

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Spécialité Microbiologie fondamentale



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

**Etude de la résistance de *Staphylococcus aureus*  
résistant à la méthicilline à la nouvelle génération  
d'antibiotique "Ceftaroline"**

Présenté par :

**MEZIANE ZOULIKHA & OURARI SORAYA**

Soutenu le : **07 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr BETTACHE AZZEDINE

MCA

Président

Mr DJOUDI FARHAT

MCA

Encadreur

Mme GHAROUT ALIMA

MCB

Examinatrice

**Année universitaire : 2017 / 2018**

# Dédicaces

*J'adresse, surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à mes parents qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de toutes mes années d'études, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.*

*Mes dédicaces sont adressées à mon adorable sœur Sabrina, ainsi qu'à mes chers frères Badis et Saber, ma tante Samia et toute la famille.*

*A toute mes amies sans exception, qui m'ont aidé et supporté mes mauvaises et rares bonnes humeurs, et à celle avec qui j'ai partagé ce travail Soraya, tous les membres de sa famille et toute la promotion de MF année 2017 -2018.*

*A tous ceux qui me sont chers et qui m'aime*

*Zoulikha*

# Dédicaces

*A mes très chers parents, que Dieu les garde pour moi et les protège de toute peine*

*A mon cher frère ADEL et mes sœurs : SIHEM, LAMIA , NABILA*

*A mes deux chers copines FAIROUZ et THELELI.*

*A ma binôme : ZOOUZO*

*A toute la promotion MF à qui je souhaite un bon parcours  
professionnel.*

*A tous ce qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## REMERCIEMENTS

*Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'ALLAH Miséricordieux le tout puissant qui nous a donné la force afin de l'accomplir.*

*Nous tenons à exprimer toute notre connaissance à notre promoteur **Mr DJoudi Ferhet** pour nous avoir encadrés et pour sa disponibilité tout au long de notre travail.*

*Nous remercions également **Mr BETTACHE**. Nous vous exprimons toute notre gratitude d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance. C'est un grand honneur pour nous.*

*Nous remercions vivement notre examinatrice **Mme GAROUTA** d'avoir examiné et évaluer notre travail.*

*Nos remerciements vont aussi à l'égard de **Mme REHMANI** l'ingénieur du **laboratoire de microbiologie** pour ses conseils et sa gentillesse.*

*En fin nous tenant à exprimer notre profonde sympathie à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de nos études et tout particulièrement aux enseignants de la spécialité.*

# SOMMAIRE

## Liste des Tableaux.

## Liste des Figures.

## Liste des Abréviations.

<b>Introduction</b>	1
<b>Chapitre I : Synthèse Bibliographique.</b>	
I. <i>Staphylococcus aureus</i> : états de connaissance	2
I.1. Historique	2
I.2. Habitat et colonisation	3
I.3. Caractéristique bactériologique et biochimique	3
I.4. Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	4
I.5. Les maladies causées par <i>S. aureus</i>	5
II. <i>Staphylococcus aureus</i> et résistance aux antibiotiques	6
II.1. Résistant à la méthicilline	6
II.2. La cassette staphylococcique SCCmec, support de la résistance à la méthicilline	6
II.2.1. Le gène <i>mecA</i>	6
II.2.2. Structure de la cassette SCCmec	7
III. Le SARM et le problème de résistance aux antibiotiques	7
III.1. Exemple de la céftaroline	10
III.1.1. Mécanisme d'action	10
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes.</b>	
I. Objectif du travail	12
II. Culture et purification	12
III. Enrichissement	12
IV. Identification	12
1. Culture	13
2. Préparation du plasma	13
3. Epreuve de la coagulase	14
V. Criblage des SARM	14
V.1 Réalisation de l'antibiogramme	14
1. Principe	14
2. Technique	14
3. Recherche de la résistance du SARM à la cefoxitine	14
V.2. Etude de la résistance du SARM aux autres antibiotiques	14
<b>Chapitre III : Résultats et Discussion.</b>	
I. Résultats	17
I.1. Fréquence	17
I.1.1 Résultat de l'antibiogramme à la cefoxitine	18
II. Répartition des souches isolées	20
III. Discussion	23

## Références bibliographiques

## Annexes

Résumé

*Listes des  
Figures,  
Tableaux et  
Abréviations*

## *Liste des tableaux*

Tableau n°	titre	page
I	Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques testés	09
II	Les antibiotiques complémentaires testés et interpretation selon L'EUCAST	16

## *Liste des figures*

Figure n°	titre	page
I	Expression temporelle des facteurs de virulence chez <i>S. aureus</i>	04
II	les maladies causeés par <i>S. aureus</i>	05
III	Acquisition des résistances par <i>S. aureus</i>	08
IV	Structure chimique de l'acétate fosamil « la Ceftaroline »	10
V	Mécanisme d'action de la ceftaroline	11
VI	Schéma montrant l'action de l'enzyme coagulase	15
VII	Dépôt de disque de clindamycine et érythromycine (cote à cote)	17
VIII	Aspect microscopique de <i>S. aureus</i>	17
IX	résultat de test de coagulase	18
X	Souche de SARM détecté par le test à la céfoxitine	19
XI	statistique de <i>Staphylococcus spp</i> , <i>S. aureus</i> , et SARM obtenue	19
XII	Profil de résistance du SARM aux antibiotiques testés	21

XIII	Taux de résistance et de sensibilité du SARM à la clindamycine et l'érythromycine.	22
XIV	Résultat du test D	22

## *Abréviation*

**ATB** : Antibiotique.  
**CPT** : Céftaroline.  
**FOX** : Céfoxitine.  
**LNZ**: Linezolid.  
**SXT**: Trimethoprim-sulfaméthoxazole.  
**E** : Erythromycine.  
**CD** : Clindamycine.  
**RD** : *Rifampicine*.  
**VA** : Vancomycine.  
**LPV** : Leucocidine de pentanvalantine.  
**PBP** : Penicillin binding protein.  
**MLSb** : Macrolide-lincosamidestreptogramin.  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique.  
**ARN** : Acide Ribonucléique.  
**MH** : Muller Hinton.  
**BMR**: Bactéries multi résistantes.  
**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.  
**SASM**: *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline.  
**S-aureus** : *Staphylococcus aureus*.  
**RM** : Résistance multiple.  
**R** : Résistance.  
**S** : Sensible.  
**BHIB** : Bouillon coeur-cerveille (Brain Heart Infusion Broth).  
**PBP** : penicillin-binding protein.  
**DNase**: Désoxyribonucléase.  
**ORF X** :Open reading frame X .  
**PLP** : Protéine liant la pénicilline.  
**PLP2a**: Protéine Liant les Pénicillines 2a.  
**SCCmec**: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*.  
**agr** : Accessorygeneregulator.  
**Mec A** : gène de résistance à la méthicilline.  
**Nacl** : Chlorure de sodium.  
**IS** : Séquence d'insertion.  
**CCr** : Cassette chromosome recombinase.  
**FDA** :Food and Drug Administration.  
**USA** :United States of America.  
**CLSI** : clinical and laboratory standards institute



# Introduction

L'utilisation des antibiotiques a été un avancé majeur en médecine. Leur découverte a suscité beaucoup d'espoirs. De nouvelles molécules étaient régulièrement mise à jour au point que l'on a parfois cru pouvoir éradiquer certaines maladies infectieuses. Mais cet « âge d'Or » a été de courte durée. Les bactéries se sont rapidement adaptées, elles ont développées de nombreux mécanismes de résistance, c'est le cas de *Staphylococcus aureus*.

Cette bactérie a la capacité remarquable de s'adapter à différents antibiotiques. L'émergence et la propagation dans le monde entier de *Staphylococcus aureus* résistant à la *méthicilline* (SARM) au cours des 50 dernières années représente l'un des défis les plus sérieux pour les microbiologistes cliniques du monde entier. De plus, l'évolution de plusieurs lignées de SARM vers la résistance à des classes d'antibiotiques supplémentaires est un sujet de préoccupation croissante (Strommenger et al., 2014).

Une piste inattendue suscite de nouveaux espoirs. Malgré la règle solidement établie « que la résistance de *S. aureus* à la méticilline est à interpréter comme une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines », plusieurs molécules de cette classe, en cours de développement, possèdent une activité anti-SARM bien documentée. (Moreillon P. ; 2008) ;(Noel-GJ. , 2007)

Pour lutter contre cette résistance de nouvelles céphalosporines ont été synthétisées, exemple la ceftaroline.

Sur ce, l'objectif de notre travail s'articule sur les points suivants :

- Isolement et identification des souches de *Staphylococcus aureus*.
- La mise en évidence du caractère multi résistant des souches selon leurs profil de sensibilité à ces antibiotiques.

La multi résistance du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline persiste malgré la mise à jour de nouvelles molécules d'antibiotique. Qu'en est il de la céphalosporine de 5<sup>ème</sup> génération ?

# Chapitre I Synthèse bibliographique

## **I. *Staphylococcus aureus* : états de connaissance**

### **I.1 Historique**

Le staphylocoque fut découvert à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, grâce à l'apparition du microscope. Il fût d'abord observé dans du pus sous la forme de grains en amas par Robert Koch, puis Louis Pasteur (Le Noir et *al.*, 2009). Le nom de genre *Staphylococcus* provient de l'aspect en microscopie de la bactérie : du grec staphyle = grappe de raisin et kokkos = baies. En 1881, Alexander Ogston, un chirurgien écossais, démontra son rôle infectieux Il parvint cultiver la bactérie dans des œufs de poules et à réinfecter des animaux à partir d'abcès postopératoires. En 1884, Anton Rosenbach isola deux types de staphylocoques dont *Staphylococcus aureus* qu'il nomma ainsi en raison de sa couleur jaune d'or et qu'il opposa au *Staphylococcus albus* renommé depuis *Staphylococcus epidermidis*(Newsom et *al.*, 2008).

La grande plasticité du génome de *Staphylococcus aureus* est associée à la constante évolution des caractéristiques épidémiologiques, des clones de *S. aureus* responsables d'infections chez l'homme. Schématiquement, chaque décennie amène l'émergence de nouveaux clones. Ainsi avant les années 40, les souches de *S. aureus* étaient sensibles à la pénicilline G, dix années après 90% étaient sécrétrices de  $\beta$ -lactamases. En 1960, la première souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) est apparue en Angleterre, puis les SARM se sont répandus de façon épidémique dans les hôpitaux à partir des années 70, pour devenir vers 1980 multi-résistants aux antibiotiques et pandémiques. Les années 90 ont vu la description des souches de SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Aux alentours des années 2000, les SARM n'ont plus été limités au secteur hospitalier(Oliveira et *al.*, 2002).

Actuellement, on constate l'apparition de souches de SARM résistantes aux nouvelles générations de  $\beta$ -lactamines, auxquelles sont sensées être sensibles. C'est le cas de la ceftaroline, une céphalosporine de 5<sup>ème</sup> génération. Les données épidémiologiques sur la résistance du SARM aux dernières familles d'antibiotiques en Algérie sont rares.

La prédominance du SARM a été déterminée dans huit pays Africains entre 1996 et 1997 et a été relativement élevée au Nigeria, au Kenya et au Cameroun (21 à 30 %) et inférieur à 10 % en Tunisie (Kesah et *al.*, 2003) En Algérie, la fréquence de l'infection à SARM était estimée à 14 % au cours de l'année 2001 (Ramdani-Bougoussa et *al.*, 2006).

Les hôpitaux algériens ont de ce fait, démontré une augmentation importante de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline en ces dernières années (Bekhoucha et

*al.*, 2008) avec un taux passé de 10 % en 1997 aux environs de 40 % en 2005 (Antri *et al.*, 2009).

## **I.2. Habitat et colonisation**

*S. aureus* est un germe ubiquitaire, commensal de la peau et des muqueuses mais sa niche écologique dominante est la partie antérieure du nez (Kluytmans *et al.*, 1997).

On les trouve chez les animaux à sang chaud. Ils peuvent également survivre sur des surfaces inanimées telles que la literie, les vêtements, et les poignées de portes (Freeman, 2006).

Chez l'homme, les staphylocoques font partie de la flore résidante cutanée qui joue un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constitue une barrière contre l'implantation des bactéries de la flore transitoire (Eveillard *et al.*, 2007). Les fosses nasales antérieures constituent avec les zones humides de la peau comme les aisselles et le périnée, un site de portage préférentiel de cette bactérie (Vincenot *et al.*, 2008). La fréquence du portage cutané dépend du portage nasal (Nguyen *et al.*, 2006). La transmission interhumaine est le plus souvent manuportée (Dumitrescu *et al.*, 2008), ou même par les aérosols émis par des patients atteints de pneumopathie (Freeman *et al.*, 2006).

## **I.3. Caractéristiques bactériologique et biochimique:**

Staphylocoque doré est un staphylocoque à coagulase positive. Il a été nommé ainsi en raison de la production de caroténoïde donnant à la bactérie sa pigmentation de surface caractéristique (Licitra, 2013). Ce genre comprend des coques à Gram positif de 0,8 à 1 micromètre de diamètre (Prescott, *et al.* 2003). Peuvent être observées isolées, en paires ou en tétrades, le plus souvent ce sont des amas ressemblant à des grappes de raisins (Prescott *et al.*, 2003). Les staphylocoques sont non-mobiles, ne forment pas de spores et sont généralement anaérobies facultatifs (Sneath, 1986).

La croissance de *S. aureus* sur milieu ordinaire est facile entre 10 et 45 °C. Sur une gélose profonde en tube, les bactéries cultivent tout au long du tube donc le caractère aéro-anaérobie facultatif est confirmé. Après 24h d'incubation, il peut se développer sur géloses trypticase-soja supplémentées ou non en sang. Les colonies observées sont alors lisses, opaques, convexes et rondes (à bord net). Leur diamètre est compris entre 1 et 3 mm et elles peuvent être pigmentées. Cette coloration a d'ailleurs donné le nom d' « aureus » à *S. aureus* car la pigmentation est souvent de couleur or (jaune à jaune orangée), C'est un germe halotolérant, capable de pousser sur des milieux riche en NaCl et thermo tolérant a un certain degré. Ces caractéristiques jouent un rôle important dans la pathogénicité de ces bactéries (Cohen, 1972 ; Tortora *et al.*, 2003 ; Sneath, 1986 ; Hardy, 2004).

Les *S. aureus* possèdent une coagulase, une désoxyribonucléase (DNase), une activité catalase positive et peuvent fermenter le mannitol.

#### I.4. Les facteurs de virulences du *S. aureus* :

Comme d'autres bactéries pathogènes, *S. aureus* exprime des facteurs de virulence participant à l'ensemble des étapes de virulence. Chaque type d'infection nécessite une combinaison particulière de facteurs de virulence. De l'adhésion à la pénétration dans les tissus, la bactérie est capable de mettre en place les acteurs de la virulence au moment opportun. Ainsi, les protéines de surface sont synthétisées au début de croissance puis réprimées laissant alors la place à la synthèse de toxines (Dunman *et al.*, 2001). La clé de voûte de ce système est le système de *quorum sensing* Agr qui régule bon nombre de ces facteurs de virulence de manière temporelle.

Les facteurs de virulence peuvent être répartis en 4 catégories : les facteurs de virulence associés à la paroi (MSCRAMMs), les facteurs d'échappement au système immunitaire (capsule, protéine A), les facteurs de virulence sécrétés comme les exotoxines ou les SERAMs, et les facteurs de persistance. L'expression de l'ensemble de ces facteurs est régulée temporellement en particulier par le système à 2 composants *agr* et permet la dissémination des bactéries dans l'organisme.

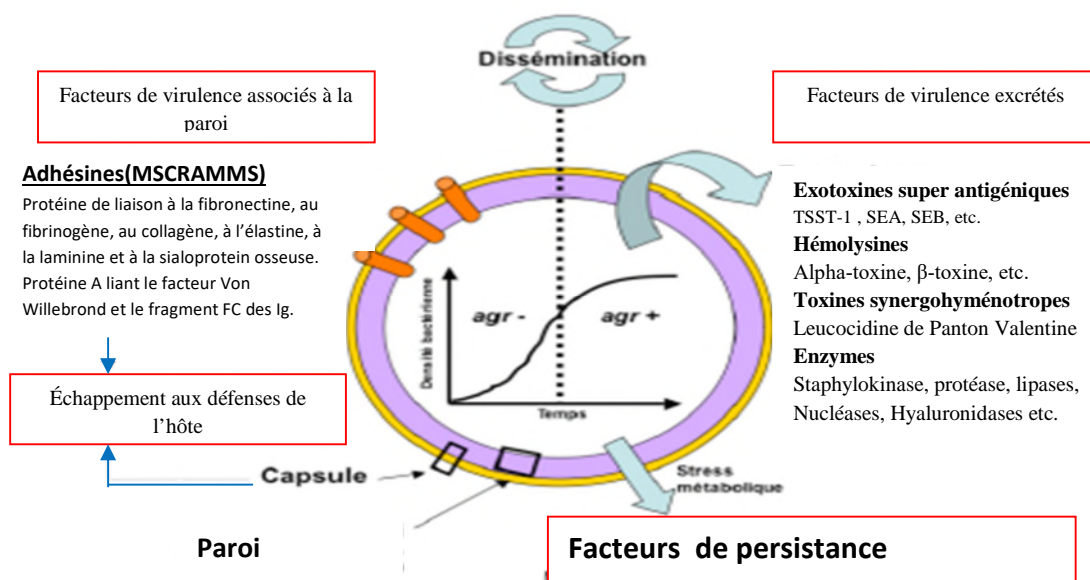


Figure I : Expression temporelle des facteurs de virulence chez *S. aureus*

(Ferry *et al.*, 2008).

### 1.5. Les maladies causées par *S. aureus* :

*Staphylococcus aureus*, parmi les autres pathogènes de l'Homme et celui qui est responsable de la plus grande variété de maladies

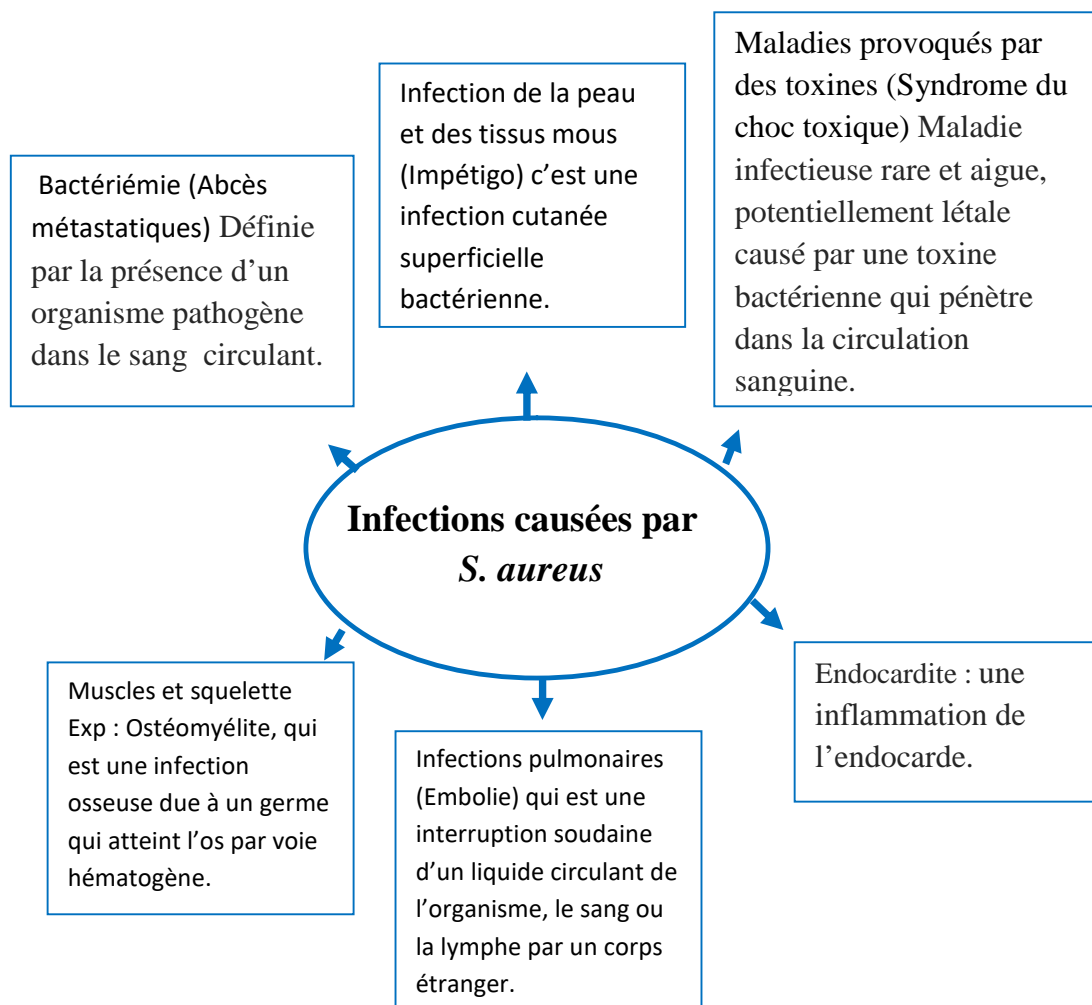


Figure II : les maladies causées par *S. aureus* (Schaechter et al., 1999)

## II. *Staphylococcus aureus* et résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne est la capacité des bactéries à résister aux effets des antibiotiques ou des biocides qui sont censés les tuer ou les contrôler. L'évolution vers la résistance des bactéries aux antibiotiques caractérise la fin du XX<sup>ème</sup> siècle. Le terme résistance multiple (RM) ou multi-résistance est utilisé lorsqu'une souche bactérienne est résistante à plusieurs antimicrobiens ou classes d'antimicrobiens différents (Jean-paul, Gaultier., 2002).

### II.1. Résistance à la méthicilline :

Deux ans après l'introduction de la méthicilline en 1959 et de ses dérivés, bêta-lactamines non dégradées par les pénicillinases, les premières souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) ont émergé en Angleterre, avant de se répandre de façon épidémique puis endémique dans les hôpitaux à partir des années 1970. Cette résistance à la méthicilline est conférée par l'acquisition d'une cassette chromosomique SCCmec portant le gène *mecA*, qui code une protéine membranaire additionnelle (PLP2a) dont l'affinité pour les bêta-lactamines est très faible, entraînant une résistance croisée à toutes les molécules de cette famille (Otter et al., 2010).

### II.2. La cassette staphylococcique SCCmec, support de la résistance à la méthicilline

#### II.2.1. Le gène *mecA* :

Le temps zéro de l'évolution des SARM est l'acquisition du gène *mecA*, fragment d'ADN de 2,1 kb codant une protéine liant la pénicilline additionnelle (PLP2a) (Ito et al., 2003). Cette transpeptidase PLP2a a une affinité faible vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines. Les souches de *S. aureus* possédant le gène *mecA* sont donc résistantes à toute la famille des  $\beta$ -lactamines, notamment à la méticilline ou à l'oxacilline. Le gène *mecA* est inclus dans un élément génétique mobile : la cassette staphylococcique (SCCmec, *Staphylococcal cassette chromosome mec*). Cette cassette s'insère au niveau d'un site spécifique du chromosome : le site *attB<sub>scc</sub>*, situé à l'extrémité 3' d'une séquence à cadre de lecture ouvert désignée sous le nom de *orfX* dont la fonction demeure inconnue (Hirmatsu et al., 2001).

La production de la PLP2a, sous le contrôle du gène *mecA*, permet à la bactérie une auto-synthèse même en présence de fortes concentrations de bêta-lactamines. La PLP2a ne possède pas d'activité transglycosylase, ce qui la rend dépendante des autres PLPs pour mener à bien la synthèse de la paroi bactérienne. De plus, malgré la variabilité des cassettes SCCmec, le gène *mecA* est très conservé d'une souche à l'autre, ce qui suggère une forte contrainte biologique sur cette protéine additionnelle, et peu de latitude pour la



bactérie de développer des alternatives fonctionnelles permettant l'émergence de la résistance (Ishikawa et *al.*, 2003).

### **II.2.2. Structure de la cassette SCCmec :**

La cassette SCCmec comporte deux éléments essentiels : le complexe du gène *mecA* et un complexe de gènes codant des recombinases *ccr* (*cassette chromosome recombinase*) qui assurent les phénomènes d'intégration et d'excision de la cassette. Comporte également des éléments dits accessoires comme des séquences d'insertion, des transposons ou des copies de plasmide portant des gènes de résistance à des métaux lourds ainsi qu'à des antibiotiques autres que les  $\beta$ -lactamines (Ito et *al.*, 2003 ; Katayama et *al.*, 2000).

L'origine de la cassette de résistance demeure inconnue. Cependant différents indices comme la présence d'un gène *mecA* homologue chez *staphylococcus sciuri* ou la présence de la séquence d'insertion IS1272 chez *staphylococcus haemolyticus* retrouvés dans les types I et IV de SCCmec orientent vers l'hypothèse d'un échange horizontal entre *S. aureus* des staphylocoques à coagulase négative (Katayama et *al.*, 2003).

### **III. Le SARM et le problème de résistances aux antibiotiques :**

*S. aureus* a développé des résistances quasiment à tous les antibiotiques mis sur le marché dont les classes d'anti staphylococciques majeurs (Figure III). Les mécanismes impliqués comprennent la synthèse d'enzymes inactivatrices, la modification de la cible des antibiotiques, des systèmes d'efflux qui diminuent la concentration de l'antibiotique dans la bactérie.

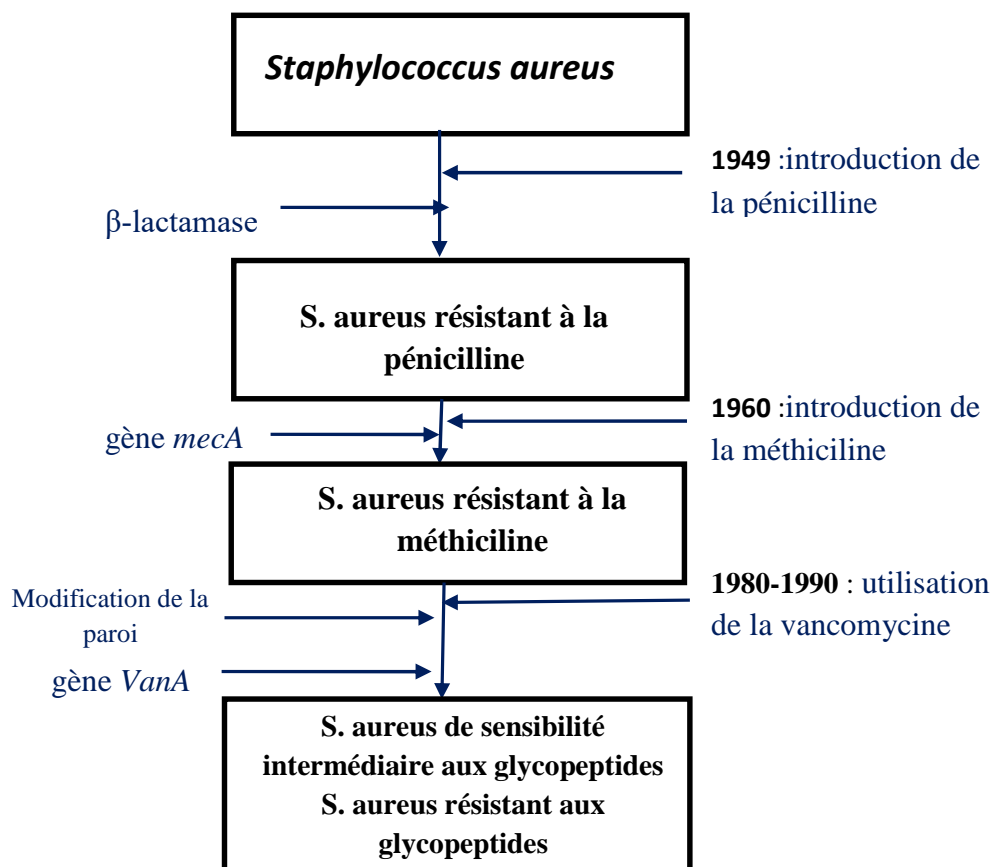


Figure III: Acquisition des résistances par *S. aureus* (Hardy et al., 2004).

*Staphylococcus aureus* produit naturellement 4 PLP (Labischinsk, 1992).

Le principal mécanisme de résistance à la méthicilline est lié à la modification de la cible des  $\beta$ -lactamines. Les SARM synthétisent une 5<sup>ème</sup> PLP, la PLP2a (ou 2'), qui a une faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines (Hartman et al., 1984 ; Utsui et al., 1985). Contrairement aux autres PLP, la PLP2a est capable de réaliser à elle seule la polymérisation de la paroi bactérienne. Cependant, la paroi bactérienne synthétisée par la PLP2a comporte des altérations morphologiques (diminution du degré de réticulation, prédominance de monomères ou dimères) qui ne sont pas favorables à la bonne croissance de la bactérie (Labischinsk, 1992).

La résistance peut être homogène (exprimée par toutes les souches) ou hétérogènes (exprimée par une proportion de colonies filles issues d'une colonie mère exprimant la résistance) (Tomasz et al., 1991).

La résistance aux antibiotiques est dans le monde entier un problème de santé publique préoccupant. Elle augmente de façon exponentielle pour certaines bactéries et dans certains pays. Elle menace la qualité et la sécurité des soins (ANSM, 2015). Plusieurs antibiotiques peuvent être utilisés dans la lutte contre les SARMs. Ce tableau présente un

résumé des mécanismes d'action et de résistance de ces principaux antibiotiques utilisés dans les infections par le SARM

Tableau I : Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques testés

Famille d'ATB	Mécanisme d'action	Mécanisme de résistance
<b>Les nouvelles <math>\beta</math>-lactamines : céphalosporine de 5<sup>ème</sup> génération (Ceftaroline et Ceftobiprole)</b>	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane par analogie de structure avec le substrat des PLP (D-ALA – D-ALA) et agissent donc par inhibition compétitive. Elles possèdent une activité bactéricide temps-dépendante.	Mutation dans le domaine allostérique PBP2a
<b>Glycopeptides</b>	Inhibition de la synthèse du PG inhibant la transpeptidase et transglycosylase par fixation sur le résidu D-ALA-D-ALA empêchant l'action des PLP par encombrement stérique	Modification de la cible Remplacement du résidu D-ALA – D-ALA par D-ALA – D-SER ou D-ALA – D-Lac
<b>Sulfamides</b>	Inhibition de la synthèse des bases puriques. Les sulfamides sont des analogues compétitifs de la dihydroptéroate synthétase. Les 2,4 diaminopyridines sont des analogues compétitifs de la dihydrofolate réductase.	Mutation de la cible Hyperproduction des enzymes cibles
<b>Oxazolidones(linézolid)</b>	Liaison à la Sous unité ARNr 23s, au niveau du site de décodage (site A). Mauvais positionnement de l'ARNt au site A et bloque la traduction.	Mutation successive au niveau de l'ARNr 23s ou par recombinaison homologue.
<b>Macrolide</b>	Fixation sur la sous-unité 50S du ribosomes et blocage de l'élongation Activité bactériostatique	Modification de la cible Méthylation de la sous-unité 50S Enzymes inactivatrices Acétyl-transférase, hydrolase, acétylase Efflux
<b>Rifampicine</b>	inhibition de (ARN)-polymérase, (ADN) dépendante Par fixation sur la sous-unité $\beta$ , empêchent l'initiation de la chaîne de transcription de l'ADN en ARN, et non son élongation.	Mutation de la cible, Les mutations touchent le gène <i>rpo</i> qui code pour la sous unité $\beta$ de l'ARN-polymérase, conduisant à des niveaux variables de résistance.

### III.1. Exemple de la céftaroline :

Ceftaroline, le métabolite actif de la ceftaroline fosamil, une prodrogue N-phosphono. Possède un groupe éthoxyiminoacétamido dans le fragment C-7 et un groupe espaceur hétéroaromatique thio à 5 membres à la position 3 (Figure IV). Un antibiotique céphalosporine de 5<sup>ème</sup> génération, développée en apportant des modifications structurales à une céphalosporine de quatrième génération, le ceftazopran (Ishikawa T, et al.2003). Il s'agit du groupe d'antibiotique céphalosporine approuvée pour le traitement des infections compliquées causé par le SARM La ceftaroline est caractérisé par une forte affinité pour la protéine PLP2a, ce qui induit une résistance à tous les antibiotiques  $\beta$ -lactames dans le SARM.(Culos et *al.*, 2013).

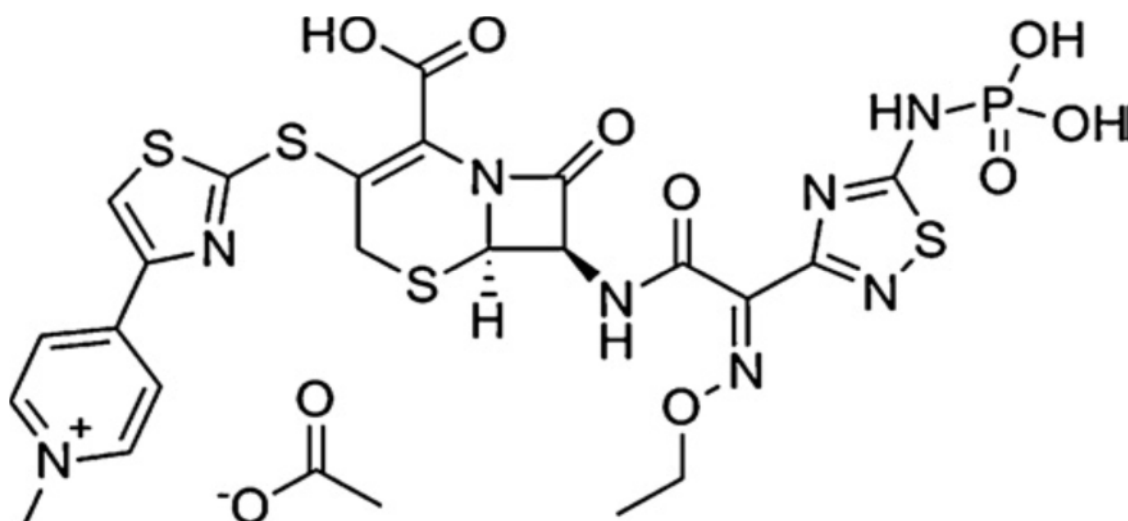


Figure IV : Structure chimique de l'acétate fosamil « la Ceftaroline »  
(Johnson LB et *al.*, 2011).

#### III.1.1 Mécanisme d'action

La ceftaroline se lie au site allostérique PLP2a à des concentrations thérapeutiques et déclenche l'ouverture et l'acylation du site actif par une seconde molécule de ceftaroline (RojasAltuve et *al.*, 2014 ; Fishovitz et *al.*, 2015) il résulte de se fait l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.

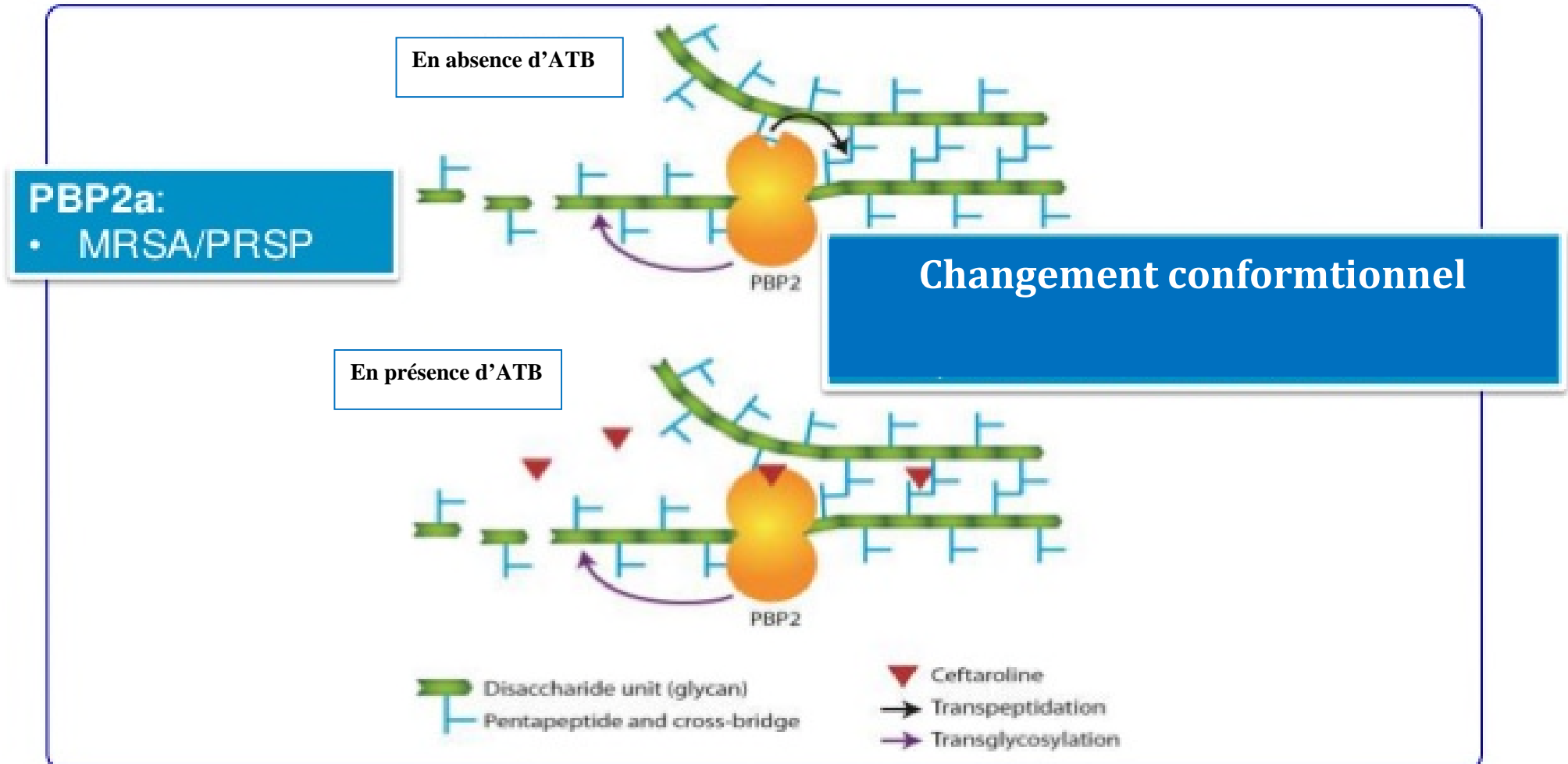


Figure V : Mécanisme d'action de la ceftaroline.

## Chapitre II Matériel et méthodes

## I. Objectif du travail

Le but de ce travail, consiste à étudier la résistance du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline vis-à-vis d'une céphalosporine de la 5<sup>ème</sup> génération (ceftaroline), et autres familles d'antibiotiques pour lesquelles peut de résistance a été rapportée.

Cette étude a duré 03 mois du 05 Février au 05 Avril 2018 et a été réalisée dans le laboratoire de microbiologie à l'université de Bejaia {Abd Rahmane Mira}. Cent soixante neuf souches non répétitives ont été conservées au niveau de ce labo à 4°C, isolés de divers prélèvements, durant les dernières années (entre 2010 à 2017).

## II. Culture et purification

A l'aide d'une anse de platine stérile, prélever des colonies de staphylocoque à partir du tube de conservation. Puis, ensemencer des boîtes de pétries contenant la gélose Chapman en utilisant la méthode de stries et incuber à 37 °C pendant 24 heures.

A cause de diverses contaminations, plusieurs repiquages ont été réalisés jusqu'à l'obtention d'une culture pure (colonie de petite taille de diamètre qui varie de 1 à 2 mm de couleur jaune et de forme arrondie).

## III. Enrichissement

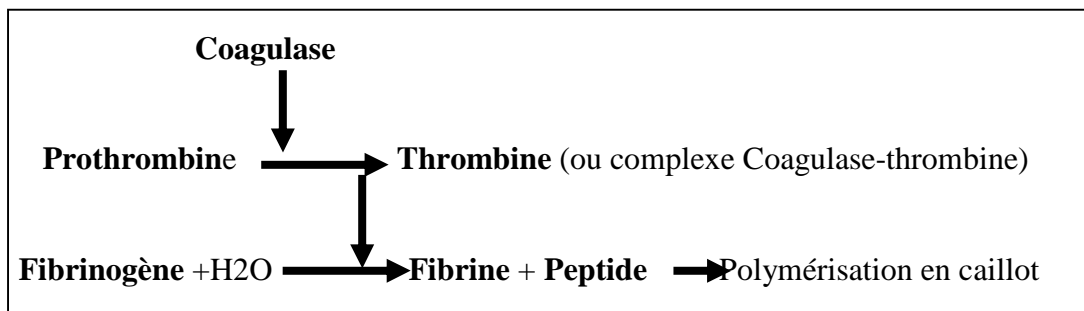
Il est réalisé lorsque la croissance bactérienne n'a pas eu lieu, dans ce travail on a utilisés deux bouillon : TSB (Bouillon Trypticase Soja) et le BHIB ( Bouillon cœur cerveau).

## IV. Identification

Afin d'identifier les souches de *S.aureus*, les caractéristiques standard de cette espèce ont été vérifiées, à savoir : Cocci Gram positif, fermentant le mannitol sur Chapman, production de catalase...etc. Puis, le test de base, la coagulase a été réalisé.

Parmi les cocci Gram positif, seul *S.aureus* possède une coagulase libre et une coagulase liée, capable de coaguler le plasma citraté humain ou de lapin, dans un délai de 24h.

La staphylocoagulase ou coagulase, est une enzyme thermostable qui agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium.



**Figure VI** : Schéma montrant l'action de l'enzyme coagulase.

Dans l'organisme, l'action de la coagulase est à l'origine de microcaillots de fibrine à l'intérieur desquels les bactéries peuvent proliférer à l'abri des défenses de l'organisme. La recherche de la coagulase de *Staphylococcus* est compliquée par la présence d'un récepteur au fibrinogène provoquant l'agglutination de la souche placée dans un plasma.

#### ➤ Culture

A partir d'une culture pure des souches à étudier isolées sur milieu Chapman, sur lequel nous avons constaté un virage du milieu au jaune, ensemencé un bouillon BHIB pour épreuve de la coagulase. Laisser la culture à 37°C pendant 18 heures.

#### ➤ Préparation du plasma

Reconstituer stérilement le plasma de lapin en mesurant exactement 2ml d'H<sub>2</sub>O distillé stérile. Agiter légèrement pour favoriser la dissolution en évitant la formation de mousse.

Le plasma ainsi reconstitué et dilué est prêt à l'emploi pour épreuve de la coagulase.

#### ➤ Epreuve de la coagulase

Mélanger dans un tube à hémolyse 0,5 ml de plasma dissous, et 0.5 ml de la culture en bouillon de staphylocoque à tester. Incuber à l'étuve 24h à 37°C.

Les souches de *S.aureus* provoquent la coagulation du plasma en un temps variant d'une demi-heure à 24 heures. La prise en masse du plasma est généralement totale au point que le tube peut être retourné, quelques fois le caillot est moins compact mais encore dans ce cas, l'épreuve doit être tenue pour positive si elle se produit avant 24 heures.



## V. Criblage des SARM

Les souches de *Staphylococcus aureus* identifiées ont été testées vis-à-vis de la céfoxitine, afin de sélectionner uniquement les souches de SARM

### V.1. Réalisation de l'antibiogramme

#### ➤ Principe

C'est un moyen qui permet de tester la sensibilité aux antibiotiques, représentant ainsi la dernière étape du diagnostic microbiologique d'une souche isolée supposé être responsable d'une pathologie infectieuse donnée tout en fournissant une catégorisation clinique que l'on exprime traditionnellement en 03 classes : sensible, intermédiaire, résistante et qui a la capacité de prédire un éventuelle succès thérapeutique et de guider le clinicien dans sa démarche décisionnelle.

#### ➤ Technique

**L'antibiogramme :** Il doit être coulé en boîte de pétrie sur une épaisseur de 04mm, la gélose doit être séché avant l'emploi.

**Préparation de l'inoculum :** A l'aide d'une seringue stérile, verser 5 ml d'eau physiologique (NaCl 0.9%) dans des tubes à essais stérilisés au four pasteur. Ensuite, racler 05 à 09 colonies bactériennes à partir d'une culture pure développée de 24 heures sur un milieu d'isolement approprié Chapman et les déchargés dans de l'eau physiologique. Enfin les vortexer afin d'homogénéiser la suspension.

**Etalement de la suspension bactérienne :** tromper un écouvillon stérile dans l'inoculum, puis on le presse fermement et on le tourne contre la paroi interne-tube, afin de décharger au maximum. Ensuite frottées l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosé, sèche, de haut en bas, en stries sérés 02 fois, tournées la boîte de 60° à chaque fois, en pivotant l'écouvillon.

#### Application de disque d'antibiotique

#### ➤ Recherche de la résistance du SARM à la céfoxitine

Selon les recommandations de l'EUCAST, le dépistage du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline doit être réalisé sur milieu MH contenant un disque de céfoxitine de 30µg et incubé à 30°C pendant 24h.

### V.2. Étude de la résistance du SARM aux autres antibiotiques

La sensibilité des souches de SARM confirmées a été vérifié vis-à-vis de 07 autres antibiotiques, connus comme actifs dur le SARM, à savoir : Clindamycine, Erythromycine,

Ceftaroline, Linézolide, Rifampicine, Vancomycine, Triméthoprim. La charge des disques et les diamètres d'interprétation sont donnés dans le tableau II.

Afin de mettre en évidence la résistance inductible à la clindamycine par l'érythromycine, ces deux antibiotiques ont été déposés côte-à-côte sur la gélose Muller-Hinton « Test D ».



Figure VII : Dépôt de disque de clindamycine et érythromycine (cote à cote) « Test D ».

Tableau II : Les antibiotiques complémentaires testés et interprétation selon l'EUCAST.

Famille d'ATB	Antibiotiques (Abréviation)	Charge des disques en µg	Diamètres critiques (mm)	
			S ≥	R <
<b>β -lactamine</b>	Cefoxitine (FOX)	30	22	22
	Ceftaroline (CPT)	05	21	19
<b>Glycopeptide</b>	Vancomycine (VA)	30	17*	17*
<b>Sulfamide</b>	Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (SXT)	25	17	14
<b>Oxazolidone</b>	Linezolid (LNZ)	10	21	21
<b>Macrolide</b>	Clindamycine (CD)	02	22	19
	Erythromycine (E)	15	21	18
<b>Rifampicine</b>	Rifampicine (RD)	05	26	23

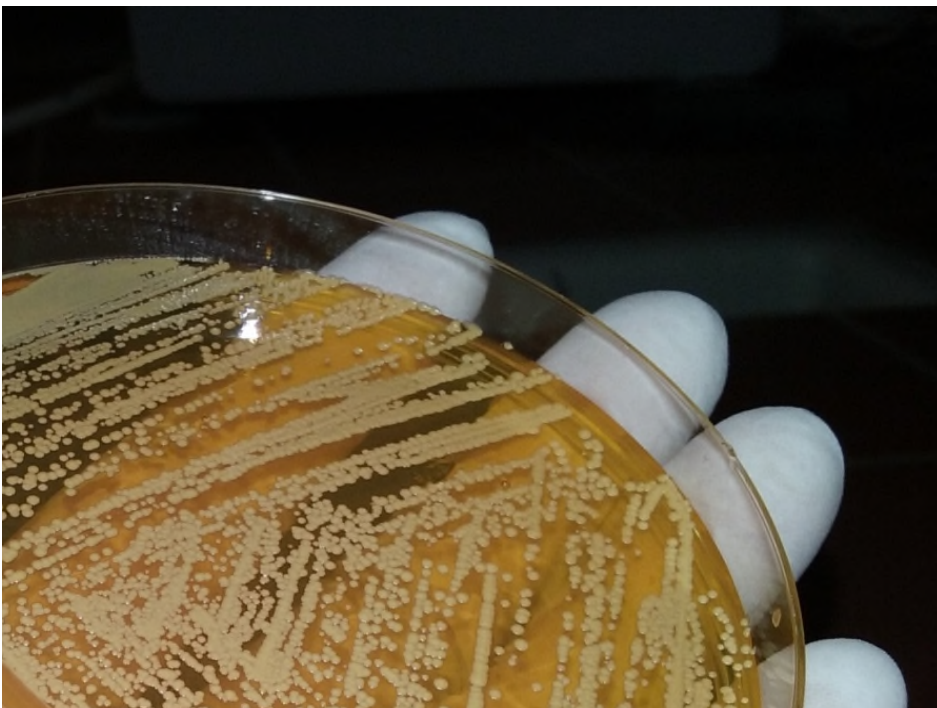
\* : Selon l'Eucast 2018..... ; selon CLSI 2011, un diamètre inférieur à 17 mm nécessite la détermination des CMI.

## Chapitre III Résultats et discussion

## I. Résultats

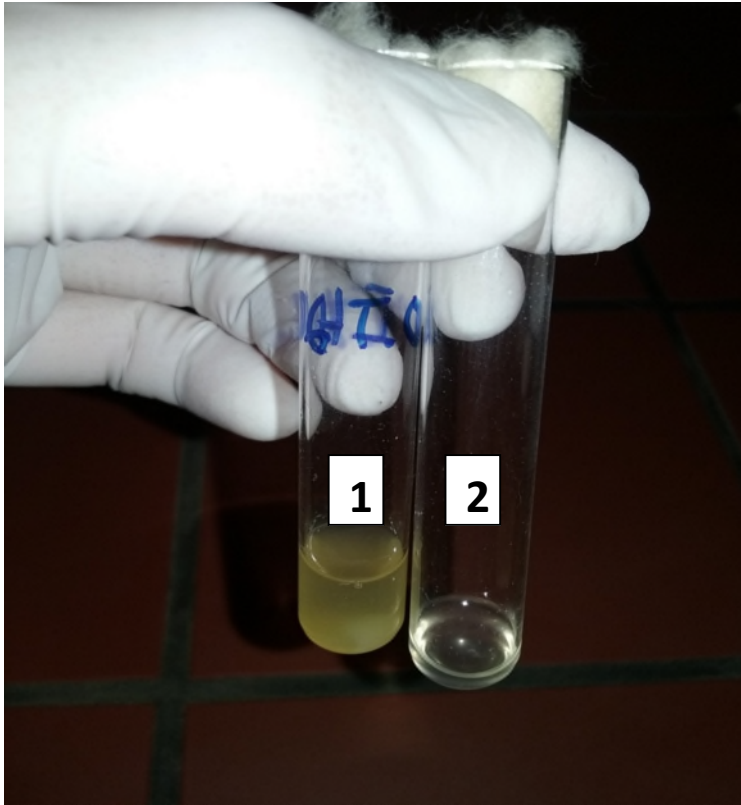
### I.1 Fréquence

La totalité des souches de *Staphylococcus sp* étudiées durant notre travail au niveau du laboratoire de microbiologie, rependent aux caractéristiques microscopiques du *Staphylococcus aureus*.



**Figure VIII :** Aspect microscopique de *S.aureus*

Nous notons, que sur 169 souches conservées à 4°C, 56 d'entre elles appartiennent à l'espèce *S. aureus* que nous avons détectées par le test de coagulase (Figure IX).



1 : Coagulase (+)

2 : Témoin

**Figure IX** : résultat de test de coagulase.

Le test à la Cefoxitine nous a permis de détecter 44 souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (Figure X), soit un taux de 26.03 %, (figures XI).

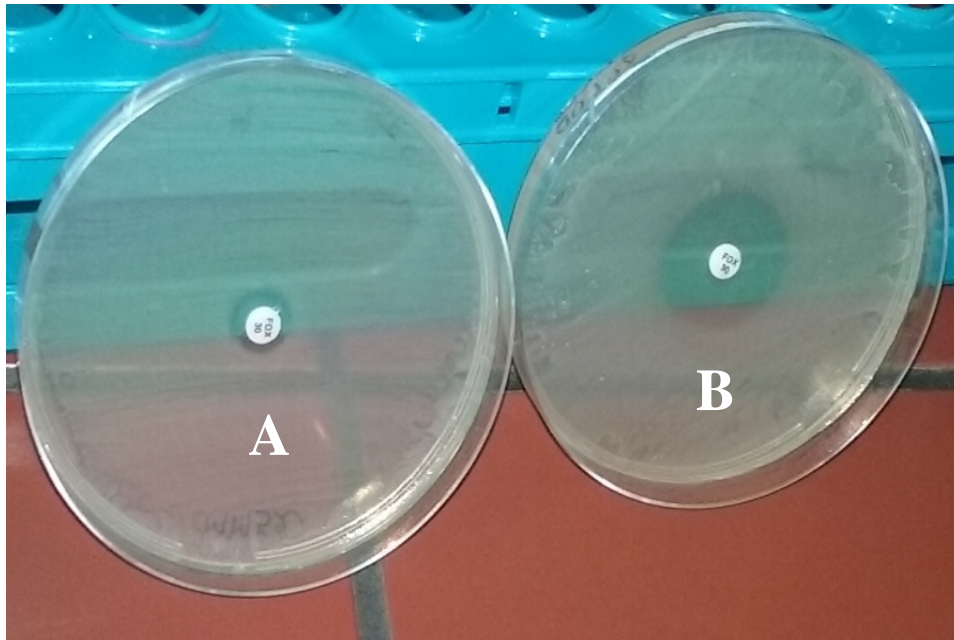
### **I.1.1. Résultat d'antibiogramme à la cefoxitine**

Selon les recommandations de **L'EUCAST, 2018**.

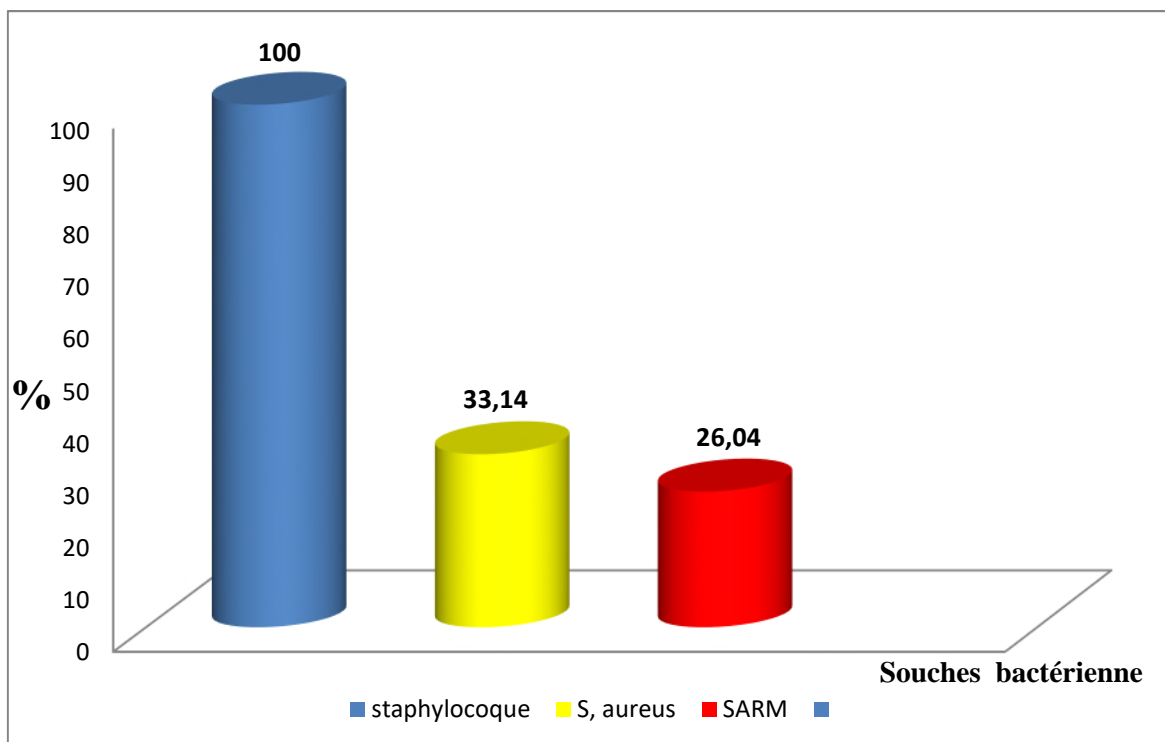
Diamètre  $\leq 22$ mm  $\rightarrow$  la souche est résistante (R) « A dans la figure X »

Diamètre  $\geq 22$ mm  $\rightarrow$  la souche est sensible (S) « B dans la figure X »

Nous avons obtenue 44 souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la cefoxitine.



**Figure X :** Souche de SARM détecté par le test à la céfoxitine.



**Figure XI :** Statistique de *Staphylococcus sp*, *S. aureus*, et SARM obtenue

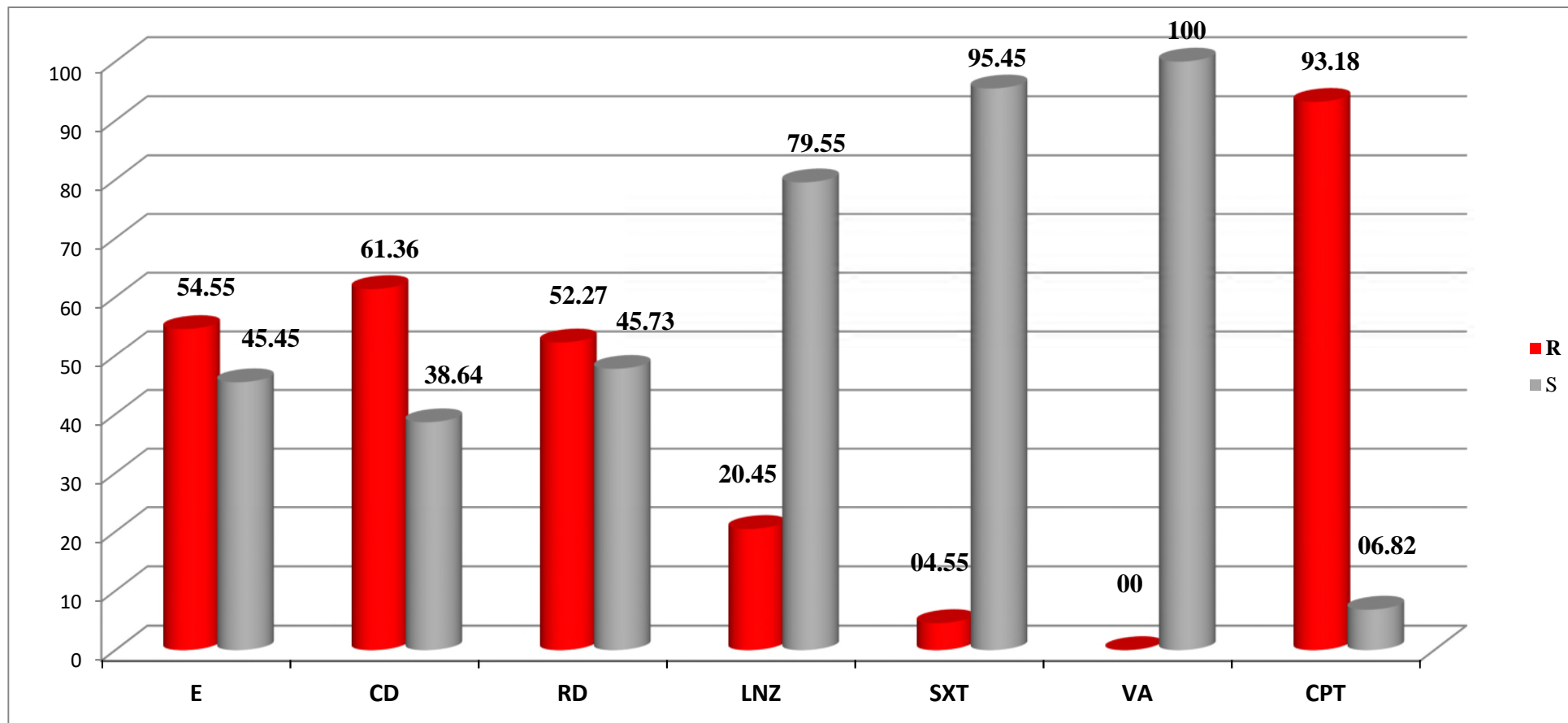
**I.2. Répartition de souches isolées**

Les tests d'évaluation de la résistance vis-à-vis des antibiotiques ont été réalisés selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique en gélose à partir des disques imprégnés d'antibiotiques, selon les recommandations d'EUCAST.

Les 44 souches de SARM présentent une résistance associée à d'autres familles d'antibiotiques.

La ceftaroline, rifampicine, clindamycine et l'érythromycine ont montré des taux de élevés de résistance, d'autre part la vancomycine, Triméthoprim-sulfamithoxazole, linezolide ont montrés des taux élevés de sensibilité, Cette dernière est liée à la grande plasticité génomique des gènes responsables de cette résistance, qui peut être acquise ou apportée par un plasmide ou d'autres éléments génétiques mobiles.



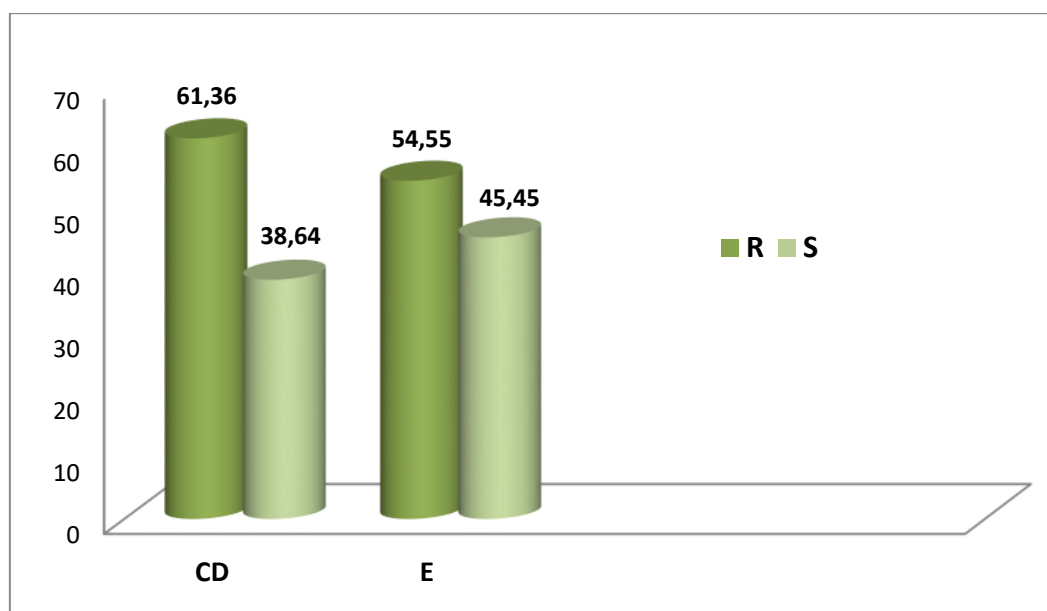


E : Erythromycine (15 µg)  
 CD : Clindamycine (2 µg)

RD : Rifampycine (5 µg)  
 LNZ : Linezolid (10 µg)

SXT : Triméthoprime-sulfaméthoxazole (25 µg)  
 VA : Vancomycine (30 µg), CPT : Ceftaroline (05µg)

Figure XII : Profil de résistance du SARM aux antibiotiques testés



**CD : clindamycine**

**R : résistance**

**E : érythromycine**

**S : sensibilité**

**Figure XIII :** Taux de résistance et de sensibilité du SARM à la clindamycine et l'érythromycine.

❖ Résistance inductible à la clindamycine (test D) :

Le test D a identifié 9 isolats (**20,45%**) présentant une résistance inductible à la clindamycine. Les souches exprimant une résistance MLSB, montrent une zone d'inhibition aplatie autour du disque de clindamycine (test de la zone D positif) lorsque les disques de l'érythromycine et de clindamycine sont placés à proximité l'un de l'autre (Swenson *et al.*, 2011). Le résultat est représenté dans la figure XIV ci-dessous :



**Figure XIV :** Résultat du test D

## II. Discussion Générale

### ➤ Ceftaroline

La Ceftaroline (PPI 0903, anciennement TAK-599), a été approuvée par la FDA des États-Unis pour le traitement des infections bactériennes cutanées et des infections bactériennes communautaires, pneumonie (Saravolatz et *al.*, 2011). Comme les autres  $\beta$ -lactamines, Cet ATB tire son activité antibactérienne de son affinité pour les PLP et interfère ainsi avec la synthèse du peptidoglycane. Chez *S. aureus*, la ceftaroline se lie à différentes PLP dont les PLP1, 2 et 3 inhibant la synthèse de la paroi cellulaire. Elle possède une excellente affinité pour la PLP2a contrairement aux autres céphalosporines, ce qui en fait un traitement de choix dans les infections à SARM. En revanche, la ceftaroline semble avoir une faible affinité pour la PLP4. (Kosowska-Shick K et *al.*, 2010)

Selon nos résultats, nous avons constatées que les SARM isolés sont résistants à CPT avec un taux très élevé (**93.18%**) qui a été relativement supérieur à celui signalé à Genève en 2015 avec un pourcentage de (**24%**) de Résistance et 66% de sensibilité (Kelly et *al.*, 2016) et celui obtenue au niveau de quelques hôpitaux américains dans deux périodes différentes **00%** résistants de 2008 à 2011 et un taux desensibilité de (**97.6%**) de 2009 à 2013.(Helio S. Sader et *al.*, 2013), (Robert k. Flamm et *al.*, 2015).

La résistance à la ceftaroline peut être de haut ou de bas niveau :

Bien que la résistance à la ceftaroline de haut niveau puisse être expliquée par des mutations dans le domaine de la transpeptidase (H351N, Y446N, E447), ou dans le domaine allostérique (N146NK, E150K, N204K, E239K, G246E) (Harrison et *al.*, 2016 ; Kelley et *al.*, 2015 ; Long et *al.*, 2014 ; Peters et *al.*, 2016), qui modifient la géométrie du site actif, une résistance de faible niveau associé à des mutations dans le site allostérique a été expliquée par une nouvelle modulation allostérique de ce dernier par modification du mécanisme de déclenchement affectant probablement les interactions protéine-protéine nécessaires à la biosynthèse du peptidoglycane(Alm et *al.*, 2014 ;Otero et *al.*, 2013 ; Fishovitz et *al.*, 2016 ; Lahiri et *al.*, 2016 ; Fernandez et *al.*, 2014).

### ➤ Erythromycine

Avec un taux de sensibilité (**45,45%**) à l'érythromycine et un taux de résistance (**54,55%**) qui a été relativement inférieur à celui signalé par Rebiahi (**56%**) et Richter (**90%**) (Rebiahi et *al.*, 2001 ; Richter et *al.*, 2014).

La résistance à cette molécule chez les SARM varie d'un pays à un autre allant de (**7,6 %**) au Maroc (Elazahari et *al.*, 2010) et (**67,6%**) aux USA (Biedenbach et *al.*, 2015), (**50%**) en Inde (Gaikwad et *al.*, 2016) pour atteindre (**100 %**) en Tunisie (boukadida et *al.*, 2003).

La clindamycine a montré un taux de sensibilité (**38,64%**) et de résistance (**61,36%**) significativement supérieur à ce qui a été rapporté en Inde (**50%**) (Gaikwad et *al.*, 2016), et dans l'Ouest de l'Algérie par Rebiahi, 2011 avec (**13,51%**). Notre résultat est inférieur à celui de la **Tanzanie (64%)**, reste supérieur à celui observé en **France (44 %)**, et inférieur à celui de l'Inde (**53,3%**) (Gaikwad et *al.*, 2016) ainsi que **l'Afrique de Sud (82 %)**, ainsi que **la Chine (83,7%)**.

Les résultats montrent que la résistance à la Clindamycine a été associée à celle de l'érythromycine.

### ➤ Vancomycine

La totalité de nos souches SARM ont montré un taux de sensibilité de 100% à la vancomycine, identique aux résultats obtenue en Inde sensibilité à 100% (Gaikwad et *al.*, 2016), cependant Rebiahi et ces collaborateurs ont rapporté 03 souches de SARM résistante à la vancomycine (1.8%) à Tlemcen, à la Libye 11 souches résistantes (17.7%) ont été rapporté (Buzaid et *al.*, 2011).

La vancomycine a démontré une activité in vitro puissante contre les SARM et elle peut représenter une option de traitement valable pour les infections causées par ces staphylocoques multi résistants (Sader et *al.*, 2013).

### ➤ Linezolid

Le linezolid est l'un des médicaments oraux les plus efficaces utilisés pour le traitement ambulatoire des infections au SARM. (Davis et *al.*, 2004) Une augmentation du taux de la résistance à LNZ selon nos résultats (**20,45%**) par rapport aux résultats rapporté en **Chine (00%)** (H.zhang et *al.*, 2014), ainsi que les résultats obtenues aux USA d'un potentiel < à 0.1% (Jennifer et *al.*, 2017), et ceux de L'inde (Gaikwad et *al.*, 2016) et la Turquie (Ahmet, 2014) **100%** de sensibilité.

➤ **Triméthoprime**

Une étude sur le triméthoprime-sulfamitoxazole a été faite en Chine, qui a révélé un taux de résistance de **(10%)** à cet ATB (H.zhang et *al.*, 2014), supérieur à nos résultats **(4.5%)** significativement plus résistant à celui de Sader aux USA avec un faible pourcentage **(2%)** (Sader et *al.*, 2017), contrairement aux résultats rapporté au **Bengladech** soit un taux de résistance très élevé **(65%)** (Rashedul, 2016).

➤ **Rifampicine**

Nous avons obtenue un taux de 52.27% résistants à la rifampicine. Plusieurs études ont été effectuées par (Ben Jamaa et *al.*, 2004 ; Remdani-Bouguessa et *al.*, 2006 ; Mastouri et *al.*, 2006) ont obtenues des taux très faible de sensibilité par rapport à notre étude soit avec des taux respectivement **(6.7%)**, **(2.3%)**, **(2%)**.

# Conclusion

## Conclusion

Staphylococque doré est un commensale pathogène, dont le fort pouvoir d'adaptation permet la survie grâce à l'acquisition successive de gènes de résistance aux antibiotiques, de mécanisme de régulation, de la croissance en présence d'antibiotiques et de facteurs de virulence particuliers. La multi résistance du *Staphylococcus aureus* persiste malgré la mise à jour de nouvelle molécule d'antibiotiques tels que la céphalosporine de 5<sup>ème</sup> génération (Ceftaroline), au point de croire parfois éradiquer certaines maladies infectieuses.

Dans cette étude on a essayé de déterminer le profil de résistance du *Staphylococcus aureus* résistant à la méticiline aux différents antibiotiques.

Des fortes résistances avec les antibiotiques de la famille :  $\beta$ -lactamine (avec un pourcentage de résistance alarmant 93.18% à la ceftaroline), Macrolide et Rifampicine ont été révélées. Les résistances les moins élevés ont été observés avec les antibiotiques de la famille : Sulfamide, Glycopeptide, Oxazolidone. A l'exception d'un groupe de glycopeptide (Vancomycine) qui a montré une forte efficacité sur les souches de SARM, il peut être considéré comme une alternative efficace pour le traitement de diverses infections.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives, il serait intéressant :

- La vigilance des cliniciens et microbiologistes est requise afin de signaler l'émergence de phénomènes épidémiologiques nouveaux, ainsi que de veiller au respect des consignes de prévention et à l'utilisation judicieuse des antibiotiques, tant en milieu hospitalier que dans la communauté.

## Références bibliographiques



## Référence :

### A

**Alm, RA., McLaughlin, RE., Kos, VN., Sader, HS., Iaconis, JP., Lahiri, SD. (2014).** Analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with reduced susceptibility to ceftaroline: an epidemiological and structural perspective. *J Antimicrob Chemother* 69(8):2065–2075. doi:10.1093/jac/dku114)

**ANSM.** Tygacil® (tigécycline) - Augmentation de la mortalité observée au cours des études cliniques menées - <http://ansm.sante.fr/S-informer/Informations-desecurite-Lettres-aux-professionnels-de-sante/Tygacil-R-tigecycline-Augmentation-de-la-mortalite-observee-au-cours-des-etudes-cliniques-menees-Lettre-aux-professionnels-de-sante,antibiotiques> de 115 staphylocoques impliqués dans des septicémies dans un hôpital

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

### B

**Banerjee, R., Gretes, M, Basuino, L., Strynadka, N., Chambers, HF. (2008)** In vitro selection and characterization of ceftobiproleresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(6):2089–2096. doi:10.1128/AAC.01403-07)

**Bekkhoucha, S N., Cady, A., Gautier, P., Itim, F., Donnio, PY (2009).** A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean sea: molecular characteristics of isolates from Western Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:553–5)

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

**Biedenbach, DJ., Hoban, D., Sahm, D., Reiszner, E., Iaconis, J., (2015).** Activity of ceftaroline and comparators against pathogens isolated from skin and soft tissue infections in Latin America-results of AWARE surveillance 2012. *Braz J Infect Dis.* 19(6): 596–603.

**Boukadida, J., Ben Abdallah, H., Boukadida, N. (2003).** Profil et sensibilité aux antibiotiques de 115 staphylocoques impliqués dans des septicémies dans un hôpital général tunisien. *Bull Soc Pathol Exot,* 96, 4, 283-285.

**Buzaid, N., Elzouki, A-N., Taher, I., Ghenghesh, KS. (2011).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a tertiary surgical and trauma hospital in Benghazi, Libya. *J Infect Dev Ctries,* 5: 723–6.

### C

**Culos, KA., Canon, JP., Grim, SA. (2013).** Agents alternatifs à la vancomycine pour le traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline . Am J Ther ; 20: 200-12).

## D

**Davis, KA., Stewart, JJ., Crouch, HK., Florez, CE. (2004).** Hospenthal DR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin Infect Dis* ; 39:776-82.

**DO, Andrey., P, François., C, Manzano ., E J, Bonetti ., S, Harbarth ., J, Schrenzel .,W L, Kelley., . (2017).** Activité antimicrobienne de la ceftaroline contre les isolats de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) collectés en 2013- (2014) aux Hôpitaux universitaires de Genève ; 36 (2): 343-350.

**Dumitrescu., Dauwaldera, O., Gilleta, Y., Vandenescha, F., Etiennea, J., Linaa, G., Tristana, A. (2008).** Lesinfections communautaires à *Staphylococcus aureus* en pédiatrie : émergence des staphylocoques dorés résistants à la méticilline d'origine communautaire. *Revue francophone des laboratoires* ; 407 :71-80.

## E

**Elhabchi, D., Cohen, N., (2010).** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* communautaire à Casablanca (Maroc). *Rev Tun Infect.* 4 : 134 –140.

**Eveillard, Matthieu. (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. *Biologie cellulaire. ANGERS : UNIVERSITE D'ANGERS* ; p159).

## F

**Fernandez, R., Paz, LI., Rosato, RR., Rosato, AE (2014).** Ceftaroline is active against heteroresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains despite associated mutational mechanisms and intermediate levels of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 58(10):5736–5746. doi:10.1128/AAC.03019-14).

**Ferry, T et al. (2008).** *Virulence determinants in Staphylococcus aureus and their involvement in clinical syndromes.* *Current Infectious Disease Reports* .7(6): p. 420-428.

**Fishovitz, J., Hermoso, JA., Chang, M., Mobashery, S (2014).** Penicillinbinding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life* 66(8):572–577. doi:10.1002/iub.1289.

**Fishovitz, J., Rojas,-Altuve., A, Otero., LH, Dawley, M., Carrasco-López, C., Chang, M., Hermoso, JA., Mobashery, S (2014).** Disruption of allosteric response as an unprecedented mechanism of resistance to antibiotics. *J Am Chem Soc* 136(28):9814–9817. doi:10.1021/ja5030657.

**Fishovitz, J., Taghizadeh, N., Fisher, JF., Chang, M., Mobashery, S (2015).** The Tipper–Strominger hypothesis and triggering of allostery in penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Am Chem Soc* 137(20):6500

**Freeman-Cook .L and Freeman-Cook .K. (2006).** *Staphylococcus aureus* infections. Chelsea House Publishers. Philadelphia, p 26-29).

## G

**Gaikwad, V., Gohel, T., Panickar, S., Chincholkar, V., Mangalkar, S. (2016).** Activité *in vitro* de la ceftaroline: Un nouvel antibiotique contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline . *Indian J Pathol Microbiol* ; 59: 496-8.

**Greninger, AL., Chatterjee, SS., Chan, LC., Hamilton, SM., Chambers, HF., Chiu, CY (2016).** Whole-genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to fifth-generation cephalosporins reveals potential non-mecA mechanisms of resistance. *PLoS One* 11(2), e0149541. doi:10.1371/journal.pone.0149541)

**Hanna, Sikorska., Wanda, Smoragiewicz. (2013).** Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *S.aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 42, Issue 6, December , Pages 475-481).

**Hardy, K.J., Hawkey, P.M., Gao F. and Oppenheirn, B.A. (2004).** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br J Anesth* . 92:121-130).

**Harrison, EM., Ba, X., Blane, B., Ellington, MJ., Loeffler, A., Hill, RL., Holmes, MA., Peacock, JS (2016).** PBP2a substitutions linked to ceftaroline resistance in MRSA isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* 71(1):268–269.

**Hartman, B.J. (1984).** and Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with betalactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 158: 513-516)

**Helio S. Sader , Rodrigo E. Mendes , Jennifer M. Streit et Robert K. Flamm (2017).** Tendances de la sensibilité aux antimicrobiens parmi les isolats de *Staphylococcus aureus* provenant d'hôpitaux américains: Résultats des 7 années du programme de surveillance de la Ceftaroline (AWARE), 2010 à 2016; 61 (9): e01043-17.

**Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, et al. (2001).** The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* ; 9 : 486-93.

## I.

**Ishikawa, T., Matsunaga, N., Tawada, H., et al. (2003).** TAK-599, un nouveau promédicament de type N-phosphono de la céphalosporine anti-SARM T-91825: synthèse, propriétés physicochimiques et pharmacologiques, *Bioorg Med Chem*, vol. 11 (pg. 2427-37)

**Ito, T., Okuma, K., Ma, XX., et al. (2003).** Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome : genomic island SCC. *Drug Resist Updat* ; 6 : 41-52.

### J

**Jean-paul. (2002).** gaudière.entre biologistes, militaires et industriels : l'introduction de la pénicilline en France La revue pour l'histoire de CNRS, N7.

### K

**Katayama, Y., Takeuchi, F., Ito, T., et al. (2003).** Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome mec of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* ; 185: 2711-22)

**Kelley, WL., Jouselin, A., Barras, C., Lelong, E., Renzoni, A. (2015).** Missense <sup>1</sup>mutations in PBP2A Affecting ceftaroline susceptibility detected in epidemic hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonotypes ST228 and ST247 in Western Switzerland archived since 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 59(4):1922–1930. doi:10.1128/AAC.04068-14.

**Kesah, C., Ben, Redjeb S., Odugbemi, T. O., Boye, C. S.B., Dosso, M., Ndinya, Achola J. O., et al. (2003).** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clin Microbiol Infect* ; 9: 153–156.

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

**Kosowski-Shick, K., McGhee, P., Appelbaum, P. (2010).** Affinité de la ceftazoline et d'autres bêta-lactamines pour les protéines liant la pénicilline à partir de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus pneumoniae*, *Agents antimicrobiens*, vol. 54 (pg. 1670-7).

### L

**Labischinski, H. (1992).** Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Med Microbiol Immunol (berl)*. 181: 241-265.

---

**Lahiri, SD., Alm, RA. (2016).** Potential of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different PBP2a alleles to develop resistance to ceftaroline. *J Antimicrob Chemother* 71(1):34–40. doi:10.1093/jac/dkv329)

**Laurence, armand-lefevre., Raymond, ruimy., alain, philippon., antoine, andremont.(2010)** *staphylococcus aureus st 398: a medical paradigm of the 21st century* Tome 163 - N°3

**Le Noir, Y., Gauthier, M. (2009).** *Staphylococcus aureus*, Monographie de microbiologie.Lavoisier; Libya. *J Infect Dev Ctries*, 5: 723–6.

**Licitra, G. (2013).** Etymologia : *Staphylococcus*. *Emerg Infect Dis* [Internet] Vol. 19.

**Long, SW., Olsen, RJ., Mehta, SC., Palzkill, T., Cernoch, PL., Perez, KK., MusickWL, Rosato, AE., Musser, JM. (2014)** PBP2a mutations causing high-level Ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 58(11):6668–6674.

## M

**Mastouri, M., Nour, M., Ben Nejma, M., Bouallegue, O et al., (2006).** Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie. *Pathologie Biologie* ; 54 : 33–36.

**Moreillon, P. (2008).** Traitement nouveau et émergent des infections à *Staphylococcus aureus* en milieu hospitalier. *Clin. Microbiol. Infecter.* 14 (Supplément 3) : 32-41.

## N

**Nguyen, Van., JC, Kitzis M.-D, Ly, A., Chalfine, A., Carlet, J., Ben Ali, A., Goldstein, F. (2006).** Détection de la colonisation nasale de *Staphylococcus aureus*. *Pathologie Biologie*; 54:285-292).

**Noel, GJ. (2007).** Clinical profile of ceftobiprole, a novel  $\beta$ -lactam antibiotic. *Clin Microbiol Infect* ;13:25–29.

## O

**Oliveira, D.C., Tomasz, A., de Lencastre H. (2002).** Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet Infect. Dis*.

**Ömer, Yıldız., Ahmet, Yılmaz., Çoban, Aslı., Gamze, Şener., Seher, Ayten., Coşkuner, Gülçin., Bayramoğlu, Hüseyin., Güdücüoğlu, Mustafa., Özyurt, Müşerref., Tatman, Otkun., Nihal, Karabiber., Nuri, Özkütük., Orhan, Aktepe., Serkan, Öncü., Uğur, Arslan., et Bülent, Bozdoğan. (2014).** Mécanismes de résistance aux antimicrobiens et de résistance à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline isolés dans 12 hôpitaux en Turquie. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* v.13; PMC4353454.

**Otero, LH., Rojas-Altuve, A., Llarrull, LL, Carrasco-López, C., Kumarasiri, M., Lastochkin, E., Fishovitz, J., Dawley, M., Heseck D, Lee, M., Johnson, JW., Fisher, JF., Chang, M., Mobashery, S., Hermoso, JA. (2013).** How allosteric control of *Staphylococcus*

aureus penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. Proc Natl Acad Sci U S A 110(42):16808–16813.

**Otter, J.A., French, G.L., (2010)**, Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infect Dis 10, 227-239.

## P

**Prescott, Harley., and Klein. (2003)**. Microbiologie, 2ème française ed. De Boeck Université 140.603.6505. 740–745.

## R

**Ramdani-Bougoussa, N., Bes, M., Meugnier, H., Forey, F., Reverdy, ME., Lina, G., et al . (2006)**. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother ; 50:1083–5.

**Rashed, N., Rashedul, H., Mrityunjy, A. (2016)**. Original Article Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections. www.tzuchimedjnl.com.

**Rebiahi, S.A. (2011)**. Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leurs antibiorésistance au niveau du centre hospitalo universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat : Université de Tlemcen, Option Microbiologie. 168P.

**Richter, SS., Diekema, DJ., Heilmann, KP., Dohrn, CL., Crispell, EK., Riahi, F., McDanel., Sader, HS., Flamm, RK., Jones, RN. (2013)**. Antimicrobial activity of ceftaroline tested against staphylococci with reduced susceptibility to linezolid, daptomycin or vancomycin from U.S. hospitals, 2008 to 2011. Antimicrob Agents Chemother 57:3178–3181. doi:10.1128/AAC.00484-13.

## S

**Saravolatz, LD., Stein, GE., Johnson, LB. (2011)**. Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis; 52(9):1156–63).

**Schaechter, M., Medoff, G., Eisenstein, Barry I. (1999)**. Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Université, Paris Bruxelles; P188-189).

**Schaumburg, F., Peters, G., Alabi, A., Becker, K., Idelevich, EA. (2016)**. Missense mutations of PBP2a are associated with reduced susceptibility to ceftaroline and ceftobiprole in African MRSA. J Antimicrob Chemother 71(1):41–44.

**Sneath, P. H. A. (1986)**. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, 1st ed, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Strommenger, B., Bartels, MD., Kurt, K., Layer, F., Rohde, SM., Boye, K et al. (2014)**. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* towards increasing resistance. J Antimicrob Chemother; 69: 616–622. pmid:24150844

**Strommenger, B., Layer, F., Klare, I., Werner, G. (2015)**. Pre-use susceptibility to ceftaroline in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Germany: is there a non-susceptible pool to be selected? PLoS One 10(5), e0125864.

## T

**Tortora, G J., B. R., Funke, and C. L. Case. (2003).** Introduction à la Microbiologie, 7 ed. Éditions du Renouveau Pédagogique inc., Saint-Laurent, Québec)

**Tsubakishita S., Kuwahara,-Arai K., Baba, T., et al. (2010).** Staphylococcal cassette chromosome mec-like element in *Micrococcus caseolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 54 : 1469-75)

## U

**Utsui, Y., and Yokota, T. (1985).** Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem- resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 28: 397-403.

## V

**Vincenot, F., Saleh, M., Prévost, G. (2008).** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires*; 407:61-69.

## Z

**Zhang, H., Xiao, M., Kong, F., O'Sullivan, MV., Mao, LL., Zhao, HR., Zhao, Y., Wang, H., Xu, YC. (2015).** A multicentre study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute bacterial skin and skin-structure infections in China: susceptibility to ceftaroline and molecular epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 45:347–350.

# Annexes



# ANNEXE I

## Matériel, réactifs utilisés et milieux de culture

### I. Matériels, solutions et Réactifs utilisés

#### A /Matériel

- ❖ Vortex
- ❖ Etuve
- ❖ Bain Marie
- ❖ Autoclave
- ❖ Four Pasteur
- ❖ Hotte microbiologique

#### B/solutions

- ❖ Sérum physiologique à 0.9% (NaCl)
- ❖ Acide chlorhydrique (HCl 1N)
- ❖ Eau distillée
- ❖ Plasma de lapin

### Milieux de culture et composition

#### ❖ Bouillon Trypticase Soja (TSB)

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de Soja.....	3g
Glucose.....	2.5g
Phosphate dipotassique.....	2.5g

pH= 7.3

25g du milieu deshydraté par 1L d'eau distillée

Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20min

#### ❖ Gélose Chapman

Chlorure de sodium .....	75g
D-mannitol.....	10g
Extrait pancréatique de la caséine.....	5g
Digestion peptique du tissu animal.....	5g
Extrait de bouf .....	1g
Rouge de phénol.....	0.025g
Agar .....	15g

pH= 7.6

111g du milieu deshydraté par litre d'eau distillée.

Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20min.

#### ❖ Bouillon au coeur-cerveau (BHIB)

Infusion de coeur cerveau.....	37g
--------------------------------	-----

pH= 7.4 ± 0.2

37g par litre d'eau distillée.

Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

❖ **Gélose Mueller- Hinton**

Amidon .....	1.5g
Hydrolysate de caséine.....	17.5 g
Solides à la perfusion de boeuf.....	2g
Agar.....	17g

pH=7.3

38g du milieu deshydraté par litre d'eau distillée ;

Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20min.

## ANNEXE II

### Profil de résistance aux antibiotiques des 44 souches de SARM

FOX 30 : cefoxitine

CD 02 : Clindamycine

LNZ 10 : Linezolid

VA 30 : Vancomycine

SXT 25 : Trimethoprime-sulfamitoxazole

CPT 05 : ceftaroline

E 15 : Erythromicine

RD 05 : Rifampicine

Codes	FOX	E	CD	induction	RD	LNZ	SXT	VA	CPT
358	R	06/R	17/R	+	26/S	22/S	24/S	15/S	16/R
361	R	06/R	17/R	+	25/R	23/S	23/S	15/S	15/R
403	R	06/R	21/R	+	27/S	25/S	27/S	17/S	18/R
617	R	06/R	18/R	+	26/S	24/S	23/S	15/S	18/R
304	R	06/R	20/R	+	28/S	23/S	25/S	16/S	17/R
810	R	06/R	18/R	+	26/S	24/S	20/S	15/S	18/R
8453	R	06/R	20/R	+	27/S	20/R	24/S	17/S	8/R
8435	R	06/R	20/R	+	26/S	22/S	23/S	15/S	6/R
8575	R	06/R	20/R	+	22/R	14/R	25/S	18/S	10/R
8454	R	22/S	20/R	-	30/S	22/S	26/S	18/S	16/R
84600	R	22/S	22/S	-	15/R	22/S	06/R	15/S	15/R
IH06T.O	R	18/R	06/R	-	17/R	24/S	24/S	20/S	6/R
MM03	R	22/S	20/R	-	24/R	22/S	24/S	15/S	18/R
MM31	R	28/S	18/R	-	19/R	16/R	28/S	19/S	10/R
MM92	R	20/R	22/S	-	17/R	22/S	24/S	15/S	17/R
MM54	R	18/R	6/R	-	26/S	22/S	26/S	16/S	08/R
MM32	R	22/S	18/R	-	25/R	20/R	21/S	15/S	16/R
P41	R	10/R	23/S	-	21/R	19/R	23/S	16/S	15/R
36411	R	23/S	24/S	-	17/R	24/S	24/S	16/S	10/R
302	R	23/S	23/S	-	28/S	24/S	23/S	17/S	16/R
666	R	26/S	23/S	-	19/R	27/S	34/S	19/S	15/R
391	R	22/S	22/S	-	26/S	23/S	22/S	14/S	13/R
300	R	22/S	23/S	-	26/S	22/S	21/S	15/S	14/R
626	R	23/S	23/S	-	27/S	26/S	26/S	15/S	18/R
8600	R	23/S	26/S	-	28/S	21/S	23/S	15/S	17/R
9420	R	24/S	24/S	-	25/R	23/S	26/S	14/S	18/R
8492	R	23/S	22/S	-	27/S	22/S	24/S	14/S	16/R
306	R	24/S	24/S	-	26/S	25/S	23/S	16/S	18/R
637	R	23/S	22/S	-	26/S	23/S	21/S	15/S	16/R
893	R	20/R	21/R	-	27/S	22/S	22/S	14/S	16/R
443	R	23/S	23/S	-	26/S	24/S	25/S	15/S	17/R
305	R	26/S	14/R	-	19/R	27/S	38/S	19/S	18/R
9476	R	16/R	26/S	-	38/S	24/S	26/S	18/S	22/S
8478	R	10/R	14/R	-	21/R	19/R	17/S	16/S	9/R
8566	R	S	S	S	S	S	S	S	S
767	R	06/R	12/R	-	23/R	20/R	15/R	15/S	16/R
8511	R	15/R	15/R	-	21/R	23/S	23/S	15/S	14/R
936	R	18/R	18/R	-	19/R	17/R	20/S	17/S	16/R
CHN380	R	16/R	19/R	-	23/R	24/S	20/S	16/S	17/R
CN40	R	23/S	15/R	-	19/R	25/S	30/S	19/S	15/R
363	R	20/R	20/R	-	24/R	22/S	20/S	18/S	11/R

## Résumé

*Staphylococcus aureus* est l'une de la principale bactérie responsable de morbi-mortalité chez l'Homme.

*Staphylococcus aureus* résistant à la méticiline (SARM) s'est établi depuis 1960 comme un pathogène nosocomiale endémique dans le monde.

Cette étude consiste à évaluer la résistance du SARM à la nouvelle génération d'antibiotique (ceftaroline).

Sur 169 souches de *S. aureus* non dupliqués conservées dans le laboratoire de microbiologie, l'identification des souches a été faite par le test classique de base (coagulase).

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé.

44 souche de SARM ont été rapportées , et les taux de résistance aux antibiotiques testés : la ceftaroline, Linezolid, vancomycine, Trimethoprime-sulfamethoxazole, rifampicine, érythromycine, clindamycine était respectivement de : 93,18%, 20,45%, 00%, 4,5%, 52,27%, 54,5%, 61,36%.

Les souches de SARM étudié résistent avec un taux très élevé à la CPT contrairement à la vancomycine qui reste un traitement de référence.

Mots clés : SARM, ceftaroline, La résistance, bactérie, coagulase, sensibilité.

---

## Abstract

*Staphylococcus aureus* is one of the main bacteria responsible for human morbimortality. Since 1960, *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA) has been established as a worldwide nosocomial pathogen endemic.

Our study consists in evaluating the resistance of MRSA towards the novel antibiotic generation (ceftaroline). Of 169 strains preserved in the microbiology laboratory strain identification was made by the strand basic test (coagulase). Antibiotic susceptibility was determined using the division method within an agar environment.

44 strains of MRSA were reported, and resistance levels to the remaind antibiotics : ceftaroline, linezolid, vancomycine, trimethoprime-sulfamithoxazole, rifampicin, erythromycin, and clindamycin were respectively 93,18%, 20,45%, 4.5%, 52,27%, 54.5%, and 61.36%.

The strains of MRSA studied resist with a very high level of CPT, unlike vancomycin, wich remains a reference traitement.

Key words : the strains of MRSA, the resistance level, morbimortality, bacteria, pathogen, ceftaroline.