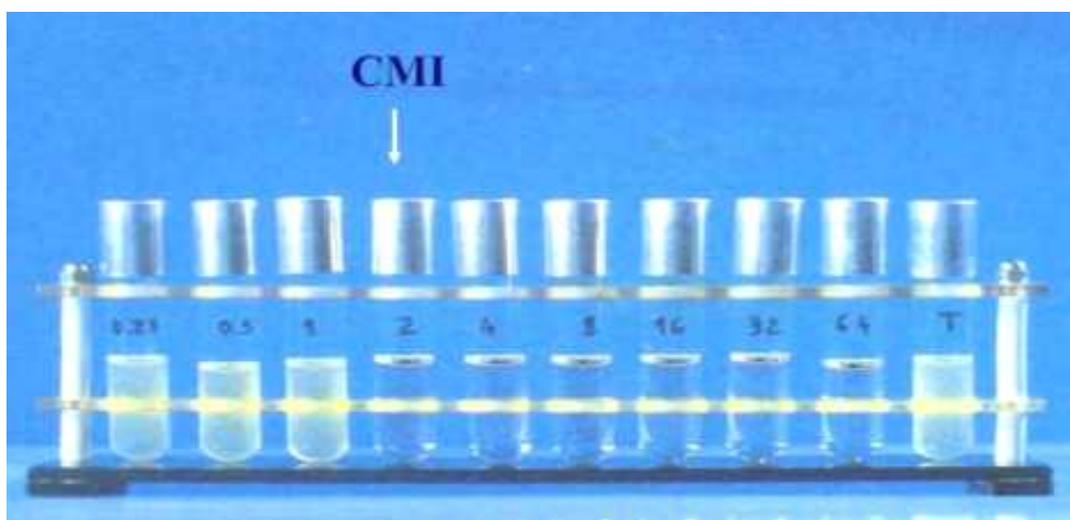


Figure6 : Exemple de la détermination de la CMI par la méthode des dilutions sériées
(Anonyme2, 2012)

❖ Dilution en gélose :

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte. Ces résultats sont souvent considérés comme les plus fiables pour la détermination d'une CMI pour la combinaison de l'essai bactérie/antimicrobien (**Chaalal, 2013**).

VIII.1.2. Méthode par diffusion de disque en milieu solide :

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Elles consistent à déposer à la surface d'une gélose Muller Hinton

préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier, des disques de papier imprégnés d'un antibiotique donné. Il se forme alors un gradient de concentrations en antibiotique autour du disque de papier et la croissance bactérienne est bloquée jusqu'au diamètre où les concentrations du gradient sont égales ou supérieures à la CMI. Avec la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et grâce à des abaques, on pourra classer la bactérie en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) (**Jorgensen et al, 2009**).

Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. Cependant, cela dépend de la concentration d'antibiotique contenue dans le disque et de sa diffusibilité (**NCCLS, 2002**).

Cette méthode est la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Le coût est faible. Mais elle est critiquée par certains auteurs en raison du manque de corrélation parfois entre les diamètres d'inhibition et les CMI déterminées par les méthodes de références (**Kamagate et al, 2001**).

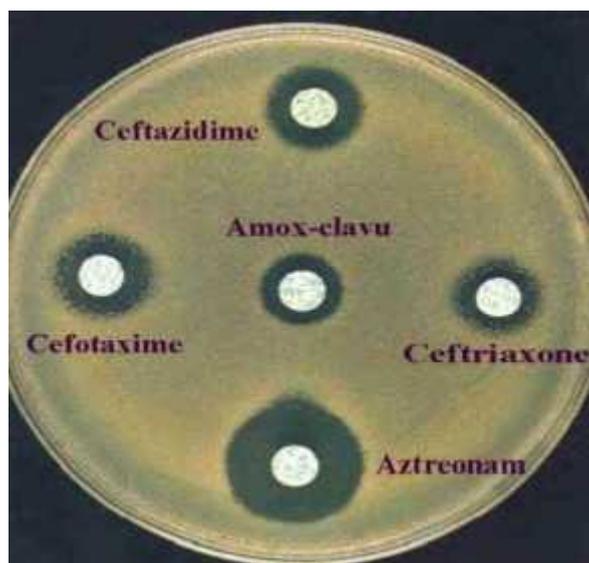


Figure7 : Exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés. (**Anonyme3, 2012**)

VIII.2. Etablissement de la courbe de concordance :

Pour un grand nombre de souches, on met en relation le diamètre d'inhibition avec la CMI obtenue par une des méthodes de dilution : on obtient un nuage de points dans un graphique représentant le diamètre en fonction du \log_2 de la CMI (Figure8). On peut calculer alors une courbe de régression, appelée courbe de concordance, qui met en relation la CMI avec le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne (**Tunneval et al, 1954 ; Chabbert, 1963 ; Bauer et al, 1966**).

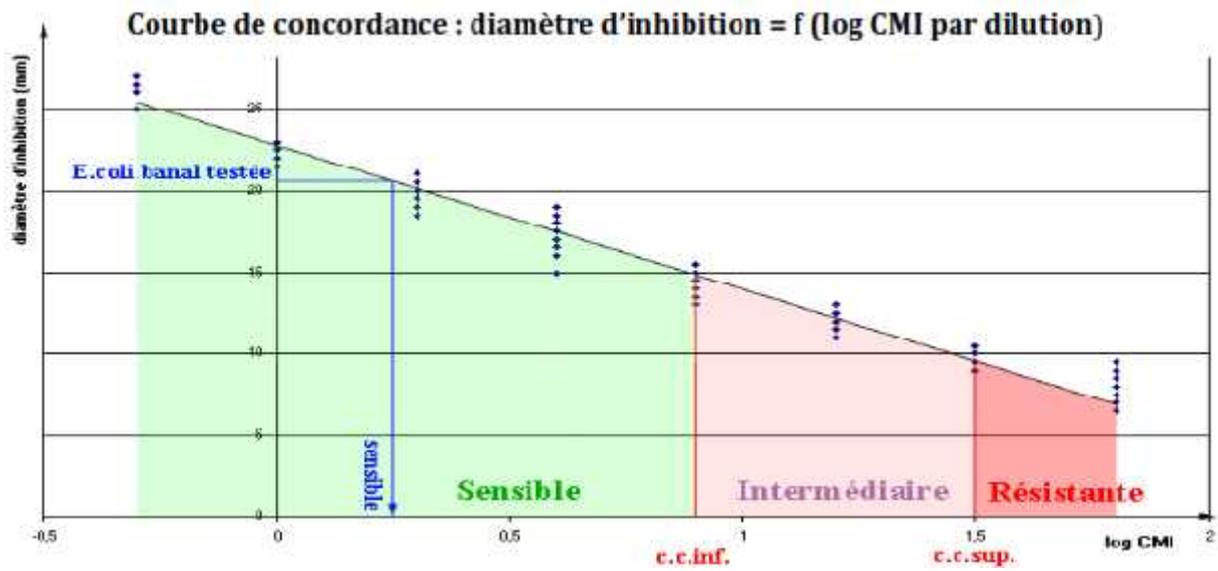


Figure8 : Exemple de courbe de concordance avec détermination des diamètres discriminants à partir des CMI discriminantes (Bennabou, 2012)

**ETUDE
EXPERIMENTALE**

Objectifs :

L'utilisation non contrôlée d'antibiotiques en médecine vétérinaire conduit à la sélection de germes résistants avec de multiples conséquences néfastes sur la santé publique, cette antibiorésistance réduit les possibilités de traitement chez l'homme et chez l'animal.

Etant donné l'importance des toxi-infections alimentaires provoquées par *S aureus* et l'inefficacité des traitements utilisés (notamment les traitements à base d'antibiotique), nous avons jugé utile et judicieux de faire l'antibiogramme des souches de *S.aureus* afin de déceler d'éventuelles antibiorésistances. Ces souches ont été isolées, lors d'une étude précédente, du lait cru provenant de citernes de collecte au niveau de plusieurs laiteries

I. Matériel et méthode :

I.1.1. Echantillonnage :

Notre étude a été effectuée sur 20 souches de *S.aureus* à coagulase positive conservées sur gélose nutritive inclinée. Ces dernières ont été isolées lors d'une étude précédente à partir de 50 échantillons de lait cru. Ces échantillons ont été prélevés dans trois différentes laiteries situés à Alger centre, et ce durant une période allant d'Octobre 2017 à Novembre 2017.

L'antibiogramme été réalisé au niveau du laboratoire d'HIDAOA de l'ENSV d'Alger.

I.1.2. Matériel :

- Gélose BairdParker
- Gélose nutritive.
- gélose Mueller -Hinton
- écouvillons stériles
- Eau oxygénée
- lame
- Plasma de lapin
- Boites de Pétri
- Disques d'antibiotiques
- Témoin McFarland



Photo1 : Micropipette de 0,1 ml

(Photo personnelle)

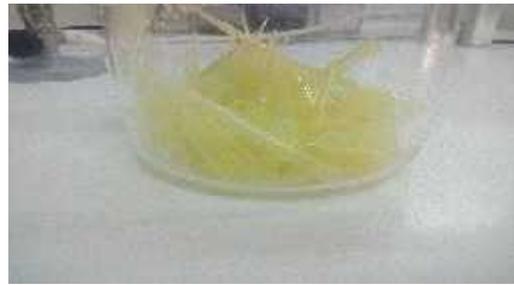


Photo2 : Embouts de 0,1 ml

(photo personnelle)



Photo3 : Tube de dilution stérile

(Photo personnelle)



Photo4 : Vortex

(photo personnelle)



Photo5 : Pipette Pasteur

(photo personnelle)



Photo6 : Incubateur

(photo personnelle)



Photo7 : Cartouches des disques d'antibiotiques (photo personnelle)

I.1.3. Méthode :

➤ La purification :

❖ 1^{ère} étape :

Afin d'être sûr de travailler sur une souche pure et non contaminée, nous avons procédé à deux purifications. La première sur le milieu sélectif Baird Parker et la deuxième sur de la gélose nutritive (GN). Les testes de catalase et de coagulase ont aussi été refais.

Nous avons tout d'abord procédé à la revivification de chaque souche conservée sur gélose nutritive inclinée en les repiquant dans du BHIB et en l'incubant 48h à 37°C. En travaillant d'une manière stérile, nous avons prélevé une goutte de la suspension à l'aide d'une pipette pasteur boullée, afin de réaliser un ensemencement en cadrans sur gélose Baird Parker additionnée de sulfaméthazine pour éliminer la bactérie *Proteus* étant donné que cette dernière est un contaminant des étuves, réfrigérateurs et laboratoires en général. La composition complète du milieu est donnée en annexe. Les boîtes ensemencées sont ensuite incubées à 37°C pendant 48h.



Photo8 : Souche conservée sur Gélose nutritive inclinée (photo personnelle)



Photo10 : Boite de pétri après poussée des bactéries (photo personnelle)

❖ 2^{ème} étape :

La 2^{ème} étape de purification a été réalisée sur gélose nutritive (GN) par étalement en surface et incubation à 37°C pendant 24h. Pour la purification nous avons pris une colonie caractéristique résultant de l'étape précédente (la purification) en faisant, à l'aide d'une pipette pasteur, un ensemencement en stries selon la méthode des trois cadrans.

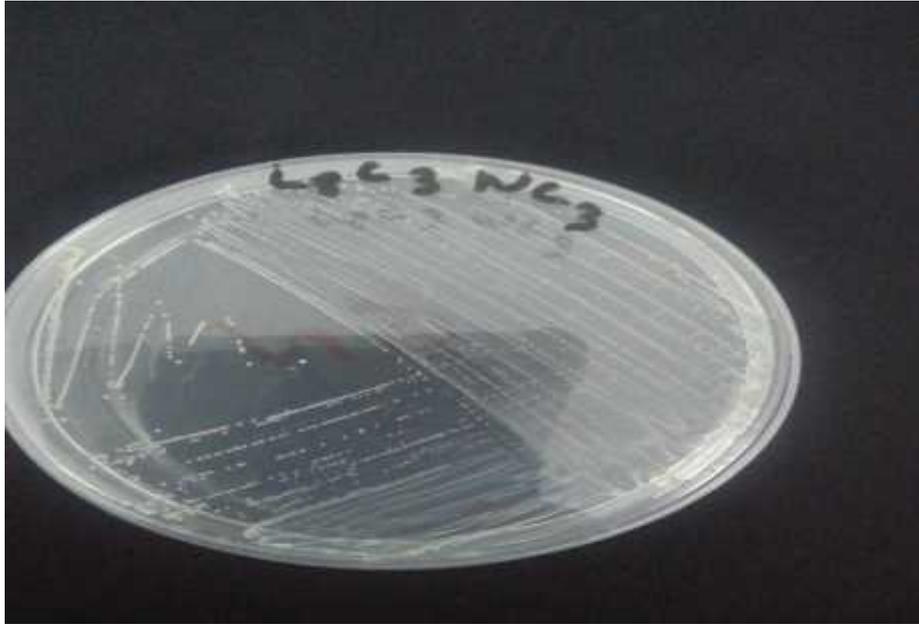


Photo11 : Poussée de la colonie caractéristique sur GN (photo personnelle)

➤ **Identification Biochimique :**

• **Test de catalase :**

La catalase est une oxydoréductase intervenant dans le mécanisme de résistance à la bactéricidie.

A partir de la GN, une petite quantité de la culture bactérienne a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur ; on l'a ensuite mise dans une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) déposée sur une lame. Une réaction positive se traduit par la formation de bulles d'air.



Photo12 : Résultat positif du test de catalase (photo personnelle)

- **test de coagulase :**

Ce test n'est effectué que sur les colonies catalase positive, il permet la recherche de la coagulase, exo-enzyme capable in vitro de coaguler le plasma de lapin. A partir des boîtes de GN, à l'aide d'une pipette pasteur, nous avons prélevé une partie de chaque colonie purifiée (catalase positive) et nous l'avons ensemencé dans un tube à essai contenant du BHIB et incubé à 37°C pendant 24 h. Dans des tubes stériles, nous avons ajouté stérilement 0,1 ml de chaque culture à 0,3 ml de plasma de lapin et incubé à 37°C.

Pour examiner la coagulation, les tubes à essai sont inclinés, nous considérons que la réaction est positive quand le coagulum occupe plus que la moitié du volume initialement occupé par le liquide.



Photo13 : Résultat positif du test de coagulase (photo personnelle)

➤ **Détermination de la sensibilité aux antibiotiques :**

❖ **Antibiogramme :**

Pour cette partie nous nous sommes référés à la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) édition 2014.

✓ Préparation de l'étalon McFarland 0,5 :

Nous avons ajouté 0,5mL d'une solution à 0,048mol/L de BaCl₂ à 99,5mL d'une solution 0,18mol/L (0,36N) de H₂SO₄ et la solution obtenue a été agitée vigoureusement.

Nous avons ensuite vérifié la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance à 625nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13. La suspension a été distribuée dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour préparer la suspension bactérienne. Une fois scellés, nous avons conservé ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

✓ Préparation de la suspension bactérienne :

A partir de notre purification, nous avons réalisé une suspension bactérienne dans des tubes remplis d'eau physiologique stérile pour atteindre une densité optique équivalente à celle de l'étalon 0,5 McFarland. Pour ce faire, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur plusieurs colonies de même morphologie, ces dernières ont été mises ensuite en suspension dans l'eau physiologique stérile.



Photo14 : Prélèvement des colonies (photo personnelle)

La suspension bactérienne est ensuite comparée au témoin 0,5 McFarland. Il est recommandé d'employer un densitomètre pour ajuster l'inoculum, mais par manque de ce dernier nous avons comparé à l'œil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon (après agitation de la suspension bactérienne et de l'étalon sur un Vortex^R). La comparaison à l'œil nu se fait en se plaçant face à un fond blanc avec des lignes noires comme le préconise aussi la

standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) édition 2014.

L'ajustement de la densité bactérienne au tube 0,5 McFarland, s'opère en ajoutant soit de l'eau physiologique stérile soit les bactéries.

✓ **Ensemencement : Méthode de Kirby-Bauer :**

Des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton (MH) sont ensemencées par la méthode d'épuisement à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne et fortement pressé sur la paroi du tube afin de le décharger au maximum.

Nous avons frotté l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée. L'opération a été répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois et en pivotant l'écouvillon sur lui-même.

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

✓ **Antibiotiques testés :**

Pour le choix des antibiotiques à tester, nous nous sommes référés au tableau n°32 de la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) édition 2014. La totalité des antibiotiques n'a pu être testée par manque de ces derniers sur le marché.

la tétracycline (30µg), la vancomycine (30µg), l'erythromycine (15 µg), la clindamycine (2 µg), l'ofloxacin (5µg), amoxicilline + acide clavulanique (20/10µg), la gentamycine (10µg), la Néomycine (30µg), chloramphénicol (30 µg), la pénicilline G (10UI), l'oxacilline (1µg), la cefoxitine (30µg), triméthoprim + sulfaméthoxazole (1, 25/23,75 µg)

✓ **Application des disques d'antibiotiques :**

Les disques sont déposés fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée. Le contact avec la surface doit être étroit. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide. Le nombre de disque déposé par boîte ne doit pas dépasser les six disques du fait du chevauchement des zones d'inhibition mais aussi pour limiter les interférences entre les antibiotiques.



Photo15 : Dépôt d'un disque d'antibiotique (photo personnelle)



Photo16 : Dépôt de 5 antibiotiques sur la boîte de Pétri (photo personnelle).

Chaque disque d'antibiotique est appliqué à l'aide d'une pince que nous devons stériliser à chaque dépôt d'un disque. L'incubation se fait dans les 15mn qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30mn à 35 +/- 2°c pendant 16 à 24h.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle. Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant sur la table de lecture n° 36 de la standardisation des testes de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) édition 2014 (voir annexe 2). Ensuite, la bactérie est classée dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante.



Photo17 : visualisation des zones d'inhibition des ATB après incubation (photo personnelle)

Nous avons utilisé la souche de contrôle : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

II. Résultat et discussion :

Les souches de *S. aureus* sont connues pour être fréquemment résistantes aux antimicrobiens à cause de leur capacité à produire une barrière exopolysaccharide (**Gundogun et al, 2006**).

Parmi les 20 souches analysées, certaines ont montrés une résistance vis-à-vis plusieurs antibiotiques, comme le montre le tableau et la figure suivants :

Tableau5 : pourcentage de sensibilité des souches de *S.aureus*.

Nombre de souche	Sensible à tous les ATB	Résistance unique	Résistance double	Résistance multiple (3)
20	12 (60%)	6 (30%)	1 (5%)	1 (5%)

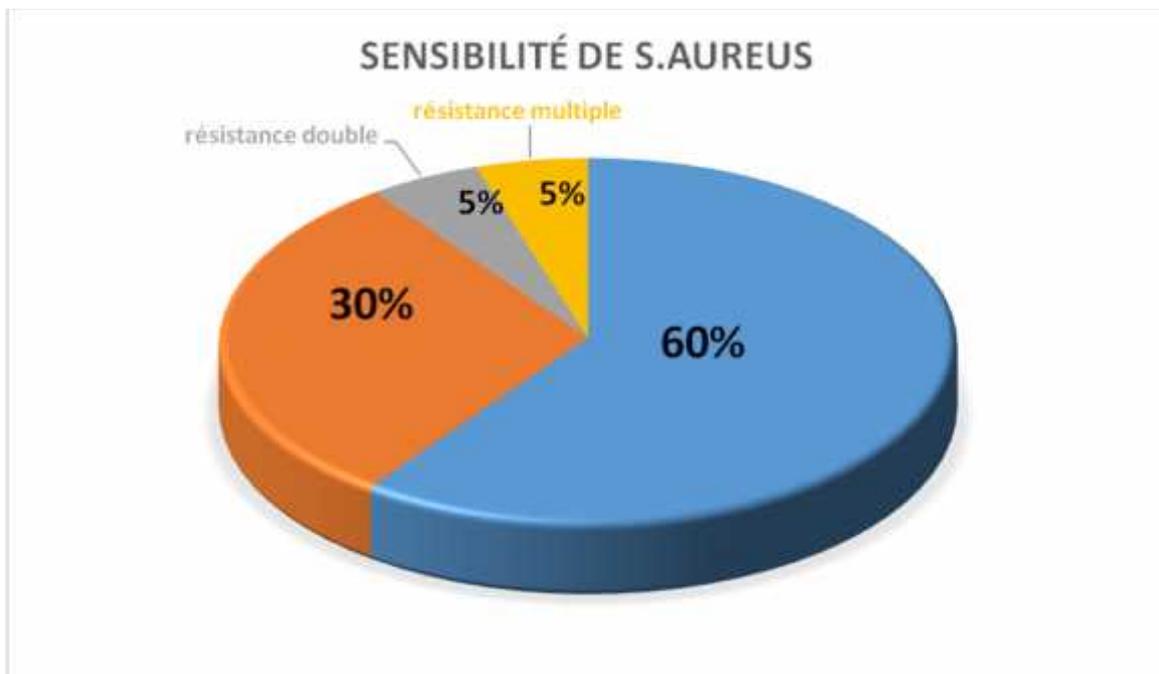


Figure9 : pourcentage de sensibilité aux ATB des souches de *S.aureus*

Sur les 20 souches de *S.aureus* nous avons constatés que 60% des souches sont sensibles à tous les antibiotiques, six souches (30%) ont montré une résistance à un seul ATB, une souche (5%) une résistance à la pénicilline et la néomycine. Les résistances multiples étaient présentes dans 5% des souches.

L'analyse sur le lait cru faite par **Chaalal en 2013** a démontré que sur 56 souches testés aucun des isolats n'étaient sensibles à tous les antibiotiques. Trois souches (5,3%) ont montré une résistance unique, 6% une résistance double alors que pour les résistances multiples le taux été de 83,9% ce qui est tout à fait différent des résultats obtenus au cours de notre étude.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 6.

Tableau6 : Résultats de l'antibiogramme des souches de *S.aureus* (n = 20)

Antibiotiques	Sensible n (%)	Intermédiaire n (%)	Résistant n (%)
TE	20 (100%)	0	0
E	19 (95%)	0	1 (5%)
CM	20 (100%)	0	0
SXT	20 (100%)	0	0
OFX	20 (100%)	0	0
AMC	20 (100%)	0	0
GM	20 (100%)	0	0
N	18 (90%)	0	2 (10%)
C	20 (100%)	0	0
P	14 (65%)	0	7 (35%)
FOX	19 (95%)	0	1 (5%)

TE : tétracycline ; **E** : érythromicine ; **CM** : clindamycine ; **SXT** : triméthoprim + Sulfaméthoxazole ; **OFX** : ofloxacine ; **AMC** : amoxicilline + acide clavulanique ; **GM** : gentamicine ; **N** : néomycine ; **C** : chloramphenicol ; **P** : penicilline ; **FOX** : cefoxitine.

Des 13 ATB testés, 7 d'entre eux (tétracycline, clindamycine, triméthoprim + Sulfaméthoxazole, ofloxacine, amoxicilline + acide clavulanique, gentamycine et chloramphenicol) aucune résistance n'a été observée. Les antibiotiques pour lesquels des résistances ont été observées sont, par ordre croissant (la penicilline avec un taux de 35%, la néomycine avec un taux de 10%, la cefoxitine et l'érythromycine avec un taux de 5%). Nous n'avons pas pu étudier la sensibilité des souches à analyser vis-à-vis la vancomycine et l'oxacilline car sur la table de lecture n° 36 de la

standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) édition 2014, ils ne sont pas interprétables.

La présence de résistance aux antibiotiques dans le lait cru a pour conséquence d'affaiblir l'efficacité de l'antibiotique dans le traitement des infections dues à *S.aureus* résistantes chez le consommateur. Cette résistance peut se propager dans l'environnement, être transmise à d'autres bactérie et être à l'origine du développement de nouvelles résistances croisées à des antibiotiques de la même famille.

Nous avons constaté qu'une souche de *S.aureus* est résistante à la cefoxitine avec un taux de 5%, ce taux est plus élevé que celui retrouvé lors de l'étude effectuée par **Chaalal** qui révèle un taux de 3,57%, de même ce taux est aussi élevé comparé au taux enregistré par **Normanno et al, 2007** qui a isolé 0,4% de SARM dans le lait de vache. Cette résistance indique que la souches est résistante à la méticilline et donc nous somme face a une SARM.

Les infections à SARM sont un problème de santé public à l'échelle mondiale, en raison de la gravité des maladies qu'ils peuvent causer (**Normanno et al, 2007**).

La plupart des animaux peuvent être colonisés par *S. aureus*, mais c'est seulement en **1995**, **Kluytmans et al.** Décrit la première éclosion d'origine alimentaire de SARM qui causa la mort à cinq des vingt-un patients (**Normanno et al, 2007**).

En matière de sécurité alimentaire, la présence de SARM dans les aliments et notamment dans le lait cru de bovins présente une menace avérée, surtout quand il est consommé cru ou utilisé dans la production fromagère, constituant ainsi une source de contamination pour les produits laitiers transformés. Le risque de contamination du consommateur peut être plus important qu'il ne paraît car à notre avis si le nombre d'échantillons était plus grand (50) le nombre de SARM aurait peut être été plus élevés. Les taux de sensibilité sont représentés dans l'histogramme ci-dessous

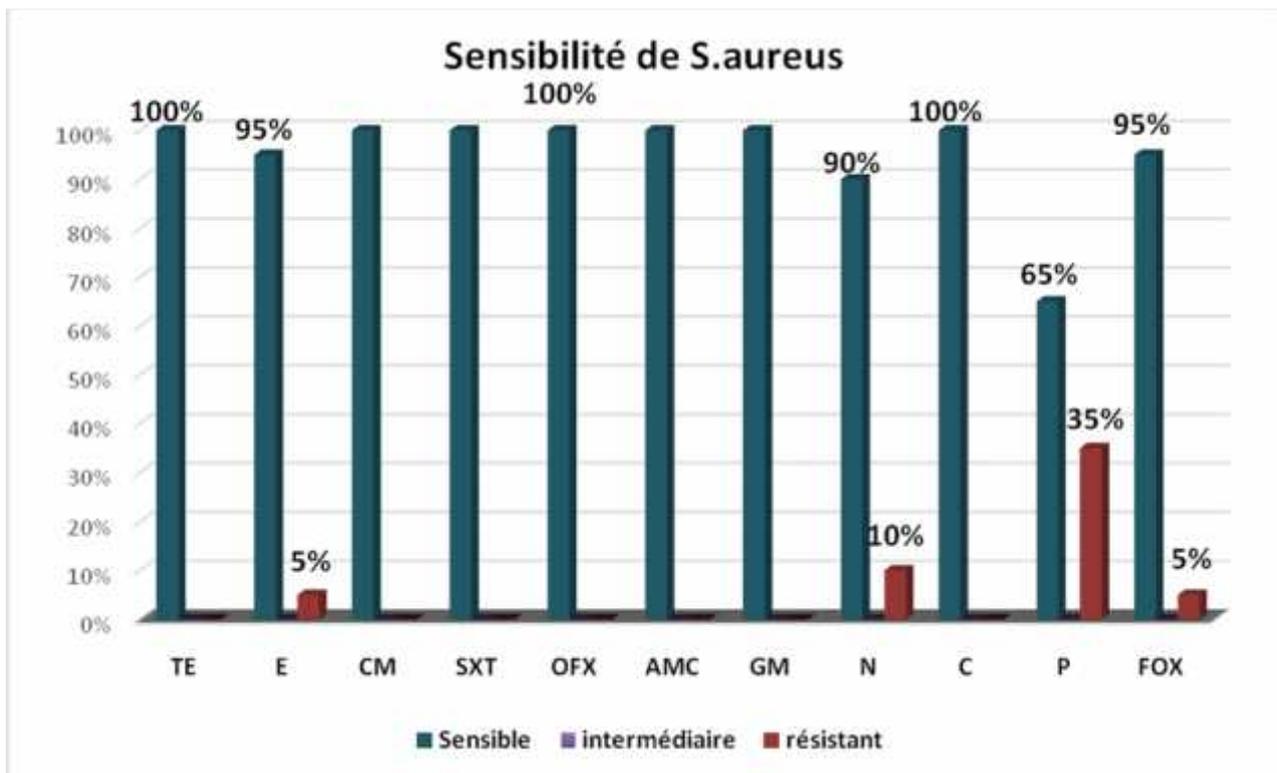


Figure10 : la sensibilité des souches de *S.aureus* aux antibiotiques

- une étude faite par **Ben Hassen et ses collaborateurs** sur le lait de vaches atteintes de mammites en Tunisie a montré des taux de résistance de *S.aureus* plus élevés que ceux de notre étude : la pénicilline (64%), chloramphénicol (8%), tétracycline (36%). Alors qu'ils n'ont enregistré aucune résistance à la gentamicine, ofloxacine et l'érythromycine.

Les résultats de l'étude de la sensibilité antimicrobienne de *S.aureus* responsables de mammites subcliniques faite par **Boutet et ses collaborateurs en Belgique en 2005** montrent une résistance à la pénicilline considérablement plus élevée que la nôtre avec un taux de 87,5%.

Nous pensons que le développement de la résistance antimicrobienne dépend de :

- ✓ La présence de gènes codant pour une résistance et la pression sélective engendrée par l'utilisation des antibiotiques influence l'expression et l'acquisition d'un phénotype de résistance. D'ailleurs, une relation étroite existe entre le taux de développement de résistance et les quantités d'antibiotiques utilisés (**Lopez-Lozano et al, 2000**).
- ✓ Les erreurs de diagnostic conduisent à l'utilisation d'antibiotiques inactifs contre le germe infectant, mais aussi parfois à une antibiothérapie injustifiée en absence d'infection bactérienne (**Pajot., 2007**).

✓ Les surinfections et substitutions de flore surviennent facilement lorsque l'antibiotique utilisé est actif sur les bactéries commensales, favorisant la sélection d'espèces qui lui sont naturellement résistantes (**Rebiahi., 2012**).

✓ Les mammites sont parmi les causes les plus fréquentes d'utilisation des antimicrobiens en exploitation laitière. Les mammites cliniques aiguës sont quasi systématiquement traitées aux antibiotiques.

III. Conclusion :

Dans cette étude nous avons déterminé l'antibiorésistance de 20 souches de *Staphylococcus aureus* qui ont été isolées du lait cru dans une étude précédente.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que 60% des souches sont sensibles à tous les antibiotiques, 30% présentent une résistance unique (majoritairement à la pénicilline), 5% présentent une résistance double et 5% une multi résistance (3).

Nous n'avons enregistré aucune résistance à 7 antibiotiques (tétracycline, clindamycine, triméthoprim+Sulfaméthoxazole, ofloxacine, amoxicilline + acide clavulanique, gentamycine et chloramphenicol). Le plus haut taux de résistance a été observé pour la pénicilline (35%), suivi par la néomycine (10%), la céfoxitine (5%) et l'érythromycine (5%).

Ceux-ci peuvent être expliqués par l'utilisation accrue et non contrôlée des antibiotiques (dans un cadre thérapeutique ou prophylactique) dans les exploitations laitières ce qui a engendré l'acquisition de certains phénotypes de résistance vis-à-vis ces antibiotiques.

IV. Recommandation :

L'usage abusif ou excessif des antibiotiques accélère le phénomène de la résistance, de même que de mauvaises pratiques de prévention et de lutte contre l'infection. Nous pouvons prendre des mesures à tous les niveaux pour réduire l'impact et limiter la propagation des résistances en :

- Veillant à mettre en place un plan d'action national robuste pour endiguer la résistance aux antibiotiques ;
- Améliorant la surveillance des infections résistantes aux antibiotiques ;
- Renforçant les politiques, les programmes et la mise en œuvre des mesures de prévention et de lutte contre les infections ;
- Réglementant et favorisant l'usage rationnel et la mise à disposition des médicaments plus appropriés ;
- Utilisant rationnellement les antibiotiques après une lecture interprétative de l'antibiogramme dans des conditions critiques, le choix thérapeutique devrait être fondé sur des données de sensibilités spécifiques ;
- Diffusant les informations sur l'impact de la résistance aux antibiotiques.
- N'utilisant pas les antibiotiques comme facteur de croissance ou pour prévenir les maladies ;
- Développant les alternatives permettant d'éviter le recours aux antibiotiques ;
- Prenant des précautions rigoureuses en vue de réduire les risques de transmission de ces microorganismes, elles doivent être appliquées sur l'ensemble des animaux.
- En confortant le dispositif de suivi de la consommation des antibiotiques et de l'antibiorésistance.

Références bibliographiques

- **Abera T., Yoseph L., Behar M., et Befekadu U., 2016.** Bacteriological quality of raw camel milk along the market value chain in Fafen zone, Ethiopian Somali regional state. BMC Res Notes. 9, 1-6.
- **Akers, M. J, 2002.** Lactation and mammary gland, Iowa, USA, 278pp.
- **Anonyme1: Arrêté interministériel du 29 Safar 1414, 1993.**
- **Anonyme 2. 2012.** [http:// acnbh.org/arcs2011/antibiogramme-H-Chardon.pdf](http://acnbh.org/arcs2011/antibiogramme-H-Chardon.pdf).
- **Anonyme 3. 2012.** [http:// acnbh.org/arcs2011/antibiogramme-H-Chardon.pdf](http://acnbh.org/arcs2011/antibiogramme-H-Chardon.pdf).
- **Avorn, J.L., Barrett J.F., Davey P.G., McEwen S.A., O'Brien T.F., Levy S.B., 2001.** Organization mondiale de la santé (OMS). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics, 2001.
- **Bachir M. E.A .A., 2014.** Studies on Clinical, Aetiological and Antibiotic Susceptibility of Mastitis in She-camel in butane area. 100.
- **Balaban et al, 2000.** Prevention of diseases caused by *Staphylococcus aureus* using the peptide RIP.
- **Barkema H., Green A. J., Bradley R. N., Zadoks , 2009:** the role of contagious disease in udder health. J. Dairy Sci. 92 : 4717-4729.
- **Bates J., Jordens Z.J., Griffiths D.T., 1994.** Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. J. Antimicrob Chemoter. 34, 507- 516.
- **Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., turck M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 36, 493-496.
- **Ben Hassen S.I., Messadi L.I., Ben Hassen A., 2003.** Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite.
- **Ben Mahdi et Ouslimani, 2009.** Mise en évidence de résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'algérois. European Journal of scientific research, 36(3), 357-362.
- **Berger-Bächli B, 1999.** Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life Sci. 56, 764-770.
- **Benabbou T.A, 2012.** Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées de produits artisanaux algériens.
- **Bismuth R., Leclercq R., 2000.** *Staphylococcus aureus* et antibiotiques. Précis de bactériologie clinique .edition Freyney J RF, Hansen W, Bollet C, ESKA, Paris, 611-918.
- **Boudier J.F et Luquet F.M., 1978.** Utilisation du lactosérum en alimentation humaine et animale, N°21, édition APRIA, Paris.

- **Boutet P., Detilleux J., Motkin M., Deliege M., Piraux E., Depinois A., Debliquy P., Mainil J., Czaplicki G., Lekeux P., 2005.** Comparaison du taux cellulaire et de la sensibilité antimicrobienne des germes responsables de mammite subclinique bovine entre les filières conventionnelle et biologique.
- **Carattoli, A., 2001.** Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*. 32, 243-259
- **Chaalal W., 2013.** Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaires.
- **Chabbert Y. A., 1963.** L'antibiogramme : sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques. Editions de la tourelle, Saint-Mandé.
- **Chambers H.F., 1997.** Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Review* 10, 781-791.
- **Chardon H., Brugere H., 2014.** Usage des antibiotiques élevage et filières viandes. *Cen Inf Viand*. 36.
- **Chavaux S., Beguin P., Aubert J.P., 1992.** Site-directed mutagenesis of essential carboxylic residues in *Clostridium thermocellum* endoglucanase CEID.
- **Child J., Andrews J., Boswell F., Brenwald N., Wse R., 1995.** The *in vitro* activity of CP-99,219, a new naphthyridone antimicrobial agent: a comparison with fluoroquinolone agents. *J. Antimicrob Chemother*. 35, 869-76.
- **Chopra I., Roberts M., 2001.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232-260.
- **Cristino J.M., 1999.** Correlation between consumption of antimicrobials in humans and development of resistance in bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* .12, 199–202.
- **Escobar E., 2009.** Etat des lieux des infections cutanées communautaires à *Staphylococcus aureus* producteurs de la leucocidine de Paton –Valentine et proposition s de prise en charge en médecine de ville. Thèse de doctorat en médecine Faculté de médecine. Université de Paris Descartes.
- **European Food Safety Authority (EFSA). 2014.** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J* . 12, 336.
- **Eveillard M., 2007.** Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de

cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat en biologie cellulaire. Université d'Angers, France.

- **Faye K., (2005).** Le point sur l'usage vétérinaire des antibiotiques: impact sur l'antibiorésistance des bactéries en santé animale et humaine. Masson, Paris. 7, 45-52.
- **Ferney, (2007).** précis de bactériologie clinique, 2eme Edition.
- **Flandrois J.C., Courco L., Lameland J.F., Ramuc M., Sirot J., Souncy C.J., (1997).** bactériologie médicale. Presses Universitaires de Lyon. ISBN 2 7297 0567 B.
- **Garner J.S., Jarvis W.R., Emori T.G., (1988).** CDC definitions for nosocomial infections. Am. J. Infect. Control 16,128-140
- **Guiraud et Galzy, (1980).** l'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition l'usine. 119p.
- **George G., Khachatourians B.A., (1998).** Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. Canadian Medical Association. 159, 1129-1136.
- **Ghuysen J.M., (1994).** Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. Trends Microbiol. 2, 372-380.
- **Gillaspy et Iandolo, (2009).** The *Staphylococcus aureus* NCTC8325 Genome. Gram positive pathogens. ASM press, Washington, pp 381- 413.
- **Gony M., Puyt J.D., Pellerin J.L., (2001).** Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, Edition le point vétérinaire. P 165-168.
- **Hermann T., (2005).** Drugs targeting the ribosome. Correct opinion in Microbiology. 15, 355-366.
- **Hiramatsu K., Katayama Y., Yuzawa H., (2002).** Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 292, 600-604.
- **Jacob et al, (2011).** la qualité du lait cru un défi permanent. Edition Agroscope Liebfeld-Posieux. Forum n°78 f.pp :5-17.
- **Jorgensen J.H., Turnidge J.D., Washington J.A., (1997).** Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American society for microbiology, 1526-1543.
- **Jorgensen J.H., Ferraro M.J., (2009).** Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clin. Infect. Dis. 49 (11): 1749-1755.
- **Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K., (2000).** A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1549-1555.

- **Khachatourians, G.G., 1998.** Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can Medic Assoc J* 159, 1129- 1136.
- **Kluytmans J., Van Belkum A., Verbrugh H., 1995.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks.
- **Knothe G.P., Shah P., Keremery V., Antai M., Mitsuhashi S., 1983.** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates. *Infections*, 11, 315-317.
- **Korta L.P., Mobashery S., 1998.** β -lactam antibiotic, β -lactamases and bacterial resistance. *Bull. inst. Pasteur, Elsevier Paris*. 96:139-150.
- **Kuzdzal S., Manson W., Moore J., 1980.** The constituents of cow's milk. *International dairy federation bull.*
- **Larpent, 1990.** Lait et produits laitiers non fermentés. Dans *Microbiologie alimentaire*. (Bourgeois C.M). tome1 : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Edition Tec et Doc. Lavoisier. Pp : 201- 215.
- **Leclercq, 2002.** Resistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann. Fr Anesth. Réanim.* 21, 375-383.
- **Levesque, 2006.** la traite des vaches laitières. Etape par étape vers la qualité Guide pratique. Edition Edicagri. Quebec.
- **Levy S.B., Marshall B., 2004.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine Reviews*. 10, 122-129.
- **Levy S.B., FitzGerald G.B. and Macone A.B., 1976.** Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N Engl J Med* 295, 583-588.
- **Lopez-Lozano J.M., Monnet D.L., Yague A., Burgos A., Gonzalo N., Campillos P., Saez M., 2000.** Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 14, 21-31.
- **Lozano C., Haythem G., Karim B.S., Myriam Z., Caren T., 2016.** *Staphylococcus aureus* in animals and food: Methicillin Resistance, Prevalence and Population Structure. A review in te African Continent. *Microorganisms*. 4, 1-19.
- **Lynn El Haddad, 2014.** Utilisation des bactériophages pour le contrôle de *Staphylococcus aureus* dans les produits laitiers. P 1.
- **Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., 2000.** In: *Brockbiology of microorganisms*, Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, USA. Ninth Edition, pp, 749-771.

- **Madigan M.T, Martinko J.M, Parker J., 2002.** In/ Brockbiology of microorganisms, Prentice Hall Upper Saddle River, NJ. USA. Ninth edition, pp. 749-771.
- **Mandell G.L., Bennett J.E, Dolin R., Mandell D.B., 2009.** Principales and practice of infectious diseases. Sixième édition, Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA. Edition en ligne.
- **Marshal B. M et Levy S.B., 2011.** Food animals and antimicrobials : impacts on human health. Clin. Microbiol Rev. 24, 718-733.
- **McCallum N., Karauzum H., Getzmann R., Bischoff M., Majcherczyk P., Berger Bachi B. Landmann R., 2006.** In vivo survival of teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* and fitness cost of teicoplanin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2352–2360.
- **McCallum N., Berger-Bachi B., Senn M., 2010.** Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology 300, 118–129.
- **Mesfin Z., 2015.** Hygienic practices, bacteriological quality of cow milk and its public health importance along the dairy value chain in sidama high lands of southern Ethiopia. A thesis submitted to the college of veterinary Medicine and Agriculture of Addis Ababa University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Veterinary Public Health. 81.
- **Mevius D.J., Rutter J.M., Hart C.A., Imberechts H., Kempf G., Lafont J.P., Luthman J., Moreno M.A., Pantosti A., Pohl P., Wiladsen C.M., 1999.** Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products., P 1-57.
- **Nilius A.M., Ma Z., 2002.** Ketolides: the future of microlides Current Opinion in pharmacology. 2, 1-8.
- **Normark B.H., Normark S., 2002.** Evolution and spread of antibiotic resistance. Journal of international Medicine. 252, 91-106.
- **Normanno G., Corrente M., La S.G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellacicco A.L., Virgilio S., Celano G.V., 2007.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. International Journal of Food Microbiology 117, 219-222.
- **Ogawara H., 1981.** Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. Microbial. Rev, 45, 591-619.
- **Ogston., 1984.** On abscess, classics in infectious diseases.
- **Oxoby M., 2002.** Etude sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones, thèse de docteur en chimie organique de l'université Bordeaux I, école doctorale des sciences chimiques, p 3-12.

- **Pajot O., Regnier B., 2007.** Échec de l'antibiothérapie en réanimation. Failure of antibiotic therapy in the intensive care unit. *Reanimation*; 16: 179–192.
- **Pesavento G., Ducci B., Comodo N., Lo Nostro., 2007.** An Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Food Control* 18, 196–200.
- **Pitout J.D., Hanson N.D., Church D.L., Laupland K.B., 2004.** Populations- based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum β -lactamases: importance of community isolates. *Clin Infect Dis.* 38, 1736-1741.
- **Prescott et al, (2011).** A region of the nucleosome required for multiple types of transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 188.
- **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D., 2010.** *Microbiologie. 2ème Edition Française.* De Boeck Université.
- **Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D.** Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In: Iowa State University Press. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine.* 3rd edition. pp 27-49.
- **Quincampoix J.C. and Mainardi J.L., 2001.** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation.* 10, 267-275.
- **Rainard et Gilbert., 2010.** Effect of naturally occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. *Am. J. Vet. Res.,* 49.
- **Ramirez M.S., Tolmasky M.E., 2010.** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates,* 13, 151–171.
- **Rebiahi S.A., 2012.** Caractérisation de souche de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen.
- **Rennie R., Turnbull L., Brosnikoff C., 2008.** Comparison of Oxoid M.I.C. Evaluator device with broth microdilution and E test device from AB Biodisk for antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 859.
- **Réseau d'épidémiologie-surveillance de l'antibiorésistance de bactéries pathogènes animales (Résepath). 2013.** Evolution du réseau et des résistances depuis dix ans. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentaire.* 53, 16-19.
- **Rice, 2006.** Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *The American Journal of Medicine* 119, 11–19.
- **Rosenbach, 1884.** *microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen.*
- **Ross J.I., Eady E.A., Cove J.H., Cunliffe W.J., Baumberg S., Wootton J.C., 1990.** A member of the ATP-binding transport super-gene family encodes inducible erythromycin resistance in staphylococci. *Mol. Microbiol.* 4, 1207-14.

- **Sabouni F., Mahmoudi S., Bahador A., Pourakbari B., Reihaneh H. S. R., Taghi H. A. M., Nikmanesh B. et Amishi S., 2014.** Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolates in an Iranian Referral Children's Hospital. *Osong public Health Res Perspect.* 5, 96-100.
- **Serieys, 1995.** concentration cellulaire du lait individuel de vache : influence de l'état d'infection mammaire, du numéro, du stade de lactation et de la production laitière., 16.
- **Sharma D.S., Pradeep K.S., Anjali M., 2011.** Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of drug resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Milk of Dairy Cattle. 14, 342-346.
- **Singer R.S., Finch R., Wegener H.C., Bywater R., Walters J. and Lipsitch M., 2003.** Antibiotic resistance- the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis.* 3, 47-51.
- **Swann M.M., Field B.K., 1969.** Use of antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. UK Joint Committee Report.
- **Taber H.W., Mueller J.P., Miller P.F., Arrow A.S., 1987.** Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* 51, 439-57.
- **Tankovic J., Aubry-damon H., Leclercq R., 1997.** Resistance aux antibiotiques autres que les beta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. *Méd. Mal. Infect.* 27, 207-16.
- **Teshome B.T., Genene T., Bizuayehu B. et Abebe M., 2016.** Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* from raw camel and goat milk. 10, 1066-1071.
- **Tunneval G., Ericson H., 1954.** Sensitivity tests by disc method as a guide for chemotherapy. *Antibiotics and chemotherapy.* 4(8)? 886-893.
- **Van den Bogaard A.E., and Stobberingh E.E., 1999.** Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs.* 58, 589-607.
- **Vignola, 2002.** science et technologie du lait Transformation du lait. Edition Presses Internationales Polytechniques, Canada. Pp, 3-75.
- **Wattiaux M.A., 2001.** La machine à traire, Guide technique, essentiels laitiers : lactation et récolte du lait, Institut Babcock pour la recherche et le développement international du Secteur laitier, USA, 2005, 5p.
- **Yamashita S.K., Louie M., Simor A.E., rachlis A., 2000.** Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in critical care unit. *Can J Infect Dis.* 11, 107- 111.
- **Zeba B., 2005.** Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African journal of biotechnology,* 4(13), 1559-1562.

ANNEXES

Annexe 1 : Gélose Mueller- Hinton

La composition:

- Infusion de viande de bœuf..... 300 ml
- Peptone de caséine..... 17.5 g
- Amidon de maïs..... 1.5 g
- Agar..... 10.0 g

pH= 7.4

Préparation :

37 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 116°C, 15 min.

Gélose Mueller-Hinton additionnée de 4% Na Cl

- bM H Agar..... 38.0 g
- Na Cl..... 40.0 g
- Eau distillée..... 1000 ml

Préparation :

Prêt à l'emploi en flacons de 250 ml.

Annexe 2 :

Nous nous sommes référés au tableau n°32 de la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) édition 2014.

Tableau7 : la liste des antibiotiques à tester

Famille des antibiotiques	Antibiotiques testés	Charge des disques
bétalactamines	Pénicilline	10UI
	Oxacilline	1µg
	Cefoxitine	30 µg
aminosides	Gentamicine	10 µg
	Néomycine	30 µg
Macrolides	Erythromicine	15 µg
	Clindamycine	2 µg
Glycopeptides	Vancomycine	30 µg
Quinolones	Ofloxacine	5 µg
Autres	Tétracycline	
	Chloramphénicol	30 µg
	Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	30 µg
	Acide clavulanique + amoxicilline	1,25/ 23,75 µg

Annexe 3 :

Nous nous sommes référés au tableau n°36 de la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) édition 2014.

Tableau8 : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus*

Antibiotiques testés	Diamètres critiques		
	R	I	S
Pénicilline	28	-	29
Pénicilline + Novobiocine	14	15 - 17	18
Oxacilline (S.aureus et S.lugdunensis)	--	--	--
Cefoxitine (S.aureus)	21	-	22
Gentamicine	12	13-14	15
Néomycine / Kanamycine	13	14-17	18
Vancomycine (S.aureus)	--	--	--
Vancomycine (S.C.N)	--	--	--
Érythromycine	13	14-22	23
Clindamycine	14	15-20	21
Ofloxacine	16	17-22	23
Sulfisoxazole	12	14-16	17
Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	10	11-15	16
Tétracycline	14	15-18	19
Bacitracine	15	-	15
Chloramphénicol	12	13-17	18
Amoxicilline + acide clavulanique	13	14-17	18

Résumé :

L'usage des antibiotiques en science animale est très répandu en Algérie. Leur emploi paraît essentiel, mais en même temps il pose beaucoup de problèmes du fait de leur utilisation arbitraire. Les conséquences sont graves aussi bien sur la santé du consommateur que sur la technologie laitière. Vingt souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru ont été testées par la méthode des disques vis-à-vis de 13 antibiotiques. Les résultats obtenus montrent que 60% des souches sont sensibles à tous les antibiotiques, 30% présentent une résistance unique, 5% présentent une résistance double et 5% présentent une résistance multiple.

Nous avons constaté que sur les 13 antibiotiques, pour 7 (tétracycline, clindamycine, triméthoprim+Sulfaméthoxazole, ofloxacine, amoxicilline + acide clavulanique, gentamycine et chloramphenicol) aucune résistance n'a été observée. Les antibiotiques pour lesquels des résistances ont été observées sont, par ordre croissant (la pénicilline avec un taux de 37%, la néomycine avec un taux de 10%, la céfoxitine et l'érythromycine avec un taux de 5%). La résistance à la céfoxitine est inquiétante car elle est le témoin de la présence de SARM qui représente un danger potentiel pour le consommateur.

Mots clés : *Staphylococcus aureus* - lait cru de citerne – antibiorésistance - SARM

Abstract:

The antibiotic use in animal production is very widespread in Algeria. The use seems essential, but at the same time it poses a lot of problems because of the arbitrary use. The consequences are serious both on the consumer health and on milk technology. Twenty strains of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk were tested by disc diffusion technique with a range of 13 antibiotics. The results obtained show that 60% of strains are sensitive to all antibiotics, 30% have a unique resistance, 5% with double resistance and 5% with multiple resistance.

All isolates were sensitive to 7 antibiotics (tétracycline, clindamycine, triméthoprim + Sulfaméthoxazole, ofloxacine, amoxicilline + acide clavulanique, gentamycine et chloramphenicol). 37% of isolates were resistant to penicillin, 10% to neomycin, 5% to erythromycin and 5% to cefoxitin. Cefoxitin resistance is worrying because it is the witness of the presence of MRSA which represents a potential consumer hazard.

Key words: *staphylococcus aureus* – tank raw milk - antibiotic resistance - MRSA

:

ان استعمال المضادات البيولوجية في العلوم الحيوانية منتشر جدا في الجزائر. يبدو أن استعمالها ضروري، و لكنه في نفس الوقت يطرح الكثير من المشاكل بسبب الاستعمال التعسفي لهذه الأخيرة. خطيرة بالنسبة لصحة المستهلك و أيضا تكنولوجيا الحليب.

تم اختبار عشرين سلالة من المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من الحليب الخام عن طريق تقنية انتشار المضاد الحيوي في الوسط الصلب. 13 مضاد حيوي. المتحصلة تظهر أن : 60% من السلالات حساسة لكافة المضادات الحيوية ، 30% 5 % لمضادين و 5 % .

كل السلالات أظهرت حساسية لسبع مضادات حيوية ، tétracycline, clindamycine, triméthoprim + Sulfaméthoxazole, ofloxacine, (amoxicilline + acide) clavulanique, gentamycine et chloramphenicol pénicilline 37% : néomycine 10 % érythromycine 5 % cefoxitine 5 % . cefoxitine امر مثير للقلق لأنه دليل على وجود SARM يمثل خطرا محتملا للمستهلك.

الكلمات المفتاحية : المكورات العنقودية الذهبية - الحليب الخام – مقاومة المضادات الحيوية - المكورات العنقودية الذهبية

meticillin -