

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

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

**Évaluation du coût biologique chez des
souches pathogènes *in vitro***

Présenté par :

HAMIDA Fatima & BENSADDEK Ahlem

Soutenu le : 24 Juin 2018

Devant le jury composé de :

Mr. BENDJEDDOU Kamel	MCB	Président
Mr. TOUATI Abdelaziz	Professeur	Encadreur
Mr. BELHADI Djilali	MCB	Examineur
Mr. BENSALD A/Krim	MAA	Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Résumé

La résistance bactérienne induite par mutation ou par acquisition d'un gène exogène, génère dans la plupart des cas un coût biologique. Pour étudier le coût biologique associé aux mutations de résistance à la rifampicine et à la ciprofloxacine, nous avons créé des mutants résistants à ces derniers et nous les avons comparés à leurs souches mères.

Méthodologie : Durant notre étude nous sommes intéressés aux mutations liées à la résistance à la rifampicine et à la ciprofloxacine, le modèle d'étude que nous avons utilisé est le *Staphylococcus aureus*, nous avons obtenu des mutants résistants à un seul antibiotique (RIF^R) et des doubles mutants (RIF^R-CIP^R) ayant différentes CMI. Nous avons sélectionné quatre mutants différents, afin d'évaluer le coût biologique liée à la résistance à ces antibiotiques, nous avons étudié différents paramètres de croissances et de virulences en comparant chaque souche mère à son mutant isogéniques.

Résultats : Les tests in vitro ont révélé que la résistance à la rifampicine et à la ciprofloxacine est associée à une réduction du niveau de fitness, pour tous les mutants étudiés.

Conclusion : Nos travaux ont démontré qu'il y aurait probablement un coût biologique lié à la résistance à la rifampicine ainsi qu'à la ciprofloxacine chez le S.aureus.

Mots clés : Fitness, Coût biologique, *staphylococcus aureus*, rifampicine, ciprofloxacine.

Abstract

The bacterial resistance induced by mutation or by acquisition of an exogenous gene, generates in most cases a biological cost. To study the biological cost associated with rifampicin and ciprofloxacin resistance mutations, we created mutants resistant to rifampicin and ciprofloxacin and compared them to their parent strains.

Methodology: During our study we were interested in mutations related to resistance to rifampicin and ciprofloxacin. The study model that we used is two strains of *Staphylococcus aureus*, we obtained mutants resistant to a single antibiotic (RIF^R) and double mutants (RIF^R-CIP^R) having different CMI. We have selected two different mutants resistant to rifampicin, and two double mutants, in order to evaluate the biological cost related to resistance to these antibiotics, we studied different growth and virulence parameters by comparing each mother strain to its isogenic mutant

Results: In vitro tests revealed that the antibiotic resistance studied is associated with a reduction in fitness level, for all the mutants studied.

Conclusion: Our work has shown us that there is probably a biological cost associated with resistance to rifampicin and ciprofloxacin in S.aureus.

Key words: Fitness, Biological cost, *Staphylococcus aureus*, Rifampicin, Ciprofloxacin.

Remerciements

Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos remerciements et à :

- * Professeur TOUATI .A pour nous avoir encadrés et dirigés durant ce travail.
- * Membres de jury pour avoir accepté d'évaluer notre travail.
- * Mr LADJOUZI.R de nous avoir appris les techniques de rédaction qui nous ont été très précieuses et indispensables, ainsi que l'utilisation du logiciel de gestion de références.
- * Mr BELHADI.D pour son aide précieuse.
- * Mr BENSALID.K d'avoir pris le temps de nous recevoir et nous guider dans nos démarches statistiques.
- * Mlle Mairi Assia pour sa présence, sa disponibilité ainsi que son soutien.
- * Tous nos enseignants, professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de répondre à nos questions durant nos années universitaire.
- * Professeur DECHAMPS.C et Mme MADOU.J pour nous avoir fournis les antibiotiques et les oses.
- * Docteur LALAOUI.K de nous avoir permis d'accéder à son laboratoire et son matériel
- * Tout le personnel des laboratoires du bloc 9

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A MES TRES CHERS PARENTS,

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulé, le fruit de vos innombrable sacrifices, bien que je ne vous en n'acquitterai jamais assez. Puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A toute ma famille,

A tous mes amis, « mes meilleurs » sans qui ma vie n'aurai pas de sens.

Et enfin à tous ceux que j'aime...

Ahlem

Dédicace

« Heureuse la famille qui, dans l'union la plus pure, coule au sein de l'amitié et de l'amour ses paisibles jours, et semble n'avoir qu'un cœur à tous ses membres ! Ô innocence des mœurs, douceur d'âme, antique simplicité, que vous êtes aimables ! »

Jean jacques rousseau

For the most important

« L'amitié naît lorsqu'on a pour l'autre une estime supérieure à celle qu'on a pour soi-même. »

Friedrich Nietzsche

To everyone I love

« La fatalité veut que l'on prenne les bonnes résolutions trop tard, hormis à la rencontre de l'amour qui fait tombé le voile, et rends cette fatalité insignifiante. »

Inspiré d'OscarWild

For you ...

Fatima

Sommaire

Liste des figures	8
Liste des tableaux	9
Glossaire	10
Partie théorique	11
Introduction	1
I) Fitness et coût biologique.....	3
I-1) Résistance aux antibiotiques et fitness.....	3
I-2) Mutations et fitness	4
I-3) Mutations compensatoires et persistance de la résistance	4
I-4) Méthodes d'analyse du coût biologique	6
I-4-1) Méthodes d'étude in vitro	6
II) Modèle d'étude <i>Staphylococcus aureus</i>	8
II-1) Généralités : résistance et virulence du <i>Staphylococcus aureus</i>	8
II-2) Résistance à la rifampicine.....	13
II-3) Résistance à la ciprofloxacine	15
Méthodologie	17
I) Souches et conditions de croissance.....	17
II) Détermination des CMI.....	18
III) Sélection de mutants	18
III-1) Sélection de mutants résistants à la rifampicine.....	18
III-2) Sélection de mutants résistants à la ciprofloxacine	18
IV) Mesure du coût biologique par détermination des paramètres de croissance.....	18
V) Mesure du coût biologique par l'étude de la compétitivité :.....	19
VI) Mesure du coût biologique par l'étude de la Formation de biofilm : Test d'adhérence <i>in vitro</i>	19
Résultats	20
I) Sélection de mutants.....	20
II) Détermination du coût biologique par l'étude des paramètres de croissances.....	22
III) Détermination du coût biologique par l'étude de la compétitivité	25

Sommaire

IV) Formation de biofilm	25
Discussion	26
Conclusion.....	28
Référence.....	29
Annexes.....	34

Liste des figures

Figure 1 : Coût biologique de la résistance aux antibiotiques et ses compensations génétiques	6
Figure 2 : Principales différences génétiques observées chez les 5 clones de SARM pour lesquels l'ensemble du génome a été analysé. D'après	10
Figure 4 : Distribution des CMI des mutants à la rifampicine(2)	20
Figure 3 : Distribution des CMI des mutants à la rifampicine(1)	20
Figure 5 : Distribution des CMI des mutants à la ciprofloxacine(1).	21
Figure 6 : Distribution des CMI des mutants à la ciprofloxacine(2).	21
Figure 7 : Courbes de croissance.....	23

Liste des tableaux

Tableau I : Quelques exemples du coût biologique de la résistance aux antibiotiques chez le <i>Staphylococcus</i>	1
Tableau II : Principaux facteurs de virulence produit par le <i>S. aureus</i>	11
Tableau III : Différentes substitutions associés à la résistance à la Rifampicine chez le <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Tableau IV : Différentes mutations de résistance à la rifampicine et les CMI associées.....	14
Tableau V : Différentes substitutions associés à la résistance à la ciprofloxacine chez le <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Tableau VI : Différentes mutations de résistance à la Ciprofloxacine et Les CMI associées..	16
Tableau VII : Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches S1 et S2.....	17
Tableau VIII : CMI des souches sélectionnées pour l'étude.....	22
Tableau X : Comparaison des paramètres de croissance entre la souche S1 et le mutant M2424	
Tableau XI : Comparaison des paramètres de croissance entre la souche S1 et le double mutant DM13ST.....	24
Tableau XII : comparaison des paramètres de croissance entre la souche S2 et le mutants M2	24
Tableau XIII : Comparaison des paramètres de croissance entre la souche S2 et le double mutant M2C4.....	24
Tableau XV : résultats du test d'adhérence.....	25

Glossaire

Coefficient de sélection (S_t) : Une mesure de la fitness d'un mutant par rapport au type sauvage (souvent noté s ou S_t), ayant une valeur entre -1 et 0. Quand $s = 0$, il n'y a pas de coût biologique.

Co-sélection génétique : Apparition d'un lien génétique entre le gène conférant la résistance et d'autres marqueurs génétiques sélectionnés. Ainsi, même si un gène de résistance non sélectionné peut conférer un coût, il pourrait rester dans la population en raison de son lien génétique avec un second marqueur.

Fitness relative : capacité d'un génotype ou d'un individu à survivre et à se reproduire par rapport à un deuxième génotype ou individu.

Indice de compétition (IC) : L'indice de compétition est défini comme le rapport du rapport du nombre de cellule de mutants / type sauvage à l'instant t . au rapport mutant / type sauvage au temps initial.

Mutation compensatoire : Une mutation du deuxième site qui se produit après une mutation qui confère une résistance, ce qui diminue ou allège les coûts de la fitness associés à la résistance.

Résistance croisée : La propension d'un changement génétique qui confère une résistance à un médicament et affecte également la résistance à un médicament différent (en augmentant ou en diminuant la résistance).

Partie théorique

Partie théorique

Introduction

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus efficaces développés par les sociétés pharmaceutiques, et leur utilisation a largement contribué à l'augmentation de l'espérance de vie et au bien-être de l'humanité(Laxminarayan et al., 2016). Il est largement admis que l'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes(Kempf and Zeitouni, 2012).

La sélection et la propagation des organismes résistants aux antibiotiques compromettent non seulement le traitement des maladies infectieuses, mais aussi la mise en œuvre des différentes procédures thérapeutiques telles que la transplantation d'organes, la chirurgie ou la chimiothérapie(Laxminarayan et al., 2013).Un micro-organisme peut acquérir une résistance à un antibiotique donné, au moyen de deux événements génétiques différents , incluant les mutations (y compris la recombinaison) et l'acquisition des gènes de résistance exogènes à travers le transfert horizontal de gènes(THG)(Fajardo et al., 2009; Martinez et al., 2009).L'impact de chacun de ces événements sur la physiologie bactérienne peut être différent. Le coût biologique de la fitness d'un microorganisme est la capacité relative de ce dernier à se multiplier ,à survivre et à se propager dans un environnement (Hernando-Amado et al., 2017; Kempf and Zeitouni, 2012; Sommer et al., 2017).

Coût biologique chez *Staphylococcus* et problématique de recherche

Plusieurs travaux traitant du coût biologique de la résistance aux antibiotiques chez les souches de staphylocoques ont été rapportés. Le tableau I rapporte quelques exemples de travaux réalisés sur le coût biologique de la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* et *S. epidermidis*.

Tableau I : Quelques exemples du coût biologique de la résistance aux antibiotiques chez le *Staphylococcus*(Andersson and Hughes, 2010)

Type de souche	Antibiotique	Coût biologique de la résistance	Expérience établie
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acide fusidique	Variable	<i>In vivo</i> (le Rat) + <i>in vitro</i>
	Rifampicine	Variable	Biofilms et <i>in vitro</i>
	Mupirocine	Non	<i>In vivo</i> (Souris) + <i>in vitro</i>
	Vancomycine	Variable	<i>In vitro</i>
	Méthiciline	Oui	<i>In vitro</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Acide fusidique	Oui	<i>In vivo</i> (Homme)
	Ciprofloxacine	Non	<i>In vivo</i> (Homme)

L'acquisition de la résistance aux antibiotiques peut conférer un coût biologique qui peut s'exprimer par une diminution de la croissance bactérienne, de la survie ou de la virulence.

La résistance aux antibiotiques conférée par les mutations chromosomiques est généralement accompagnée de coûts biologiques physiques qui sont exprimés en termes de taux de croissance réduits, de capacités compétitives et de virulence de la part des mutants résistants par rapport aux phénotypes sauvages sensibles aux antibiotiques en absence d'antibiotiques (Andersson, 2006; Andersson and Hughes, 2010). Curieusement, certaines de ces études montrent que les différentes mutations qui confèrent une résistance au même antibiotique peuvent être associées à des coûts biologiques très différents.

La rifampicine est un antibiotique à large spectre (Wehrli, 1983). Des études ont démontré que des mutants résistants à la rifampicine engendrent des coûts biologiques chez plusieurs espèces dont *P.aeruginosa* (Hall et al., 2011), *Escherichia coli* (Jin and Gross, 1989), *Mycobacterium tuberculosis* (Gagneux et al., 2006), et *Staphylococcus aureus* (Wichelhaus et al., 2002a) ..

L'objectif de notre étude est d'évaluer le coût biologique associé à la résistance à quelques antibiotiques (Rifampicine et Ciprofloxacine) chez les souches de *S. aureus*. Cette évaluation se fera *in vitro* (mesure du taux de croissance, du temps de génération et de la compétitivité) et (virulence) en comparant une souche sauvage et son mutant isogénique.

I) Fitness et coût biologique

I-1) Résistance aux antibiotiques et fitness

L'évolution de la résistance aux antibiotiques ne dépend pas uniquement de la pression de sélection liée à leur utilisation, mais d'autres facteurs peuvent intervenir, dont le coût biologique de cette résistance (Andersson and Hughes, 2010). Le raisonnement de cette hypothèse est venu de l'analyse des mécanismes de résistance eux-mêmes.

La plupart des mutations de résistance chez les bactéries confèrent un coût biologique (Andersson and Hughes, 2010; Melnyk et al., 2015). Cela est lié au fait que de nombreux antibiotiques ciblent d'importants processus cellulaires (réplication, transcription, topoisomérases,etc.) et la résistance à ces antibiotiques perturbe ces processus ou impose de grandes charges énergétiques qui réduisent la capacité concurrentielle contre les souches sensibles (Melnyk et al., 2015). La plupart des mutations de résistance se produisent dans des gènes codant pour les cibles ou les transporteurs des antibiotiques, ainsi que dans des éléments qui régulent l'expression des éléments de détoxification, comme les pompes à efflux ou les enzymes qui inactivent les antibiotiques. Tous ces éléments sont très bien conservés et la plupart d'entre eux sont primordiaux pour la physiologie bactérienne. Ainsi par exemple la résistance à la rifampicine est due à des mutations dans le gène *rpoB* codant pour la sous unité bêta de l'ARN polymérase, de même la résistance à la Ciprofloxacine est liée à des mutations au niveau des gènes codant pour les sous unités des topo-isomérase impliquées dans la modulation de la topologie de l'ADN.

Toute mutation dans ces gènes impliquerait un dysfonctionnement physiologique qui sera reflété par une moindre compétitivité des mutants résistants en comparaison avec la souche sauvage sensible (Fajardo et al., 2009). En outre, les régulateurs transcriptionnels comme MarR chez les Enterobacteriaceae ou MexT chez *Pseudomonas aeruginosa* contrôlent simultanément la résistance aux antibiotiques et la virulence bactérienne et par conséquent, des mutations dans ces régulateurs globaux peuvent modifier à la fois la résistance et la virulence lors de l'infection *in vivo* (Hernando-Amado et al., 2017). Dans le cas des gènes acquis par THG, il est supposé que la souche résistante doit produire plus d'énergie, pour pouvoir fournir les ressources nécessaires pour la réplication, la transcription et la traduction de ces éléments génétiques mobiles acquis (EGM) (Björkman and Andersson, 2000).

I-2) Mutations et fitness

Différents travaux ont montré que les degrés du coût biologique associés à la résistance mutation-dépendante dépend de la mutation en cause (Andersson and Hughes, 2010). Ainsi, dans une étude méta-analyse, les auteurs ont conclu que les mutations confèrent des CMI très élevées sont les plus coûteuses (Melnyk et al., 2015).

Dans certaines circonstances, il est possible que des mutations de résistance soit sans coût. Les mutations sans coût biologique ne sont probablement pas une raison commune pour laquelle la résistance aux antibiotiques persiste en l'absence d'usage de pression de sélection. Il semble plutôt plus probable que la persistance est due soit à la co-sélection de mutations génétiquement liées (Hernando-Amado et al., 2017) ou parce que le coût biologique des mutations de résistance est souvent compensé par d'autres mutations (Björkman et al., 2000; Melnyk et al., 2015).

En outre, un gain de fitness associé à l'acquisition de la résistance a été rapporté (Durão et al., 2015). C'est le cas par exemple des souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème par mutations dans le gène de la porine *oprD* qui semblent être plus compétentes que les souches sensibles pour la colonisation de la muqueuse respiratoire lors d'un modèle d'infection chez la souris (Skurnik et al., 2013).

Il convient de souligner que le coût de certaines mutations de résistance peut dépendre du fond génétique des espèces bactériennes spécifiques ou lignées clonales. (Fuzi, 2016). En effet, dans une étude méta-analyse, il a été montré que l'effet de certaines mutations de résistance chez *Enterococcus faecium* et *Borrelia burgdorferi* avait un coût biologique relatif > 1 en l'absence d'antibiotique, tandis que ces mêmes mutations dans des espèces telles que *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* étaient coûteuses (Melnyk et al., 2015).

Des études ont rapporté que le coût biologique peut être élevé *in vitro* et *in vivo* pour les premières mutations et ensuite diminué par de nouvelles mutations (Kempf and Zeitouni, 2012). Ainsi, O'Neill et al. ont montré que, pour des mutants de *S. aureus* résistants à la rifampicine, la compétitivité d'un mutant présentant la substitution H481N dans le gène *rpoB* est de 0,80 mais peut être améliorée par une seconde mutation intragénique S529L dans le même gène, qui non seulement permet d'atteindre une compétitivité de 0,99, mais augmente aussi le niveau de résistance (O'Neill et al., 2006).

I-3) Mutations compensatoires et persistance de la résistance

Plusieurs études ont démontré l'existence d'un coût biologique associé à l'acquisition de la résistance aux antibiotiques, une fois que la résistance a émergé, la récupération d'une

population totalement sensible même en l'absence d'antibiotiques n'est pas facile. Cela est dû aux différents mécanismes qui réduisent le coût biologique et par conséquent permettent la stabilisation de cette résistance (Hernando-Amado et al., 2017). Parmi ces mécanismes, nous pouvons citer : (A) des mécanismes de résistance aux antibiotiques qui n'ont pas de coût biologique ce qui permettent le maintien de la population bactérienne en l'absence de pression de sélection, (B) ceux qui confèrent un faible coût (C) ou un gain de fitness, (D) évolution par mutations compensatoires qui réduisent les coûts biologiques sans réduire la résistance aux antibiotiques, en l'absence de pression de sélection et (E) co-sélection de locus génétiques différents conférant une résistance à différents antibiotiques (Hernando-Amado et al., 2017; Melnyk et al., 2015).

Les mécanismes mis en œuvre par les bactéries pour réduire le coût biologique d'une résistance sont variés : mutations intra-géniques, mutations extra-géniques, mode d'expression inductible; réduction en silence d'un plasmide, ... etc (Kempf and Zeitouni, 2012).

Une fois les mutations compensatoires acquises, le retour vers la sensibilité est improbable. Selon des auteurs, une souche résistante adaptée devient plus compétitive que la même souche révertante (figure 1) (Isabelle Kempf and Eric Jouy, 2012). Par ailleurs, certains exemples montrent que l'adaptation peut s'orienter vers la réduction ou la perte de la résistance. La compétitivité de la souche peut être restaurée au profit de la résistance à l'antibiotique initial ou vis-à-vis d'autres classes d'antibiotiques (Kempf and Zeitouni, 2012).

D'autres travaux ont montré que le coût biologique infligé par une mutation pour acquérir une résistance à un antibiotique, peut être compensé par la perte d'un gène de résistance pour un autre antibiotique déjà existant (Noto et al., 2008). Néanmoins d'autres résultats ont montré que la croissance d'une souche ayant acquis un gène de résistance pour un autre antibiotique tout en ayant déjà une résistance à un autre n'est pas différente de la croissance de la souche sauvage résistante, mais la culture en compétition de la souche sauvage et du transconjugant révèle un léger désavantage pour la souche doublement résistante (Foucault et al., 2009).

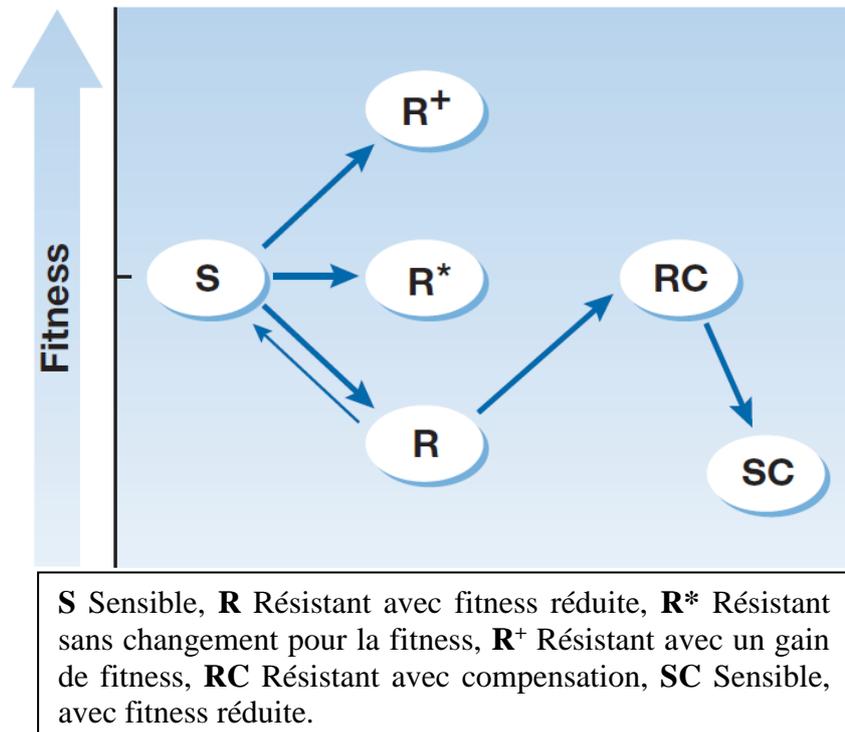


Figure 1 : Coût biologique de la résistance aux antibiotiques et ses compensations génétiques (Davies, 2007).

I-4) Méthodes d'analyse du coût biologique

I-4-1) Méthodes d'étude *in vitro*

- **Mesure de la croissance**

Les méthodes classiques de mesure du coût biologique sont basées sur l'estimation des paramètres de croissance. L'analyse d'un coût biologique est souvent réalisée *in vitro* en comparant la croissance d'une souche sensible et des mutants isogéniques résistants dans un milieu sans antibiotique. La façon la plus simple et la moins coûteuse est de cultiver *in vitro* les souches résistante et sensible et de dénombrer ensuite le nombre de cellule de chaque culture à des temps déterminés et ainsi comparer les paramètres de croissance des différentes souches en comparant leurs taux de croissance (Wiser and Lenski, 2015).

- **Mesure de la compétitivité**

Une autre approche pour mesurer la fitness est d'étudier la compétitivité entre une souche sauvage sensible et la souche isogénique résistante. Dans ces expériences, desco-cultures

bactériennes contenant la souche sauvage et la souche résistante sont repiquées en série en l'absence d'antibiotique et la fitness est évaluée comme étant le rapport entre le nombre de cellules des deux souches présentes dans la co-culture dans des échantillons prélevés au début et à la fin de la compétition pendant une période de temps fixé, souvent de 24 heures. Si la souche isogénique subit un coût biologique, sa fréquence diminue (Andersson and Hughes, 2010; Martínez et al., 2011). Afin de distinguer les deux souches, des marqueurs génétiques spécifiques peuvent être utilisés, y compris l'utilisation de protéines fluorescentes qui peuvent être détectées par cytométrie de flux (Gullberg et al., 2011; Vogwill et al., 2016).

- **Autres méthodes**

Les méthodes basées sur la mesure de la croissance sont souvent peu coûteuses et rapides, et, à l'occasion, les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus à partir de modèles *in vivo* (Paulander et al., 2007). En plus du taux de croissance, d'autres facteurs doivent être pris en considération lors de l'étude du coût biologique d'un antibiotique donné puisque la résistance aux antibiotiques peut affecter la physiologie bactérienne de différentes manières. Selon le microorganisme et son mode de vie, ces altérations peuvent inclure la capacité de formation de biofilm, la virulence et la survie dans les écosystèmes non cliniques, naturels, la cinétique d'élimination par l'hôte ou le potentiel de transmission entre hôtes infectés (Andersson, 2003).

II) Modèle d'étude *Staphylococcus aureus*

II-1) Généralités : résistance et virulence du *Staphylococcus aureus*

S. aureus est à la fois une bactérie commensale et un pathogène important des plus versatile en termes de spectre hôte, d'équipement en facteurs de virulence et de capacité pathogène (Becker et al., 2014; Tong et al., 2015). Il est responsable d'infections très diverses allant de simples infections cutanées à des affections systémiques pouvant engager le pronostic vital de l'hôte (Collomb, 2011). *S. aureus* possède un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif; possède une activité catalase, coagulase, phosphatase, ainsi que des nucléases thermostables mais pas d'oxydase (Behme et al., 1996; Nandy et al., 2013). Elles sont hémolytiques, ont la capacité de fermenter de nombreux sucres comme le glucose, le saccharose, le lactose et le mannitol (Behme et al., 1996). Le diagnostic permettant de distinguer *S. aureus* des autres espèces est basé sur des tests réalisés sur colonies tels que l'identification du facteur de la coagulase, des hémolysines et de la désoxyribonucléase thermostable ou thermonucléase (Brown et al., 2005).

Quelques temps après l'introduction de la pénicilline G pour le traitement des infections à *S. aureus*, sont apparus les staphylocoques résistants à la pénicilline, grâce à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique, enzyme dégradant la pénicilline. Durant les années 1950, sont apparues les souches de *S. aureus* multirésistantes, qui en plus de la résistance à la pénicilline, étaient aussi résistantes à la streptomycine, à l'érythromycine, à la tétracycline, au chloramphénicol ainsi qu'aux sulfamides. Un an après l'introduction de la méthicilline en 1959, les premières souches hospitalières de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM-H) sont apparues dans un hôpital de Grande-Bretagne (Oliveira et al., 2002). Le SARM a longtemps été le prototype du pathogène exclusivement nosocomial, plus rarement d'acquisition communautaire (Chambers, 2001; Lowy, 2003). La situation a radicalement changé en quelques années entre 1993 et 2000 où l'Amérique du Nord a connu l'émergence de plusieurs souches de SARM d'acquisition communautaire SARM-C, parmi lesquelles un groupe clonal, appelé USA300 appartenant au ST8, qui a connu un essor spectaculaire (Boucher and Corey 2008). Les infections à SARM se sont multipliées chez des patients n'ayant aucun facteur de risque traditionnel d'acquisition de SARM (Bukharie et al., 2001). Les souches de SARM isolées dans ce contexte ont des caractéristiques permettant de les différencier de souches SARM-H; notamment, le SARM-C ST80 clone européen présente un profil caractéristique de résistance

aux antibiotiques (résistant à la pénicilline, à l'oxacilline, à la kanamycine, à la tétracycline et de sensibilité intermédiaire à l'acide fucidique) permettant une identification rapide par tout laboratoire de bactériologie (Dufour et al., 2002). Les gènes codant pour la toxine PVL et la cassette chromosomique *SCCmec* de type IV sont probablement les caractères génétiques les plus clairement associés au caractère du groupes clonaux de SARM-C (Tristan et al., 2007).

Le génome du *S.aureus* est constitué d'un chromosome circulaire unique d'environ 2,8 Mb à faible teneur en GC (30 à 39 %) classant *S. aureus* parmi les bactéries Gram positives à faible GC% (Holden et al. 2004 ; Kim et al. 2014). Le génome de *S. aureus* est formé de deux domaines fonctionnels distincts. La majeure partie du chromosome contient les gènes qui assurent la maintenance de la bactérie. La deuxième partie du génome est constituée d'éléments génétiques accessoires et mobiles comme des plasmides, transposons, prophages ou des îlots de pathogénie portant la plupart des gènes associés à des facteurs de virulence et à la résistance aux antibiotiques (Figure 2) (Katayama et al., 2000; Malachowa and DeLeo, 2010). Ainsi, en dehors des mutations spontanées, *S. aureus* diversifie son génome grâce aux échanges de matériel génétique avec d'autres espèces bactériennes par des phénomènes de transfert horizontal de gènes (THG). Le phénotype de résistance, comme le profil pathogénique, semble donc bien être déterminé par les combinaisons de ces éléments génétiques accessoires portés par le chromosome (Dumitrescu et al., 2010).

Au cours des dernières décennies, plusieurs articles et chapitres de livres ont porté sur les bases génétiques de la résistance aux antimicrobiens chez *S. aureus*. (Schwarz Stefan et al., 2016). Des travaux antérieurs sur le resistome de *S. aureus* ont révélé que (1) *S. aureus* peut être un donneur et un récepteur de gènes de résistance, (2) de nombreux gènes de résistance trouvés chez *S. aureus* sont situés sur des éléments génétiques mobiles, et (3) l'acquisition de nouveaux gènes de résistance par *S. aureus* est un processus continu résultant de son interaction avec d'autres bactéries (Kadlec et al., 2012; Wendlandt et al., 2013)

Tableau II : Principaux facteurs de virulence produit par le *S. aureus*. D'après (Gordon and Lowy 2008).

Rôle dans la virulence	Principaux facteurs	Gènes	Manifestations cliniques associées
<u>Adhérence aux molécules de l'hôte</u>	MSCRAMMs (clumping factors, fibronectin-binding protein, collagen et bone sialoprotein-binding protein)	<i>clfA, clfB, fnbA, fnbB, cna, sdr, bbp</i>	-Endocardite -Infections ostéo-articulaires -Infections sur corps étranger (prothèses, cathéters)
<u>Persistance dans l'organisme</u>	Accumulation de biofilms (polysaccharide intercellular adhesion) Small colony variants	<i>Ica</i> locus, <i>hemB</i> mutation	-Infections récurrentes -Infections et mucoviscidose - Infections sur corps étranger (prothèses, cathéters)
<u>Échappement à la réponse immune</u>	Leucocidines (toxine PVL, γ -hémolysine) Polysaccharides de capsule (type 5 et 8) Protéine A, CHIPS, Phenol soluble modulins	<i>lukS-PV, lukF-PV, hlg</i> , gènes <i>cap5 et 8, spa, chp, eap, psm-α</i>	-Infections invasives -Pneumopathie nécrosante liée aux -SARM communautaires -Abscesses et infections compliquées de la peau et des tissus mous
<u>Invasion tissulaire</u>	Sérine-protéase-like, V8 protéase, auréolysine, cystéine protéase, staphopain (protéase II), glycérol ester hydrolase, butyryl estérase, FAME, PI-phospholipase C, nucléase, hyaluronidase, coagulase, staphylokinase	<i>splA-F, ssp aur, sspB, scp, geh, lip, fne, plc, nuc, hys, coa, sak</i>	-Destruction tissulaire -Foyers infectieux secondaires (dits 'métastatiques')

<p><u>Manifestations</u> <u>toxiques ou sepsis</u></p>	<p>Entérotoxines, toxic shock syndrome toxin-1, toxines exfoliatrices A et B, α-toxine, peptidoglycane, acides lipoteichoïques</p>	<p>De <i>sea</i> à <i>seq</i> (à l'exclusion de <i>sef</i>), <i>tstH</i>, <i>eta</i>, <i>etb</i>, <i>hla</i></p>	<p>-Intoxications alimentaires, -Syndrome de choc toxique - staphylococcique, -Impétigo bulleux, -Sepsis sévère et choc septique</p>
--	--	--	--

II-2) Résistance à la rifampicine

La rifampicine est l'un des médicaments les plus utilisés en association avec d'autres antibiotiques (Bongiorno et al., 2017). Elle inhibe spécifiquement l'ARN polymérase bactérienne, enzyme responsable de la transcription de l'ADN. La résistance à la rifampicine survient facilement via, les mutations dans le gène *rpoB*, qui encode la sous-unité bêta de l'ARN polymérase. Plusieurs études ont montré que la résistance à la rifampicine peut survenir rapidement (Fetsch, 2018)

La résistance bactérienne à la rifampicine est provoquée par des mutations accumulées dans une région extrêmement conservée de l'ARN polymérase de la sous-unité bêta, appelée «rifampicin resistance-determining region» (RRDR), regroupant trois clusters différents de l'acide aminé (aa) 462 à 550 dans cette séquence. Deux clusters sont étroitement associés à la résistance à la rifampicine : Cluster I (aa 462-488) et Cluster II (aa 515-530) (Bongiorno et al., 2017) (Tableau III). Les mutations au niveau du gène *rpoB* peuvent se traduire par des modifications de la structure au niveau du site de liaison de la rifampicine qui confère une résistance à l'antibiotique, ceci en diminuant l'affinité de liaison entre la rifampicine et l'ARN Polymérase (Severinov et al., 1993).

Les mutations n'ont pas le même effet sur les CMI de la rifampicine (Tableau IV), certains isolats qui présentent deux ou trois mutations du gène *rpoB* ont des CMI plus élevées que ceux qui présentent une seule mutation sur ce même gène (Aubry-Damon et al., 1998a; Li et al., 2016; Villar et al., 2011).

Tableau III : Différentes substitutions associés à la résistance à la Rifampicine chez le *Staphylococcus aureus*

Cluster I											Cluster II	Cluster III	
463	464	465	466	468	471	473	477	481	484	486	527	529	550
Ser	Ser	Gln	Leu	Gln	Asp	Ala	Ala	His	Arg	Ser	Ile	Ser	Asp

Tableau IV : Différentes mutations de résistance à la rifampicine et les CMI associées

type de mutation	Substitution de l'Acide Aminé	CMI à la Rif (µg/ml)	Référence
une seule mutation	471(Asp--Gly)	0,5	(Wichelhaus et al., 2002b)
	471(Asp--Glu)	0,5	(Wichelhaus et al., 2002b)
	477(Ala-- Val)	1	(Aubry-Damon et al., 1998b)
	464(Ser--Pro)	4	(Aubry-Damon et al., 1998b; Wichelhaus et al., 2002b)
	464(Ser--Pro)	4	(Aubry-Damon et al., 1998b; Wichelhaus et al., 2002b)
	471(Asp--Tyr)	4	(Aubry-Damon et al., 1998b; Wichelhaus et al., 2002b)
	481(His--Asn)	4	(Aubry-Damon et al., 1998b; Wichelhaus et al., 2002b)
	527(Ile--Phe)	4	(Aubry-Damon et al., 1998b; Wichelhaus et al., 2002b)
	474(Asn--Lys)	8	(Lim et al., 2014; Wichelhaus et al., 2002b)
	529(Ser--Leu)	128	(Aubry-Damon et al., 1998b)
	550(Asp--Gly)	128	(Aubry-Damon et al., 1998b)
	484(Arg--His)	256	(Aubry-Damon et al., 1998b)
	477 (Ala--Asp)	256	(Aubry-Damon et al., 1998b)
	486 (Ser--Leu)	512	(Wichelhaus et al., 2002b)
	468(Gln--Leu)	512	(Wichelhaus et al., 2002b)
486(Gln--Arg)	256-512	(Aubry-Damon et al., 1998b; Wichelhaus et al., 2002b)	
Double mutation	481(His--Asn),482 (Lys--Asn)	512	(Aubry-Damon et al., 1998b)
	481(His--Asn),466 (Leu--Pro)	512	(Aubry-Damon et al., 1998b)
Triple mutation	481(His--Asn),465(Gln--Arg),529(Ser--Leu)	512	(Aubry-Damon et al., 1998b)
	481(His--Asn),473(Ala--Thr),477(Ala--Thr)	512	(Aubry-Damon et al., 1998b)

II-3) Résistance à la ciprofloxacine

La ciprofloxacine est un antibiotique appartenant à la famille des fluoroquinolones, ils ont pour cible les topoisomérases de type II incluant la gyrase qui est composée de deux sous unités, (Gyr A et Gyr B), ainsi que la topoisomérase IV constituée de deux sous unités également, appelées ParC et ParE ou GrlA et GrlB). Ces enzymes sont responsables du surenroulement de la molécule d'ADN qui est nécessaire à son stockage sous forme compacte ou à son relâchement lors de la traduction en ARNm (topoisomérase IV) (Hooper, 2002). *S.aureus* est naturellement résistant aux quinolones de première génération (acide nalidixique, acide oxolinique et flumequine), mais sensible aux fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine et norfloxacine). La liaison des fluoroquinolones à leur cible entraîne l'arrêt de la réplication et de la transcription de l'ADN bactérien.

Le principal mécanisme de résistance est dû à des mutations ponctuelles dans les cibles des quinolones (gyrase et topoisomérase IV) (Hooper, 2002) (Tableau V). Ces mutations siègent dans une courte région conservée appelée QRDR (*quinolones resistance determinig region*). Les mutations n'ont pas le même effet sur les CMI de la ciprofloxacine (Tableau VI), Une première mutation sur une cible (en général Par C) confère une résistance de bas niveau, une deuxième mutation sur la seconde cible (ParC, ParE ou GyrA) confère une résistance de haut niveau à plusieurs molécules (Lowy, 2003) (Daurel et al., 2008). Un second mécanisme de résistance à cette famille d'antibiotiques est assuré par le système d'efflux, Des pompes appelées « NorA » sont capables de diminuer la concentration intra-cytoplasmique de la ciprofloxacine (Hooper, 2002).

Tableau V : Différentes substitutions associés à la résistance à la ciprofloxacine chez le *Staphylococcus aureus*

Topoisomérase type II									Topoisomérase type IV								
GyrA				GyrB					GrlA				GrlB				
81	84	85	88	437	456	458	477	517	79	80	84	108	422	443	444	451	471
Ser	Ser	Ser	Glu	Asp	Pro	Arg	Glu	Arg	Asp	Ser	Glu	Ser	Glu	Asp	Arg	Pro	Glu

Tableau VI : Différentes mutations de résistance à la Ciprofloxacine et Les CMI associées.

Type de mutation	Substitution de l'acide Aminé	CMI à la Ciprofloxacine (µg/ml)	Références
Une seule mutation	80(Ser-Phe)	4	(Ba et al. 2006)
Double mutation	80 (Ser-Phe)-84(Ser-Leu)	256	(Ba et al. 2006)
	80 (Ser-Phe)-84(Ser-Ala)	256	(Ba et al. 2006)
	80(Ser-Thy)-84(Ser-Leu)	64	(Ba et al. 2006)
	80(Ser-Phe)-84(Ser-Val)	32	(Ba et al. 2006)
	80(Ser-Leu)-84(Ser-Pro)	32	(Bogdanovich et al. 2005)
	88(Ser-Phe)-471(Glu-Lys)	32	(Bogdanovich et al. 2005)
	80(Ser-Pro)-84(Ser-Leu)	16	(Ba et al. 2006)
Triple mutation	84(Ser-Leu) -80(Ser-Pro) 444(Glu-Lys)	<32	(Bogdanovich et al. 2005)

Méthodologie

I) Souches et conditions de croissance

Au cours de notre étude nous avons utilisé deux souches de *S.aureus* caractérisées génétiquement par Mlle. Assia MAIRI lors de ses travaux de thèse de doctorat au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU de Nîmes (France) en 2017.

La souche désignée **S1** est une souche de *S.aureus* isolée à partir d'aliment (merguez), appartenant au clone européen ST80 et productrice de la Leucocidin Panten Valenine (PVL+). Pour la souche désignée **S2**, elle a été isolée d'un pus nasal hospitalier appartenant également au même clone ST80 et non productrice de la PVL (PVL-) (Tableau VII).

En parallèle nous avons utilisé deux souches comme control de qualité interne lors de la détermination des CMI, il s'agit de la souche **MRSA ATCC 103911** (désignée **S3**) et **E. coli C600 Rif^R** (désigné **S4**).

Les milieux solides et liquides utilisés au cours de notre étude sont le bouillon Trypticase soja (TSB), gélose Trypticase soja (TSA), gélose Mueller Hinton (MH). La composition de ces milieux est donnée en annexe I

Les antibiotiques utilisés sont : la rifampicine (Poudre injectable, SANOFI France) et la ciprofloxacine (solution Injectable 200mg/100mlFRESENIUS KABIAAllemagne).

Tableau VII : Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches S1 et S2.

Code	Antibiogramme													
	PNG1	FOX	ERY	CMN	GDF	KMN	TMN	GMN	MNO	OFX	FAD	FOS	RIF	SXT
S1	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S2	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S

R : Résistant, **S** : Sensible, **PNG1** : Pénicilline G, **FOX** : Cefoxitine, **CMN** : Clindamycine, **GDF** : Quinupristine-Dalfopristine, **KMN** : Kanamycine, **TMN** : Tobramycine, **GMN** : Gentamycine, **OFX** : Ofloxacine, **FAD** : Acide fusidique, **FOS** : Fosfomycine, **RIF** : Rifampicine, **STX** : Sulfamide-Triméthoprime

II) Détermination des CMI

Nous avons déterminé les CMI vis-à-vis de la rifampicine et/ou de la ciprofloxacine pour les souches sauvages S1 et S2 ainsi que leurs mutants respectifs selon la méthode des dilutions en gélose Mueller Hinton selon les recommandations de (EUCAST, 2000).

Une série de boîtes de Pétri a été préparée avec des concentrations d'antibiotiques allant de 0.015 à 512 µg/ml pour la détermination de la CMI à la rifampicine et allant de 0.5 à 64µg/ml pour la détermination de la CMI à la ciprofloxacine.

Nous avons ensemencé les souches par spots (10µl d'une suspension à 10⁶UFC). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24h.

La CMI est la concentration la plus faible de l'antibiotique qui inhibe complètement la croissance bactérienne visible à l'œil nu,(EUCAST, 2000).

III) Sélection de mutants

Le protocole de sélection de mutants a été adapté à partir de plusieurs références (Bhagwat et al. 2006; Pietsch et al. 2017; Aubry-Damon, Soussy, and Courvalin 1998a ,Horváth et al. 2012 et Livermore et al. 2015)

III-1) Sélection de mutants résistants à la rifampicine

Pour la sélection des mutants de *S. aureus* résistants à la rifampicine, nous avons ensemencé sur gélose trypticase soja (TSA) contenant différentes concentrations de rifampicine. Après 48h d'incubation à 37°C, nous avons pris en compte les mutants obtenus sur gélose TSA.

III-2) Sélection de mutants résistants à la ciprofloxacine

La sélection des doubles mutants (Rif^RCip^R) a été réalisée en étalant chaque mutant sur gélose (TSA) additionnée de ciprofloxacine. Nous avons sélectionné les mutants obtenus sur gélose (TSA).

IV) Mesure du coût biologique par détermination des paramètres de croissance

Nous avons évalué l'aptitude en culture des deux souches sauvages (S1 et S2) et leurs mutants isogéniques respectifs (mutants Rif^R et mutants Rif^R-Cip^R) en déterminant leurs taux de croissance et leurs temps de génération.

V) Mesure du coût biologique par l'étude de la compétitivité :

Nous avons mélangé chaque souche sauvage et son mutant isogénique avec un rapport de 1:1. Des dénombrements ont été réalisés

VI) Mesure du coût biologique par l'étude de la Formation de biofilm :

Test d'adhérence *in vitro*

La formation de biofilm a été évaluée *in vitro* à l'aide d'un spectrophotomètre en utilisant des cuves.

Les souches sauvages et les mutants isogéniques ont été inoculés dans 2 ml de TSB contenant 0.25% de glucose puis incubés pendant toute une nuit dans un bain marie agitateur à 37°C. Un volume de 100µl de la culture est utilisé pour inoculer des cuves contenant 1 ml de TSB additionné de 0,25% de glucose. Les cuves sont incubées pendant 24 heures à 37 ° C.

Après incubation, les cuves ont été soigneusement lavées trois fois avec une solution saline stérile tamponnée au phosphate : (Na₂HP04 7 mM, NaHP043 mM, et NaCl 130 mM, pH 7,4) jusqu'à élimination des cellules non adhérentes et séchées à l'air libre avant d'être colorées.

Les cellules adhérentes ont été colorées avec 1 ml de la solution de cristal violet à 0,4% pendant 2 minutes, l'excès du colorant est éliminé.

Les cuves ont été lavées avec de l'eau distillée stérile puis séchées à l'air libre. Un volume de 1mL de l'éthanol absolu est ajouté dans chaque cuve avant d'être lu au spectrophotomètre.

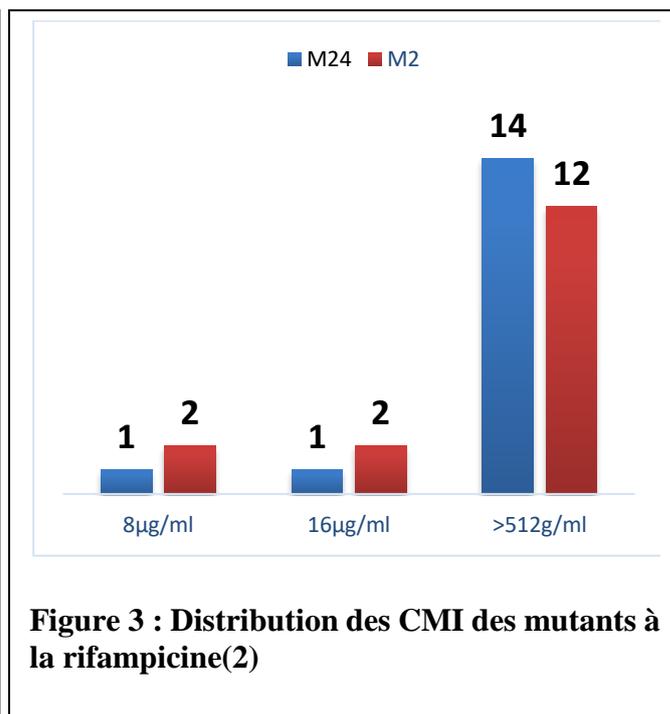
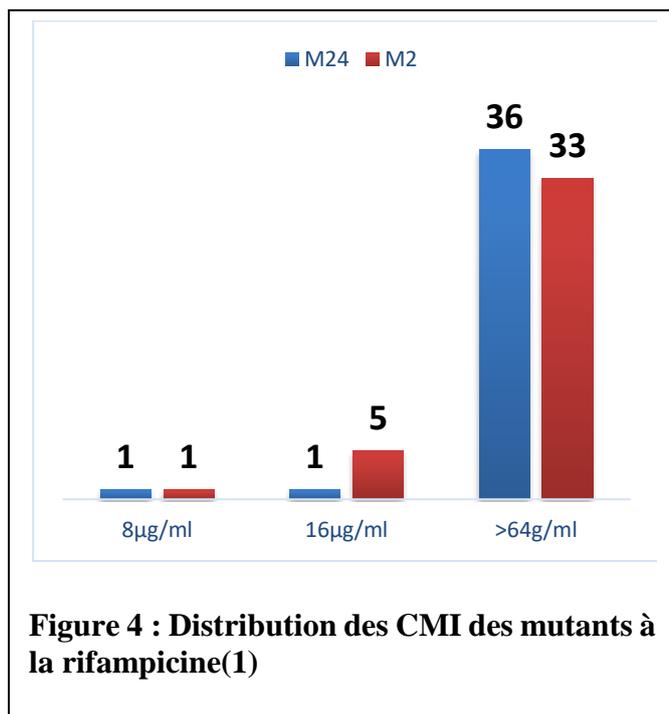
La densité optique du biofilm adhérent est déterminée à 570 nm. (Gowrishankar et al, 2016). La capacité d'adhérence des isolats testés seront classés en quatre catégories en fonction de la DO obtenu :

- a) fortement adhérent ($OD_{570} \geq 3,0$),
- b) modérément adhérent ($OD_{570} \leq 1.5-2.0$),
- c) faiblement adhérent ($OD_{570} \leq 0,5- 1,0$),
- d) et non adhérent ($OD_{570} < DO_{570}$ de contrôle négatif) (Gowrishankar et al, 2016)

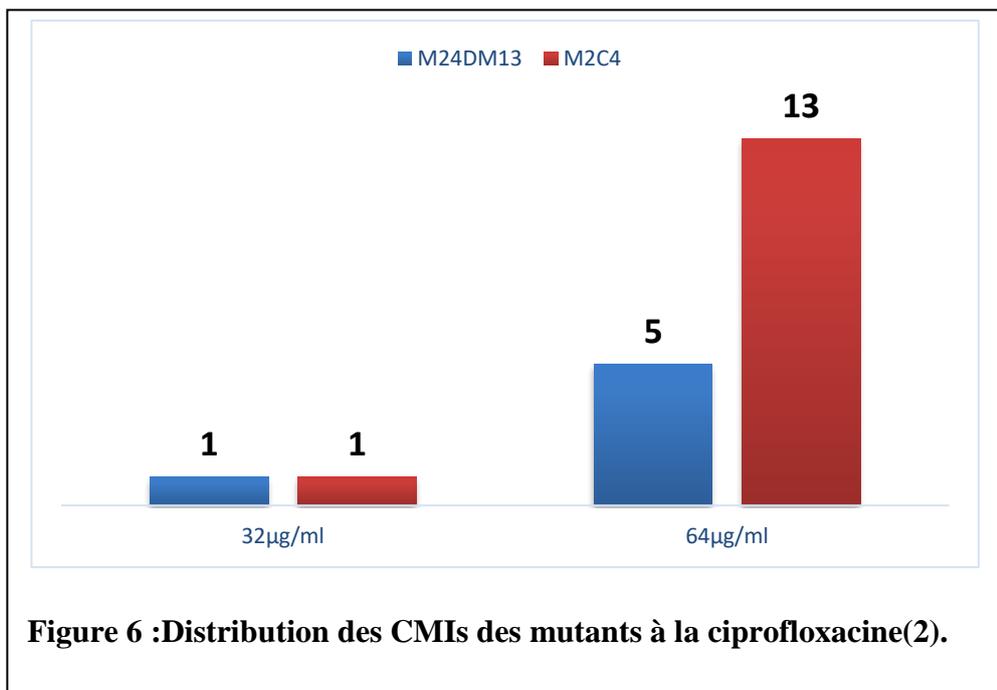
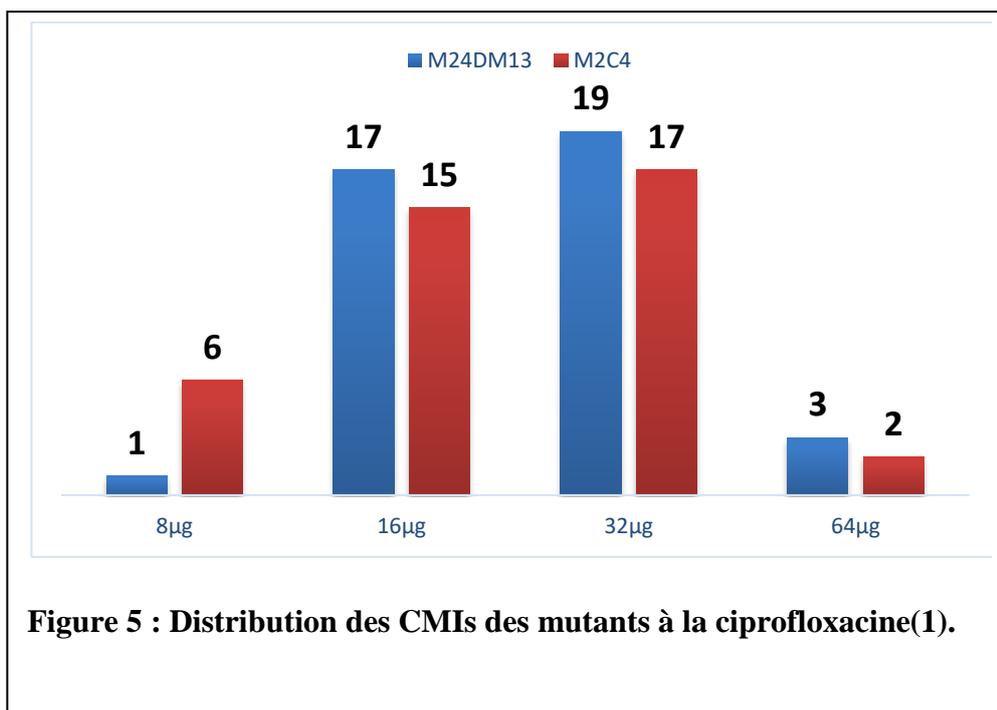
Résultats

I) Sélection de mutants

Nous avons obtenus après sélection 38 et 39 mutants résistant à la rifampicine respectivement à partir des souches S1 et S2. La majorité de ces mutants ont une CMI >64µg/ml (figures 3 et 4).



La sélection sur gélose additionnée de ciprofloxacine a permis d'obtenir 20 mutants (Figures 5 et 6)



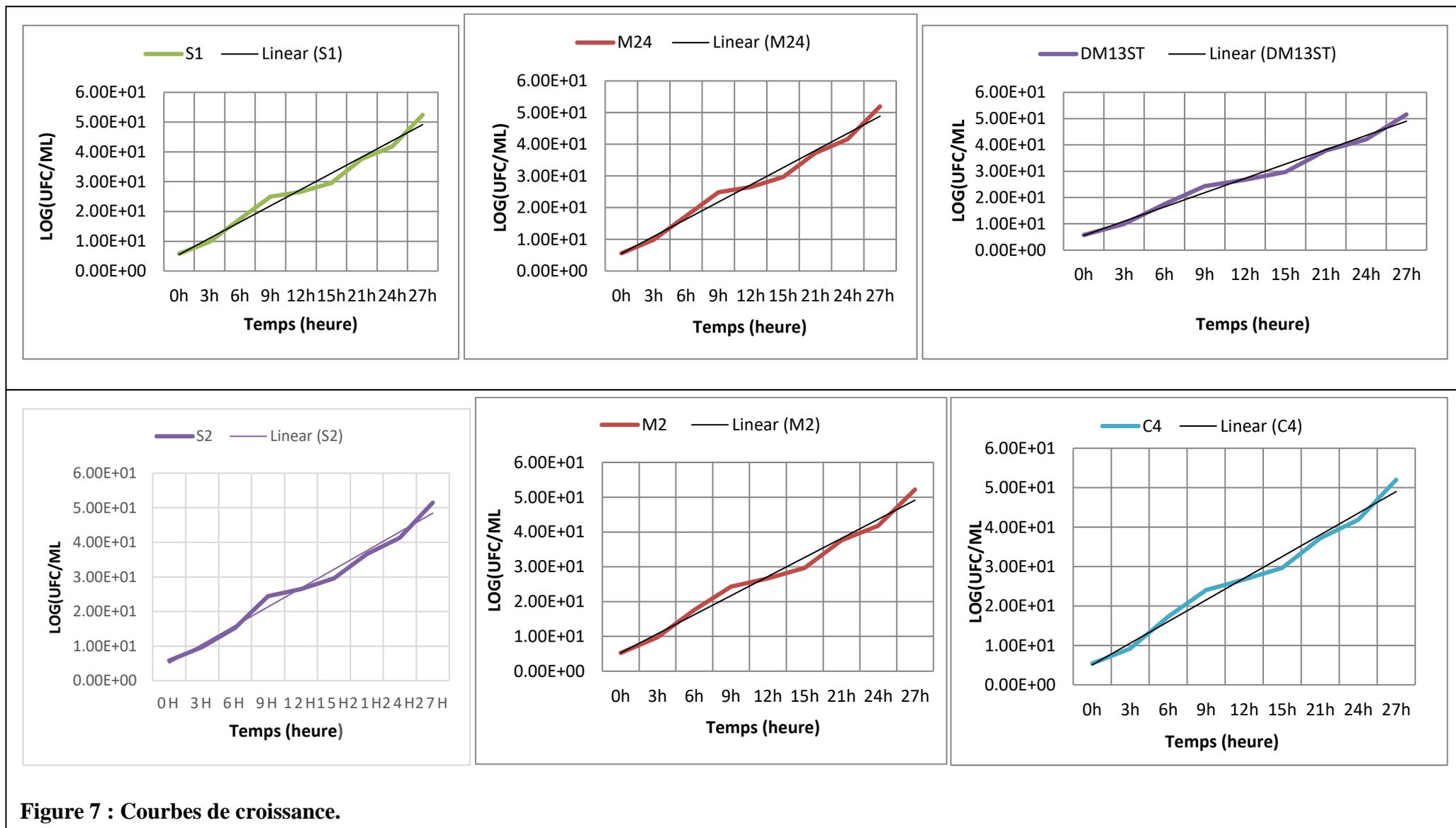
En résumé 04 mutants ont été retenus pour l'étude du coût biologique. Les caractéristiques de ces mutants et des souches sauvages sont résumées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : CMI des souches sélectionnées pour l'étude.

Mutant	souche mère	CMI	
		Rifampicine ($\mu\text{g/ml}$)	Ciprofloxacine ($\mu\text{g/ml}$)
S1	/	0,015	2
S2	/	0,015	2
M24	S1	512	2
M2	S2	128	2
M24DM13	M24	512	64
M2C4	M2	128	16

II) Détermination du coût biologique par l'étude des paramètres de croissances

Après avoir réalisé un dénombrement pour les six souches que nous avons sélectionnées, nous avons obtenu les résultats illustrés dans les figures suivantes :



Le temps de génération, le taux de croissance ainsi que le nombre de (G) est quasiment identique pour la S1 et son mutant M24 (tableau X).

Tableau IX : Comparaison des paramètres de croissance entre la souche S1 et le mutant M24

	TG (min)	TC (min-1)	Nombre de génération (G)
S1	27,28	0,0367	154,80
M24	27,64	0,0362	153,96

Le temps de génération, le taux de croissance est identique pour les deux souches. Nous remarquons une légère différence dans le nombre de génération (G) qui est plus élevé chez la souche sauvage (tableau XI).

Tableau X : Comparaison des paramètres de croissance entre la souche S1 et le double mutant DM13ST

	TG (min)	TC (min-1)	Nombre de génération (G)
S1	27,28	0,037	154,80
DM13ST	27,48	0,036	152,17

Le temps de génération de la souche S2 est supérieur à celui du mutant d'environ 1 min, leurs taux de croissance est identique, par contre nous remarquons que le nombre de génération du mutant M2 est plus élevé (tableau XII).

Tableau XI : comparaison des paramètres de croissance entre la souche S2 et les mutants M2

	TG (min)	TC (min-1)	Nombre de génération (G)
S2	27,72	0,036	151,62
M2	26,83	0,037	155,99

La souche S2 démontre un temps de génération plus lent que celle du double mutant d'1 min, leurs taux de croissance est identique, par contre le nombre de génération du double mutant M2C4 est plus élevé (tableau XIII).

Tableau XII : Comparaison des paramètres de croissance entre la souche S2 et le double mutant M2C4

	TG (min)	TC (min-1)	Nombre de génération (G)
S2	27,72	0,036	151,62
M2C4	26,77	0,037	154,76

III) Détermination du coût biologique par l'étude de la compétitivité

Tous les mutants semblent présenter un coût biologique que ce soit les simples mutants (RIF^R) ou les double mutants (RIF^R CIP^R), nous remarquons que le coût de la fitness est légèrement plus prononcé chez les doubles mutants.

Nous remarquons que le nombre de génération des souches S1 et S2 est plus élevé que leurs mutants résistants à la rifampicine, aussi les doubles mutants Cip ont un nombre de génération moins élevé que celui des mutants Rif, que ce soit à 24h ou à 48h.

Le mutant M2C4 montre un nombre de génération légèrement plus élevé que celui de la souche mère à t=24h, mais au bout de 48h son nombre de génération a diminué.

Nous remarquons une perte de fitness chez tous les mutants.

Le mutant M2 (mutant de la S2) présente un coût biologique plus élevé que celui du mutant (M24 mutant de la S1).

Le mutant DM13 appartenant à la souche S1 présente un coût biologique à la ciprofloxacine plus élevé que le mutant C4 appartenant à la souche S2.

IV) Formation de biofilm

Nous avons sélectionné deux mutants à différentes CMI à la RIF provenant des deux souches mères S1 et S2 sur lesquelles nous avons réalisé le test de la formation du biofilm, les résultats d'adhérences sont illustrés sur le tableau suivant :

Tableau XIII : résultats du test d'adhérence

Formation de biofilm		
Mutants	DO (570nm)	Adhérence
S1	0,293	Non adhérente
M24	0,26	Non adhérente
M32	0,568	faiblement adhérente
S2	0,226	Non adhérente
M2	0,614	faiblement adhérente
M30	0,579	faiblement adhérente

Parmi les six souches sur lesquelles nous avons réalisé le test de formation de biofilm, nous remarquons que les trois mutants M32, M2 et M30 présentent une adhérence faible, tandis que pour les autres souches l'adhérence est quasiment absente.

Discussion

La résistance bactérienne qu'elle soit induite par mutation ou acquisition d'un gène engendre un coût biologique (le conditionnement génétique de la souche sauvage sensible est le plus optimal généralement). Dans la plus part des cas le coût se traduit en une perte de compétitivité, diminution du taux de croissance et de la virulence. Mais aussi la résistance peut être dans certains cas non coûteuse, et peut aussi apporter un gain.

Le principal mécanisme de résistance à la rifampicine et aux quinolones est l'apparition des mutations dans leurs cibles respectives. Dans cette étude, nous avons examiné les effets de ces mutations sur la fitness de deux mutants résistants à la rifampicine et deux autres doubles mutants résistants à la rifampicine et à la ciprofloxacine.

Nos résultats montrent qu'il y'aurait un coût biologique associé à l'acquisition de la résistance ces résultats ne sont pas surprenant car les deux antibiotiques utilisés dans notre travail ciblent des processus cellulaires importants et la résistance à ces derniers perturbe ces processus ou impose de grands fardeaux énergétiques qui réduisent la capacité compétitive face aux souches sensibles

Moorman et Mandell (Moorman and Mandell, 1981) ont également montré que les souches de *S.aureus* résistante à la Rifampicine présentent une fitness réduite *in vitro* et dans certains cas présentent une virulence réduite dans un modèle animal.

Nilsson et al. ont comparé les taux de croissance de souche d'*E. coli* uropathogènes, sensibles à la fosfomycine et de leurs mutants isogéniques résistants à cet antibiotique, obtenus *in vitro*, cultivés dans un milieu de culture ou dans l'urine et ont démontré que la croissance des mutants résistants est diminuée de 10 à 25 % en absence de fosfomycine (Nilsson et al., 2003). De même, Sandegren et al. ont rapporté que le temps de génération des mutants d'*E. coli* résistants au nitrofurantoïne est 1,4 à 2 fois plus long que la souche parentale sensible (Sandegren et al., 2008). Il a été également rapporté par Ender et al. que le temps de génération d'une souche de *S.aureus* ayant acquis l'élément *SCCmec* est de 40 minutes alors que pour la même souche sensible le temps de génération est de 29 minutes (Ender et al., 2004) certains mutants d'*Enterococcus faecium* résistants à la rifampicine ont des taux de croissance supérieurs à ceux des souches parentales (Enne et al., 2004).

La fitness est relative et devrait être mesurée dans différents environnements (Björkman et al., 2000) pour établir sa valeur prédictive dans la détermination du résultat clinique de

l'infection. Dans certains cas, les mutants résistants semblent être aussi adaptés que les bactéries sauvages (Björkman et al., 1998; Sander et al., 2002), ce qui soulève la question de savoir comment interpréter les résultats négatifs. Cependant, si les coûts biologiques sont observés *in vitro* (Melnyk et al., 2015), il est raisonnable de supposer qu'il y aura également des conditions cliniques dans lesquelles la résistance imposerait un coût biologique. La variation des coûts de la résistance peut survenir soit parce que certaines mutations sont coûteuses et d'autres non, quel que soit le contexte génétique dans lequel elles surviennent, ou parce que une mutation donnée n'est pas coûteuse dans certains contextes génétiques mais elle est coûteuse dans d'autres. Comprendre les mécanismes d'acquisition de la résistance et son effet sur la fitness du microorganisme est nécessaire pour prédire plus au moins l'effet d'un antibactérien dans le temps.

Afin de démontrer le coût biologique engendré par ces mutations et de savoir si il y'a oui ou non une corrélation entre la CMI et la fitness relative des mutants il faudrait augmenter le nombre de mutant à étudier, il serait intéressant de passer au niveau moléculaire pour connaître le type de mutation retrouvé chez ces mutants ayant des CMI différentes et un coût biologique quasi identique.

Nous étions contraint de prendre un nombre réduit de mutants à étudier vu l'indisponibilité des consommables et du temps limité (sélection de mutant et adaptation des protocoles), il est donc nécessaire de refaire la mesure des paramètres de croissance entre les souches mères et leurs mutants avec des répétitions et de prolonger le teste de compétitivité dans le temps (3 à 10 jours). D'autres expériences sont nécessaires afin de détecter les dysfonctionnements physiologiques imposés par le coût biologique de la résistance aux antibiotiques étudiés, tel que l'étude *in vivo* (chez le lapin) afin d'évaluer le coût biologique chez l'hôte et connaître l'effet sur la virulence chez les souches de *S.aureus* PVL- et PVL+.

Conclusion

Si la résistance aux antibiotiques s'accompagne souvent d'un coût biologique pour la bactérie, cette dernière développe très fréquemment des mutations ou stratégies permettant de réduire ce fardeau et de retrouver sa compétitivité. L'évolution de la résistance dans une population dépendra donc très fortement de l'utilisation des antibiotiques et de la vitesse d'émergence de mutants résistants, mais des facteurs externes (utilisation ou présence d'autres antimicrobiens, métaux, biocides...) ou propres à la bactérie (coût biologique et possibilités de compensation de ce coût, présence d'autres gènes avantageux sur un élément génétique mobile) sont des éléments primordiaux pour la stabilisation et la persistance de la résistance. Ces phénomènes doivent nous convaincre que l'arrêt de l'utilisation de certains antibiotiques, surtout s'il est tardif, ne signifie pas toujours la disparition des souches résistantes.

En conséquence, il est indispensable de promouvoir au plus vite une politique d'utilisation raisonnée des antibiotiques. Il est alors à craindre que l'absence de coût ou de la réduction du coût biologique d'une résistance puissent être telle qu'une fois établie dans une population, cette résistance soit maintenue pendant très longtemps même après l'arrêt de l'utilisation de l'antibiotique. Il est donc capital de tenir compte de ce phénomène dans nos politiques d'usage des antibiotiques. Il serait également souhaitable que le coût biologique d'une résistance et son éventuelle compensation soient analysés lors de l'évaluation de nouvelles molécules, voire dès leur conception. Ainsi, la connaissance des gènes ou des voies métaboliques qui permettent à la bactérie de réduire la gêne occasionnée par un mécanisme de résistance pourrait être la source d'innovations thérapeutiques susceptibles de prolonger l'efficacité des antibiotiques.

Référence

- Andersson, D.I. (2003). Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 452–456.
- Andersson, D.I. (2006). The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 461–465.
- Andersson, D.I., and Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, nrmicro2319.
- Aubry-Damon, H., Soussy, C.-J., and Courvalin, P. (1998a). Characterization of Mutations in the *rpoB* Gene That Confer Rifampin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 2590–2594.
- Aubry-Damon, H., Soussy, C.-J., and Courvalin, P. (1998b). Characterization of Mutations in the *rpoB* Gene That Confer Rifampin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 2590–2594.
- Becker, K., Heilmann, C., and Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* *27*, 870–926.
- Behme, R.J., Shuttleworth, R., McNabb, A., and Colby, W.D. (1996). Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. *J. Clin. Microbiol.* *34*, 3075–3084.
- Bhagwat, S.S., Mundkur, L.A., Gupte, S.V., Patel, M.V., and Khorakiwala, H.F. (2006). The Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Quinolone WCK 771 Has Potent Activity against Sequentially Selected Mutants, Has a Narrow Mutant Selection Window against Quinolone-Resistant *Staphylococcus aureus*, and Preferentially Targets DNA Gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 3568–3579.
- Binet, R., and Maurelli, A.T. (2005). Fitness Cost Due to Mutations in the 16S rRNA Associated with Spectinomycin Resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 4455–4464.
- Björkman, J., and Andersson, D.I. (2000). The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *3*, 237–245.
- Björkman, J., Hughes, D., and Andersson, D.I. (1998). Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3949–3953.
- Björkman, J., Nagaev, I., Berg, O.G., Hughes, D., and Andersson, D.I. (2000). Effects of Environment on Compensatory Mutations to Ameliorate Costs of Antibiotic Resistance. *Science* *287*, 1479–1482.
- Bongiorno, D., Mongelli, G., Stefani, S., and Campanile, F. (2017). The Burden of Rifampicin- and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Italy. *Microb. Drug Resist.*
- Brown, D.F.J., Edwards, D.I., Hawkey, P.M., Morrison, D., Ridgway, G.L., Towner, K.J., Wren, M.W.D., Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Hospital Infection Society, and Infection Control Nurses Association (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Antimicrob. Chemother.* *56*, 1000–1018.
- Bukharie, H.A., Abdelhadi, M.S., Saeed, I.A., Rubaish, A.M., and Larbi, E.B. (2001). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community pathogen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *40*, 1–4.

- Chambers, H.F. (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* 7, 178–182.
- Collomb, A. (2011). Caractérisation de la différence de sensibilité à l'infection par *staphylococcus aureus* de deux lignées de souris. other.
- Davies, J. (2007). Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Rep.* 8, 616–621.
- Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Floret, D., Etienne, J., and Richet, H. (2002). Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in France: Emergence of a Single Clone That Produces Panton-Valentine Leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* 35, 819–824.
- Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.-É., Tristan, A., and Vandenesch, F. (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. *Med Sci Paris* 26, 943–949.
- Durão, P., Trindade, S., Sousa, A., and Gordo, I. (2015). Multiple Resistance at No Cost: Rifampicin and Streptomycin a Dangerous Liaison in the Spread of Antibiotic Resistance. *Mol. Biol. Evol.* 32, 2675–2680.
- Ender, M., McCallum, N., Adhikari, R., and Berger-Bächli, B. (2004). Fitness Cost of SCCmec and Methicillin Resistance Levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2295–2297.
- Enne, V.I., Delsol, A.A., Roe, J.M., and Bennett, P.M. (2004). Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 203–207.
- EUCAST (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 509–515.
- Fajardo, A., Linares, J.F., and Martínez, J.L. (2009). Towards an ecological approach to antibiotics and antibiotic resistance genes. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 14–16.
- Fetsch, A. (2018). *Staphylococcus aureus* - 1st Edition.
- Foucault, M.-L., Courvalin, P., and Grillot-Courvalin, C. (2009). Fitness Cost of VanA-Type Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2354–2359.
- Fuzi, M. (2016). Dissimilar Fitness Associated with Resistance to Fluoroquinolones Influences Clonal Dynamics of Various Multiresistant Bacteria. *Front. Microbiol.* 7.
- Gagneux, S., Long, C.D., Small, P.M., Van, T., Schoolnik, G.K., and Bohannan, B.J.M. (2006). The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 312, 1944–1946.
- Gowrishankar, S., Kamaladevi, A., Balamurugan, K., and Pandian, S.K. (2016). In Vitro and In Vivo Biofilm Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients Associated with Pharyngitis Infection.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., and Andersson, D.I. (2011). Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLOS Pathog.* 7, e1002158.
- Hall, A.R., Iles, J.C., and MacLean, R.C. (2011). The Fitness Cost of Rifampicin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Depends on Demand for RNA Polymerase. *Genetics* 187, 817–822.
- Hernando-Amado, S., Sanz-García, F., Blanco, P., and Martínez, J.L. (2017). Fitness costs associated with the acquisition of antibiotic resistance. *Essays Biochem.* 61, 37–48.
- Hodille, E. (2014). Identification des facteurs de virulence de *staphylococcus aureus* capables d'activer les mastocytes humains cutanes. universite claudes bernard - lyon 1 faculte de pharmacie de lyon institut des sciences pharmaceutiques et biologiques.
- Holden, M.T.G., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P.J., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., et al. (2004). Complete genomes of two clinical

- Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 9786–9791.
- Horváth, A., Dobay, O., Kardos, S., Ghidán, Á., Tóth, Á., Pászti, J., Ungvári, E., Horváth, P., Nagy, K., Zissman, S., et al. (2012). Varying fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones governs clonal dynamic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *31*, 2029–2036.
- Isabelle Kempf, and Eric Jouy (2012). Coût biologique et évolution de la résistance aux antibiotiques (Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 53/Spécial Antibiotiques et Antibiorésistances). 45–49.
- Jin, D.J., and Gross, C.A. (1989). Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. *171*, 5229–5231.
- Kadlec, K., Feßler, A.T., Hauschild, T., and Schwarz, S. (2012). Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. *18*, 745–755.
- Katayama, Y., Ito, T., and 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.
- Kempf, I., and Zeitouni, S. (2012). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences. /data/revues/03698114/v60i2/S0369811409002089/.
- Kim, B.-S., Yi, H., Chun, J., and Cha, C.-J. (2014). Genome sequence of type strain of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Gut Pathog. *6*, 6.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., et al. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. Lancet Infect. Dis. *13*, 1057–1098.
- Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Røttingen, J.-A., Klugman, K., and Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. The Lancet *387*, 168–175.
- Li, J., Feßler, A.T., Jiang, N., Fan, R., Wang, Y., Wu, C., Shen, J., and Schwarz, S. (2016). Molecular basis of rifampicin resistance in multidrug-resistant porcine livestock-associated MRSA. J. Antimicrob. Chemother. *71*, 3313–3315.
- Lim, K.-T., Teh, C.S.J., Yusof, M.Y.M., and Thong, K.-L. (2014). Mutations in *rpoB* and *fusA* cause resistance to rifampicin and fusidic acid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from a tertiary hospital in Malaysia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *108*, 112–118.
- Livermore, D.M., Warner, M., Jamroz, D., Mushtaq, S., Nichols, W.W., Mustafa, N., and Woodford, N. (2015). In Vitro Selection of Ceftazidime-Avibactam Resistance in Enterobacteriaceae with KPC-3 Carbapenemase. Antimicrob. Agents Chemother. *59*, 5324–5330.
- Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. *111*, 1265–1273.
- Malachowa, N., and DeLeo, F.R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life Sci. *67*, 3057–3071.
- Martinez, J.L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J.F., Martínez-Solano, L., and Sánchez, M.B. (2009). A global view of antibiotic resistance. FEMS Microbiol. Rev. *33*, 44–65.
- Martínez, J.L., Baquero, F., and Andersson, D.I. (2011). Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. Curr. Opin. Pharmacol. *11*, 439–445.
- Melnyk, A.H., Wong, A., and Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. Evol. Appl. *8*, 273–283.

- Moorman, D.R., and Mandell, G.L. (1981). Characteristics of rifampin-resistant variants obtained from clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *20*, 709–713.
- Nandy, P., Roy, S., Thakur, A.R., and Chaudhuri, S.R. (2013). Comparative Study on Characterization of Three Staphylococcal Isolates from Varied Origin.
- Nilsson, A.I., Berg, O.G., Aspevall, O., Kahlmeter, G., and Andersson, D.I. (2003). Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 2850–2858.
- Noto, M.J., Fox, P.M., and Archer, G.L. (2008). Spontaneous Deletion of the Methicillin Resistance Determinant, *mecA*, Partially Compensates for the Fitness Cost Associated with High-Level Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 1221–1229.
- Oliveira, D.C., Tomasz, A., and de Lencastre, H. (2002). Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.* *2*, 180–189.
- O’Neill, A.J., Huovinen, T., Fishwick, C.W.G., and Chopra, I. (2006). Molecular Genetic and Structural Modeling Studies of *Staphylococcus aureus* RNA Polymerase and the Fitness of Rifampin Resistance Genotypes in Relation to Clinical Prevalence. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 298–309.
- Paulander, W., Pennhag, A., Andersson, D.I., and Maisnier-Patin, S. (2007). *Caenorhabditis elegans* as a Model To Determine Fitness of Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 766–769.
- Pietsch, F., Bergman, J.M., Brandis, G., Marcusson, L.L., Zorzet, A., Huseby, D.L., and Hughes, D. (2017). Ciprofloxacin selects for RNA polymerase mutations with pleiotropic antibiotic resistance effects. *J. Antimicrob. Chemother.* *72*, 75–84.
- Pränting, M., Negrea, A., Rhen, M., and Andersson, D.I. (2008). Mechanism and Fitness Costs of PR-39 Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 2734–2741.
- Robert, D. (2013). *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM): généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l’exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive.
- Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G., and Andersson, D.I. (2008). Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* *62*, 495–503.
- Sander, P., Springer, B., Prammananan, T., Sturmfels, A., Kappler, M., Pletschette, M., and Böttger, E.C. (2002). Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 1204–1211.
- Schwarz Stefan, Loeffler Anette, and Kadlec Kristina (2016). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet. Dermatol.* *28*, 82-e19.
- Severinov, K., Soushko, M., Goldfarb, A., and Nikiforov, V. (1993). Rifampicin region revisited. New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* *268*, 14820–14825.
- Skurnik, D., Roux, D., Cattoir, V., Danilchanka, O., Lu, X., Yoder-Himes, D.R., Han, K., Guillard, T., Jiang, D., Gaultier, C., et al. (2013). Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant *oprD* mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 20747–20752.
- Sommer, M.O.A., Munck, C., Toft-Kehler, R.V., and Andersson, D.I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 689–696.

- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661.
- Tristan, A., Ferry, T., Durand, G., Dauwalder, O., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., and Etienne, J. (2007). Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* 65 Suppl 2, 105–109.
- Villar, M., Marimón, J.M., García-Arenzana, J.M., de la Campa, A.G., Ferrándiz, M.J., and Pérez-Trallero, E. (2011). Epidemiological and molecular aspects of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from wounds, blood and respiratory samples. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 997–1000.
- Vogwill, T., Kojadinovic, M., and MacLean, R.C. (2016). Epistasis between antibiotic resistance mutations and genetic background shape the fitness effect of resistance across species of *Pseudomonas*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283.
- Wehrli, W. (1983). Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Rev. Infect. Dis.* 5, S407–S411.
- Wendlandt, S., Feßler, A.T., Monecke, S., Ehrlich, R., Schwarz, S., and Kadlec, K. (2013). The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 338–349.
- Wichelhaus, T.A., Böddinghaus, B., Besier, S., Schäfer, V., Brade, V., and Ludwig, A. (2002a). Biological Cost of Rifampin Resistance from the Perspective of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3381–3385.
- Wichelhaus, T.A., Böddinghaus, B., Besier, S., Schäfer, V., Brade, V., and Ludwig, A. (2002b). Biological Cost of Rifampin Resistance from the Perspective of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3381–3385.
- Wiser, M.J., and Lenski, R.E. (2015). A Comparison of Methods to Measure Fitness in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* 10, e0126210.

Annexes

Composition des milieux de culture utilisés

Bouillon Trypticase Soja (g/l)

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de farine de soja.....	3g
D-glucose.....	2,5g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate dipotassique.....	12g
Chlorure de lithium.....	5g

PH=7,5

Milieu de Mueller Hinton (g/l)

Infusion de viande de Bœuf.....	300g
Hydrolysant de caséine.....	17,5g
Amidon.....	1,5 g
Agar.....	10g

PH=7 ,4

Gélose Trypticase Soja (g/l)

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de farine de soja.....	3g
D-glucose.....	2,5g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate dipotassique.....	12g
Agar.....	15g

PH=7,5