

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**



MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Hygiène et Qualité des Aliments d'Origine Animale

Intitulé

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PREVALENCE ET DE L'ANTIBIORESISTANCE DES
BACTERIES PATHOGENES (*S. aureus*) ISOLEES DES DENREES ALIMENTAIRE DANS
LA WILAYA DE TIARET**

Présenté par

Sofiane TAMENDJARI

devant le jury composé de :

A. HAMMOUDI	Professeur, Université de Tiaret	Président
K. ZIDANE	Maitre de conférences, Université de Tiaret	Promoteur
H. AGGAD	Professeur, Université de Tiaret	Co-promoteur
A. HAKEM	Maitre de conférences, Université de Djelfa	Examineur
K. GHAZI	Maitre de conférences, Université de Tiaret	Examineur

Tiaret, Mai 2016

Remerciements

Mes plus vifs remerciements vont à Mr Zidane khaled, maitre de conférences à l'Université de Tiaret pour sa disponibilité.

Je remercie vivement Mr Aggad hebib, professeur à l'Université de Tiaret pour ses conseils, sa gentillesse et son aide.

Je témoigne ma reconnaissance à Mr Hammoudi abd el hamid, professeur à l'Université de Tiaret pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury.

Je remercie profondément Mr Hakem ahcène, maitre de conférences à l'Université de Djelfa pour avoir accepté d'examiner ce travail, pour ses conseils et sa confiance.

Je remercie infiniment Mme Ghazi kheira, maitre de conférences à l'Université de Tiaret pour avoir accepté d'examiner ce travail, pour sa gentillesse, sa confiance, sa disponibilité et son aide.

Un grand hommage à Mr Slimani mabrouk khaled, maitre assistant à l'Université de Tiaret pour sa disponibilité, son aide, sa simplicité et son amitié.

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

Aw : Activity of water

CA-SARM : *S. aureus* résistant à la méthiciline associé la communauté

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CAT : chloramphénicol acétyltransférase

CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institute

DNase : désoxyribonucléase

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

ES : Entérotoxine Staphylococcique

G+C : contenu en Guanine et Cytosine de l'ADN

HA-SARM : *S. aureus* acquis dans les hôpitaux

IgG : Immunoglobuline G

kb : kilo base

kDa : kilo dalton

LPV : Leucocidine de Panton et Valentine

LukE-PV : sous-unité E de la toxine PVL

LukS-PV : sous-unité S de la toxine PVL

mec : Methicillin resistant gene

PABA : acide paraaminobenzoïque

PBP : Protein-Binding-Penicillin

PBP2a : Protein-Binding-Penicillin 2a

pH : potentiel d'hydrogène

PSM : moduline soluble au phénol

SARM : *S. aureus* résistants à la méthicilline

SCC : Staphylococcal chromosomal cassette

SCV : variante de petite colonie

SpA : staphylococcal protein A

TSST-1 : toxic shock syndrom toxin-1

µm : micromètre

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Méthode pour la préparation des solutions d'antibiotique	35
Tableau 2 : Fréquence de résistance des <i>S. aureus</i> isolés aux antibiotiques testés	46
Tableau 3 : Phénotype de résistance des souches <i>S. aureus</i>	47
Tableau 4 : Production de bêta-lactamase	49
Tableau 5 : CMI et phénotype de résistance des SARM isolés	50

Liste des Figures

	Page
Figure 1 : Etapes de formation de biofilm chez les staphylocoques	22
Figure 2 : Fonctions des protéines de la paroi cellulaire de <i>S. aureus</i>	23
Figure 3 : Colonies présomptives de <i>S. aureus</i> entourées d'un halo opaque	36
Figure 4 : <i>Staphylocoque</i> Mannitol + sur milieu Chapman	37
Figure 5 : Coagulation du plasma par les Staphylocoques	37
Figure 6 : Production de la nucléase thermostable par <i>S. aureus</i>	38
Figure 7 : Pourcentage de résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	46
Figure 8 : pourcentage des Staphylocoques, des <i>S. aureus</i> et des SARM par rapport aux échantillons prélevés	48

SOMMAIRE

	Page
Introduction	1
Etude bibliographique	
1. Généralités sur <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.1. Historique.....	3
1.2. Habitat.....	3
1.2.1. Chez l'être vivant.....	4
1.2.2. Dans l'environnement.....	4
1.2.3. Dans l'aliment.....	5
1.3. Taxonomie.....	5
1.4. Caractères bactériologique.....	6
1.5. Pouvoir pathogène.....	6
1.5.1. Facteurs d'adhésion.....	6
1.5.2. Exoenzymes.....	7
1.5.3. Exotoxines.....	8
2. <i>S. aureus</i> et les antibiotiques.....	10
2.1. Bêta-lactamine.....	10
2.1.1. Mécanisme d'action.....	11
2.1.2. Spectre d'action.....	11
2.1.3. Mécanisme de résistance.....	11
2.2. Méthicilline.....	12
2.3. Glycopeptide.....	13
2.3.1. Mécanisme d'action.....	13
2.3.2. Mécanisme de résistance.....	13
2.4. Quinolone et Fluoquinolone.....	14
2.4.1. Mécanisme d'action.....	14
2.4.2. Mécanisme de résistance.....	14
2.5. Aminoglycoside.....	15
2.5.1. Mécanisme d'action.....	15
2.5.2. Mécanisme de résistance.....	15
2.6. Tétracycline.....	16
2.6.1. Mécanisme d'action.....	16
2.6.2. Mécanisme de résistance.....	16
2.7. Macrolides, Lincosamides et Streptogramines.....	17
2.7.1. Mécanisme d'action.....	17
2.7.2. Mécanisme de résistance.....	17
2.8. Triméthoprim/Sulfaméthoxazole.....	18
2.8.1. Mécanisme d'action.....	18
2.8.2. Mécanisme de résistance.....	19
2.9. Phénicolés.....	19
2.9.1. Mécanisme d'action.....	19
2.9.2. Mécanisme de résistance.....	19
2.10. Novobiocine.....	20
2.10.1. Mécanisme d'action.....	20
2.10.2. Mécanisme de résistance.....	20
2.11. Acide fusidique.....	20

2.11.1.	Mécanisme d'action.....	20
2.11.2.	Mécanisme de résistance.....	20
2.12.	Fosfomycine.....	21
2.12.1.	Mécanisme d'action.....	21
2.12.2.	Mécanisme de résistance.....	21
3.	Facteurs de persistance.....	21
3.1.	Biofilm.....	21
3.1.1.	Etapas de formation du biofilm.....	21
3.1.2.	Résistance des biofilms aux antibiotiques.....	22
3.2.	Variante de Petite Colonie.....	22
4.	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthiciline.....	23

Matériel et Méthodes

.1.	Période et site de prélèvements.....	25
.2.	Transport, conservation et traitement des échantillons.....	25
.3.	Préparation des échantillons.....	26
.4.	Isolement.....	26
.5.	Identification.....	27
.5.1.	Aspect macroscopique.....	27
.5.2.	Aspect microscopique.....	27
.5.3.	Recherche de la catalase.....	27
.5.4.	Fermentation du mannitol.....	28
.5.5.	Recherche de la coagulase.....	28
.5.6.	Recherche de la DNase thermostable.....	29
.6.	Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	30
.6.1.	Antibiogramme.....	30
.6.1.1.	Principe.....	30
.6.1.2.	Technique.....	30
.6.1.3.	Lecture.....	31
.6.2.	Disques d'antibiotique utilisés.....	31
.7.	Recherche de la résistance à l'oxacilline.....	31
.7.1.	Test de diffusion de céfoxitine.....	31
.7.2.	Test de screening à l'oxacilline.....	32
.7.2.1.	Technique.....	32
.7.2.2.	Lecture.....	33
.9.	Recherche de la bêta-lactamase.....	33
.9.1.	Technique.....	33
.9.2.	Lecture.....	34
.10.	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice.....	34
.10.1.	Technique.....	34
.10.2.	Lecture.....	35

Résultats et Discussion

.1.	Résultats des prélèvements.....	36
.1.1.	Prélèvements contaminés.....	38
.1.1.1.	Prélèvements contaminés pour l'espèce bovine.....	38

.1.1.2.	Prélèvements contaminés pour l'espèce caprine.....	38
.1.2.	Prélèvements contaminés par les Staphylocoques.....	39
.1.2.1.	Prélèvements contaminés par les Staphylocoques pour l'espèce bovine	39
.1.2.2.	Prélèvements contaminés par les Staphylocoques pour l'espèce caprine	39
.1.3.	Prélèvements contaminés par les SCP.....	39
.1.3.1.	Prélèvements contaminés par les SCP pour l'espèce bovine.....	39
.1.3.2.	Prélèvements contaminés par les SCP pour l'espèce caprine.....	39
.1.4.	Prélèvements contaminés par <i>S.aureus</i>	40
.1.4.1.	Prélèvements contaminés par <i>S. aureus</i> pour l'espèce bovine.....	40
.1.4.2.	Prélèvements contaminés par <i>S. aureus</i> pour l'espèce caprine.....	40
.1.5.	Discussion.....	40
.2.	Antibiogramme.....	42
.2.1.	Bêta-lactamine.....	42
.2.2.	Aminoside.....	43
.2.3.	Glycopeptide.....	43
.2.4.	Fluoroquinolone.....	43
.2.5.	Macrolide et apparentés.....	44
.2.6.	Tétracycline.....	44
.2.7.	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole.....	44
.2.8.	Phénicolés.....	44
.2.9.	Les antibiotiques non classé.....	45
.3.	Résistance à l'oxacilline.....	48
.4.	Production de bêta-lactamase.....	48
.5.	Concentration Minimale Inhibitrice.....	49
.6.	Fréquence des SARM par rapport aux prélèvements.....	50
.7.	Fréquence des SARM par rapport aux Staphylocoques isolés.....	50
.8.	Fréquence des SARM par rapport aux <i>S. aureus</i>	51
	Conclusion	54
	Références bibliographiques	55
	Annexes	

INTRODUCTION

Introduction :

Le problème de santé publique majeur relié à *S. aureus* et présent partout dans le monde, est celui de sa résistance aux antibiotiques. A cause d'une exposition fréquente à différents types d'antibiotiques, ce pathogène est de plus en plus résistants à ceux-ci, dont notamment à la famille des bêta-lactames (méthicilline, pénicilline, etc.). Ces souches pathogènes prennent le nom de SARM (*S. aureus* résistants à la méthicilline).

Aux États-Unis, il a été estimé que les infections par les SARM sont plus létales que la mortalité associée au VIH (Virus d'Immunodéficience Humain) (Bancroft, 2007; Peschel et Otto, 2013). Le taux de maladies reliées aux SARM est 17 fois plus élevé dans les hôpitaux du Canada depuis l'année 1995 jusqu'à l'année 2010 (Public Health Agency of Canada, 2013). Celles-ci sont aussi très coûteuses. On note un coût total relié aux infections par les SARM d'environ 33 à 85 millions de dollars dans les hôpitaux canadiens en l'an 2005 (Goetghebeur et al., 2007) avec une moyenne annuelle de 36 millions de dollars jusqu'en 2013 (Public Health Agency of Canada, 2013). Ils sont à l'origine de cas de morbidité et de mortalité (Chen et al., 2011) et se disséminent rapidement dans la communauté (Goetghebeur et al., 2007; Nichol et al., 2011).

S. aureus est aussi un pathogène alimentaire contaminant, entre autres, le lait et les dérivés laitiers. En effet, le lait est un milieu riche et propice pour la croissance d'organismes de par le fait qu'il contient une teneur en eau élevée, une abondance de nutriments et un pH près de la neutralité (entre 6,4 et 6,8) (Touch et Deeth, 2009).

La majorité des intoxications liées à la consommation de lait cru sont causées par les bactéries pathogènes *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* et *S. aureus* (Rola Jolanta et al., 2013).

Pour ce qui est de *S. aureus*, sa présence dans le lait cru et les produits laitiers peut être due à plusieurs facteurs. Premièrement, une mammite de ruminants peut conduire au transfert de *S. aureus* dans le lait cru, une étude a montré que presque 45 % des échantillons de lait cru bovin testés contenaient des souches staphylococciques à coagulase positive (Rola Jolanta et al., 2013).

Deuxièmement, un manque d'hygiène du personnel durant la traite ou durant la manipulation du lait et ses dérivés et l'utilisation impropre d'appareils industriels peuvent affecter l'innocuité du produit laitier. Ce critère non respecté pourrait être à l'origine de la présence de

SARM dans ces aliments et de souches hypermutables résistantes à plusieurs types d'antibiotiques et porteuses de facteurs de virulence (Graham et al., 2006; Normanno et al., 2007; Soares et al., 2011; Wang et al., 2013).

Le dernier facteur favorisant la présence de *S. aureus* dans l'aliment est le non-respect des conditions de transformation de l'aliment ou l'utilisation de conditions inadéquates durant les différentes étapes de fabrication, de stockage et de transport du produit fini.

D'autant plus que certaines souches de *S. aureus* peuvent sécréter des entérotoxines staphylococciques. Il a été démontré qu'une concentration de 10^5 unités formatrices de colonies staphylococciques (UFC) par millilitre ou par gramme d'aliment sont nécessaires pour qu'il y ait production et sécrétion des entérotoxines dans le milieu. Cependant, certaines souches virulentes de *S. aureus* sont capables de libérer leurs entérotoxines à une concentration de 10^3 UFC/ml (Meyrand et al., 1998).

Une fois sécrétées dans l'aliment, une concentration en entérotoxines de l'ordre du nanogramme peut déclencher les symptômes d'une intoxication alimentaire (diarrhées, fièvre, nausées, crampes abdominales, maux de tête) à la personne ingérant l'aliment contaminé (Ostyn et al., 2010 ; Hennekinne et al., 2012; Krakauer et Stiles, 2013). Ces symptômes peuvent être bénins, mais, dans des cas rares, ils se déclenchent par des variations de la pression artérielle et même par la mort de la personne par entérotoxicose et déshydratation (Balaban et Rasooly, 2000; Do Carmo et al., 2004).

De ce fait, *S. aureus* présente un danger de santé publique, que ce soit au niveau médical ou alimentaire.

Les objectifs de cette étude est de déterminer l'incidence des souches de *S. aureus* isolées d'échantillons de lait cru de vache et de chèvre dans la région de Tiaret, d'évaluer leurs sensibilités envers 16 antibiotiques et une recherche de la bêta-lactamase.

De plus, une CMI des *S. aureus* résistant à la méthicilline sera déterminée.

CHAPITRE 1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur *Staphylococcus aureus* :

1.1. Historique :

En 1878, Louis Pasteur (1822-1895), travaillant avec Emile Roux et Chamberland sur les germes des maladies, observa au microscope dans le pus de furoncle et d'ostéomyélite des formations en « amas de grains » qu'il appelle staphylocoque. En 1880, Sir Alexander Ogston (1844-1929), un écossais, isola le premier les staphylocoques à partir d'abcès et d'autres lésions cutanées et les cultiva in vitro, reconnaissant leur rôle dans l'inflammation et la suppuration. Il décrivit en 1881 la première espèce connue de staphylocoque : *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque doré en raison de la couleur des colonies bactériennes obtenues en culture. Plus tard, une autre variété de staphylocoques donnant des colonies bactériennes non pigmentées sera nommée tout naturellement staphylocoque blanc. Les découvertes de Pasteur sur la bactériologie ont permis de faire des progrès considérables en hygiène et en prévention. Afin que les chirurgiens et les accoucheurs cessent de semer la mort autour d'eux, Pasteur leur apprendra à se laver les mains, à flamber les instruments et à stériliser les objets. Ainsi fut établie la nécessité de stériliser les instruments chirurgicaux et l'équipe de Pasteur conçut le premier autoclave (Chamberland). Toutefois, le problème des infections était loin d'être réglé. En 1929, Alexander Fleming découvre la pénicilline et ses propriétés bactéricides, ouvrant la voie au traitement des maladies infectieuses par les antibiotiques. La pénicilline est utilisée pour la première fois en 1941 pour traiter un patient atteint de septicémie à staphylocoque. La découverte des antibiotiques à partir des années 40 allait donner de grands espoirs et changer le pronostic des infections. En 1953, est isolée pour la première fois au Canada une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la pénicilline qui était à l'origine de lésions de la peau, de pneumonies chez les enfants ou de septicémies. L'arrivée d'un autre antibiotique, la méthicilline, dans les années 60, a mis fin à cette épidémie. La résistance à la méthicilline de souches de *Staphylococcus aureus* isolées en pathologie humaine n'a pas mis longtemps à survenir et a été décrite dès 1961 au Royaume-Uni. Et à partir des années 1970, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) sont devenues l'une des premières causes des infections acquises à l'hôpital (infections nosocomiales) avec une dissémination mondiale (Galmiche, 1999).

1.2. Habitat :

1.2.1. Chez l'être vivant

La présence de réservoirs de *S. aureus* chez les hôtes humains et animaux est une réalité. En effet, *S. aureus* fait partie de la flore commensale normale des mammifères et des oiseaux, à l'inverse de certaines espèces de staphylocoques qui ont, eux un hôte préférentiel. *S. aureus* semble capable de coloniser tous les mammifères (marins et terrestres) même si différents biotypes de souches de *S. aureus* pourraient être raccordés à des hôtes spécifiques. Par exemple, selon une étude de 2003, un biotype dit « abattoir » serait associé aux produits de boucherie et au personnel des unités de production des abattoirs (Hennekine et al., 2003).

Chez l'homme, *S. aureus* est présent sur plusieurs sites corporels. On le repère sur la surface de la peau et des muqueuses, mais il colonise principalement les fosses nasales, les glandes de la peau, le cuir chevelu, les mains, la bouche, les dents et le périnée (Williams, 1963 ; Kloos et al., 1976 ; Smith et al., 2001).

La colonisation de ce microorganisme, n'induit pas forcément une pathologie puisqu'il existe des porteurs sains dans la population générale. La fréquence du portage sain chez les humains est approximativement de 30 %, cette fréquence diffère selon plusieurs paramètres comme par exemple le site de la colonisation, 23 à 46 % au niveau du nez (Amir et al., 2006), 24 à 36 % au niveau de la bouche (Smith et al., 2001) ou l'âge, jusqu'à 64 % chez les enfants (Waston et al., 2006). *S. aureus* peut donc, à partir de ces réservoirs, infecter les lésions cutanées, les glandes mammaires et les muqueuses intestinales ou génitales. Certains facteurs de risque de portage de *S. aureus* ont été identifiés comme les phototypes blancs, le sexe masculin, les diabétiques, les insuffisants hépatiques, les personnes présentant des problèmes cutanés (Williams, 1963), les sujets séropositifs pour le VIH (William, 1963 ; Nguyen et al., 1999) ou encore les personnes dialysées (Williams, 1963 ; Yu et al., 1986) sont plus à risque d'être porteurs de la bactérie et de développer une infection.

1.2.2. Dans l'environnement :

Le *S. aureus* est une bactérie qui est répandue sur la planète bleue de façon ubiquitaire. Il possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux. Ces capacités expliquent en partie la difficulté à l'éradiquer.

La bactérie peut être isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer, la surface des plantes. Concrètement, elle est largement présente dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces (Dworkin et al., 2006).

Les difficultés d'eradication du microorganisme posent un problème en milieu hospitalier car les personnes hospitalisées peuvent être infectées par des *S. aureus* qui sont d'origine généralement humaine. Ces personnes se retrouvent contaminées par contact direct, par des aérosols, ou bien à partir de surfaces contaminées. Une étude a déterminé que durant une période de 18 mois, 64 % des échantillons d'air prélevés dans un bloc opératoire en activité étaient contaminés par *S. aureus* (Edmiston et al., 2005).

1.2.3. Dans les aliments et leur environnement de production :

La bactérie peut se retrouver dans les aliments comme par exemple, le lait, les produits laitiers ou la viande. La contamination des aliments peut être due principalement à la matière première qui est contaminée ou d'origine humaine lors de la fabrication et/ou le conditionnement de l'aliment dans l'industrie agro-alimentaire (Callon et al., 2007).

Ces contaminations sont souvent liées à un défaut d'hygiène du matériel de production ou de l'employé.

1.3. Taxonomie :

En 2001, les chercheurs Garrity et Holt ont proposé de radier les *S. aureus* de la famille des *Micrococcaceae* (genre *Micrococcus* et *Stomatococcus*) grâce à l'analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) ainsi que d'autres analyses génétiques (Dworkin et al., 2006). Sa position taxonomique est maintenant bien définie et il a une famille à son nom : *Staphylococcaceae* (Dworkin et al., 2006).

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

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : Staphylococcus

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

1.4. Caractères bactériologiques :

- *Staphylococcus aureus*, espèce membre de la famille des *Staphylococaceae*, est un coque à Gram positif, sphérique, de 0,5 à 1 µm de diamètre, mésophile, immobile, non sporulé, parfois encapsulé, pouvant se présenter isolé, en paires, ou le plus souvent en grappes. Cette bactérie est aéro-anaérobie facultative, à catalase positive et à oxydase négative (Sperber et Tatini, 1975; Foster, 1996).
- Germe halophile qui supporte des taux de sel allant de 7 à 20%, et une Aw basse(0,83).
- Cultive à un pH qui va de 4 à 9,8. Le pH optimal se situe entre 6 et 7 (De Buyser et al., 1994 ; Brisabois et al., 1997).
- Le génome de *S. aureus* est constitué d'un chromosome circulaire comprenant 2,7 à 2,9.10⁶ paires de bases (pb) (Holden et al., 2004; Baba et al., 2008), avec des prophages, des plasmides, des transposons et d'autres éléments génétiques tels que les cassettes chromosomiques. Le contenu en paires G-C est de 33%. Les gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques sont rencontrés sur le chromosome et sur des éléments extrachromosomiques. (Kuroda et al., 2001).

1.5. Pouvoir pathogène

Il est dû principalement aux facteurs d'adhésion, aux exoenzymes et aux exotoxines.

1.5.1. Facteurs d'adhésion :

Les capsules polysaccharides, représentées par 11 types sérologiques identifiés pour *S. aureus* isolés d'humains et de bovins, elles interfèrent avec le mécanisme immunitaire de l'hôte en inhibant l'attachement des anticorps. Elles peuvent aussi se fixer aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes et induisent la sécrétion de cytokines (Soell et al., 1995) et inhibent la phagocytose (Gordon et Lowy , 2008) et peuvent induire la formation d'abcès (O'Riordan et Lee, 2004).

Le peptidoglycane joue un rôle dans l'activation du complément, stimule la sécrétion des cytokines par les macrophages ainsi que l'agrégation des plaquettes (Lowy, 1998).

L'acide téichoïque, lié au peptidoglycane ou bien à la membrane cytoplasmique. Il assure trois rôles principaux :

- 1) La protection contre les antimicrobiens et le stress environnemental.
- 2) Le contrôle de l'activité enzymatique et la concentration cationique de l'enveloppe.
- 3) La liaison aux différents récepteurs et surfaces (Xia et al., 2010).

1.5.2. Exoenzymes :

La staphylocoagulase ou coagulase libre, c'est une protéine extracellulaire thermostable caractéristique de *S. aureus*, à l'exception de certaines souches staphylococciques d'origine animale telles que *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, et *Staphylococcus delphini* qui possèdent également la coagulase (Langlet et al., 1999). En l'absence de Ca^{2+} , elle provoque la coagulation du plasma humain ou du lapin (prélevé sur citrate, oxalate, héparine ou EDTA) (Avril et al., 1992). La coagulase forme avec la prothrombine (coagulase-reacting factor : CRF) du plasma, un complexe appelé Staphylothrombine qui converti le fibrinogène en fibrine (Peacock, 2006). C'est un facteur primordial dans le pouvoir pathogène en coagulant le plasma autour des coques et les protégeant de la phagocytose (les leucocytes ayant une mauvaise pénétration à l'intérieur des caillots de fibrine) (Tally, 1999), elle est à l'origine des thrombophlébites suppurées (Avril et al., 1992).

En réponse à une infection, l'hôte peut produire une variété d'acide gras et d'autres molécules lipidiques agissant comme surfactant qui perturbe la membrane bactérienne, spécialement lors de la formation d'un abcès. Les lipases et les FAME (fatty acid-metabolizing enzyme) produites par *S. aureus* ont probablement un effet négatif sur la réponse immunitaire. De plus, un des rôles des lipases est de libérer les nutriments dans l'environnement (Projan and Novick, 1997).

Hyaluronidase, cette enzyme extracellulaire thermolabile hydrolyse l'acide hyaluronique, substance fondamentale de la matrice du tissu conjonctif, ce qui permet la diffusion tissulaire des *S. aureus* (Makris et al., 2005). Cette enzyme est produite uniquement dans la phase exponentielle de croissance (Poncholi, 2002).

Les protéases à sérine (ou protéase V8) sont les plus décrites, elles agissent en bloquant l'action des anticorps par leur clivage, puisque l'action de cliver les anticorps IgG est mise en évidence *in vitro*. Ces protéases peuvent aussi contribuer à la destruction des structures protéiques afin de favoriser l'invasion de *S. aureus*, et sont responsables de la dégradation des protéines de liaison à la fibronéctine (FnBP) après son adhérence initiale.

Un autre rôle possible, est d'obtenir des nutriments depuis le milieu environnant (McGavin et al., 1997).

1.5.3. Exotoxines :

Les Enterotoxines sont des exoprotéines de masse moléculaire compris entre 22 et 29 kDa. Elles sont pyrogènes, provoquent une immunosuppression et une prolifération non-spécifiques de lymphocytes T (action superantigénique).

Il existe jusqu'à présent, 23 différentes entérotoxines (ES), dont les cinq principales ES A à E, de nouvelles ES (ES G à I) et des « ES-like » (ES like J à X) (Hennekinne et al., 2012 ; Alibayov et al., 2014).

Les ES et les « ES-like » présentent tous deux un effet superantigénique puisqu'ils activent les lymphocytes T et stimulent la prolifération cellulaire et le relargage massif des cytokines. Ceci va déclencher une réponse pro-inflammatoire et affaiblir le système immunitaire contre les infections bactériennes (Gillaspy et Iandolo, 2009; Larkin *et al.*, 2009; Podbielska *et al.*, 2011).

Ce qui diffère ces deux types est la capacité des ES à déclencher une réponse émétique suite à une intoxication, alors que les « ES-like » ne le sont pas ou n'ont pas encore été testés efficacement sur des primates (Lina et al., 2004).

Les toxines communément rencontrées sont celles de type A, qui sont attribuables à des souches virulentes chez l'humain et celles de types B et C, qui sont attribuables à des souches isolées des bovins et caprins (Villeneuve et al., 2007).

les souches de *S. aureus* isolées d'échantillons de lait de chèvre et de vache sont, le plus souvent, productrices de l'entérotoxine ES C (Ercolini et al., 2004; Jorgensen et al., 2005).

Le syndrome du choc toxique est causé par la toxine TSST-1. Celle-ci porte aussi le nom de ES F ou entérotoxine staphylococcique F. Elle cause la stimulation accrue d'un vaste nombre de lymphocytes T (action superantigénique) et le déclenchement inapproprié d'une libération massive de cytokines affaiblissant le système immunitaire de l'individu (Kum et al., 2001; Raulin et al., 2010).

Les auteurs ont observé une production des ES A durant toute la phase exponentielle de croissance de *S. aureus* (Derzelle et al., 2009; Wallin-Carlquist et al., 2010).

les ES B, C et D sont produits seulement durant la transition entre les phases exponentielle et stationnaire (Derzelle et al., 2009).

Les toxines épidermolytiques dont le type A et le type B, sont des protéases sécrétées par *S. aureus* qui entraînent la disparition des vésicules intercellulaires. Et ce, en ciblant la glycoprotéine desmogléine-1 responsable du maintien de l'adhésion cellulaire. Ceci donne lieu à la formation d'une couche liquide entre les couches granuleuse et superficielle de

l'épiderme et se manifeste macroscopiquement par le décollement intradermique. Lorsque ce phénomène est localisé grâce à la présence d'anticorps, il prend le nom de syndrome bulleux épidermique alors qu'il se nomme syndrome de la peau ébouillantée ou syndrome de Ritter lorsqu'il est généralisé (Larkin et al., 2009 ; Bukowski et al., 2010; Podbielska et al., 2011).

Les Hémolysines alpha, elles vont former des pores au niveau de la membrane des globules rouges et autres types cellulaires et ainsi rendre disponibles plusieurs nutriments pour la bactérie (Sneath, 1986), les cellules cibles sont les cellules épithéliales, les érythrocytes, les monocytes, les macrophages, les plaquettes et les lymphocytes mais, pas les polynucléaires neutrophiles (Dinges et al., 2000). Les Hémolysines bêta, très fréquentes chez les souches de *S. aureus* d'origine animale (Hirsh et al., 2004), ce sont des sphingomyélinases qui altèrent les membranes riches en lipides (Quinn et al., 1999). Les Hémolysine Gamma, présentent chez 97 % des souches de *S. aureus*, affectent les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les érythrocytes (Dinges et al., 2000), cette toxine formée de deux protéines stimule la dégranulation des phagocytes, ce qui augmente les dommages tissulaires liés à la réponse inflammatoire. Un autre type de toxine aurait le même rôle, la leucocidine (Hirsh et al., 2004). Les Hémolysines Delta (ou la delta-toxine), codées par la majorité des souches de *S. aureus* (97 %), cette toxine a une activité cytolytique, notamment sur les érythrocytes en formant des pores transmembranaires (Schmitz et al., 1997 ; Dinges et al., 2000) et les Leucocidines ont pour cible les polynucléaires, les monocytes et les macrophages. Deux protéines sont importantes : LukE-LukD et la Leucocidine de Panton Valentine (LPV) composée de LukS-PV et LukF-PV dont le gène est codé par un phage (Vincenot et al., 2008). La toxine LPV, codée par un prophage, est responsable de la formation de pores dans les neutrophiles, les macrophages et entraîne une apoptose cellulaire et des infections nécrotiques cutanées et pulmonaires. (Kaneko et Kamio, 2004).

Une nouvelle classe de toxines a été identifiée depuis l'an 2000, celles des modulines solubles au phénol ou PSM. Ces peptides contribuent à la virulence de *S. aureus* et surtout des SARM associés à la communauté (CA-SARM). Elles peuvent tout d'abord favoriser la structure, le développement et le détachement des biofilms ainsi que faciliter la dissémination des infections staphylococciques associées aux biofilms aux autres organes du corps. De plus, les PSM, n'étant pas dépendants d'un récepteur, ciblent presque toutes les membranes cytoplasmiques eucaryotes avec un tropisme pour les leucocytes et les érythrocytes. Ces

peptides restent peu étudiés, mais font l'objet de cibles prometteuses pour le développement de vaccins anti-staphylococciques (Peschel et Otto, 2013).

Plus particulièrement, le système de sécrétion de ces protéines responsables de la lyse des neutrophiles, et essentiel à la croissance bactérienne, a été identifié récemment. Ce système de sécrétion de toxine constitue une cible potentielle pouvant inhiber la croissance et la virulence de *S. aureus* (Chatterjee et al., 2013).

2. *Staphylococcus aureus* et les Antibiotiques :

Les molécules antimicrobiennes ciblent différentes composantes de l'organisme bactérien afin d'exercer une action bactéricide ou bactériostatique.

Pour échapper aux différents mécanismes d'action des antimicrobiens, les bactéries doivent utiliser différentes stratégies. Par exemple, certains microorganismes ont développé des pompes à efflux situées au niveau de la membrane cellulaire qui expulsent la molécule antimicrobienne à l'extérieur de la bactérie, diminuant ainsi la concentration intracellulaire en antimicrobien et de par le fait même, l'action de celui-ci. D'autres, suite à des mutations, transforment le site de fixation de la molécule antibiotique. Ne pouvant plus se fixer, l'antibiotique ne peut donc plus agir. (Sundsford et al., 2004).

2.1. Bêta-lactamines :

La famille des bêta-lactamines comprend plusieurs classes d'antibiotiques. Parmi elles se trouvent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèms, les monobactams et les pénèms (hybrides entre les pénicillines et les céphalosporines). Ces antimicrobiens ont tous une structure en commun: l'anneau bêta-lactame (Poole, 2004).

La structure du noyau bêta-lactame est commune à tous les membres de la famille des bêta-lactamines. C'est aussi cette structure qui est ciblée par les bêta-lactamases, des enzymes élaborés par les *S. aureus*. L'action de ces enzymes rendent les antimicrobiens de certaines classes de cette famille inactifs contre les *S. aureus*.

Premier antibiotique découvert, la pénicilline est produite par le champignon *Penicillium notatum* et est utilisée de façon courante depuis les années 50. Depuis sa mise en marché, de nombreuses autres molécules ont vu le jour et font partie de la famille des bêta-lactamines.

Certains de ces antibiotiques ont été créés dans le but d'élargir le spectre d'action en étant plus efficaces aux mécanismes de résistance des bactéries (Poole, 2004).

2.1.1. Mécanisme d'action des bêta-lactamines :

Ces antibiotiques interviennent au niveau de la phase terminale de la formation de la paroi peptidoglycane. Ils inhibent l'action des penicillin-binding-proteins (PBP) qui sont des transpeptidases, endopeptidases et des carboxypeptidases qui construisent les liens entre les unités de polymère de glycopeptides. L'action des bêta-lactamines sur les bactéries à Gram positif n'est pas seulement de prévenir les liens entre les peptidoglycanes, mais elle contribue également au relâchement de l'acide lipotéichoïque, ce qui conduit à des enzymes autolytiques participant à l'action bactéricide.

Cette famille d'antibiotiques possède donc une action bactéricide et par conséquent, n'est active que contre les bactéries en phase de croissance qui activement synthétisent du peptidoglycane de la paroi cellulaire.

2.1.2. Spectre d'action des bêta-lactamines :

L'efficacité de l'action des molécules faisant partie des bêta-lactamines dépend de différents aspects: leur affinité pour les différentes PBP qui sont les récepteurs des bêta-lactamines, le contenu relatif de la paroi en peptidoglycanes (nettement plus élevé chez les bactéries à Gram positif versus à Gram négatif), la capacité de la molécule à traverser la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et finalement, la résistance aux différents types de bêta-lactamases produites par les bactéries (Prescott, 2006).

2.1.3. Mécanismes de résistance des *S. aureus* vis-à-vis des bêta-lactamines :

La résistance aux bêta-lactamines chez les *Staphylococcus* est principalement reliée à la production de bêta-lactamases, et de façon secondaire à l'altération des PBP et/ou à l'acquisition de nouvelles PBP (Werckenthin, 2001). Les souches de *S. aureus* résistantes aux pénicillines produisent des enzymes appelées pénicillinases qui font partie de la famille des bêta-lactamases. Lorsque cette enzyme est produite, il y a hydrolyse et destruction des liens amides du noyau bêta-lactame de la molécule qui devient alors inefficace. Selon leurs séquences d'ADN, les gènes codant pour les bêta-lactamases sont divisées en 4 classes, appelées les classes Ambler, allant de A à D.

Chez *S. aureus*, le gène codant pour la production de bêta-lactamases est *blaZ*. Les représentants des classes A, C et D sont des constituants du transposon Tn552 situé sur un

plasmide de grande taille alors que ceux de la classe B sont situés sur un chromosome (Werckenthin, 2001 ; Malik et al., 2007).

Le gène *blaZ* est en général lié à d'autres gènes de résistance. Deux gènes régulateurs, l'anti-répresseur *blaR1* et le répresseur *blal* contrôlent l'expression du gène *blaZ*. Ces deux gènes codent pour des protéines de régulation soient BlaR1 et Blal. La protéine BlaR1 est un récepteur transmembranaire qui, suite à une exposition à la pénicilline ou à ses dérivés, va s'auto-clivé. Le mécanisme n'est pas complètement compris et d'autres protéines jouent peut être un rôle dans la régulation du gène *blaZ* (Lowy, 2003). Ce mode de résistance est valide pour toutes les pénicillines sensibles à l'action des pénicillinases (pénicilline G, ampicilline, amoxicilline etc.). Par contre, le mécanisme de résistance est différent chez les *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM).

2.2. Méthicilline :

En 1961, la méthicilline est la première pénicilline semi-synthétique à envahir le marché. Tout comme les autres molécules du groupe des bêta-lactames, elle agit en liant les PBP (enzymes impliquées dans la synthèse des peptidoglycanes). Toutefois, des chaînes latérales volumineuses la protègent de l'action des bêta-lactamases produites par les staphylocoques, ce qui lui procure un avantage (Prescott, 2006).

Mécanismes de résistance des *S. aureus* contre la méthicilline :

Les *S. aureus* possédant le gène *mecA* qui code pour la protéine « penicillin binding protein 2a » (PBP2a) sont résistants à la méthicilline. Lorsqu'elles sont produites, les PBP2a remplacent les PBP au niveau du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ayant moins d'affinité que les PBP aux bêta-lactamines, les PBP2a permettent aux *S. aureus* de survivre et donc de résister à des grandes concentrations de tous les antibiotiques de cette classe (Prescott, 2006).

Le gène *mecA* qui code pour la résistance à la méthicilline, est situé sur un élément génétique mobile nommé «staphylococcal chromosomal cassette» mec (SCCmec) (Werckenthin, 2001). Le transfert horizontal du gène *mecA* se produit d'un SARM à un *S. aureus* exempt, mais il semble y avoir des restrictions spécifiques à l'hôte pour la stabilité et le maintien du gène chez les staphylocoques, ce qui pourrait expliquer le faible nombre de clones (Poole, 2004). Les poids moléculaires de ces îlots génomiques varient entre 21 et 67 kb. Plusieurs gènes de résistance à d'autres antimicrobiens se retrouvent dans ces îlots et sont associés au SCCmec

(Lowy, 2003). Les souches de SARM sont donc la plupart du temps résistantes aux bêta-lactamines, aux aminoglycosides, aux macrolides et aux tétracyclines. La rifampine ainsi que les quinolones et la combinaison triméthoprim-sulfaméthoxazole sont quant à eux généralement efficaces *in vitro* face aux SARM (Prescott, 2006).

2.3. Glycopeptides :

La vancomycine et la téicoplamine sont des antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à coques à Gram positif, essentiellement les staphylocoques, les streptocoques et les entérocoques, en cas de multirésistance aux antibiotiques et d'intolérance aux β -lactamines. Ces antibiotiques constituent le traitement de choix dans les infections à SARM.

Les glycopeptides présentent de nombreuses limitations: une bactéricidie lente, une fluctuation de CMI, une faible pénétration intracellulaire, une toxicité potentielle, et enfin le développement de la résistance souvent associée à un échec thérapeutique (Levine, 2006).

2.3.1. Mécanisme d'action :

Les glycopeptides inhibent la synthèse du composant essentiel de la paroi cellulaire, le peptidoglycane. L'inhibition est due à l'affinité de ces antibiotiques pour l'extrémité (D-alanyl-D-alanine) des précurseurs du peptidoglycane. Ceux-ci, après avoir été synthétisés dans le cytoplasme bactérien, sont transportés à travers la membrane cytoplasmique pour finalement être branchés par des enzymes (transglycosylases et transpeptidases) au peptidoglycane en cours d'élongation. La fixation du glycopeptide sur l'extrémité du précurseur empêche, par encombrement stérique, son branchement au peptidoglycane (Daurel et Leclercq, 2010).

2.3.2. Mécanisme de résistance :

Les souches présentent une réorganisation complexe du métabolisme du peptidoglycane, probablement liée à des mutations dans des gènes de structure ou de régulation. Cette réorganisation est traduite par un épaissement de la paroi bactérienne, synthèse de précurseurs monomériques, ont moins de branchements dans leur peptidoglycane, une PLP4 inactive et de multiples altérations de leur paroi (Lee et Glenn, 1995), c'est le mécanisme des souches VISA/GISA (Vancomycin or Glycopeptide- Intermediate *Staphylococcus aureus*) de résistance intermédiaire.

Les souches hétéro-VISA présentent aussi une paroi épaissie.

La résistance des VRSA (Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*) est due à l'acquisition de l'opéron Van A des entérocoques, elle se traduit par la synthèse de précurseurs de faible affinité pour les glycopeptides et par l'élimination de précurseurs de haute affinité produits par la bactérie hôte.

2.4. Quinolones et fluoroquinolones :

Ce groupe d'antimicrobiens est constitué entièrement de molécules synthétiques. En 1965, l'acide nalidixique est le premier antibiotique de la classe des quinolones à être commercialisé (Walker et al., 2006). Par la suite des fluoroquinolones ont été produites avec des spectres d'action plus larges et des effets secondaires moindres.

En 1986, la norfloxacine avec un spectre plus large est introduite sur le marché (Walker et al., 2006). Les quinolones sont divisées en 4 générations. L'acide nalidixique, le ciprofloxacine, l'enrofloxacine, l'orbifloxacine, le difloxacine, le danofloxacine, le sarafloxacine et le marbofloxacine sont des molécules utilisées en médecine vétérinaire (Walker et al., 2006). Aucun représentant de la quatrième génération n'est commercialisé pour un usage vétérinaire (Walker et al., 2006).

2.4.1. Mécanisme d'action :

Le rôle principal de l'ADN gyrase (topo-isomérase composée de quatre sous-unités) est de permettre le surenroulement de l'ADN, ce qui permet une réduction de l'espace occupé par l'ADN dans la cellule (Schmitz *et al.*, 2002).

La topo-isomérase IV est une enzyme qui permet le déroulement des brins d'ADN (Fluit et al., 2001).

Les fluoroquinolones inhibent l'activité enzymatique de l'ADN gyrase et de la topo-isomérase IV. Ils vont inhiber de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien (Fluit et al., 2001; Lowy, 2003).

2.4.2. Mécanismes de résistance :

Chez les *S. aureus* résistants aux fluoroquinolones, plusieurs mutations chromosomales au niveau des gènes codant pour la topo-isomérase IV et ADN gyrase ont été identifiées. Ces mutations entraînent une diminution de l'affinité des fluoroquinolones pour les sites cibles. De plus, des pompes à efflux NorA multidrogues peuvent contribuer à la résistance clinique. Les

souches exprimant cette pompe ont de faibles niveaux de résistance aux fluoroquinolones (Fluit *et al.*, 2001; Lowy, 2003).

2.5. Aminoglycosides :

Les aminoglycosides sont un groupe d'antibiotiques bactéricides efficaces uniquement contre les bactéries aérobies ainsi que les mycoplasmes. Certaines de ces molécules sont aussi efficaces contre les *Pseudomonas* spp. De 1944 à 1975, plusieurs antimicrobiens ont envahi le marché: streptomycine, néomycine, kanamycine, gentamicine, tobramycine, sisomicine, amikacine, netilmicin. Cependant la résistance accrue chez les bactéries et la grande toxicité de certains aminoglycosides diminuent leur utilisation. En pratique bovine, la dihydrostreptomycine est utilisée en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens sous forme d'infusion intra-mammaire. (Dowling, 2006).

2.5.1. Mécanisme d'action :

Afin d'exercer son action bactéricide, l'antibiotique doit tout d'abord traverser les membranes externe et cytoplasmique. Cela s'effectue par 2 modes différents, le premier étant un transport oxydatif actif et le second, une diffusion passive. Le transport oxydatif s'effectue uniquement sous conditions aérobies. Une fois à l'intérieur du cytoplasme, l'antibiotique se lie à une cible située sur la sous unité ribosomale 30S. Cette liaison interfère avec la traduction de l'ARNm en protéines induisant donc une erreur de traduction. La production d'acides aminés est alors faussée et il y a arrêt de la synthèse protéique. D'autres effets sont aussi présents, comme l'interférence avec le transport cellulaire d'électrons, l'induction d'une panne d'ARN, l'inhibition de la traduction, des effets sur le métabolisme de l'ADN et des dommages cellulaires. L'effet bactéricide est une conséquence de la lecture faussée des protéines causant l'incorporation de ces protéines anormales dans la membrane cytoplasmique entraînant la formation de canaux membranaires anormaux et altération de la membrane (Dowling, 2006).

2.5.2. Mécanisme de résistance :

Les bactéries résistent aux aminoglycosides par le biais d'enzymes modifiant les groupements hydroxyles et amines de ces antibiotiques, plus de 50 de ces enzymes ont été caractérisées (Dowling, 2006). Tout dépendant des modifications qu'elles induisent, ces enzymes souvent portées par des intégrons, se classent dans les aminoglycosides acétyltransférases (AAC),

aminoglycoside adényltransférases (ANT) et aminoglycosides phosphotransférases (APH). Les premières modifient le groupement amines et les deux dernières le groupement hydroxyl. En plus de ces enzymes, d'autres mécanismes de résistance comme les pompes à efflux et des mutations de l'ARNr existent (Fluit et al., 2001).

2.6. Tétracyclines :

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques utilisés en première ligne qui possèdent un large spectre d'action. Ce groupe est composé de molécules naturelles issues du champignon *Streptomyces*, et inclus des molécules telles que chlortétracycline, oxytétracycline et tétracycline et d'autres, semi synthétiques, comme la doxycycline et la minocycline. En médecine vétérinaire, plus particulièrement chez les animaux de production et la volaille, les tétracyclines ont été utilisées abondamment comme promoteurs de croissance. Les doses sous optimales employées à cette fin ont favorisé le développement de résistance chez les bactéries, plus particulièrement chez les bactéries à Gram négatif. Elles sont également utilisées en prophylaxie dans les grandes populations animales (Giguère, 2006).

2.6.1. Mécanisme d'action :

La molécule traverse la membrane externe de la cellule bactérienne par diffusion passive pour être ensuite acheminée par un mécanisme de transport actif à travers la membrane cellulaire interne. Une fois à l'intérieur de la bactérie, les tétracyclines se lient de façon réversible à la sous unité 30S ribosomale. L'effet bactériostatique des tétracyclines réside dans la réversibilité de cette liaison. Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en empêchant l'association de l'ARN aminoacyltransférase avec le ribosome au niveau du site accepteur du complexe ARNm-ribosome (Giguère, 2006; Chopra, 2001).

2.6.2. Mécanisme de résistance :

La résistance est souvent de type plasmidique et interfère avec le transport actif de la molécule de tétracycline à travers la membrane interne de la cellule. Il y a également des protéines cytoplasmiques de protection du ribosome et des systèmes de pompes à efflux, ces dernières sont des protéines associées à la membrane qui exportent les tétracyclines à l'extérieur de la cellule bactérienne, cela diminue la concentration intracellulaire en

antibiotiques et protège le ribosome. La majorité de ces pompes fonctionnent avec les tétracyclines, mais peu avec les minocyclines.

Staphylococcus aureus possède un gène de résistance aux tétracyclines, gène *tetM* qui code pour une protéine de protection du ribosome. Cette dernière fait partie des protéines cytoplasmiques qui sont au nombre de 9 et qui protègent le ribosome de l'action des tétracyclines et qui confèrent une résistance à la doxycycline et à la minocycline.

2.7. Macrolides, Lincosamides et les Streptogramines :

Les macrolides et les lincosamides font partie avec les streptogramines d'un groupe d'antibiotiques communément nommé MLS. Les lincosamides comprennent la lincomycine, la clindamycine et la pirlimycine alors que chez les macrolides, l'érythromycine est plus souvent utilisée en médecine vétérinaire. Ce sont tous des produits disponibles de façon commerciale pour le traitement des infections intra-mammaires chez les vaches laitières. Cependant, certains d'entre eux ont été utilisés à grande échelle comme promoteur de croissance au niveau de l'alimentation des animaux de consommation (Lina et al., 1999; Giguère, 2006).

2.7.1. Mécanisme d'action :

Au niveau structural, ces molécules sont différentes mais elles partagent de nombreuses homologies au niveau fonctionnel. Elles sont bactériostatiques et se fixent à la sous-unité 50S ribosomale au niveau de l'ARN ribosomal 23S. Ils inhibent ainsi la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 50S du ribosome en empêchant la peptidyltransférase d'agir sur l'élongation du peptide en cours de synthèse (Giguère, 2006; Fluit et al., 2001).

2.7.2. Mécanisme de résistance :

Il existe un mécanisme de résistance d'origine chromosomale et un autre plus fréquent et plus stable, c'est-à-dire d'origine plasmidique. Chez les bactéries à Gram positif, il existe 3 modes de résistance connus aux MLS. Le premier résulte de l'effet de l'enzyme adénine-N6-méthyltransférase qui entraîne des modifications post-transcriptionnelles du 23S ARNr. Le site affecté est le récepteur des MLS, donc celles-ci ne peuvent plus se fixer et agir. Ce type de modification entraîne une résistance croisée pour tous les antimicrobiens de cette classe et demeure le plus fréquemment rencontré. Les gènes codant pour ces enzymes sont les gènes

erm « erythromycin ribosome methylation », et ce sont *ermA* et *ermC* qui sont les plus souvent rencontrés chez *S. aureus*.

Un deuxième type de résistance aux MLS est constitué de pompes à efflux, chez les *S. aureus*, les gènes principaux codant pour ces pompes à efflux sont portés par un plasmide. Ces gènes confèrent une résistance aux macrolides ainsi qu'aux streptogramines de type B.

D'autres gènes ont été identifiés chez les *S. aureus* et codent pour des nucléotidyltransférases conférant une résistance aux lincosamides (Giguère, 2006; Fluit et al., 2001).

Le gène *msrA* codant pour une pompe à efflux a rarement été détecté chez des staphylocoques d'origine animale, mais a été rapporté comme étant le troisième mode de résistance le plus fréquent après *ermA* et *ermC* chez des *Staphylococcus* d'origine humaine (Werckenthin, 2001).

La résistance aux MLS peut être constitutive, résistance à toutes les molécules du groupe, ou inductible, résistance aux macrolides uniquement (Giguère, 2006; Fluit et al., 2001).

2.8. Triméthoprine/sulfaméthaxazole :

Lorsque utilisés seuls, les antimicrobiens de la classe des sulfamides, comme le sulfaméthaxazole, ne sont pas très efficaces, car une grande majorité des bactéries ont développées une résistance envers ces antimicrobiens. Toutefois, couplés à une autre molécule, comme dans la combinaison triméthoprine/sulfaméthaxazole, les sulfonamides sont protégés et peuvent exercer leur action. En pratique bovine, la combinaison triméthoprine/sulfaméthaxazole est utilisée dans le traitement des infections systémiques comme dans le cas des mammites aiguës à *S. aureus* (Prescott, 2006).

2.8.1. Mécanisme d'action :

Les sulfamides empêchent de manière compétitive l'incorporation de l'acide para-aminobenzoïque (PABA) dans la molécule ptéroylglutamique de l'acide folique résultant en l'inhibition de la synthèse de l'acide folique au niveau de la cellule bactérienne. Plus précisément, ces agents antimicrobiens compétitionnent avec la PABA pour l'enzyme dihydroptéroate synthétase. Tout comme les bactéries, les cellules mammifères ont besoin de l'acide folique à la différence que ces dernières utilisent de l'acide folique préformée alors que les cellules bactériennes doivent la synthétiser par elles-mêmes. Cela explique la spécificité d'action des sulfamides sur les cellules bactériennes (Prescott, 2006).

Le triméthoprime fait partie du groupe des diaminopyrimidines et empêche la production d'acide folique en se combinant à l'enzyme dihydrofolate réductase des bactéries. Il agit donc au même niveau que les sulfonamides en prévenant la synthèse des purines, et par conséquent de l'ADN (Prescott, 2006). La combinaison du triméthoprime et du sulfaméthaxazole produit une synergie et prévient le développement rapide de la résistance chez les bactéries. Cette combinaison possède un spectre d'action large, mais est inactif en présence de tissus nécrotiques (Prescott, 2006).

2.8.2. Mécanisme de résistance :

La résistance aux sulfamides chez les *S. aureus* est souvent le résultat d'une surproduction d'acide para-aminobenzoïque. Cette surproduction serait due à une mutation d'origine chromosomale (Werckenthin, 2001).

La résistance au triméthoprime est liée à la production de dihydrofolate réductase ayant une affinité réduite pour l'antibiotique. (Werckenthin, 2001).

2.9. Phénicolés :

La tête de liste des phénicolés est le chloramphénicol, il a été isolé à partir de *Streptomyces venezuale*. Depuis 1996, le chloramphénicol n'est plus commercialisé en France mais on peut le retrouver dans d'autres pays émergents. Son retrait du marché est consécutif à des effets secondaires importants dont l'aplasie médullaire touchant 1 cas sur 20000 traitements ainsi que son effet inhibiteur enzymatique. Maintenant, il ne reste que le thiamphénicol qui est mieux toléré que le chloramphénicol, car il n'est pas inhibiteur enzymatique et ne provoque pas d'aplasie médullaire (Dorosz et al., 2011).

2.9.1. Mécanisme d'action :

Le thiamphénicol va se fixer à côté du site accepteur A de la sous-unité 50S du ribosome et inhibe ainsi la synthèse protéique. Le thiamphénicol est une molécule bactériostatique sur les souches de *S. aureus* (Dorosz et al., 2011).

2.9.2. Mécanisme de résistance :

Les phénicolés sont sujets aux mécanismes d'efflux multiple (MDR) avec un gène qui augmente la CMI.

Une autre résistance a été décrite, elle est due à un plasmide qui code pour une chloramphénicol acétyltransferase (CAT) qui neutralise l'antibiotique.

2.10. Novobiocine :

La novobiocine est un dérivé de la coumarine et produite par un champignon *Streptomyces* (Dowling, 2006). Cet antimicrobien bactériostatique est utilisé en pratique bovine en combinaison avec la pénicilline pour le traitement intra-mammaire au tarissement (Dowling, 2006).

2.10.1. Mécanisme d'action :

La novobiocine inhibe la réplication de l'ADN en inactivant la sous-unité bêta de l'ADNgyrase (Dowling, 2006).

2.10.2. Mécanisme de résistance :

Des mutations chromosomales conférant de la résistance à la novobiocine et pouvant être induite *in vitro*, ont été rapportées selon Dowling (2006), mais peu de données sont disponibles à ce sujet dans la littérature.

2.11. Acide fusidique :

La structure de l'acide fusidique est assimilée à un stéroïde donc lipophile, il est d'ailleurs le seul représentant des antibiotiques stéroïdiques ou fusidanines. La molécule est d'origine naturelle car elle est produite par un micromycète, le *Fusidium coccineum* (Robert, 2013).

2.11.1. Mécanisme d'action :

Les fusidanines vont former un complexe stable avec le facteur d'élongation EF-G qui est une GTPase. Ce complexe empêche la synthèse protéique puisque l'élongation de la chaîne peptidique est bloquée. L'antibiotique a une activité bactéricide rapide envers *S. aureus* (Robert, 2013).

2.11.2. Mécanisme de résistance :

La résistance à cet antibiotique est la conséquence d'une diminution de l'affinité entre le facteur d'élongation et l'antibiotique (résistance de type chromosomique, mutation du gène codant le facteur EF-G) ou un défaut de pénétration dans la bactérie (résistance de type plasmidique) (O'Neill, 2007).

2.12. Fosfomycine :

Dans les années 60, la fosfomycine a été découverte et isolée. Cette molécule naturelle est issue de certaines espèces de *Streptomyces* (ex : *Streptomyces fradiae*).

2.12.1. Mécanisme d'action :

La fosfomycine est un antibiotique agissant sur la paroi bactérienne. Après avoir pénétré dans la cellule cible par des voies de transports transmembranaires, elle va inhiber précocement la synthèse du peptidoglycane en rendant inapte l'enzyme énolpyruvyl-transférase. Les antibiotiques phosphoniques sont bactéricides envers *S. aureus* (Robert, 2013).

2.12.2. Mécanisme de résistance :

La résistance est consécutive à la production d'une protéine FosB qui hydrolyse la fosfomycine en ouvrant le noyau époxyde. La résistance est apportée par des plasmides ayant le gène de FosB (Etienne et al., 1991).

En monothérapie, la sélection de mutants résistants est rapide. Ces antibiotiques doivent donc être utilisés en association.

3. Facteurs de persistance de *S. aureus* :

3.1. Le biofilm :

La découverte du biofilm remonte au début des années 40 depuis les travaux de Zobell(1943). Les biofilms sont un ensemble de micro colonies, entourées d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides (EPS). C'est une structure très organisée avec de nombreuses communications intercellulaires pour assurer un équilibre et un mode de vie coopératif (Characklis, 1989 ; Bourion, 1995 ; Bosgiraud, 2003 ; Boutaleb, 2007 ; Salaun, 2009).

3.1.1. Etapes de formation de biofilm chez les staphylocoques :

Mack *et al.* (1994) ont proposé un modèle de formation de biofilm en deux phases chez les staphylocoques l'attachement initial et l'accumulation. Ils ont montré que ces deux phases peuvent être génétiquement séparées.

Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme (Otto, 2008).

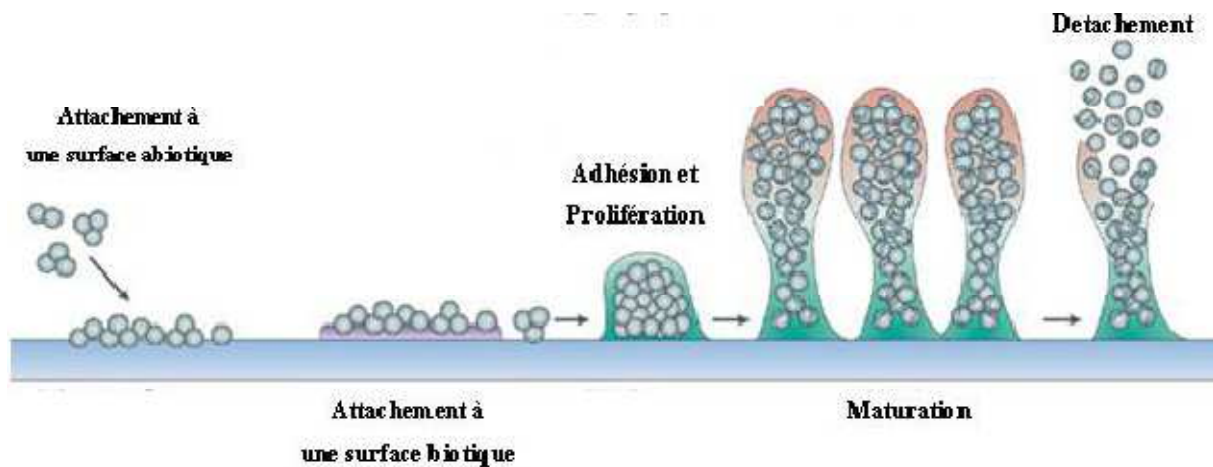


Figure 1: Etapes de formation de biofilm chez les staphylocoques (Otto, 2012).

3.1.2. Résistance des biofilms aux antibiotiques :

Les bactéries au sein du biofilm résistent à des concentrations en antibiotiques plus élevées que les bactéries planctoniques.

Pour Rediske *et al.*, (1999) il faut multiplier de 50 à 500 fois la dose thérapeutique normale pour éliminer les jeunes biofilm (moins de 24h) et par 5000 cette dose dans le cas des biofilms matures (Burin Des Roziers, 2002).

3.2. La variante de petite colonie (SCV) :

Une caractéristique spécifique à *S. aureus* est sa capacité à envahir une cellule hôte non phagocytaire. Une fois à l'intérieur de ces cellules, *S. aureus* peut induire une apoptose ou une nécrose cellulaire en les endommageant par ses cytotoxines, ou bien, persister sous un état semi-dormant. Ce phénotype, appelé variante de petite colonie (ou small colony variant, SCV), est protégé contre les attaques du système immunitaire et contre l'effet des antibiotiques (Foster *et al.*, 2014; Tuchscher *et al.*, 2010). Une étude a montré que les SCVs peuvent demeurer plusieurs semaines à l'intérieur de la cellule hôte. De plus, lorsque ces bactéries se « réveillent », elles reprennent leur virulence et infectent rapidement et dynamiquement d'autres cellules de l'hôte (Tuchscher *et al.*, 2011). Ce changement de phénotype semble essentiel pour le processus d'infection de *S. aureus* et est à l'origine des infections chroniques et récurrentes (Garzoni & Kelley, 2011)

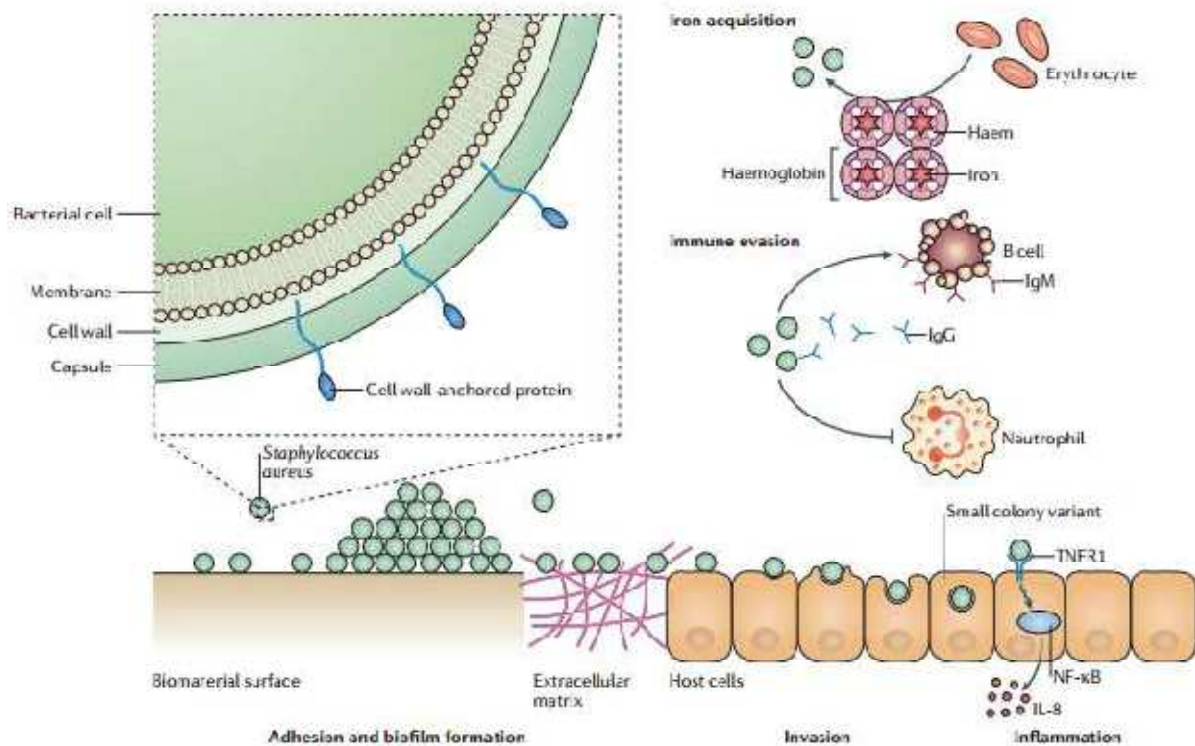


Figure 2: Fonctions des protéines de la paroi cellulaire de *S. aureus* (Foster *et al.* 2014).

4. SARM communautaire :

Le SARM communautaire est apparu dans les années 1980 et sa prévalence ne fait qu'augmenter. Alors que les SARM étaient jusque-là restreints aux hôpitaux, de nouvelles souches plus virulentes sont apparues dans la communauté (natifs de la communauté) (Dufour *et al.*, 2002).

Les souches isolées dans la première partie des années 2000 étaient généralement caractérisées par la présence d'une cassette *SCCmec* de type IV et par la production de la LPV. L'analyse d'une collection internationale de ces souches a montré qu'elles appartiennent à quelques clones spécifiques qui n'ont jamais été observés dans les hôpitaux (Durand *et al.*, 2006).

Cependant, ces souches ont été décrites par la suite comme responsables d'épidémies hospitalières (Denis *et al.*, 2005).

Ce type de souche est responsable le plus souvent d'infections de la peau et des tissus mous, mais peut également être impliqué dans des pneumonies nécrosantes hémorragiques,

beaucoup plus rares, souvent consécutives à une infection virale des voies aériennes. Les pneumonies nécrosantes hémorragiques sont associées à une forte mortalité. On trouve ces infections à SARM communautaires dans des situations favorisant les contacts physiques inter-humains. Des études ont décrit des cas dans le milieu carcéral (Wooton et al., 2004 ; Centers for Disease Control and Prevention, 2001), dans les armées (Ellis et al., 2004 ; Zinderman et al., 2004), dans les collectivités d'enfants (Hisata et al., 2005) ainsi que lors de la pratique d'activités sportives ou physiques. La particularité de ces infections est qu'elles touchent plutôt des personnes jeunes en bonne santé. Certains clones comme USA300 aux Etats-Unis ont largement circulé dans le milieu communautaire.

Depuis le milieu des années 2000, des souches de SARM ont également été isolées chez les animaux. Le clone ST398 est diffusé très largement parmi le bétail en particulier aux Pays-Bas et en Allemagne. Des analyses génomiques ont permis de montrer que ces souches associées au bétail étaient différentes des souches humaines mais il peut exister des échanges de gènes, en particulier des gènes de virulence (Fluit, 2012). De plus, des souches de SARM ont été isolées chez les animaux de compagnie vivant au contact de personnes porteuses (Morris et al., 2012). Des interactions entre l'environnement (surfaces), les animaux de compagnie et les humains pourraient avoir un rôle important dans le maintien de réservoir de SARM dans certaines habitations (Davis et al., 2012).

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

Matériel et Méthodes :

1. Période et site de prélèvements :

De mars 2015 à septembre 2015, 76 échantillons de lait cru ont été prélevés de 5 fermes différentes, à savoir 29 échantillons pour l'espèce caprine et 47 échantillons pour l'espèce bovine.

Les prélèvements de lait bovin provenaient de la commune de Tiaret, alors que les échantillons caprins sont récoltés de la commune de Ksar Chellala.

La valeur de l'examen bactériologique des laits dépend en grande partie de la qualité du prélèvement.

La technique de prélèvement est inspirée des méthodes de Bind et al. (1980) et Mialot (1983).

Les principales phases du prélèvement sont :

- 1) Lavage des mains.
- 2) Lavage et séchage des trayons.
- 3) Désinfection de l'extrémité du trayon avec un tampon de coton imbibé d'alcool à 70°.
- 4) Elimination des premiers jets.
- 5) On saisit le flacon à prélèvement entre le pouce et l'index de la main gauche et on le retourne de telle sorte que le bouchon soit dirigé vers le bas.
- 6) On dévisse le bouchon avec la main droite et on le porte entre l'index et le médus de la main gauche. Tube et bouchon ont alors leur ouverture dirigée vers le bas afin d'éviter toute contamination.
- 7) On saisit le trayon de la main droite, on le ramène en position latérale et on trait presque horizontalement dans le flacon incliné au moment où le lait gicle
- 8) On referme le flacon avant de le redresser.
- 9) On identifie le flacon en inscrivant ; la date, le numéro de l'animal et le quartier prélevé.

2. Transport, conservation et traitement des échantillons

Les échantillons sont placés dans une glacière à +4 °C et acheminés au laboratoire (ISO 17604, 2003).

Les échantillons sont traités à l'heure suivant leurs prélèvements et en aucun cas, l'échantillon ne doit être congelé.

Le contact direct avec l'échantillon se fait dans des conditions rigoureuses d'asepsie, ce qui implique l'utilisation d'un matériel stérile (ISO 7218, 2003).

Les échantillons sont traités au niveau du laboratoire d'hygiène et pathologie animale, Institut des sciences vétérinaires, université de Tiaret.

3. Préparation des échantillons :

Les laits étant des produits liquides constitueront d'emblée une solution mère.

Il est nécessaire de procéder à leur homogénéisation à l'aide de techniques et d'appareils appropriés (homogénéisateurs, vortex...) avant leurs analyses.

Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile, 1 ml de la solution mère, dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant, cette dilution est alors au 1/10 ou 10^{-1} (JORADP, 1998).

4. Isolement :

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement et l'identification de *S. aureus* est le milieu Baird-Parker (Laboratoire Conda, Madrid, Spain).

Ce milieu est le plus utilisé en microbiologie alimentaire pour être le plus sélectif et favorise mieux la croissance des Staphylocoques que celui de Chapman (Joffin, 1999).

Il contient du jaune d'œuf, du pyruvate ainsi que des agents sélectifs dont la tellurite, la glycine et le chlorure de lithium qui jouent un rôle dans l'inhibition de la flore secondaire (Baird-Parker, 1990 ; Adams et al., 2008).

Pour l'isolement, 0,1 ml de la dilution 10^{-1} sont transférés à la surface du milieu Baird Parker.

Il a été démontré qu'en augmentant l'inoculum de départ de 0,01 ml à 0,1ml, les chances relatives d'isoler *S. aureus* de l'échantillon passaient de 78% à 90% respectivement (Lam et al., 1996).

L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 24 à 48 heures (ISO 6888, 1983).

5. Identification :

5.1. Aspect macroscopique :

Les colonies présomptives de *S. aureus* sont noires, brillantes et convexes, de 1 à 1,5mm après 24 heures, entourées de zones claires dues à l'hydrolyse des protéines de l'œuf.

Des zones opaques dues à l'activité lipolytiques (lécithinase) peuvent apparaitre plus tardivement dans le halo clair (Guiraude, 1998).

La couleur noire des colonies provient de la capacité du *S. aureus* de réduire les ions tellurites en tellure métallique (Baird-Parker, 1962).

Toutes ces colonies, présomptives de *S. aureus* sont prélevées et ensemencées dans un bouillon nutritif (Institut Pasteur, Algérie) pour des tests ultérieurs.

5.2. Aspect microscopique :

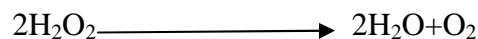
En microscopie, ces bactéries peuvent être observées isolées, en paires ou en tétrades, mais le plus souvent ce sont des amas ressemblant à des grappes (Prescott et al., 2003). Le *S. aureus* est un coque à Gram positif (Sperber et Tatini, 1975; Foster, 1996).

5.3. Recherche de la catalase :

Principe

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation à un effet létal pour les bactéries.

La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d' O_2 sous forme gazeuse selon la réaction suivante :



Technique

A partir d'un milieu solide et aérobie, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame.

Lecture

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d'O₂ (Joffin et Leyral, 2001).

5.4. Fermentation du mannitol :

Principe :

Le milieu Mannitol Salt Agar contient 7,5 % de NaCl inhibant la croissance des bactéries à l'exception des staphylocoques, ce qui le rend sélectif pour ces derniers, mais seul *S. aureus* peut fermenter le mannitol.

Il contient un indicateur de pH nommé rouge de phénol, à bas pH, ce dernier colore en jaune les colonies qui fermentent le mannitol comme celles de *S. aureus* et garde en orange ou rouge les autres colonies.

Technique :

Ensemencer le milieu Mannitol Salt Agar (Laboratoire Conda, Madrid, Spain) par la souche présumée *S. aureus*.

Lecture :

Le milieu passe de la couleur rouge à la couleur jaune s'il y a fermentation du mannitol (Chapman, 1945 ; Sharp et al., 2006).

5.5. Recherche de la coagulase :

Principe :

La coagulase libre libérée de la cellule agit sur la prothrombine contenue dans le plasma pour former un produit analogue à la thrombine, ce produit réagit ensuite avec le fibrinogène pour former un caillot de fibrine (Pezzlo, 1994).

Technique : BD BBL Coagulase Plasmas

A l'aide d'une pipette, ajouter 0,5 ml de BBL Coagulase Plasma, Rabbit réhydraté à un tube de culture.

Ajouter environ 0,05 ml de culture en bouillon de la veille du microorganisme à tester dans le tube de plasma.

Mélanger doucement, et incuber à 37 °C jusqu'à 4 heures.

Lecture : BD BBL Coagulase Plasmas

Tout degré de coagulation dans un délai de 3 à 4 heures doit être interprété comme un résultat positif.

5.6. Recherche de la DNase thermostable :

Principe :

La DNase thermostable est le produit du gène *nuc*, on la nomme aussi la thermonucléase. C'est une endonucléase, enzyme qui coupe les acides désoxyribonucléiques (ADN) en nucléotides ou polynucléotides en hydrolysant les liaisons phosphodiester.

La thermonucléase est caractéristique des souches de *S. aureus* et elle n'est pas détruite à des températures élevées (15 minutes à 100°) (Delarras, 2007).

Technique :

A partir d'une culture en bouillon cœur cerveau, placer un aliquote de la culture agitée de 24h au bain d'eau à 100°C durant 15 min.

Percer le milieu de cupules à l'aide d'un emporte-pièce ou d'une pipette Pasteur.

Prélever une goutte de bouillon bouilli et la mettre dans une cupule.

Faire de même avec une goutte de bouillon non chauffé.

Incuber durant 4h à 37°C et faire une première lecture puis une deuxième à 24h.

Lecture :

Rose : Absence d'ADN donc **DNase+**

Bleu : ADN toujours présent, **pas de DNase** (Joffin et Leyral, 2001).

6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques :

6.1 Antibiogramme :

6.1.1. Principe :

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les normes préconisées par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie en 2013, antibiogramme vétérinaire (CASFM Vét, 2013) ainsi que le Réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6^{ème} édition, 2011.

6.1.2. Technique :

- Repiquer une colonie à partir d'une culture pure développée (24 heures à 37°C) sur un milieu d'isolement (BHIB, Laboratoire Conda, Madrid, Spain).
- Incuber pendant 18 à 24 heures.
- Grâce à un spectrophotomètre mesurer la densité optique de l'inoculum et ajuster en ajoutant la culture s'il est très faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est très fort, la densité optique doit être entre 0.08 et 0.1 à 625 nm équivalente à 10⁸ UFC /ml (0,5 Mc Farland).
- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée (gélose Mueller-Hinton coulée dans une boîte de Petri sur une épaisseur de 4 mm), sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° a chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm, pour notre cas, on a utilisé 5 disques d'antibiotiques.
- Incuber les boîtes à 35 °C pendant 18 heures (Benslimani, 2011).

6.1.3. Lecture :

Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.

Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I (CASFM Vét, 2013).

Quelques difficultés d'interprétation se sont opposées, alors on a dû faire référence à d'autres standards d'interprétation tel que : (CLSI, 2007), (CASFM, 2007), (CLSI, 2008), (CASFM, 2012), (CASFM, 2015).

6.2. Disques d'antibiotiques utilisés :

Spiramycine (100µg) ; Vancomycine (30µg) ; Penicilline (10µg) ; Fosfomycine (50µg) ; Gentamicine (10µg) ; Céfoxitine (30µg) ; Acide fusidique (10µg) ; Chloramphicol (30µg) ; Novobiocine (30µg) ; Oxacilline (5µg) ; Triméthoprime+Sulphaméthoxazole (25µg) ; Lincomycine (15µg) ; Amikacine (30µg) ; Tétracycline (30µg) ; Ofloxacine (5µg) ; Tobramycine (10µg). Ces antibiotiques sont fournis par Liofilchem[®], Italie.

Les disques d'antibiotiques sont choisis selon leurs disponibilités et leurs utilisations en médecine vétérinaire et humaine.

7. Recherche de la résistance de *S. aureus* à l'oxacilline :

7.1. Test de diffusion du disque de céfoxitine :

La résistance des staphylocoques aux isoxazolyl-pénicillines (oxacilline, cloxacilline) est recherchée à l'aide d'un disque de céfoxitine dans les conditions standards de l'antibiogramme. Il ne doit pas être tenu compte d'une éventuelle zone fantôme pour la lecture des diamètres de zones d'inhibition vis-à-vis de la céfoxitine (CASFM Vét, 2013).

Pour, le disque de céfoxitine (30µg) est comparable à celui de l'oxacilline pour détecter la résistance à l'oxacilline par production de PLP2a (gène *mecA*) ; cependant, le disque de céfoxitine (30µg) est plus facile à lire et donc c'est la méthode préférée (CASFM Vét, 2013).

La mesure du diamètre d'inhibition se fait à l'aide d'un pied à coulisse.

7.2. Test de screening à l'oxacilline pour *S. aureus* (test MRSA) :

Ce test concerne uniquement les souches de *S. aureus* présentant une résistance à l'oxacilline (NCCLS, 1999 ; Rahal, 2005 ; CLSI, 2008).

7.2.1. Technique :

Préparation de la solution :

- Diluer 6 mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1 g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis faire une solution au 1/10ème.
- Mettre 2 ml de cette solution dans une boîte de Petri de 90 mm de diamètre, ajouter 18 ml de gélose Mueller-Hinton additionnée de 4% de NaCl, mélanger en faisant des mouvements rotatoires.

Inoculum :

- Repiquer une colonie à partir d'une culture pure développée de 24 heures à 37°C sur un milieu d'isolement (BHIB).
- Incuber pendant 18 à 24 heures.
- Grâce à un spectrophotomètre, mesurer la densité optique de l'inoculum et ajuster en ajoutant la culture s'il est très faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est très fort, la densité optique doit être entre 0.08 et 0.1 à 625 nm équivalente à 10^8 UFC /ml (0,5 Mc Farland).
- Faire de même avec les souches de référence, et doivent être testées dans les mêmes conditions que les souches à tester.

Ensemencement (CLSI, 2008) :

La boîte de Petri est divisée en quatre quadrants :

- Un quadrant est ensemencé par la souche à tester.
- Deux quadrants sont ensemencés par les deux souches de références, *S. aureus* ATCC 25923 souche sensible à l'oxacilline et *S. aureus* ATCC 43300 souche résistante à l'oxacilline.
- Le dernier quadrant est non ensemencé.

Incubation :

Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37 °C.

7.2.2. Lecture :

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

8. Recherche de la bêta-lactamase (test du trèfle) :

La recherche de la bêta-lactamase est réalisée pour toute souche présentant un diamètre à la pénicilline ≤ 29 mm (Rahal, 2011).

8.1. Technique :

Ensemencement :

- La souche de *S. aureus* ATCC 25923 sensible à la pénicilline (témoin négatif) est ensemencée sur la totalité de la gélose Mueller-Hinton.
- Un disque de pénicilline G est appliqué au centre de la boîte.
- Cette même souche est ensemencée en stries radiales sur cette même boîte du centre vers la périphérie.
- La souche *S. aureus* ATCC 43300 résistante à la pénicilline (témoin positif) et la souche à tester sont ensemencées aussi du centre vers la périphérie en stries radiales.

Incubation :

La boîte est incubée pendant 24 heures à 37 °C en atmosphère normale.

8.2. Lecture :

La production de la bêta-lactamase (Pénicillinase) par la souche à étudier et la souche témoin positif induit la culture de la souche témoin négatif (sensible à la pénicilline) jusqu'au contact du disque de pénicilline (Rahal, 2005).

9. Détermination de la concentration minimale inhibitrice :

Cette technique consiste à déposer des suspensions bactériennes calibrées sur des milieux contenant des concentrations croissantes d'antibiotique.

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Cette étude a été réalisée en respectant les directives éditées par le « Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CASFM 2010 » (CASFM, 2010).

9.1. Technique :

Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique (tableau 2) :

- Diluer 51,20 mg de poudre de l'antibiotique à tester dans 100 ml de solvant approprié pour obtenir une concentration de 5120 µg/ml (solution-mère).
- Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 dans le solvant approprié jusqu'à la concentration de 1,25 µg/ml.
- Répartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la plus forte concentration.
- Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires.
- La dilution obtenue (1/10^{ème}) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées.
- Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.
- Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

Préparation de l'inoculum bactérien :

- Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 MF, ce qui correspond à 10⁸ UFC/ml.
- Utiliser l'eau physiologique à 0,9 % pour la préparation de la suspension directe à partir d'une culture jeune de la bactérie à tester.
- Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose, 2 µl soit 10⁴ UFC par spots de 5 à 8mm.

Incubation

Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn).

Renverser les boîtes et incuber à 37°C±2 pendant 16-20 heures.

9.2. Lecture des CMI

Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive.

Noter la CMI. Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film.

Classer la bactérie dans l'une des catégories Sensible (S), Résistante (R) ou Intermédiaire (I).

Tableau 1: Schéma pour la préparation des solutions d'antibiotique :

Etape	Concentration (µg/ml)	ATB (ml)	Diluant (ml)	Concentration intermédiaire	Concentration finale (µg/ml)
Solution mère	5120			5120	512
1	5120	2	2	2560	256
2	5120	1	3	1280	128
3	5120	1	7	640	64
4	640	2	2	320	32
5	640	1	3	160	16
6	640	1	7	80	8
7	80	2	2	40	4
8	80	1	3	20	2
9	80	1	7	10	1
10	10	2	2	5	0,5
11	10	1	3	2,5	0,25
12	10	1	7	1,25	0,125

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et Discussion :

1. Résultats des prélèvements :

❖ Isolement :

L'isolement a été réalisé sur milieu Baird-Parker, mais d'autres bactéries peuvent s'y multiplier (bacillus et micrococcus) (Joffin, 2006). (figure 3)



Colonies
présomptives de
S. aureus
entourées d'un
halo opaque

Figure 3 : Colonies présomptives de *S. aureus* entourées d'un halo opaque

❖ Fermentation du mannitol :

Le staphylocoque doré peut fermenter le mannitol en présence d'une concentration élevée en NaCl, cependant certaines souches de staphylocoques à coagulase négative fermentent également le mannitol (Robert, 2013) (Figure:4).



Figure 4 : *Staphylocoque* Mannitol + sur milieu Chapman

❖ **Recherche de la coagulase :**

Certaines espèces de *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. hyicus* et *S. intermedius*) ont la propriété de coaguler le plasma, l'identification de ces espèces est basée sur la présence de cette enzyme (Pezzlo, 1994) (Figure:5).

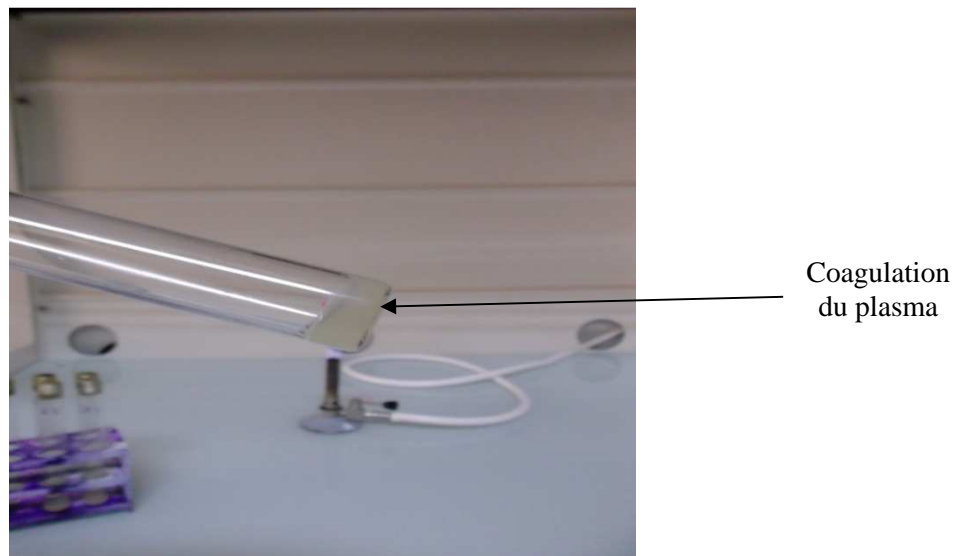


Figure 5 : Coagulation du plasma par les *Staphylocoques*

❖ **Recherche de la DNase thermostable :**

Certains auteurs ont étudié la découverte faite par Cunningham *et al* (1956) de la remarquable résistance à la chaleur de la nucléase du *S. aureus*. Ils sont arrivés à la conclusion que cette caractéristique est spécifique au *S. aureus*. Les nucléases sécrétées par

Staphylococcus epidermidis et les Micrococci ne résistent pas à une ébullition de 15 minutes (Lachica et al., 1971a ; Rayman et al., 1975). De plus, Lachica et al., (1971b) ont mis au point un milieu permettant de détecter facilement l'activité de cette nucléase, grâce à la propriété métachromatique du bleu de Toluidine (Figure:6).

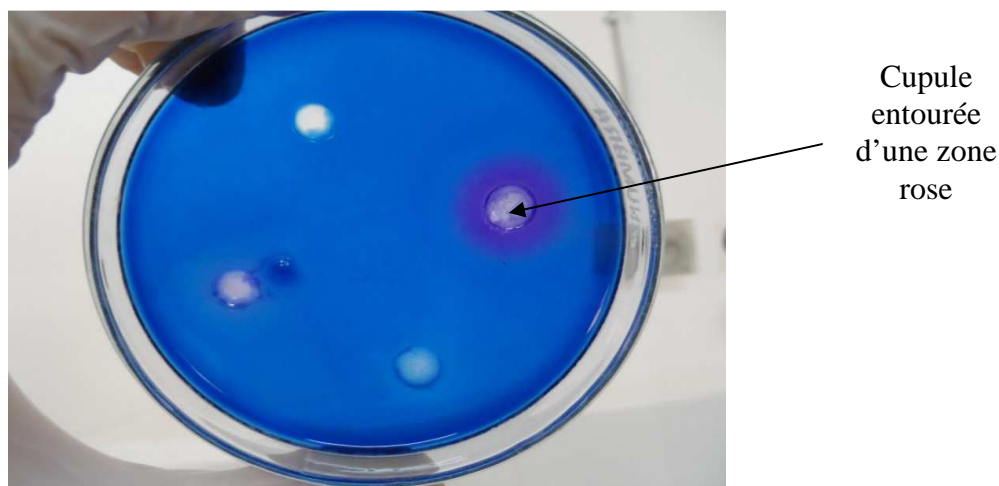


Figure 6 : Production de la nucléase thermostable par *S. aureus*

Après avoir effectué ces tests au laboratoire, nous sommes arrivés aux résultats suivants :

1.1. Prélèvements contaminés :

Nous considérons comme positifs, les prélèvements qui, après culture sur milieu d'isolement Baird-Parker montrent un développement bactérien.

Sur 76 prélèvements analysés, 61 se sont révélés positifs (développement bactérien), donc 80,26 % sont contaminés.

1.1.1. Prélèvements bovins contaminés :

Sur 47 prélèvements de lait bovin, 37 échantillons ont présenté un développement bactérien soit un pourcentage de 78,72%.

1.1.2. Prélèvements caprins contaminés :

Sur les 29 prélèvements, 24 sont contaminés (82,75%).

1.2. Prélèvements contaminés par les Staphylocoques :

Les colonies présomptives de *S.aureus* sont repiquées sur un bouillon nutritif pour conservation et pour d'autres tests, les bactéries présentant une coloration de Gram positif, forme de cocci, catalase positive et une culture sur milieu Chapman quel qu'en soit le résultat de la fermentation positif ou négatif sont considérées comme des bactéries appartenant au genre : *Staphylococcus*.

Parmi 76 échantillons, 43 sont contaminés par des staphylocoques (56,57%)

1.2.1. Prélèvement contaminés par les Staphylocoques pour l'espèce bovine :

Soit 27 échantillons sont contaminés par des staphylocoques (57,44 %).

1.2.2. Prélèvement contaminés par les Staphylocoques pour l'espèce caprine :

Pour le lait de chèvre, 16 échantillons sont contaminés par des staphylocoques (55,17 %).

1.3. Prélèvements contaminés par les Staphylocoques à coagulase positive :

Les 43 souches de Staphylocoque isolées sont testées pour mettre en évidence une coagulase. 23 souches sont coagulases positives (SCP) (30,26 %), et d'après ce résultat, on a pu déduire le taux des Staphylocoques à coagulase négative (SCN) (26,31 %).

Le taux de SCN pour l'espèce bovine est de 19,14% (09 souches) et pour l'espèce caprine 37,93 % (11 souches).

1.3.1 Prélèvements contaminés par Staphylocoques à coagulase positive pour l'espèce bovine :

Sur les 47 prélèvements, 18 isolats de Staphylocoques étaient coagulase positive, soit un taux de 38,29 %.

1.3.2. Prélèvements contaminés par les Staphylocoques à coagulase positive pour l'espèce caprine :

Cinq souches de Staphylocoque à coagulase positive sont isolées parmi les 29 échantillons de lait de chèvre soit 17,24%.

1.4. Prélèvements contaminés par *S. aureus* :

Ce résultat est obtenu après le test de la DNase thermostable, le pourcentage de *S.aureus* présents dans tous les prélèvements est de 26,31 %.

1.4.1. Prélèvements contaminés par *S. aureus* pour l'espèce bovine :

Toutes les souches SCP isolées de lait de vache possèdent une nucléase thermorésistante, le taux de *S. aureus* par rapport aux prélèvements de lait de vache est de 38,29 % (18 souches).

1.4.2. Prélèvements contaminés par *S. aureus* pour l'espèce caprine :

Parmi les souches SCP isolées de lait de chèvre, deux sont DNase positive, ce qui présente un taux de 6,89 % (02souches).

1.5. Discussion :

Le taux des échantillons contaminés est de 80,26 % (78,72 % pour l'espèce bovine et 82,75 % pour l'espèce caprine).

La difficulté d'éviter toute contamination dans des élevages où les mesures d'hygiène sont mal appliquées et où les conditions de prélèvement sont difficiles (éclairage insuffisant, mouvements d'animaux, poussières dans l'air) a été souligné par Neave (1975) et peut expliquer les pourcentages élevés d'échantillons contaminés.

Néanmoins, le nombre d'échantillons contaminés est difficile à prédire vu que certains agents étiologiques de mammites (clinique, subclinique ou en phase latente) autres que *S. aureus* ne peuvent pas cultiver sur Baird-Parker.

Dans notre étude, le taux des Staphylocoques est de 56,57 % soit 57,44 % pour l'espèce bovine et 55,17 % pour l'espèce caprine, ce qui montre l'importante contamination par ce genre.

Les staphylocoques représentent la bactérie la plus souvent mise en cause dans les toxi-infections alimentaires dues à des produits laitiers en France (De Buyser et al., 1997) comme au Royaume-Uni (Maguire et al., 1991).

Le taux des Staphylocoques à coagulase positive est de 30,26 % (38,29 % pour le lait de vache et 17,24 % pour le lait de chèvre). L'étude de Normanno et al en Italie (2005) rapporte que 38,4 % des échantillons de lait cru testés sont contaminés par des staphylocoques à coagulase positive. Une étude a montré que presque 45 % des échantillons de lait cru bovin testés contenaient des souches staphylococciques à coagulase positive (Rola Jolanta et al., 2013).

Pour les Staphylocoques à coagulase négative, le taux de contamination était de 26,31 % (19,14 % pour l'espèce bovine et 37,93 % pour l'espèce caprine) et pour Ben Hassen et al (2003), les SCN ont représenté 97,5 % des cas d'infections latentes et 62,8 % des cas de mammites subcliniques.

Pyörälä (1995) montre que les SCN sont responsables de plus de 3 % des cas de mammites subcliniques, les fréquences des mammites subcliniques dans certaines études était de 56 % en Jamaïque (Zingesser et al., 1991), 64 % en Inde (Saxena et al., 1993), 45 % en Trinidad (Romain et al., 2000), 52 % en Uruguay (Giannechini et al., 2002), 62% en Ethiopie (Deogo et Tareke, 2003) et 50 % au Maroc (Houssainl-Hilali, 2003).

Il faudrait rappeler que ces laits provenant de femelles atteintes de mammites subcliniques, sont destinés à la consommation humaine.

On voit bien que les SCN prennent de plus en plus de l'ampleur dans nos élevages, pourtant considérées comme germes mineurs, mais il faudrait prêter une attention particulière à ces bactéries.

Dans notre étude, on a isolé 20 souches de *S. aureus* (18 souches pour le lait de vache et 2 souches pour le lait de chèvre), soit un taux de 26,31 % des échantillons.

Pour Asperger (1994), *S. aureus* constitue la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections latentes et les mammites subcliniques chroniques. Les mammites étant difficiles à éradiquer, elles représentent la principale source de contamination des laits crus.

A partir d'études faites sur l'incidence et la fréquence des mammites subcliniques, *S. aureus* est classé comme agent étiologique important puisqu'il est isolé en France à 39 %, 44,7 %, 29% (Bouchot et al., 1985 ;Longo et al.,1994 ; Fabre et al,1997) respectivement, en Egypte 29,1 % (Seddek et al.,1999), en Zimbabwe 34,2 % (Kuddinha et al., 2002). En revanche, d'autres études rapportent des fréquences plus faibles, 12 % pour Lafi et al. (1994) en Jordanie, 16 % pour Busato et al. (2000) en Suisse.

2. Antibiogramme :

Aucune des souches isolées n'est sensible à tous les antibiotiques testés ; 19 souches (95%) sont multirésistantes, c'est-à-dire une résistance à au moins trois antibiotiques (CLSI, 2007) alors que 5% présentent une double résistance et aucun des isolats ne présente une seule résistance.

2.1. Les Bétalactamines (CASFM Vét, 2013) :

Pénicilline :

Le taux de résistance à la pénicilline des souches isolées est de 95%, ce taux est très élevé par rapport à d'autres études qui ont ramené des taux plus faibles de résistance à la pénicilline des *S. aureus* isolés de denrées alimentaires d'origine animale, en Finlande un taux de 50,7% a été rapporté par Myllys et al (1998), en Tunisie 60 % des souches isolées par Ben Hassen et al (2003) sont résistantes, au Canada, un pourcentage de 9,1 a été trouvé (Sabour et al.,2004), en Hongrie, Peles et al. (2007) rapporte un taux de 46,4%, en Italie, Normanno et al. (2007) rapporte un taux de 88,9% et au Portugal, Pereira et al (2009) rapporte un taux de 53,8% de résistance.

D'autres souches de *S. aureus* isolées de différents hôpitaux montrent aussi des résistances alarmantes, kara Terki (2014) rapporte un taux de 98%, en France ONERBA (2005) rapporte 67%, aux USA un taux de 47% (Pillar et al. 2008), 95,2% en Algérie (Rahal et al., 2008), et 98% en Iran (Rahimi et al., 2013).

Céfoxitine et Oxacilline :

Les résultats de l'antibiogramme ont révélé que 35 % et 30 % des *S. aureus* sont résistantes à la Céfoxitine et l'Oxacilline, respectivement.

Il est à noter que le mécanisme d'hyperproduction de pénicillinases peut être également responsable de l'hydrolyse des pénicillines du groupe M (Méticilline, Oxacilline) mais ce mécanisme génère un bas niveau de résistance (Bismuth et Leclercq, 2000).

Cette résistance doit être confirmée par d'autres tests bien évidemment.

2.2. Les Aminosides :

Gentamicine (CLSI, 2008) ; Amikacine (CASFM, 2007 ; CASFM, 2012) ; Tobramycine (CASFM, 2015) :

On a noté une seule résistance à la gentamicine soit 5 %, et 50 % des souches sont sensibles alors que 45 % présentaient une résistance intermédiaires.

Un taux de résistance de 40 % a été noté pour l'amikacine, une sensibilité pour 25 % des souches et 35 % présentaient une résistance intermédiaire.

Parmi les 20 souches isolées, 55 % présentaient une résistance à la tobramycine et 45 % étaient sensibles.

Les souches résistantes à la gentamicine sont résistantes à l'ensemble des aminosides sauf streptomycine (CASFM, 2015).

L'usage de la gentamicine n'est pas permis chez la vache laitière en Algérie d'ailleurs c'est pour cela qu'on a eu un taux aussi faible (RADP, 2011)

La résistance à la gentamicine au niveau hospitalier a été rapportée par certaines études, le 9ème rapport algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques a rapporté un pourcentage de 13,9 et selon Ramoul (2014) 75 % des souches isolées au niveau du CHU de Annaba sont résistantes.

2.3. Glycopeptide (CLSI, 2008) :

Vancomycine : Aucune résistance n'est remarquée, d'ailleurs cette molécule est à usage hospitalier seulement, comme dernier recours en cas d'infection sévère à *S. aureus*.

2.4. Fluoroquinolone :

Ofloxacin (CASFM, 2012) :

Pour l'ofloxacin, on a noté une résistance de 15% alors que 85% étaient sensibles, les souches isolées d'un milieu hospitalier ont un taux de 10,8% et pour celles isolées dans la communauté, il est de 5,2% (Rahal et al., 2007), alors que Kara Terki (2014) a rapporté un taux de 75% de résistance pour les Staphylocoques.

2.5. Macrolides et apparentés :

Spiramycine et Lincomycine (CASFM, 2012 ; CASFM Vét, 2013) :

Le taux de résistance est de 5 % pour la spiramycine alors qu'il est de 10 % pour la lincomycine ; Bouaziz (1998) rapporte un taux de 100 % de sensibilité vis-à-vis de l'erythromycine, lincomycine et de spiramycine pour les souches isolées de laits mammites. Il rapporte le même résultat quatre ans après (en 2002), c'est-à-dire une sensibilité de 100 %.

Dans les hôpitaux algériens rahal et al (2007) apporte des taux de 24,3 % ; 16,3 % et 2,1 % pour l'erythromycine, la clindamycine et la pristinamycine respectivement, Kara Terki (2014) rapporte un taux de 71,5 % de résistance pour les staphylocoques isolés à l'hôpital.

2.6. Tétracycline (CASFM Vét, 2013) :

Selon notre étude, 35 % de résistance vis-à-vis de l'oxytétracycline, Bouaziz rapporte une fréquence de résistance de 38 % en 1998 et 40 % en 2002 des *S. aureus* isolés de laits de mammites, en Tunisie, Messadi et al (1991) ont rapporté un pourcentage de 23,9 alors que Ben Hassen et al (2003) ont rapporté 36 %. Une étude menée dans la province de Québec au Canada rapporte un taux de 1,9 % (sur 105 souches) de résistance des *S. aureus* isolés de glandes mammaires (Sabour et al., 2004).

L'utilisation irrationnelle de cet antibiotique est l'une des principales causes de cette résistance.

2.7. Triméthoprime /Sulphaméthoxazol (CASFM Vét, 2013) :

20 % des souches sont résistantes, 5 % sont de sensibilité intermédiaire et 75 % sont sensibles alors que Bouaziz (1998) n'a obtenu aucune résistance vis-à-vis de la triméthoprime associé à la sulphaméthoxazol sur ses isolats de *S.aureus*.

2.8. Phénicolés (CASFM Vét, 2013 ; CASFM, 2015) :

La fréquence de sensibilité est de 90 % soit 2 souches qui sont résistantes, en Tunisie, 8 % de résistance par Ben Hassen et al (2003), en Algérie 100 % de sensibilité est rapportée par Aouati et al(2009) et Ouchénane et al (2011), 4,5 % de résistance par Kara Terki (2014).

L'usage du chloramphinicol est interdit en Algérie vu qu'il provoque beaucoup d'effets secondaires graves.

2.9. Les antibiotiques non classés :

Fosfomycine (CASFM, 2012) :

Le taux de résistance pour la fosfomycine est de 55 % pour nos isolats alors que dans nos hôpitaux, est de 12,5 % par Kara Terki (2014).

Acide fusidique (CASFM, 2015) :

Un taux de 75 % de résistance est noté pour l'acide fusidique, et 43% des souches sont résistantes selon Kara Terki (2014).

Novobiocine (CASFM, 2007) :

Une seule souche est résistante pour la novobiocine soit 5%.

Très peu d'études sont faites sur cet antibiotique, des tests expérimentaux l'utilisent en association avec d'autres molécules telle que la pénicilline contre les *S. aureus*.

Tableau 2 : Fréquence de résistance des *S. aureus* isolés aux antibiotiques testés

Famille	Antibiotique	Abréviation	Nombre de souches					
			Résistante		Intermédiaire		Sensible	
			N	%	N	%	N	%
Béta-lactames	Penicillin	P	19	95	0	0	1	5
	Oxacillin	OX	6	30	0	0	14	70
	Cefoxitin	FOX	7	35	0	0	13	65
Aminoglycosides	Gentamicin	CN	1	5	9	45	10	50
	Amikacin	AK	8	40	7	35	5	25
	Tobramycin	TOB	11	55	0	0	9	45
Macrolides	Spiramycin	SP	1	5	0	0	19	95
	Lincomycin	MY	2	10	0	0	18	90
Glycopeptides	Vancomycin	VAN	0	0	0	0	20	100
Quinolones	Ofloxacin	OFX	3	15	0	0	17	85
Tétracyclines	Tetracycline	TE	7	35	0	0	13	65
Sulfonamides	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	SXT	4	20	1	5	15	75
Phénicolés	Chloramphenicol	C	2	10	0	0	18	90
Autres molécules	Fosfomycin	FOS	11	55	0	0	9	45
	Fusidic acid	FC	15	75	0	0	5	25
	Novobiocin	NO	1	5	0	0	19	95

Tableau 3 : Phénotype de résistance des souches *S. aureus*

Souche	Origine	Phénotype
S1	Lait cru de vache	P/FOS/CN/FOX/FC/OX/SXT/AK/OFX/TOB
S2	Lait cru de vache	P/FOX/FC/OX
S3	Lait cru de chèvre	P/OX/CN/FOX/FC/OFX/TOB
S4	Lait cru de chèvre	P/OX/CN/FOX
S 5	Lait cru de vache	P/FOS/CN/FC/C30/AK/TE/TOB
S 6	Lait cru de vache	SP/P/FOS/CN/C30/AK/TE/TOB
S 7	Lait cru de vache	P/FOS/FC/AK/TE/TOB
S 8	Lait cru de vache	P/FOS/FC/OX/SXT/AK/TE/OFX/TOB
S 9	Lait cru de vache	P/FOS/CN/FC/SXT/AK/OFX/TOB
S 10	Lait cru de vache	P/FOS/CN/FC/C30/MY/AK/TE/
S 11	Lait cru de vache	P/FOS/FC/AK/TOB
S 12	Lait cru de vache	P/FOS/CN/OX/AK/
S 13	Lait cru de vache	P/FOX/FC/SXT/AK/TE/
S 14	Lait cru de vache	P/FOS/CN/FOX/FC/AK/OFX/TOB
S 15	Lait cru de vache	FOS/FC/SXT/AK/TOB
S 16	Lait cru de vache	P/FC/TE/
S 17	Lait cru de vache	P/FOS/
S 18	Lait cru de vache	P/FOS/CN/NO/AK/TOB
S 19	Lait cru de vache	P/FOS/AK
S 20	Lait cru de vache	P/FOX/FC/OX/AK/

3. Résistance à l'oxacilline (Test MRSA) :

Ce test concerne les souches présentant une résistance à l'oxacilline ou à la céfoxitine dans les conditions standard de l'antibiogramme, dans notre cas, vu qu'on a utilisé les deux disques alors toute souche présentant une résistance pour l'un des deux disques, elle sera testée.

Sur 7 souches présentant des résistances (déjà mentionnées dans la partie concernant l'antibiogramme) seule quatre souches ont été positives au test de screening soit 20 % des *S. aureus* isolés, notons aussi, que ces souches sont toutes multirésistantes.

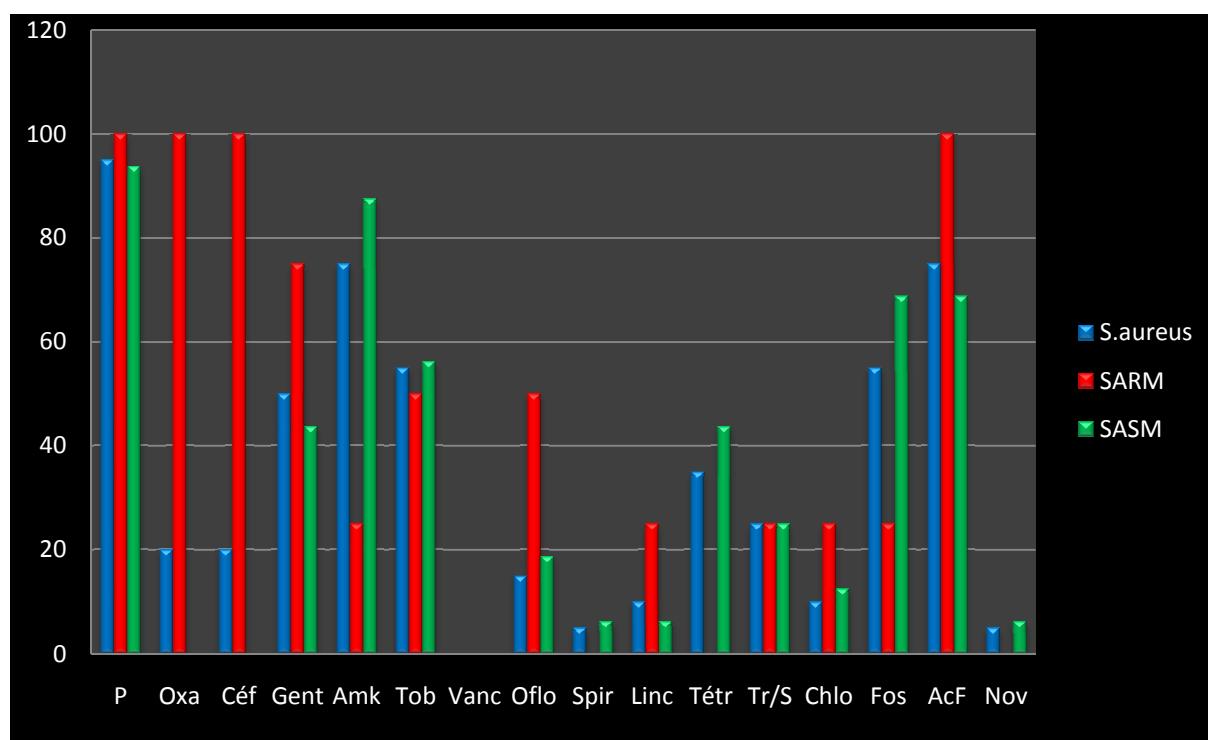


Figure 7: Pourcentage de résistance de *S. aureus* aux antibiotiques

4. Production de bêta-lactamase :

Toutes les souches catégorisées « résistante » à la pénicilline (19 souches) sont testées, le test de trèfle a révélé que 89,47 % des souches isolées sont productrices de bêta-lactamase à savoir deux souches seulement ne produisent pas cet enzyme (85 % des souches isolées sont productrices de bêta-lactamase).

Serieys et Gicquel-Bruneau (2005) rapporte un taux de 60 % de positivité avec une homogénéité de 71 % pour leurs élevages, alors que Bruno et al (2014), 83 % des souches qu'ils ont isolé, sont productrices de bêta-lactamase.

Tableau 4 : Production de bêta-lactamase

Production de bêta-lactamase	Nombre de souches	pourcentage %
Positive	17	85
Négative	2	10
Total	19	95

5. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La plus faible CMI observée pour nos souches, est de 16 µg/ml c'est-à-dire qu'il y a eu développement bactérien pour la concentration de 8 µg/ml, et est représentée par les deux souches isolées de lait de chèvre, alors que les valeurs les plus élevées, sont représentées par les souches isolées de lait de vache avec des CMI équivalentes à 64 µg/ml et 256 µg/ml c'est-à-dire qu'on a assisté à un développement bactériens pour les concentrations inférieures, 32 µg/ml et 128 µg/ml, soit une souche qui présente une résistance de haut niveau (possède une CMI supérieure à 64 µg/ml), à noter aussi que tous ces SARM sont producteurs de bêta-lactamase.

Les souches isolées de lait de chèvre avaient des CMI faible par rapport à celles isolées de lait de vache, cela est sûrement dû aux traitements reçue par les vaches, c'est-à-dire que les souches bovine sont en contact avec les médicaments alors qu'on assiste rarement à des infections concernant les caprins vu qu'ils sont rustique donc pas de traitement et pas de contact fréquent avec les molécules antibiotiques.

Des CMI de l'oxacilline sont rapportées par des études antérieures, Watts et al. (1997) rapporte une CMI égale à 1 µg/ml pour les SARM producteurs de bêta-lactamase et 0,25 µg/ml pour les SARM non producteurs de bêta-lactamase, au Danemark, une CMI de 0,05 µg/ml par Salmon et al. (1998), enfin des CMI de 0,5 µg/ml et 1 µg/ml sont observées par Gentilini et al. (2000) et De Oliveira et al. (2000) respectivement.

Au niveau hospitalier, un taux de 100% de SARM avaient une CMI supérieure ou égale à 512µg/ml à Tokyo (Kato et al., 2006) alors qu'en Algérie, un taux de 71% de SARM possèdent une CMI supérieure à 64 µg/ml (Rebiahi, 2012).

Ces résistances sont nettement plus élevées que les résistances que nous rapportons, car en médecine humaine la résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques est très fréquente surtout en milieu hospitalier (Guerin-Faubleee et Brun, 1999) d'autant plus qu'il existe plusieurs paramètres que nous ciblerons prochainement.

Tableau 5 : CMI et phénotype de résistance des SARM isolés

Souche MRSA	Origine	CMI (µg/ml)	Phénotype
S1	Lait cru de vache	256	P/FOS/CN/FOX/FC/OX/SXT/AK/OFX/TOB
S2	Lait cru de vache	64	P/FOX/FC/OX
S3	Lait cru de chèvre	16	P/OX/CN/FOX/FC/OFX/TOB
S4	Lait cru de chèvre	16	P/OX/CN/FOX

6. Fréquence des SARM par rapport aux prélèvements :

Sur 76 échantillons, quatre SARM sont détectés, soit un taux de 5,26 %.

Pour le lait provenant de l'espèce bovine, deux souches sont détectées sur 47 prélèvements soit 4,25 % et pour l'espèce caprine, deux souches sont détectées aussi mais sur 29 prélèvements soit 6,29 %.

7. Fréquence des SARM par rapport aux Staphylocoques isolés :

Présence de quatre souches SARM sur les 43 souches de Staphylocoques soit un taux de 9,30%.

8. Fréquence de SARM par rapport aux *S. aureus* :

Parmi les 20 souches de *S. aureus*, quatre sont résistantes à la méthicilline (SARM) soit 20 %.

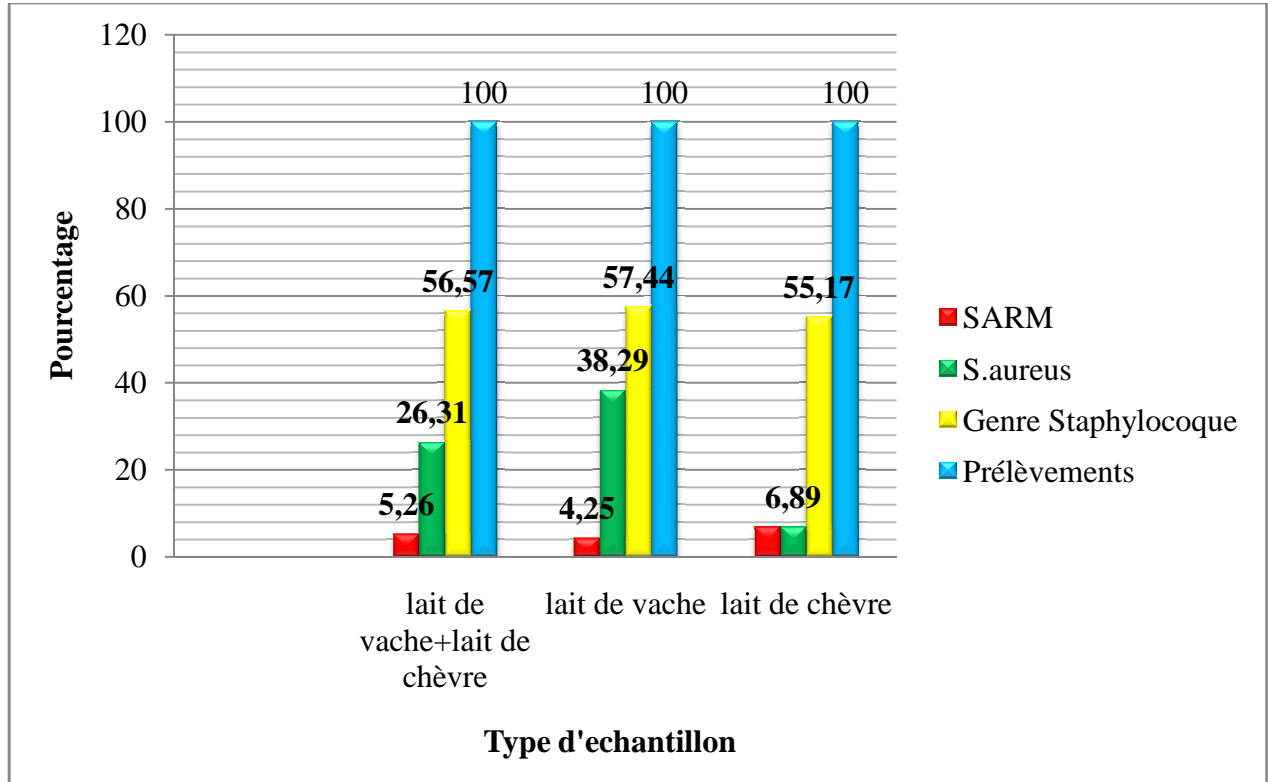


Figure 8: pourcentage des Staphylocoques, des *S. aureus* et des SARM par rapport aux échantillons prélevés

Plusieurs études dans le monde, dans différents pays ont rapporté la présence de SARM dans les laits, en Corée, 1,2 % de SARM retrouvé dans le lait de chèvre (Lee, 2003) et 0,18 % dans le lait de vache (Kwon et al., 2005), en Italie, Normanno et al. ramène un taux de 0,37 % isolé de lait et de fromage en 2007, en Hongrie, 0,26 % a été rapporté (Kaszanyitzky et al., 2004), et aussi quelques données sur la présence de SARM dans les denrées alimentaires d'origine animale sont publiées, en Corée 0 % de SARM dans la viande de chèvre, 1 % dans la viande de poulet (Lee, 2003) et en 2006, Kwon et al. rapporte 0,3 % dans la viande de poulet.

Au Japon, 0,45 % dans la viande du poulet (Kitai et al., 2005).

Aux Pays-Bas, van Loo et al. (2007) n'a isolé aucun SARM dans les viandes de chèvre, mais en 2009, les taux sont élevés par rapport à d'autres pays avec 10,6 % pour la viande de bœuf, 15,2 % pour la viande de veau, 6,2 % pour la viande d'agneau et de mouton, 16 % pour la

viande de poulet, 35,3 % pour la viande de dinde, 2,2 % pour la viande de gibier (de Boer et al., 2009).

En Espagne, 1,6 % de viandes diverses (Lozano et al., 2009).

Aux Etats-Unis, 3,3 % de viande de bœuf, mais pour les viandes de poulets, lapins et agneaux aucune résistance à la méthicilline par les *S. aureus* isolés n'est enregistrée (Pu et al., 2009).

Au Canada, 5,6 % pour la viande de bœuf et 1,3 % pour la viande de poulet (Wees et al., 2010).

La prévalence de *S. aureus* dans le lait cru dépend de la région géographique, de la saison, du nombre d'animaux dans la ferme et de l'hygiène du lieu et du personnel (Touch et Deeth, 2009). Ces souches staphylococciques retrouvées dans le lait sont généralement géographiquement différents ou endémiques à la ferme et à la région dans laquelle elles ont été isolées (Piccinini et al., 2010; Proietti et al., 2010).

La littérature scientifique offre plusieurs articles traitant de l'antibiorésistance chez les *S. aureus* isolés de lait de vaches (Thornsberry et al., 1993 ; Owens et al, 1997 ; Salmon et al., 1998; De Oliveira et al., 2000 ; Gentilini et al., 2000 ; Yoshimura, 2002 ; Vintov et al., 2003 ; Shitandi, 2004 ; Sabour et al, 2004 ; Tenhagen et al., 2006 ; Moroni et al., 2006 ; Bennedsgaard et al., 2006).

Dans ces études, les patrons de résistance retrouvés chez les *S. aureus* isolés de lait de vache divergent entre eux.

L'utilisation de différentes techniques dans ces études rend l'interprétation et la comparaison difficiles d'une étude à l'autre (Schlegelova et al., 2001 ; Erskine et al., 2004).

Un autre facteur influençant les données réside dans les critères d'interprétation utilisés dans chacune des études pour établir le classement des souches comme étant sensibles, intermédiaires ou résistantes à un antimicrobien donné (Schlegelova et al., 2001 ; Erskine et al., 2004).

Avant 1999, aucun standard n'avait été établi pour l'interprétation des données d'antibiorésistance obtenues chez les souches d'origine vétérinaire (Schlegelova et al., 2001), il était donc difficile d'extrapoler les données obtenues in vitro à l'efficacité d'un antibiotique in vivo.

Actuellement plusieurs standards sont disponibles pour l'interprétation des données de l'antibiorésistance, malgré tout, les interprétations diffèrent entre eux (dans cette étude, les souches isolées sont toutes résistantes à la gentamycine si on interprète avec le standard de

CASFM Vét 2013 et le CASFM 2015) et la comparaison reste difficile de même pour les études antérieures à cette date, et celles n'utilisant pas les mêmes molécules, les mêmes techniques pour détecter phénotypiquement la résistance de ces bactéries.

CONCLUSION

Conclusion :

S. aureus est un pathogène alimentaire et médical dangereux de par ses facteurs de virulence multiples nécessaires pour sa propagation et son évolution.

A la suite de ces résultats, on peut conclure que le *S. aureus* peut être présent dans le lait de vache sans qu'il ait un signe inflammatoire de la glande mammaire ou bien une altération du produit alimentaire (lait de vache et de chèvre) avec des taux assez élevés (26,31 %) ce qui est un danger pour l'animal et pour la santé publique, et peut être résistant à plusieurs antibiotiques (95 % des souches isolées sont multirésistantes) allant de molécules utilisées en médecine vétérinaire jusqu'aux molécules utilisées pour l'homme, limitant ainsi le choix du traitement lors d'apparition d'une mammite, d'infection touchant l'homme (zoonose) ou toute autre pathologie que peut causer cette bactérie.

Afin de limiter les dégâts provoqués par ce germe (mammite, infection cutanée, intoxication...), on essaie d'éliminer ce germe tout d'abord dans nos élevages par des désinfections régulières et essayer de procurer une meilleure hygiène pour nos animaux (vache et chèvre), ce pathogène bien évidemment présent dans toute la planète bleue ne peut être éliminé alors essayant de limiter sa présence et sa multiplication en respectant le protocole de tarissement, hygiène lors de la traite et la collecte du lait, son transport et sa conservation, de limiter sa résistance envers les antibiotiques en se basant sur un bon diagnostic premièrement, antibiogramme si c'est possible, respecter la posologie (injection de doses supérieures à la CMI) et la durée du traitement enfin, utilisation des associations d'antibiotique. Ceux-ci sont quelques méthodes afin de réduire la fréquence de *S. aureus*, en conséquence les affections que peut provoquer et les résistances vis-à-vis des antibiotiques.

En perspective de ce travail, il serait intéressant d'étudier un plus grand nombre d'échantillons, les méthodes et les conditions d'élevage, les mécanismes et les gènes responsables de ces résistances qui ne cessent d'augmenter et enfin une ou des molécules qui auront une activité bactéricide sur *S. aureus* multirésistant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Adams, M. R. et Moss M. O. 2008. Food Microbiology, 3rd ed. vol. Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge. 25-29.
2. Alibayov, B., L. Baba-Moussa, H. Sina, K. Zdenkova et K. Demnerova. 2014. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. Mol. Biol. Rep. [Epub ahead of print].
3. Amir, LH., Garland, SM., Lumley, J. 2006. A case-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. BioMedCentral Fam Pract. 11, p57.
4. Asao, T., Y. Kumeda, T. Kawai, T. Shibata, H. Oda, K. Haruki, H. Nakazawa et S. Kozaki. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiology and Infection. 130:33-40.
5. Asperger H. (1994). - *Staphylococcus aureus*. In The significance of pathogenic microorganisms in raw milk (G. Hahn, édit.). Monographie, Document n° 9405, Fédération internationale de laiterie, Bruxelles, 24-42.
6. Avril J.L, Dabernat H, Denis F et Monteil H.1992. bactériologie clinique 2ème édition. Paris : Ellipses Marketing. p14-16-17.
7. Baba, T., T. Bae, O. Schneewind, T. Takeuchi et K. Hiramatsu. 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. Journal of Bacteriology. 190: 300-310.
8. Baird-Parker, A. C. 1990. The staphylococci: an introduction. Society for Applied Bacteriology symposium series. 19:1S-8S.
9. Baird-Parker, A.C. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. Journal of Applied Bacteriology. 25, 12-52.
10. Balaban, N. et A. Rasooly. 2000. Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology. 61:1-10.
11. Bancroft, E. A. 2007. Antimicrobial resistance: Its not just for hospitals. Journal of the American Medical Association. 298:1803-1804.
12. Ben Hassen S., messadi I., Ben Hassen A. Identification et caractérisation des espèces de staphylococcus isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. ann. méd. vét., 2003, 147, 41-47

13. Bennedsgaard TW, Thamsborg SM, Aarestrup FM, Enevoldsen C, V Aarst M, Christoffersen AB. 2006. Resistance to penicillin of *staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in denmark. *acta vet scand.* 24;48(1):24.
14. Bennett, S. D., K. A. Walsh et L. H. Gould. 2013. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Diseases.* 57:425-433.
15. Benslimani A. 2011. Standardisation de L'antibiogramme à l'Echelle Nationale (Medecine Humaine et Vétérinaire). Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. 6ème édition avec la collaboration de l'OMS, 2011.p25
16. Bosgiraud, C. 2003. Microbiologie générale et santé. Edition ESKA.
17. Bouaziz O. 2002. Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien. Thèse de doctorat, université de Constantine, Algérie. p 235
18. Bouchot MC, Catel J, Chirol C, Ganière JP, Le Menec M. 1985. L'antibiogramme et le traitement des infections mammaires des bovins. *Rec. Med. Vet.*, 161 : 587-60.
19. Bourion F. 1995. Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono- et bimicrobiens de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Listeria innocua*, thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire, Massy, France.200p.
20. Boutaleb N. 2007. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat : Université de Bretagne Sud UFR science et science de l'ingénieur. 194 p.
21. Bruno F. Robles, Diego B. Nóbrega, Felipe F. Guimarães, Guido G. Wanderley and H. Langoni. 2014. Beta-lactamase detection in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Pesq. Vet. Bras.* 34(4):325-328
22. Bukowski, M., B. Wladyka, G. Dubin. 2010. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins.* 2:1148-1165.
23. Burin des Rozières M .P. C. 2002. Les biofilm. Thèse de doctorat : Ecole national Vétérinaire d'Alford.92P.
24. Burke, F. M., McComack, N., Rindi, S., Speziale, P et Foster T. J. 2010. Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. *BioMedCentral Microbiol.* 10: 160-175.

25. Busato A, Trachsel P, Schallibaum M, Blum JW. 2000. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 44 : 205-220.
26. Callon, C., Gilbert, FB., De Cremoux, R., Montel, MC. 2007. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S.aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control.*19, p143-150.
27. CASFM (2010). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Communiqué 2010.
28. CDCP. Center for Disease Control and Prevention. 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infections in a state prison: Mississippi, 2000. *Morbidity and Mortality Weekly report.* 50, p919-922.
29. Chapman, G. H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology.* 50:201-203.
30. Characklis, W. G. 1989. *Biofilms.* Edited by W. G. Characklis et K. C. Marshall. New York: Wiley. 55-89.
31. Chatterjee, S. S., H. S. Joo, A. C. Duong, T. D. Dieringer, V. Y. Tan, Y. Song, E. R. Fischer, G. Y. Cheung, M. Li et M. Otto. 2013. Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat. Med.* 19:364-367.
32. Chen, C.-J., K.-H. Hsu, T.-Y. Lin, K.-P. Hwang, P.-Y. Chen & Y.-C. Huang. 2011. Factors Associated with Nasal Colonization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* among Healthy Children in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology.* 49:131-137.
33. Chopra, L., Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 65 (2). 232-260.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2007. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Fifteenth Informational Supplement.* CLSI document M100-S15. Wayne, PA.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement.* CLSI document M100-S18 (ISBN 1- 56238-653-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
36. Corrigan, R. M., H. Miajlovic et T. J. Foster. 2009. Surfaces proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BioMedCentral Microbiology.* 9: 22-32.

37. Coveney, H. M., G. F. Fitzgerald et C. Daly. 1994. A study of the microbiological status of Irish farmhouse cheeses with emphasis on selected pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology*. 77:621-630.
38. Cunningham, L., Catlin, B.W., & Privat de Garilhe, M. 1956. A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*. *Journal of American Chemistry Society*. 78, 4642-4645.
39. Daurel, C. et R. Leclercq. 2010. Faut-il abandonner la vancomycine? *Archive de Pédiatrie*. 17: S121-S128.
40. Davis, MF., Iverson, SA., Baron, P., Vasse, A., Silbergeld, EK., Lautenbach, E., Morris, DO. 2012. Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *Lancet Infectious Diseases*. 12: p703-716.
41. De Buyser M.L., Lapeyre C, Dilasser F. et Janin F. (1997). - Le point sur les TIAC à staphylocoques : foyers déclarés et résultats de l'analyse d'aliments suspects. *In Actes du colloque « Faut-il craindre les microorganismes présents dans les aliments ? »* (P. Colin, édit.), 13-14 mars, Paris. Société française de microbiologie, Paris, 7-16.
42. De Oliveira AP, Watts JL, Salmon SA, Aarestrup FM. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science*. 83(4). 855-862.
43. Dego OK, Tareke F. 2003. Bovine mastitis in selected areas of southern Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod*. 35 (3) : 197-205
44. Delarras, C. 2007. *Microbiologie pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. 1er éd., Éditions Tec et Doc - EM Inter – Lavoisier, Paris. p476.
45. Denis, O., Deplano, A., De, BH., Hallim, M., Huysmans, G., Garrino, MG., Glupczynski, Y., Malaviolle, X., Vergison, A., Struelens, MJ. 2005. Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leucocidin genes in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56, p1103-1106.
46. Derzelle, S., F. Dilasser, M. Duquenne & V. Deperrois. 2009. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiology*. 26:896-904.
47. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(1): 16-34.
48. Do Carmo, L. S., C. Cummings, V. R. Linardi, R. S. Dias, J. M. De Souza, M. J. De Sena, D. A. Dos Santos, J. W. Shupp, R. K. Pereira et M. Jett. 2004. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog. Dis*. 1:241-246.

49. Dorosz, Ph., Vital Durand, D., Le Jeune, C. 2011. Guide pratique des médicaments. 30^{ème} édition. Maloine, Paris. p1892.
50. Dowling, P.M. 2006. Aminoglycosides. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th ed., Ames, Blackwell publishing. p207-229.
51. Dowling, P.M. 2006. Miscellaneous antimicrobials: ionophores, nitrofurans, nitroimidazoles, rifamycins, oxazolidinones, and others. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th ed., Ames, Blackwell publishing. p285-300.
52. Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Floret, D., Etienne, J., Richet, H. 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France : emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. Clinical Infectious Diseases. 35, p819-824.
53. Durand, G., Bes, M., Meugnier, H., Enright, MC., Forey, F., Liassine, N., Wenger, A., Kikuchi, K., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J. 2006. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community- acquired infections in France. Journal of Clinical Microbiology. 44: p847-853.
54. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schkeufer, KH., Stackebrandt, E. 2006. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3^{ème} éd. ; Springer, New-York, Volume 4, Chapitre. 1.2.1. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p4-75.
55. Edmiston Jr. CE., Seabrook, GR., Cambria, RA., Brown, KR., Lewis, BD., Sommers, JR., Krepel, CJ., Wilson, PJ., Sinski, S., Towne, JB. 2005. Molecular epidemiology of microbial contamination in the operating room environment: Is there a risk for infection? Surgery. 138 (4), p573-582.
56. Ellis, NW., Hospenthal, DR., Dooley, DP., et al. Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in soldiers. Clinical Infectious Diseases. 2004; 39, p971-979.
57. Ercolini, D., G. Blaiotta, V. Fusco et S. Coppola. 2004. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. Journal of Applied Microbiology. 96:1090-1096.
58. Erskine Ron, Cullor. J et al. 2004. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antimicrobial drugs. nmc annual meeting proceedings. p400-414.
59. Etienne, J., Gerbaud, G., Fleurette, J., Courvalin, P. 1991. Characterization of staphylococcal plasmids hybridizing with the fosfomycin resistance gene *fosB*. FEMS Microbiol Lett. 68, p119-122.

60. Fabre JM, Morvan H, Lebreux B, Houffschmitt RM, Langridge S, Booth JM. 1997. Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France, partie 2 : mammites subcliniques. *Bull. GTV*, 3 : 17-23.
61. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(4):836-871.
62. Fluit, AC. 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Infectious*. 18, p735-744.
63. Foster TJ, Höök M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiology*. 6(12): 484-8.
64. Foster, T. J., J. A. Geoghegan, V. K. Ganesh et M. Hook. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*. 12:49-62.
65. Foster, T. 1996. *Staphylococcus*. In: S. Baron, Editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston.
66. Galmiche JM. 1999. HYGIENE et MEDECINE. Histoire et actualités des maladies nosocomiales. Editions Louis Pariente, Paris.
67. Garzoni, C. & W. L. Kelley. 2011. Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *EMBO Molecular Medicine*. 3:115-117.
68. Gentilini E, Denamiel G, Lorente P, godaly S, Rebuelto M, Degregorio O. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal Dairy Science* ;83 (6). 1224-1227.
69. Giannechini R, Concha C, Rivéro R, Delucci I, Moreno Lopez J. 2002. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 43 (4) : 221-230.
70. Giguère, S. Macrolides, azalides and ketolodes. In *Antimicrobial therapy III veterinary medicine*. 4th ed., Ames, Blackwell publishing, 2006. 191-205.
71. Giguère, S. Tetracyclines and glycyclines. In *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed., Arnes, Blackwell publishing, 2006. 231-240.
72. Gillaspay, A. F. & J. J. Iandolo. 2009. *Staphylococcus*. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. M. Schaechter. Oxford. Academic Press. p. 293-303.
73. Goetghebeur, M., P. A. Landry, D. Han & C. Vicente. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a public health issue with economic consequences. *Can. Journal Infectious. Diseases. Med. Microbiology*. 18:27-34.

74. Graham, P. L., 3rd, S. X. Lin et E. L. Larson. 2006. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann. Intern. Med.* 144:318-325.
75. Guerin –Fauble V, Brun Y. 1999. Les résistances aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine animale. *Rec. Med. Vet.*, 150 : 299-312.
76. Guiraud J.P. 1998. Microbiologie alimentaires. Edition Dunod, Paris. pp 314-320
77. Hennekine, JA., Kerouanton, A., Brisabois, A., De Buyser, ML. 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *Journal of Applied Microbiology.* 94, p321-329.
78. Hennekinne, J. A., M. L. De Buyser et S. Dragacci. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews.* 36:815-836.
79. Hirsh, D.C., Biberstein, E.L. 2004. *Staphylococcus*. In *Veterinary microbiology*. 2nd ed. Oxford, Blackwell Publishing. 153-158.
80. Hisata, K., Kuwahara-Arai, K., Yamanoto, H., et al. 2005. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *Journal of Clinical Microbiology.* 43, p3364-3372.
81. Holden, M. T., Feil, E. J, J. A. Lindsay , S. J. Peacock, N. P. J. Day, M. C. Enright, T. J. Fooster, C. E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. D. Bentley, C. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell et B. G. Spratt. 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.
82. Hossainl-Hilali J. 2003. Analyse de lait du grand mélange comme outil de gestion des élevages laitiers. XXème Congrès Vétérinaire Maghrébin, 8 et 9 mai 2003, Fès Maroc.
83. ISO. 17604. 2003. Microbiologie des aliments : Prélèvement d'échantillons sur carcasses en vue de leur analyse microbiologique. pp 4.
84. ISO. 6888. 1983. Microbiologie des aliments : Directives générales pour le dénombrement de *S.aureus* – Méthode par comptage des colonies.
85. ISO. 7218. 2003. Microbiologie des aliments : Règles générales pour les examens microbiologiques. pp 6.
86. Joffin C ; Joffin J.N 1999. Microbiologie alimentaire. CRDP AQUITAINE. 5ème édition. p212.

87. Joffin JN, Leyral G. Microbiologie technique : 1 'Dictionnaire des techniques'. 3ème Edition, Bordeaux : Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, 2001 ; 320 p.
88. JORADP. Journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire. 1998. arrêté interministeriel du 27 Mai 1998. Critères microbiologiques de denrées alimentaires. Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire. n° 35/98.
89. Jorgensen, H. J., T. Mork, H. R. Hogasen & L. M. Rorvik. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. Journal of Applied Microbiology. 99:158-166.
90. Kaneko, J. et Kamio, Y. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68:981-1003.
91. Kara Terki Ibtissem. 2014. Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat, université de Tlemcen, Algérie. p51
92. Kaszanyitzky, E. J., Z. Egyed, S. Janosi, J. Keseru, Z. Gal, I. Szabo, Z. Veres, and P. Somogyi. 2004. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. Acta Veterinaria Hung 52:7-17.
93. Kato Y, Suzuki T, Ida T, Maebashi K, Sakurai M,1, Shiotani J, Hayashi I. 2008. Microbiological and clinical study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying *VraS* mutation: changes in susceptibility to glycopeptides and clinical significance. International Journal of Antimicrobial Agents ; 31: 64–70.
94. Kitai, S., A. Shimizu, J. Kawano, E. Sato, C. Nakano, T. Uji, and H. Kitagawa. 2005. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. Journal Vet Med Sci 67:107-10.
95. Kloos, WE., Zimmerman, RJ., Smith, RF.1976. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. Applied and Environmental Microbiology. 31, p53-49.
96. Krakauer T., Stiles, B.G. 2013. The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings. Virulence. 4:759-773.
97. Kudinha T, Simango C. 2002. Prévalence of coagulase négative staphylococci in bovine mastitis in Zimbabwe. Journal of the South Africa Veterinary Association 73 (2) : 62-65.

98. Kum W. W. S., Cameron S. B., Hung R. W. Y, Kalyan S. et. Chow A. W. 2001. Temporal sequence and kinetics of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine secretion induced by toxic shock syndrome toxin 1 in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*. 69:7544-7549.
99. Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kabayashi, L. Cui, A. Ogushi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutami-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kenehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furaya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi et K. Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357: 1225-1240.
100. Kwon N.H., Park K.T., Jung W.K., Lee Y., Kim S.H., Bae W, Lim J.Y., Kim J.Y., Kim J.M., Hong S.K., Park Y.H. 2006. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Veterinary Microbiology* 117, 304-312.
101. Kwon, N. H., K. T. Park, J. S. Moon, W. K. Jung, S. H. Kim, J. M. Kim, S. K. Hong, H. C. Koo, Y. S. Joo, and Y. H. Park. 2005. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 56:624-32.
102. Lachica, R.V.F., Genigeorgis, C., et Hoeprich, P.D. 1971b. Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Applied Microbiology*. 21, 585-587.
103. Lachica, R.V.F., Hoeprich, P.D., et Genigeorgis, C. 1971a Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase catalase positive cocci. *Applied Microbiology*. 21, 823-826.
104. Lafi S. Al-Rawashdeh D, Na'was T, Hailat N. 1994. National cross-sectional study of mastitis in dairy cattle in Jordan. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 26 : 168-174.
105. Lam, T.J.G.M., van Wuyckhuise, L.A., Franken, P., Morselt, M.L., Hartman, E.G., Schukken, Y.H. 1996. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 208. 1705-1708.
106. Langlet S, Quentin G, Contant G, Ghnassia C.J. 1999. Method chromogénique d'identification rapide de *Staphylococcus aureus*. *Annales de Biologie clinique*. 57 (2) : 191-6.

107. Larkin, E. A., R. J. Carman, T. Krakauer & B. G. Stiles. 2009. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Current Medicil Chemistry*. 16:4003-4019.
108. Le Loir, Y., F. Baron & M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research*. 2:63-76.
109. Lee CK, Glenn DJ. 1995. Cefotaxime and ceftriaxone use evaluation in pediatrics. Consideration of cost-effectiveness. *Diagnostic and Microbiology Infectious Diseases*. 22:231-233.
110. LEE, J.H. 2003. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied Environmental Microbiology* ; 69(11). 6489-6494.
111. Levine, D. P. 2006. Vancomycin: a history. *Clinical Infectious Diseases*. 42: S5-12.
112. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 43(5). 1062-1066.
113. Lina, G., G. A. Bohach, S. P. Nair, K. Hiramatsu, E. Jouvin-Marche & R. Mariuzza. 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *Journal of Infectious Diseases*. 189:2334-2336.
114. Loeb, L. 1903. The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *Journal of Medical Research*. 10 :407-419.
115. Longo F, Beguin JC, Consalvi PJ, Deltour JC. 1994. Quelques données épidémiologiques sur les mammites Subcliniques de la vache laitière. *Rev. Med. Vet.*, 145 (1) : 43-47.
116. Lowy, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*. 339:520-32.
117. Lowy, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*.111(9).1265-1273,
118. Lozano, C., M. Lopez, E. Gomez-Sanz, F. Ruiz-Larrea, C. Torres, and M. Zarazaga. 2009. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64:1325-6.

119. Mack D., Nedelmann M., Krokotsch A., Schwarzkopf A., Heesemann J., Laufs R. 1994. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infectiology and Immunology*. 62, 3244- 3253.
120. Maguire H.C.F., Boyle M., Lewis M.J., Pankhurst J., Wieneke A., Jacob M., Bruce J. et O'Mahony M. (1991). – A large outbreak of food poisoning of unknown aetiology associated with stilton cheese. *Epidemiology and Infection*, 106, 497-505.
121. Makris G, Wright D.J, Ingham E, et Holland T.K. 2005. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus*- a virulence factor? *Microbiology*. p 150.
122. Malik S, Christensen H, Peng H, Barton MD. 2007. Presence and diversity of the beta-lactamase gene in cat and dog staphylococci. *Veterinary Microbiology*. 123(1-3):162-8.
123. McGavin , M. J. , C. Zahradka , K. Rice , and J. E. Scott . 1997. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease . *Infection and Immunity*. 65 : 2621 – 2628.
124. Meyrand, A., S. Boutrand-Loei, S. Ray-Gueniot, C. Mazuy, C. E. Gaspard, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre et C. Vernozy-Rozand. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *Journal of Applied Microbiology*. 85:537-544.
125. Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Villa R, Boettcher P, Carli S. 2006. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. *Journal of Dairy Science* ;89(8):2973-2976.
126. Morris, DO. Lautenbach, E., Zaoutis, T., Leckerman, K., Edelstein, PH., Rankin, SC. Potential for pet animals to harbour methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* when residing with human MRSA patients. *Zoonoses Public Health*. 2012; 59: p286-293.
127. Myllys V, Asplund K, Broefeldt E, Hirvel. Koski V, Honkanen, Buzalski T, Junttila J, Kulkas I. 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995. changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 39 : 119-126.
128. NCCLS. 1999. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement M100-S9, 19(1). National Committee for Clinical Laboratory Standard.

129. Neave FK. 1975. Diagnostic of mastitis by bacteriological methods alone. In: Seminar on mastitis control, Doc. 85, International Dairy Federation, DODD F.H., Griffin T.K., Kingwill R.G.,Eds. Brussels, Belgium : 341-344.
130. Nguyen, MH., Kauffman, CA., Goodman, RP. 1999. Nasal carriage and infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patient. Ann Intern Med. 130, p221-225.
131. Nichol, K. A., H. J. Adam, Z. Hussain, M. R. Mulvey, M. McCracken, L. F. Mataseje, K. Thompson, S. Kost, P. R. S. Lagacé-Wiens, D. J. Hoban & G. G. Zhanel. 2011. Comparison of community-associated and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada: results of the CANWARD 2007–2009 study. Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. 69:320-325.
132. Norman no, G., A. Firinu, S. Virgilio, G. Mula, A. Dambrosio, A. Poggiu, L. Decastelli, R. Mioni, S. Scuota, G. Bolzoni, E. Di Giannatale, A. P. Salinetti, G. La Salandra, M. Bartoli, F. Zuccon, T. Pirino, S. Sias, A. Parisi, N. C. Quaglia et G. V. Celano. 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology. 98:73-79.
133. Normanno, G., M. Corrente, G. La Salandra, A. Dambrosio, N. C. Quaglia, A. Parisi, G. Greco, A. L. Bellacicco, S. Virgilio et G. V. Celano. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. International Journal of Food Microbiology. 117:219-222.
134. O’Neill, AJ., McLaws, F., Kahlmeter, G., Henriksen, AS., Chopra, I. 2007. Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 51, p1737- 1740.
135. O’Riordan, K. et Lee J. C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clinical Microbiology Reviews. 17: 218-234.
136. Ostyn, A., M. L. De Buyser, F. Guillier, J. Groult, B. Felix, S. Salah, G. Delmas et J. A. Hennekinne. 2010. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E in France. Euro. Surveill. 15:1-4.
137. Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. Microbiology and immunology.322: 207-228.
138. Owens WE, Ra CH, Watts JL, Ancey rj. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. Journal of Dairy Science. 80(2). 313-317.
139. Peacock S J. 2006. *Staphylococcus aureus* in: Principales and practice of clinical bactériology. 2nd edition. England: John Wiley et Sons Ltd. p 76.

140. Peles F, Wagner M, Varga I, Hein I, Rieck P, Gutser K, Keresztüri P, Kardos G, Turcsányi I, Bérib, Szabo A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. international journal of food microbiology 118, 186-193.
141. Pereira V., Lopes C., Castro A., Silva J., Gibbs P., Teixeira P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiology 26, 278-282.
142. Peschel, A. et M. Otto. 2013. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nature Reviews Microbiology. 11:667-673.
143. Pezzlo, M. (ed). 1994. Aerobic bacteriology, p. 1.0.0.-1.20.47. In H. D. Isenberg (ed), Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1. American Society for microbiology, Washington, D. C.
144. Piccinini, R., V. Borromeo et A. Zecconi. 2010. Relationship between *Staphylococcus aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. Veterinary Microbiology. 145:100-105.
145. Podbielska, A., H. Galkowska et W. L. Olszewski. 2011. Staphylococcal and enterococcal virulence - a review. Cent. Eur. J. Immunol. 36:56-64.
146. Poncholi V. Staphylococcal extracellular surface enzymatic activity. In: *Staphylococcus aureus* infection and Disease. USA: Kluwer Academic Publishers, 2002; p 145.
147. Poole, K. 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. Cell Mol Life Sci. 61(17). 2200-2223.
148. Prescott, Harley, and Klein. 2003. Microbiologie, 2ime française ed. De Boeck Université.
149. Prescott, J.F. 2006. Beta-lactam antibiotics: penam penicillins. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th ed., Ames, Blackwell publishing.. 121-137.
150. Proietti, P. C., G. Coppola, A. Bietta, M. L. Marenzoni, D. R. Hyatt, M. Coletti & F. Passamonti. 2010. Characterization of genes encoding virulence determinants and toxins in *Staphylococcus aureus* from bovine milk in central Italy. Journal Vet. Med. Science. 72:1443-1448.

151. Pu, S., F. Han, and B. Ge. 2009. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Applied Environmental Microbiology*. 75:265-7.
152. Public Health Agency of Canada. 2013. Protecting Canadians from illness. CHICA-National Education Conference. Dr Howard Noo. Retrieved May 21, 2014 from http://www.ipac-canada.org/conf/13_presentations/tuesday_njoo_phacupdateFre.pdf.
153. Pyörälä S. 1995. Staphylococcal and streptococcal mastitis. In : Sandholm. M, Honkanen-Busalski .T., Kaartinem. I., Pyörälä. M. (eds), *The bovine udder and mastitis*. Edition Helsinki, 143-148.
154. Rahal K. 2005. Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Vétérinaire à l'échelle Nationale selon les recommandations de l'OMS. 3^{ème} édition, 2005.p18-24
155. Rahal k. 2007. 9^{ème} rapport d'évaluation de la résistance des bactéries aux antibiotiques en Algérie, projet de l'OMS. p 76
156. Ramoul A. 2014. Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses. Thèse de doctorat, université d'Annaba, Algérie. p 80
157. Raulin, O., G. Durand, Y. Gillet, M. Bes, G. Lina, F. Vandenesch, D. Floret, J. Etienne et F. Laurent. 2010. Toxin profiling of *Staphylococcus aureus* strains involved in varicella superinfection. *Journal of Clinical Microbiology*. 48:1696-1700.
158. Rayman, M.K., Park, C.E., Philpott, J., et Todd, E.C.D. 1975. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology*. 29, 451-454.
159. Rebiahi Sid ahmed. 2012. Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat, université de Tlemcen, Algérie.
160. Rediske A. M., Roeder B.L ., Brown M.K ., Nelson J.L ., Robison R.L., Draper D.O., Schaalje G.B., Robison R.A., Pitt W.G. 1999. Ultrasonic enhancement of antibiotic action on *Echerichia coli* biofilm: an in vivo model. *Antimicrobial agent and chemotherapy*. 43(5) :1211-1214.
161. RADP, 2011. République Algérienne Démocratique et Populaire, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction des services vétérinaires, Liste des substances pharmalogiquement actives prohibées en médecine vétérinaire, mai 2011.

162. Robert D, 2013. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive. Thèse de docteur d'état en pharmacie, Université d'Angers, France, p :26
163. Roche, F. M, M. Meehan et T. J. Foster. 2003. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology*. 149: 2759-2767.
164. Rola Jolanta, G., W. Korpysa-Dzirba et J. Osek. 2013. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins at different stages of production of raw milk cheeses - preliminary results. *The Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*. 57:341-345.
165. Romain HT, Adesiyun AA, Webb LA , Lauckner FB. 2000. Study on risk factors and their associations with subclinical mastitis in lactating dairy cows in Trinidad. *Journal of Veterinary Medicine*. B, 47 : 257-271.
166. Sabour PM, Gill JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R, Leslie K. 2004. Molecular typing and distribution of staphylococcus aureus isolates in eastern canadian dairy herds. *Journal of clinical microbiology*. 42(8). 3449-3455.
167. Salaun S. 2009. Interaction entre la macroalgue brune *Laminaria Digitata* et ses epibiontes bactériens : étude moléculaire et spectroscopique et capacité d'adhésion et formation de biofilm. Thèse de doctorat : Université de Bretagne Sud. p265.
168. Salmon SA, Watts JL, Aarestrup FM, Pankey JW, Yancey RJ. 1998. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *Journal of Dairy Science*. 81(2).570-578.
169. Salyers, A. A., and D. D. Whitt. 2002. *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach*, Second Edition ed. ASM Press, Washington, D.C.
170. Saxena RK, Dutta GN, Borah R, Duragohain J. 1993. Incidence and etiology of bovine subclinical mastitis. *Indian Veterinary Journal*., 70 : 1079-1080.
171. Schlegelova J, Rysanek D, Sediva I, Babak V. 2001. Comparison of methods for the determination of antimicrobial resistance in *staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *j vet med B infect dis vet public health*. 48(1):21-29.
172. Schmitz FJ, Higgins PG, Mayer S, Fluit AC, Dalhoff A. 2002. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 21(9). 647-659.

173. Schmitz FJ, Veldkamp KE, Van Kessel KP, Verhoef J, Van Strijp JA. 1997. Delta-toxin from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *Journal of Infectious Disease*. 176(6): 1531-7.
174. Schroeder, K, M. Jularic, S. M. Horshburg, N. Hirschhausen, C. Neumann, A. Berteling, A. Schulte, S. Foster, B.E. Kehrel, G. Peters et C. Heilmann. 2009. Molecular characterization on a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS ONE Journal* 4: e7567-e7581.
175. Seddek SR, El Kader HAA, Abd-El Hafeez MM. 1999. Bacteriology studies of subclinical mastitis in Friesian cattle in Assiut Governorate. *Assiut Vet. Med. J.*, 42 (83) : 77-88.
176. Serieys, M. Gicquel-bruneau. 2005. Homogénéité intra-troupeau des souches de *Staphylococcus aureus* de mammites sub-cliniques pour la production de β -lactamase et la résistance à la pénicilline. *Renc. Rech. Ruminants*, (12), p267-270
177. Sharp, S. E. et C. Searcy. 2006. Comparison of mannitol salt agar and blood agar plates for identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* in specimens from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:4545-4546.
178. Shitandi A, Sternesjo A. 2004. Prevalence of multidrug resistant *staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in kenya. *Journal dairy science* ; 87(12):4145-9.
179. Smith, AJ., Jackson, MS., Bagg, J. 2001. The ecology of staphylococcus species in the oral cavity. *Journal of Medical Microbiology*. 50, p940-946.
180. Sneath, P. H. A. 1986. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed, vol. 2. Williams et Wilkins, Baltimore.
181. Soares, J. C., M. R. Marques, F. K. Tavarria, J. O. Pereira, F. X. Malcata & M. M. Pintado. 2011. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*. 146:123-129.
182. Sperber, W. H. et S. R. Tatini, 1975. Interpretation of tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 29: 502-505.
183. Su, Y.-C. et A. C. Lee Wong. 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Food Prot.* 60:195-202.

184. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Littauer P, Dahl KH. 2004. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. 112(11-12):815-837.
185. Sutra, L., M. Frederighi, J. L. Jouve. 1998. Manuel de Bactériologie Alimentaire. Paris. Polytechnica. 308 pp.
186. Tally P.F. 1999. Les staphylocoques, abcès et autres maladies. In : Microbiologie et pathologie infectieuse, 2ème édition. De Boeck. pp 192-193.
187. Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in brandenburg, germany. Journal of dairy science ; 89(7):2542-51.
188. Thornsberry Y C, Marler JK, Watts JL, Yancey RJ JR. Activity of pirlimycin against pathogens from cows with mastitis and recommendations for disk diffusion tests. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 1993 May;37(5):1122-6.
189. Touch, V. et H. C. Deeth. 2009. Microbiology of raw and market milks Milk processing and quality management. United Kingdom. Blackwell. 324 pp.
190. Tuscherr, L., E. Medina, M. Hussain, W. Volker, V. Heitmann, S. Niemann, D. Holzinger, J. Roth, R. A. Proctor, K. Becker, G. Peters et B. Löffler. 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. EMBO Molecular Medicine. 3:129-141.
191. Tuscherr, L., V. Heitmann, M. Hussain, D. Viemann, J. Roth, C. von Eiff, G. Peters, K. Becker et B. Löffler. 2010. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. Journal of Infectious Diseases. 202:1031-1040.
192. van Loo, I. H., B. M. Dierenen, P. H. Savelkoul, J. H. Woudenberg, R. Roosendaal, A. van Belkum, N. Lemmens-den Toom, C. Verhulst, P. H. van Keulen, and J. A. Kluytmans. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. Emerging Infectious Diseases 13:1753-5.
193. Villeneuve, Y., S. Gingras et M.-A. St-Yves. 2007. Étude sur l'évolution de *Staphylococcus aureus* lors de la transformation fromagère au lait cru. 31 pp
194. Vincenot.F, Saleh.M, Prévost.G. 2008. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Revue francophone des laboratoires. 407:61-69.

195. Vintov J, Aarestrup FM, Elsberg Zinn C, Olsen JE. 2003. Phage types and antimicrobial resistance among danish bovine *Staphylococcus aureus* isolates since the 1950s. *veterinary microbiology* ; 97(1-2). 63-72.
196. Walker, R.D., Dowling, P.M. 2006. Fluoroquinolones. In *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed., Ames, Blackwell publishing. 263-284.
197. Wallin-Carlquist, N., D. Marta, E. Borch et P. Radstrom. 2010. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. *International Journal of Food Microbiology*. 141 Suppl 1:S69-74.
198. Wang, S., C. Wu, J. Shen, Y. Wu et Y. Wang. 2013. Hypermutable *Staphylococcus aureus* strains present at high frequency in subclinical bovine mastitis isolates are associated with the development of antibiotic resistance. *Veterinary Microbiology*. 165:410-415.
199. Waston, K., Carville, K., Bowman, J., Jacoby, P., Riley, TV., Leach, AJ., Lehmann, D. Upper Respiratory Tract Bacterial Carriage in Aboriginal and Non-Aboriginal Children in a Semi-Arid Area of Western Australia. *Pediatr infec Dis J*. 2006; 25, p782-790.
200. Watts, IL., Salmon, S.A. 1997. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce beta-lactamase. *Journal of Dairy Sciece*. 80(4).788-791.
201. Weese, J. S., B. P. Avery, and R. J. Reid-Smith. 2010. Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Lett Appl Microbiol* 51:338-342.
202. Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL, Schwarz S. 2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Research* .32(3-4). 341-362.
203. Williams, RE. 1963. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriology Reveys*. 27, p56-71.
204. Wooton, SH., Arnold, K. Hill, HA, et al. 2004. Intervention to reduce the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections in a correctional facility in Georgia. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 25, p402-407.
205. Xia G, Kohler T, Peschel A. 2010. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 300:148–154.)

206. Yoshimura H, Ishimaru M, Kojima A. 2002. minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in japan. j vet med b infect dis vet public health ;49 (9).457-460.
207. Yu, VL., Goetz, A., Wagener, M. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis: efficacy of antibiotic prophylaxis. New England Journal of Medicine.1986; 315, p91-96.
208. Zinderman, CE., Byron, C., Malakooti, MA, et al. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among military recruits. Emerging infection Diseases. 10, p941-944.
209. Zinegesser J, Daye Y, Lopez V, Grant G, Bryan L, Kearney M, Hugh-Jones ME. 1991. National survey of clinical and subclinical mastitis in Jamaican dairy herds. 1985-86. Trop. Anim. Hlth. Prod. 23, 2-10.
210. Zobel C.E. 1943. The effect of solid surface upon bacteria activity. Journal of bacteriology.46 :39-56.

ANNEXES

Annexe 1

Valeurs des diamètres des zones d'inhibition pour *S. aureus* (CASFM, Vétérinaire 2013)

Antibiotique	Charge du disque	Diamètre critique (mm)		
		S	I	R
Penicilline	10 UI	≥29	-	<29
Céfoxitine	30 µg	≥27	-	<25
Gentamicine	15µg	≥20	-	<20
Chloramphicol	30 µg	≥22	-	<19
Oxacilline	5µg	≥20	-	<20
Triméthoprim/Sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≥19	-	<10
Tétracycline	30 UI	≥19	-	<17

(CASFM, 2015)

Antibiotique	Charge du disque	Diamètre critique (mm)		
		S	I	R
Gentamicine	10 µg	≥18	-	<18
Chloramphicol	30 µg	≥18	-	<18
Acide fusidique	10 µg	≥24	-	<14
Tobramycine	10 µg	≥18	-	<18

µg : microgramme S : sensible R : résistant

(CASFM, 2012)

Antibiotique	Charge du disque	Diamètre critique (mm)		
		S	I	R
Fosfomycine	50 µg	≥14	-	<14
Amikacine	30 µg	≥17	-	<15
Lincomycine	15 µg	≥21	-	<17
Ofloxacine	5 µg	≥22	-	<22

(CASFM, 2007)

Antibiotique	Charge du disque	Diamètre critique (mm)		
		S	I	R
Novobiocine	30 µg	≥18	-	<17
Amikacine	30 µg	≥17	-	≤14

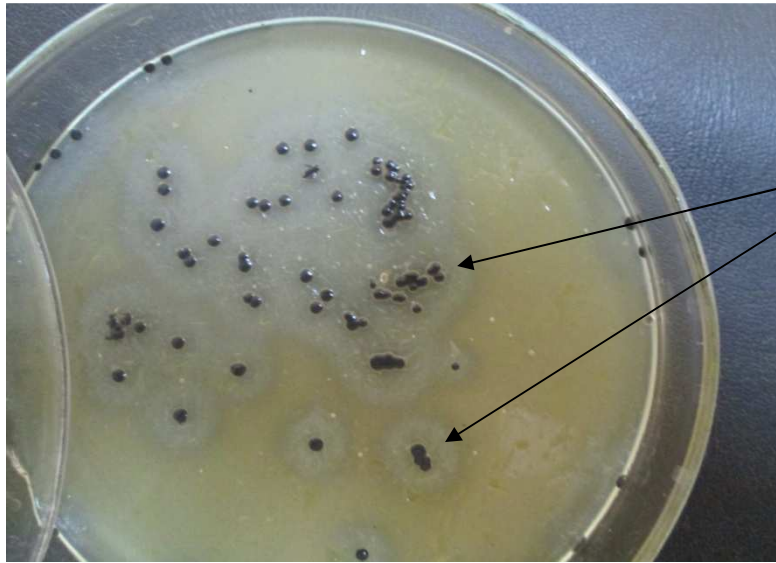
(CLSI, 2008)

Antibiotique	Charge du disque	Diamètre critique (mm)		
		S	I	R
Vancomycine	30 µg	≥15	-	-
Gentamicine	10 µg	≥15	13-14	<12

µg : microgramme S : sensible R : résistant

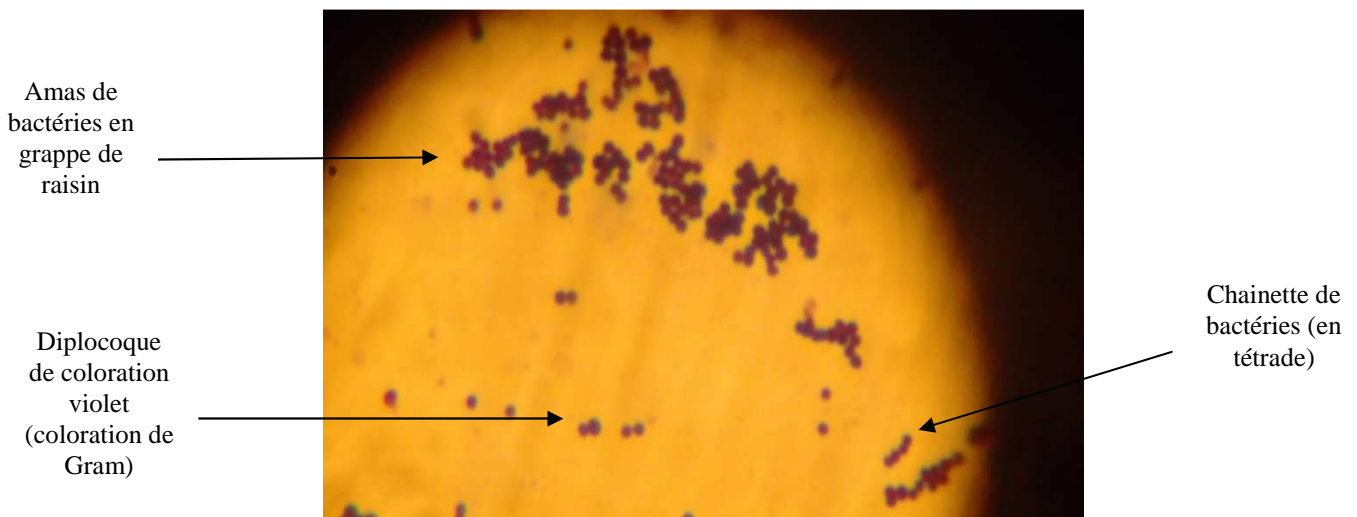
Annexe 2 :

Photos personnelles



Zones claires dues à l'hydrolyse des protéines par des colonies présumptives de *S. aureus*

Photo : dégradation des protéines (zone d'éclaircissement)



Amas de bactéries en grappe de raisin

Diplocoque de coloration violet (coloration de Gram)

Chainette de bactéries (en tétrade)

Photo : bactéries sous microscope optique 10X

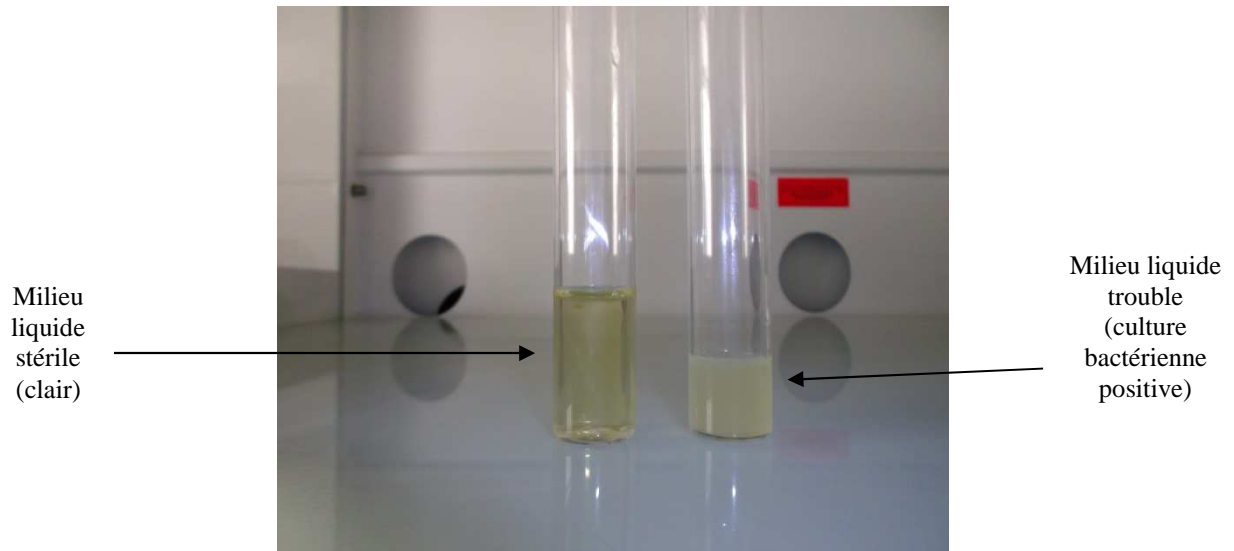
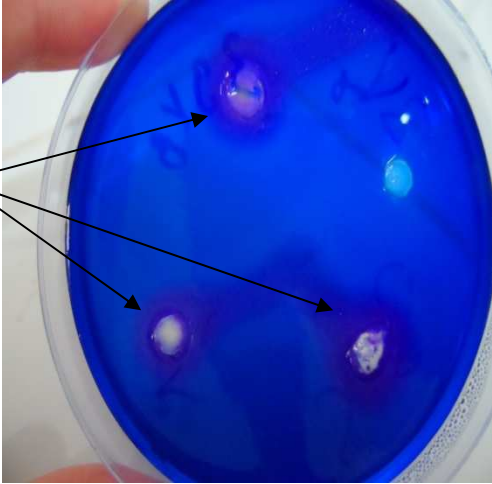


Photo : culture bactérienne en milieu liquide



Photo : Résultat du test de la coagulase

Zone rose
au tour des
cupules



Rayon violet
dû à la
préparation
enzymatique
(écoulement
accidentel)

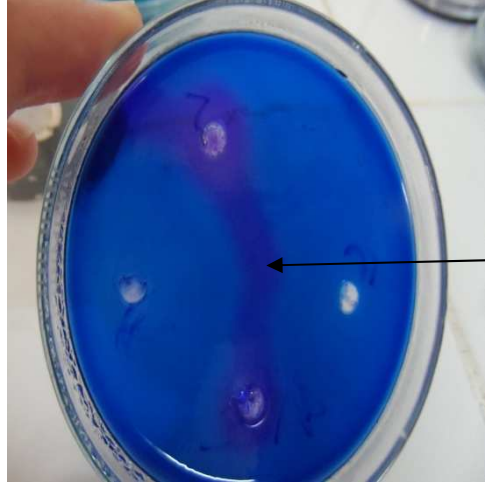


Photo : Résultat du test DNase thermostable

Disque de
Pénicilline

Disque
d'Oxacilline

Disque de
Triméthoprime/
Sulfaméthoxazole

Disque de
Fosfomycine

Disque de
Sulfaméthoxazole
(à titre d'essai)

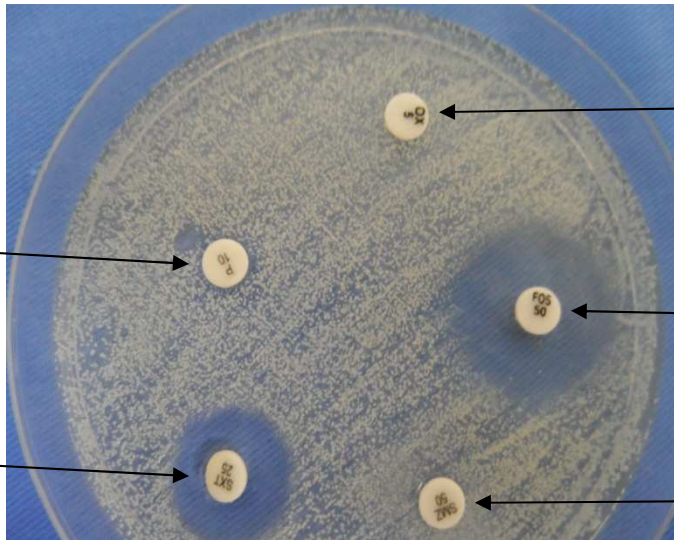


Photo : Résultat d'antibiogramme

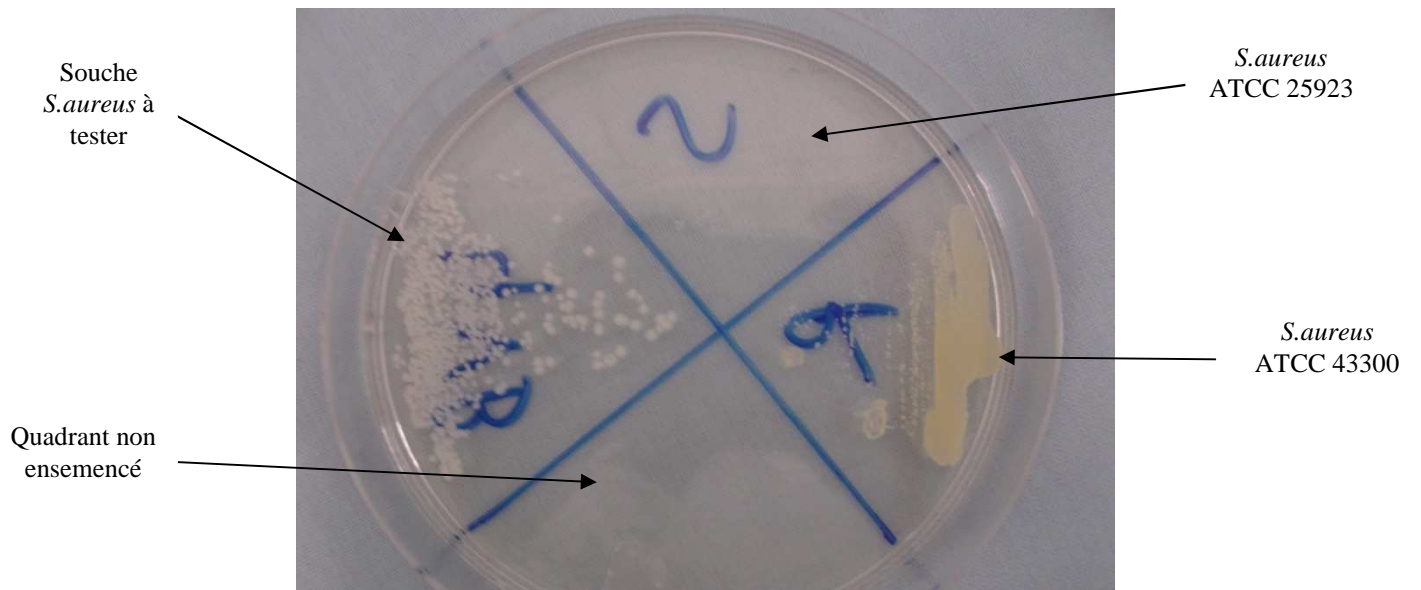


Photo : Résultat du test MRSA

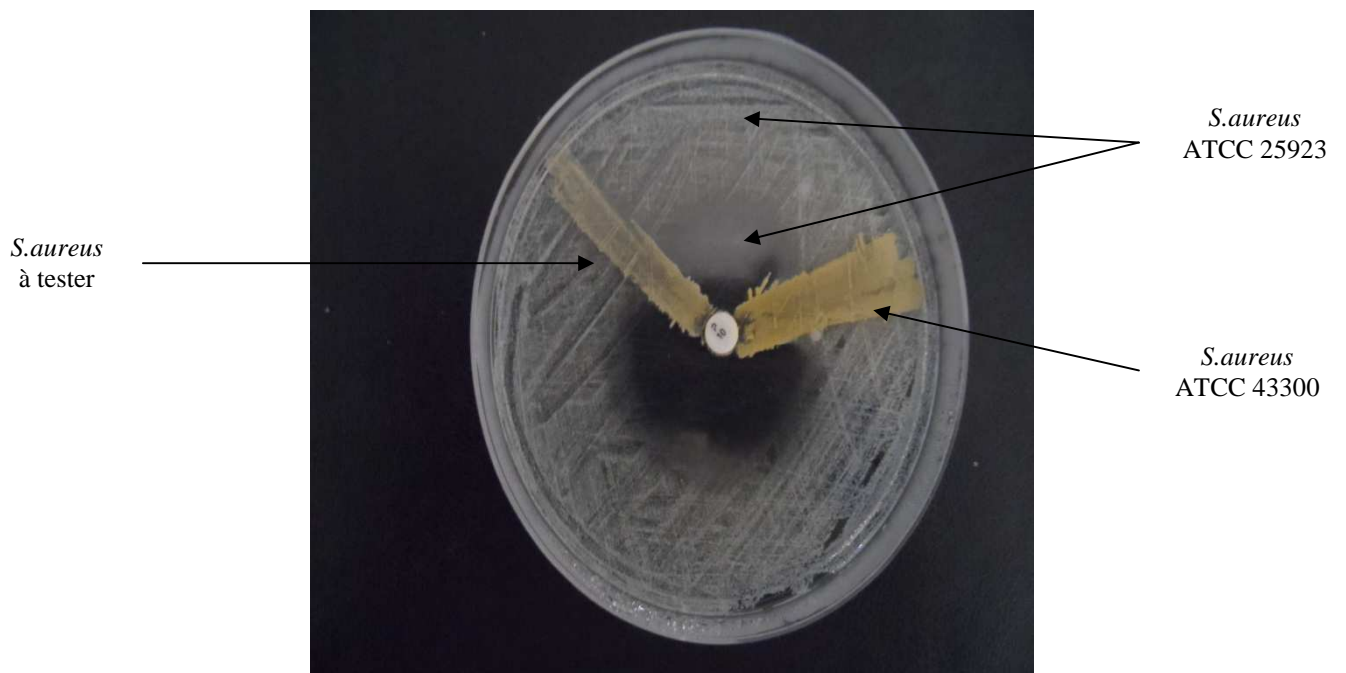


Photo : Résultat de « test du trèfle »

Développement de colonies de *S. aureus* même en présence de concentration en antibiotique

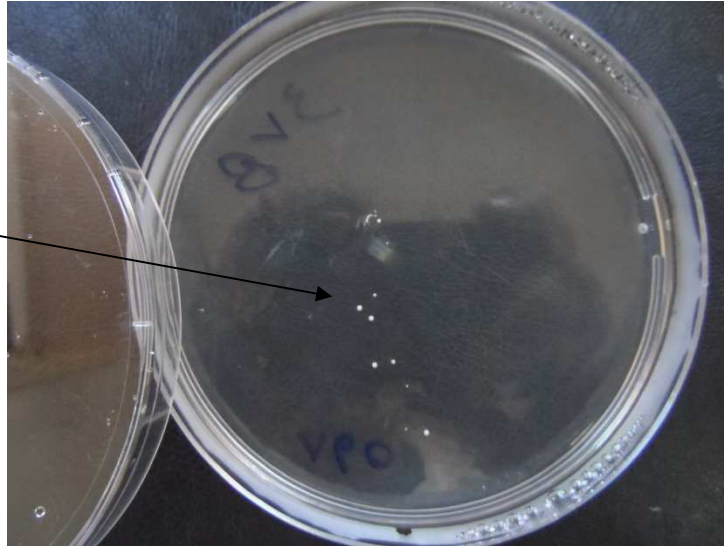
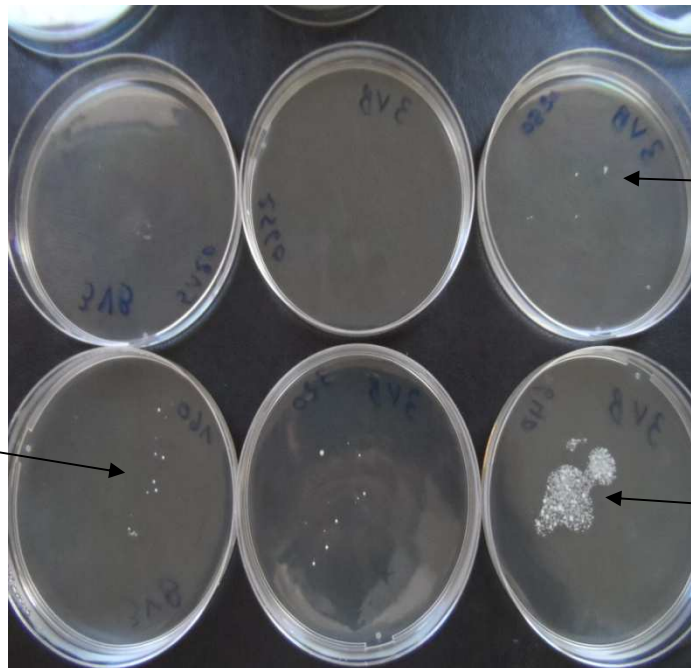


Photo : Résultat de la CMI

Colonies de *S.aureus* à 16 $\mu\text{g/ml}$



Colonies de *S.aureus* même à 128 $\mu\text{g/ml}$

Colonies de *S.aureus* à 64 $\mu\text{g/ml}$

Photo : Résultat de la CMI

RESUMES

Résumé :

S. aureus est une bactérie pathogène des animaux et de l'homme causant plusieurs symptômes chez ceux-ci, allant de simples indigestions, intoxications alimentaires liées à l'ingestion de nourritures contaminées par les entérotoxines staphylococciques jusqu'aux infections sévères cutanées, pulmonaires, septicémiques...etc.

Parmi les problèmes majeurs de ce pathogène, est celui de sa résistance aux antibiotiques réduisant ainsi le choix du traitement et une réussite peu probable.

L'objectif principal est d'estimer la prévalence de *S. aureus* dans le lait cru de vache et de chèvre, et d'établir le phénotype de sa résistance envers certaines familles d'antibiotiques.

Un total de 20 souches ont été isolées et identifiées en utilisant un milieu sélectif et des tests biochimiques.

L'antibiogramme a été réalisé selon la méthode de diffusion sur gélose, suivi par la recherche des *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) par le screening test, et de la production de bêta-lactamase. Enfin, une concentration minimale inhibitrice en milieu solide pour les SARM vis-à-vis de l'oxacilline a été déterminée.

Une forte prévalence (26,31 %), des phénotypes de résistance multiple (95 %) et des fortes CMI (jusqu'à 128 µg/ml) sont les résultats de cette étude.

Quelques approches ont été proposées dans le but de limiter la propagation, l'émergence et le développement de résistance envers les antibiotiques.

Mots clés : *S. aureus*, prévalence, résistance aux antibiotiques, SARM, CMI

Abstract:

Staphylococcus aureus is a bacterial pathogen of animals and humans causing several symptoms, from simple indigestion, food intoxications related to the ingestion of foods contaminated with staphylococcal enterotoxins, to severe infections of the pulmonary and skin, sepsis ... etc.

Among the major problems of this pathogen is the antibiotic's resistance that reducing the choice of treatment and unlikely success.

This study was carried out to estimate the prevalence of *S. aureus* in raw cow's milk and goat, and to establish the phenotype of resistance to certain antibiotics families.

A total of 20 strains were isolated and identified using selective media, and biochemical tests. Antimicrobial susceptibility was tested by the agar diffusion method. screening test was used for search *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA), and the production of beta-lactamase was performed. Finally. The MRSA minimum inhibitory concentration against oxacillin was determined by solid medium.

High prevalence (26.31%), multidrug resistance phenotypes (95%) and high CMI (128 µg/ml) were the results of this study. Some approaches have been proposed in order to limit the emergence, spread, and development of antibiotics resistance.

Keywords: *S. aureus*, prevalence, antibiotic resistance, MRSA, CMI

ملخص :

Staphylococcus aureus بكتيريا ممرضة للحيوانات والبشر مما يسبب العديد من الأعراض, منها اضطراب هضمي, تسمم غذائي بسبب تناول الأطعمة الملوثة بالانتروتكسن, الالتهابات الجلدية الحادة والرئوية و تعفن الدم ... الخ

و من بين المشاكل الرئيسية هو مقاومتها للمضادات الحيوية مما يقلل من اختيار الادوية ونجاح محتمل.

يتمثل الهدف الرئيسي بتقدير مدى انتشار هذه البكتيريا في الحليب الطازج للبقر والماعز، وإنشاء النمط الظاهري للمقاومة ضد المضادات الحيوية .

تم عزل 20 سلالات و حددت باستخدام وسائل انتقائية و اختبارات بيوكيميائية.

تحليل النمط الظاهري للسلالات المعزولة بواسطة اختبار الحساسية للمضادات الحيوية عن طريق تقنية انتشار المضاد الحيوي في الوسط الصلب.

البحث عن *S. aureus* المقاوم للمثسلين (méthicilline) عن طريق screening test
البحث عن انتاج ال β -lactamase و اخيرا تم تقييم CMI بواسطة اختبار التخفيف في الوسط الصلب لل
Oxacilline

الانتشار الواسع (26.31٪)، ظواهر المقاومة للأدوية المتعددة (95٪) وCMI عالية (128 ميكروغرام / مل) هي نتائج هذه الدراسة. وقد اقترحت بعض النهج من أجل الحد من انتشار، ونشوء وتطور المقاومة للمضادات الحيوية.

كلمات البحث: *S. aureus*, الانتشار, مقاومة المضادات الحيوية, SARM, CMI