

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

**Thème**

**Caractérisation moléculaire de la résistance de  
*Staphylococcus aureus* isolés de la cavité buccale  
des enfants , aux antibiotiques**

Présenté par :

**Ait zenati Souad & Bensalem Sabrina**

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

M. NABTI H

Président

Mme BENACHOUR K

Encadreur

Mme YAHIAOUI H

Examinatrice

**Année universitaire :2020 / 2021**

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents Nourdine et Nadia que j'aime énormément. L'amour et le respect que je leur porte reste pour moi primordiaux. Que ce travail leur apporte joie et fierté. Ce travail, fruit de leurs conseils et encouragements est le cadeau que je puisse leur offrir.*

*Vous mes très chers parents, je vous dis merci.*

*A mes chers frères Soufiane, Karim, Fahem et sa femme Hayat, mes chères sœurs Hakima, Souhila et Nesrine qui m'ont aidé à surmonter toutes les difficultés rencontrées au cours de mes années d'études avec leurs patiences et leurs encouragements.*

*A ma chère copine et ma binôme Souad et toute sa famille.*

*A mes adorables amies : Nabila, Fouzia, Lilia, Lynia, Ryma, et surtout Imene et les autres.*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce Travail.*

***Bensalem Sabrina***

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mon très cher PAPA et ma très chère MAMAN*

*Une simple dédicace ne pourrait en aucun cas exprimer tout l'amour que je porte pour vous. Vous m'avez été tout au long de ma vie, une référence de bonté, d'amour, de générosité et de tendresse. Vos prières m'ont été d'un soutien considérable au cours de ce long parcours. Tous les mots ne sauraient exprimer mon respect, ma considération, gratitude et l'amour éternel et inestimable pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour notre bien à moi et à mes frères et sœurs. Puisse le bon Dieu vous garder et vous procurer santé et longue vie.*

*A mes très chères sœurs NADIRA, SAMIA, NASSIMA et NADJET.*

*A mes très chers frères ABD ELHAK, FARES et HOCINE.*

*A mes petits (es) MALAK, FATIMA, NESSRIN, AJA, YASSMINE, RIMA, HAFSA, YUCEF, ADEM, ALLAOIA, MOHAMED et ABD EL JALIL.*

*A celui qui m'a encouragé jusqu'au bout chère B.Nassim, que notre future vie soit amour, bonheur et santé.*

*A tout mes amies Sabrina, Imen, Célia, Nabila, Lilia, Lina.....*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

*Souad Ait zenati*

## Liste des abréviations

<b>BHIB</b>	Brain Heart Infusion Broth
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CAP</b>	Caprins
<b>CBA</b>	Colombia Blood Agar
<b>MH</b>	Mueller – Hinton
<b>MSA</b>	Mannitol – Salt –Agar
<b>PM</b>	Poid Moléculaire
<b>PVL</b>	Panton – Valentine leucocidin
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
<b>SASM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
<b>SCC</b>	<i>Staphylococcal</i> Cassette Chromosome
<b>SSSS</b>	<i>Staphylococcal</i> scalded skin syndrome
<b>SSTIs</b>	Skin and soft tissu infections
<b>S.aureus</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar
<b>TSST-1</b>	Toxic Shock Syndrom Toxin

## *Liste des tableaux*

Tableau I : Taxonomie de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
Tableau II : Principaux caractères des <i>Staphylocoque</i> .....	4
Tableau III : Principale bactéries à Gram positif et négatif de la cavité buccale.....	12
Tableau IV : Préparation de la gamme d'étalonnage de la BSA ( 0,1 µg /µl).....	19
Tableau V : Préparation de la gamme d'étalonnage des proteines de <i>S.aureus</i> (0,1µg/µl)....	20
Tableau VI : Caractérisation des patients inclus dans l'étude.....	21

## *Liste des figures*

Figure 1 : Image de <i>S.aureus</i> au microscope électronique.....	5
Figure 2 : Historique d'apparition des résistances aux antibiotiques chez <i>S.aureus</i> .....	8
Figure 3 : Schéma de l'anatomie de la cavité buccale.....	9
Figure 4 : Représentation du test de coagulas ( control +, control -).....	17
Figure 5 : Répartition des patients selon la tranche d'âge et le sexe.....	21
Figure 6 : Résultats des échantillons positif et négatif.....	22
Figure 7 : Résultats des échantillons positifs selon le sexe.....	22
Figure 8 : Résultat positif d'un échantillon incubée dans BHIB.....	22
Figure 9 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu Chapman.....	23
Figure 10 : Résultat de la purification sur Chapman .....	23
Figure 11 : Résultat du test de catalase.....	24
Figure 12 : Observation de la capsule du <i>S.aureus</i> sous microscope optique .....	25
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la solution de BSA (1mg/ml) Bradford,(1976).....	25
Figure 14 : Résultats des réactions des protéines de <i>S.aureus</i> avec le réactif de Bradford.....	26
Figure 15 : les concentrations des protéines de <i>S.aureus</i> et le Témoin.....	26

# Glossaire

## **Abcès**

L'abcès est l'accumulation locale de pus après nécrose dans une cavité, peut être superficielle ou profonde

## **Adhésion**

L'adhésion est le processus dynamique permettant à une bactérie de passer de l'état libre à l'état fixé.

## **Anthrax**

L'anthrax est une infection staphylococcique de l'appareil glandulaire pilosébacé, caractérisée par l'agglomération de plusieurs furoncles à tendance nécrosante. L'ensemble rouge vif est violacé à son sommet.

## **Bactériémie**

La bactériémie traduit le passage dans le courant sanguin, dans certaines circonstances, des bactéries de la flore buccale et du foyer infectieux d'origine buccale.

## **Biofilm**

Le biofilm est un film de micro-organismes d'une ou plusieurs espèces, adhérant à une surface submergée ou soumise à un environnement aqueux.

## **Carie dentaire**

La carie dentaire est une maladie infectieuse. Son étiologie, multifactorielle, est intimement liée aux bactéries cariogènes et aux sucres fermentescibles, dans le mécanisme d'acidogénèse.

## **Cellulite**

Cellulite infectieuse est due à une infection des tissus mous sous-cutanés, liée à la présence d'un streptocoque ou d'un staphylocoque doré.

## **Commensalisme**

Le commensalisme est une relation dont une population tire profit, alors que l'autre n'en subit aucun préjudice et n'en retire aucun bénéfice.

## **Folliculite**

La folliculite est l'infection de l'appareil pilo-sébacé (le poil et sa racine) par un germe qui est le plus souvent le staphylocoque doré. On l'appelle aussi furoncle. Il ressemble à un gros bouton rempli.

## **Furoncle**

Le furoncle est infection aiguë d'un follicule pilosébacé due au staphylocoque aureus.

## **Gingivite**

L'inflammation est confinée à la gencive, Elle est réversible.

## **Impétigo**

L'impétigo est une infection de la peau très contagieuse, généralement bénigne, causée par des bactéries (staphylocoques ou streptocoques) qui pénètrent dans la peau. Le plus souvent, elles infectent une partie fragilisée ou blessée de l'épiderme.

## **Infection focale**

L'infection focale est le processus expliquant l'apparition d'un foyer secondaire à partir d'un foyer primaire.

## **Microbiome**

Le microbiome est l'environnement spécifique du microbiote.

## **Microbiote**

Le microbiote est l'ensemble des micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) dans un environnement spécifique appelé microbiome.

## **Mutualisme**

Le mutualisme (synergisme) est une relation symbiotique dont deux populations tirent profit.

## **Nécrose**

Mort cellulaire ou tissulaire due à une maladie, un traumatisme, une hypoxie, une irradiation, une infection aiguë, etc. ; la constellation de changements qui accompagnent et suivent une lésion cellulaire irréversible dans les organismes vivants.

## **Septicémie**

La septicémie ou sepsis est une infection grave, qui se propage dans l'organisme par voie sanguine à partir d'un foyer infectieux initial. Le plus souvent d'origine bactérienne



## Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

### Synthèse Bibliographique

<b>I. <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>3</b>
1.Historique .....	3
2.Classification phylogénique .....	3
3.Habitat.....	3
4.Caractères bactériologiques.....	4
4.1.Caractères morphologiques.....	4
4.2.Caractères biochimiques.....	5
4.3.Caractères cultureux .....	5
5.Facteurs de virulences .....	6
5.1.Protéines de surfaces .....	6
5.2.Toxines.....	6
6.Profil de résistance.....	8
6.1.Résistance à la Pénicilline.....	8
6.2.Résistance à la Méthicilline.....	9
6.3.Résistance à la Vancomycine.....	9
<b>II. La cavité buccale.....</b>	<b>9</b>
1. Définition.....	9
2. Langue.....	9
3.Salive et les glandes salivaires.....	10
4.Dent.....	10
5.Amygdales.....	10
6.Muqueuse buccale.....	11
7.Flore buccale.....	11

### Methodologie de travail

#### I. Matériel et méthodes

1. Cadre et objectif de l'étude.....	15
2. Prélèvement.....	15
3. Isolement et purification des <i>S.aureus</i> .....	15
4. Identification .....	16
4.1.Coloration de Gram.....	16

4.2. Test de catalase.....	16
4.3. Test de coagulase libre.....	16
5. Antibiogramme.....	17
5.1. Test de l'Oxacilline liquide.....	17
5.2. Test de diffusion du disque de Cefoxitine .....	17
6. La mise en évidence de la capsule.....	18
7. Dosage des proteines par la méthode (Bradford, 1976).....	18
7.1. Préparation de réactif de BRADFORD.....	18
7.2. La solution BSA (Bovin Sérum Albumine).....	19
7.3. Elaboration de la courbe d'étalonnage des proteines.....	19
7.4. Préparation des échantillons.....	19
II. Résultats	
1. Résultats de la caractérisation de la population d'étude.....	21
2. Résultat de l'enrichissement, d'isolement et la purification de <i>S.aureus</i> .....	22
2.1. Enrichissement.....	22
2.2. Isolement.....	22
2.3. Purification.....	23
2.3.1. Vérification de la pureté des souches.....	23
➤ Coloration de Gram .....	23
3. Test de catalase.....	24
4. Test d'identification de <i>S.aureus</i> .....	24
4.1. Test de coagulase.....	24
5. Test de l'Oxacilline liquide .....	24
6. Test de diffusion du disque de Céfoxitine.....	24
7. La capsule.....	25
8. Dosage des proteines.....	25
8.1. Dosage des proteines des <i>S.aureus</i> .....	25

## *Intoduction*

La cavité buccale est la principale interface entre le corps et l'environnement extérieur, surtout pour les tout-petits. Elle abrite un des écosystèmes bactériens les plus complexes de l'organisme. Elle est considérée comme la porte d'entrée principale d'infections dites focales, depuis de nombreuses années. À défaut de trouver l'origine de la pathologie, la bouche est souvent incriminée[1].

En effet, plusieurs centaines d'espèces de microorganismes cohabitent dans la cavité buccale : bactéries, levures, protozoaires et virus. Elle représente donc un réservoir potentiel important de microorganismes pathogènes [2]. Parmi les espèces pathogènes les plus connues dans le monde Bacteria, on distingue *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie appartient à la famille de *Staphylococcaceae* [3]. Elle est responsable de nombreuses infections réfractaires aux traitements, de par ses résistances aux antibiotiques, et sa persistance en milieu biologique.

Dès 1942, sont apparues des souches de Staphylocoque résistantes à la pénicilline par la production de la pénicillinase, rendant nécessaire la recherche de nouveaux antibiotiques. À partir de 1960, la métécilline qui est une bêtalactamine résistante aux pénicillinases, a été utilisée. Comme pour la pénicilline en 1961, *S.aureus* a développé rapidement des résistances vis-à-vis de cet antibiotique ; d'où le terme de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Métécilline (SARM). Et maintenant, plusieurs souches de ce pathogène sont considérées comme multi-résistantes [4].

Au cours de cette étude, on s'est intéressé à l'isolement et l'identification des isolats de *Staphylococcus aureus* à partir des prélèvements de la cavité buccale des enfants malades ayant un âge compris entre 7 jours et 16 ans, au niveau de l'EPH d'Amizour. Le but est la caractérisation moléculaire des SARM, et de tester l'activité des antibiotiques afin de répondre à la problématique suivante : Quel est la nature des protéines à l'intérieur de *S.aureus*, qui leur ont conféré une résistance à la métécilline ?

Ce travail comportera deux parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique sur des généralités sur *Staphylococcus aureus* et la cavité buccale.

## ***Introduction***

- La deuxième partie expose l'expérimentation mise en œuvre pour l'isolement, purification et l'identification de *S.aureus* , et enfin l'étude de la sensibilité des souches de *S.aureus* isolées aux antibiotiques et la caractérisation moléculaire.

## *Synthèse bibliographique*

## ***I. Staphylococcus aureus***

### **1. Historique**

*Staphylococcus aureus* fut découverte en 1870 lors de l'étude microscopique d'échantillons de pus [1]. Ces bactéries furent initialement nommées « micrococci », du grec Kokkos pour grain. Ainsi Robert Koch en 1878 et Louis Pasteur en 1880 décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine [2]. Leur implication possible en tant qu'agents pathogènes ne fut démontrée que plus tard par Alexander Ogston en 1881 [3]. La poursuite de ses travaux aboutit en 1882, à la description des Staphylocoques (du grec « staphyle » pour grappe de raisin), par opposition aux streptocoques (coques en chaîne). Enfin en 1884, Anton J. Rosenbach, chirurgien allemand, isola 2 souches différentes de Staphylocoques qu'il baptisa en fonction de la couleur des colonies obtenues : *S. aureus* (dorées) et *S. albus* (blanches) [4].

### **2. Classification phylogénique**

Il existe plusieurs types de classification de *S. aureus* dont la classification de BERGEY est la plus utilisée (tableau I) [5].

**Tableau 1 : Taxonomie de *Staphylococcus aureus* [6].**

<b>Règne</b>	Bactéria ou Eubacteria
<b>Phylum</b>	Firmicutes
<b>Classe</b>	Bacilli
<b>Ordre</b>	Bacillales
<b>Famille</b>	Staphylococcaceae
<b>Genre</b>	Staphylococcus
<b>Espèce</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>

### **3. Habitat**

*S. aureus* est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino – pharynx, intestin). Chez l'homme, il est principalement présent au niveau du tractus respiratoire supérieure, en particulier dans les fosses nasales [7], mais aussi au niveau du cuir chevelu et les mains. Dans la bouche, il coloniserait préférentiellement la surface des

dents. Cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement, et sa présence due à une contamination par l'homme ou par les animaux [8].

#### **4. Caractères bactériologique :**

Les principaux caractères bactériologiques des staphylocoques sont résumés dans le tableau II.

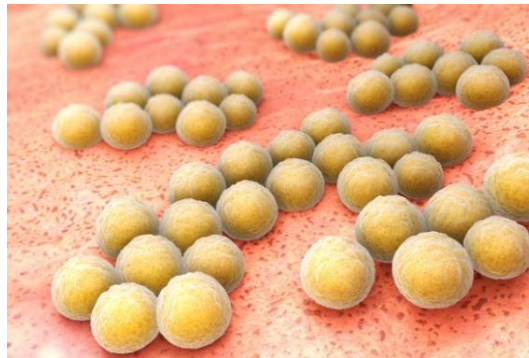
**Tableau II : Principaux caractères des Staphylocoques [9].**

<b>Morphologie</b>	Cocci sphérique de 0,5 à 1µm de diamètre : -en amas (grappes de raisin) :S.aureus ; -en paires, amas irréguliers : autre espèces.
<b>Coloration de Gram</b>	Gram+.
<b>Mobilité</b>	Immobilés (mouvements browniens).
<b>Type respiratoire</b>	Anaérobies facultatifs en général.
<b>Oxydase</b>	Positive.
<b>Catalase</b>	Positive.
<b>Condition de culture</b>	-Température optimale à 37°C ; croissance à 10°C et à 45°C selon les espèces. -pH optimal de 7,2 à 7,4.
<b>Caractères spécifiques</b>	Halotolérants : 6,5% de Na Cl.
<b>Milieux de culture d'usage courant</b>	Gélose nutritive, gélosetrypticasesoja...
<b>Milieux d'isolement sélectifs</b>	Gélose de Baird-Parker ; Milieu de Chapman...
<b>Milieu d'enrichissements sélectifs</b>	Bouillon de Giolitti-Cantoni.

#### **4.1.Caractères morphologique :**

*S.aureus* est de forme sphérique (coque) et se regroupe généralement en amas,souvent qualifiés de grappes de raisin (figure 1).





**Figure 1** : Image de *S.aureus* au microscope électronique

D'un point de vue macroscopique, cette bactérie se caractérise par la pigmentation dorée de ses colonies, justifiant le nom vernaculaire de « Staphylocoque doré ». ces cocci mesurent de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, sont immobiles, non sporulés et positifs à la coloration de Gram [10]. Comme chez la majorité des bactéries Gram positives, l'enveloppe de *S.aureus* est composée d'une paroi épaisse riche en peptidoglycane et en acide téicoïques. On y trouve chez peu de souches la présence de capsule visible en microscope optique en présence d'encre de chine. Mais les souches peuvent perdre leur capsule après culture. En revanche, la majorité des souches isolées dans les infections humaines et animales produisent des polysaccharides capsulaires qui forment des microcapsules non visibles en microscope optique [11,12].

## **4.2. Caractères biochimiques**

*S.aureus* a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Ces bactéries possèdent une activité catalase, phosphatase, ainsi que des nucléases thermostables mais pas d'oxydase [13,14]. Est une espèce productrice de coagulase, d'un pigment caroténoïde jaune doré et la présence d'une protéine A de paroi caractérisent *Staphylococcus aureus* (SCP) [15]. Le diagnostic permettant de distinguer *S.aureus* des autres espèces est basé sur des tests réalisés sur colonies tels que l'identification du facteur agglomérant, de la coagulase, des hémolysines et de la désoxyribonucléase thermostable ou thermonucléase [16].

## **4-3- Caractères culturels :**

In vitro, *S.aureus* est une bactérie peu exigeante. En effet, en plus d'être aéro-anaérobie facultatif, elle est facilement cultivable en milieu gélosé classique tel que CBA (Columbia Blood Agar), TSA (Tryptic Soy Agar) ou BHI (Brain Heart Infusion) ; ainsi que

dans les milieux liquides correspondants [17,18]. Sur gélose au sang, *S.aureus* peuvent produire des colonies jaune doré entourés d'une  $\beta$ -hémolyse. certains milieux de culture peuvent être utilisés soit dans un but d'identification soit dans un but sélectif, on retrouve : la gélose Chapman ou MSA (Mannitol-Salt-Agar) qui présente un caractère halophile ainsi que la capacité à fermenter le mannitol. La gélose sélective Columbia qui est additionnée d'antibiotique CNA ou CAP. Les milieux chromogènes, en fonction de la couleur des colonies obtenue : (Chrom IDR, CHROM agar R staph aureus, BBL CHROM agar R Staph aureus) ; et aussi la gélose chromogène (MRSA) contient de la céfoxitine : (SAMR=apparition des colonies colorés en vert, SAMS= ne poussent pas. *S.aureus* se développe entre 10 et 42°C avec une température optimale de 37°C et un pH compris entre 7,4 et 7,6 [19]. Les colonies peuvent être observées après 24h d'incubation, de taille variable, Circulaire de 2 à 3 millimètres de diamètre, légèrement bombées ou aplaties.

### 5. Facteurs de virulences

Le pouvoir pathogène de *S.aureus* est lié à sa capacité de survie et à ses nombreux facteurs de virulences telles que les protéines de surface qui initient la colonisation des tissus de l'hôte, les facteurs inhibant la phagocytose, et la libération des toxines et des enzymes qui lèsent les cellules et les tissus de l'hôte.

#### 5.1. Protéine de surface

➤ **La protéine A :** Il s'agit d'une protéine caractéristique de l'espèce *S.aureus*. Elle est retrouvée dans la majorité des souches pathogènes pour l'homme, et elle est produite lors de la phase exponentielle de croissance [20]. La protéine A inhibe l'opsonisation et la phagocytose de la bactérie grâce à sa capacité de fixation au fragment Fc des immunoglobulines de classe G et M [21]. Elle joue un rôle dans la capacité des *S.aureus* à coloniser les tissus, dans le phénomène d'agrégation bactérienne et la protection de la bactérie face à l'action des agents antimicrobiens produits par les cellules immunitaires [22].

#### 5.2. Toxines

➤ **Hémolysines :** Les souches de *S.aureus* ont un pouvoir hémolytique qui est lié à la production de toxines protéiques, au nombre de quatre (alpha, beta, gamma, delta), elles ont une action cytolitique sur les plaquettes et les globules rouges [23,24].

a)  **$\alpha$ -hémolysines :** Toxine  $\alpha$ , c'est une exotoxine protéique de PM de 33 Kda, thermostable,

antigénique. Elle est la plus fréquente chez les souches d'origine Humaines (90%) que chez les souches animales (50 à 60%). Elle peut détruire les neutrophiles ou bien diminuer leur capacité à attaquer la bactérie [25].

**b)  $\beta$ -hémolysines :** Les toxines  $\beta$ , elle est très fréquente chez les souches de *S.aureus* d'origine animale (de 75 à 100%) que chez les souches humaines (10 à 50%). Il s'agit d'une phospholipase de type C. Elle agit sur un grand nombre de cellules incluant les globules rouges, les globules blancs et les fibroblastes [25].

**c)  $\delta$  -hémolysines :** Toxine  $\delta$ , c'est une protéine de PM de 103 Kda, composée de sous unités, elle est thermostable, facilement antigénique, elle cause des dommages sur la membrane d'un certain nombre de cellules des mammifères. Elle a une activité hémolytique, mais bien qu'elle a de nombreux effets cytotoxiques, son importance dans l'étiologie des maladies liée à *S.aureus* reste assez peu claire [26].

**d)  $\gamma$  -hémolysines :** La toxine  $\gamma$ , antigénique chez l'Homme. Elle stimule la dégradation des phagocytes, ce qui augmente les dommages tissulaires liés à la réponse inflammatoire [27].

### ➤ **Leucocidine de Pantone Valentine (PVL)**

C'est une protéine à deux composants non associés mais agissent en synergie sur les membranes cellulaires. Le rôle de la PVL n'est pas encore clairement défini, mais elle semble être un facteur important de la nécrose tissulaire, notamment des dommages musculaire, car elle est retrouvée dans la majorité des infections nécrosantes [28]. Cette substance n'est présente que dans les granulocytes de l'homme et de lapin [29].

### ➤ **Les entérotoxines**

Il existe huit (08) A, B, C1, C2, C3, D, E et H. Ce sont toutes de puissants super antigènes capable de stimuler la prolifération non spécifique des lymphocytes T [30]. Elles sont responsables d'intoxication alimentaires dues à la consommation d'aliments contaminés par *S.aureus*. Ce sont des protéines thermostables, et résistantes aux enzymes protéolytiques et partiellement à la chaleur.

### ➤ **Toxines du syndrome de choc toxique (TSST-1)**

Est une protéine extracellulaire, d'origine chromosomique ; qui agit comme un super antigène. Elle induit la synthèse d'anticorps dont la fréquence augmente avec l'âge. On la trouve dans 20% des souches *S.aureus* [24].

### ➤ **Exfoliatines**

Ce sont des toxines épidermolytiques, ayant une spécificité d'action sur la peau, dont l'activité entraîne un décollement intra-épidermique [31]. Elles sont responsables d'érythème et de clivage de l'épiderme, causant l'épidermolyse bulleuse staphylococcique. On distingue

deux sérotypes différents : exfoliatine A, la plus fréquente ; elle est thermostable, codée par un gène chromosomique (90%). Et les exfoliatines B, qui est thermolabile et d'origine plasmidique (4 à 5%). Les deux sérotypes peuvent être produits par une même souche [32].

## 6. Profil de résistance :

Les années 1940 ont marqué le début d'une période de développement de nouveaux antibiotiques. Durant 20 ans, les chercheurs ont mis à jour une vingtaine de nouvelles classes d'antibiotiques (figure)[33].

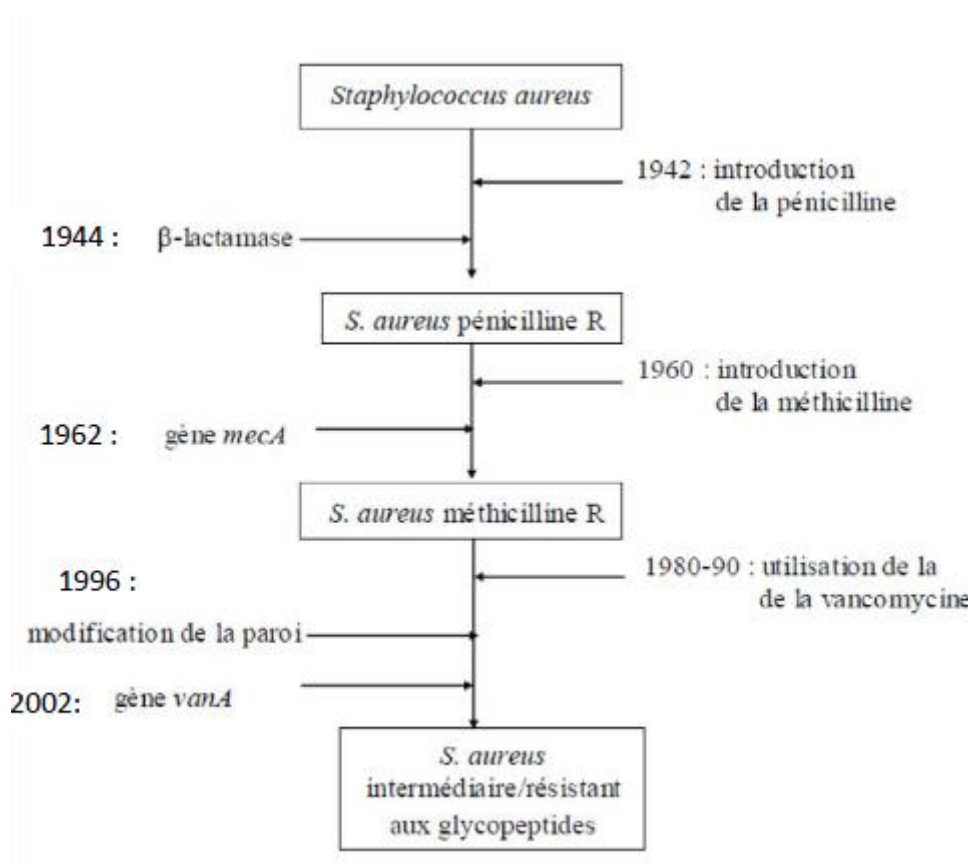


Figure 2 : Historique d'apparition des résistances aux antibiotiques chez *S.aureus*[34].

### 6-1-Résistance à la Pénicilline :

Le début de l'ère de l'antibiothérapie, correspond à l'introduction de la pénicilline. Néanmoins, en 1942, apparut la première souche de *S.aureus* résistante à la pénicilline [36], par production des pénicillinases, qui inactivent la pénicilline G et les pénicillines à spectre étendu (pénicilline A), telles que l'ampicilline, l'amoxicilline ou la pipéracilline [37]. De par, ces souches résistantes sont rapidement devenues majoritaires, rendant la pénicilline inefficace contre près de 90% des souches de *S.aureus* [36].

## 6.2. Résistance à la Méthicilline

En 1960, la première souche résistante à la méthicilline est apparue [38]. Les souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), causent un problème majeure de santé public à l'heure actuelle, elle est le fruit de gène *mecA*, codant pour une nouvelle protéine de liaison à la pénicilline (PLP 2a) modifiées, localisé sur la cassette chromosomale Staphylococcique (SCC) [36, 38, 39, 40].

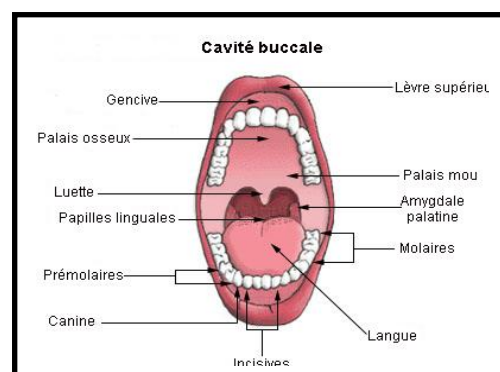
## 6.3. Résistance à la vancomycine

La résistance des souches de *S. aureus* à la vancomycine est liée quant à elle à l'acquisition d'un plasmide contenant le gène *vanA* acquis très vraisemblablement d'entérocoques résistants à la vancomycine [41]. Le gène *vanA* code pour une ligase qui, en créant une liaison ester au niveau du précurseur du peptidoglycane, diminue l'affinité de la vancomycine avec le peptidoglycane et empêche ainsi son action bactéricide [42].

## II. Cavité buccale

### 1. Définition

La cavité buccale est une cavité irrégulière représente le premier segment du tube digestif. Elle est délimitée en avant par les lèvres ; latéralement par les joues ; en arrière par l'isthme de gosier et les tonsilles palatines ; en bas par les plancher de la bouche [43] ; au centre de la cavité comprend la Lang mobile ; les dents et les glandes salivaires ; elle est recouverte par une muqueuse buccale. Elle assure également la manducation présentant l'ensemble des actions mécaniques et des actions de digestion [44].



**Figure 3** : Schéma de l'anatomie de la cavité buccale [45]

### 2. Langue

C'est un organe musculaire et mobile attaché au plancher buccale, présentant un muscle strié qui est recouvert d'un ensemble des papilles fongiformes et caliciforme et les papilles

filiformes et foliées [46] ; Ces papilles permettant la sensation et la distinction du différent goût alimentaire [47].

Elle est impliquée dans les fonctions de mastication ; dégoutation et phonation [48 ; 49].

### 3. Salive et les glandes salivaires:

Les sécrétions salivaires sont des réponses hormonales et nerveuses dans la cavité buccale, qui résultent d'un mécanisme biologique bien compliqués, qui assuré par deux grandes types de glandes salivaires (majeures et mineures)[50 ; 51] ; Sous forme d'un liquide composé plus de 99% d'eau et le reste est constitué d'une partie organique et d'une partie minérale [52].Elles assurent deux principales fonction ; digestive et protectrice, mais elles jouent également un rôle protecteur antibactérien [53 ; 54].

### 4. Dent :

C'est un organe dur blanchâtre ; généralement composé d'une couronne libre et d'une ou plusieurs racines implantées dans la cavité buccale ; Impliquée dans les fonctions de destiné à saisir ; retenir et broyer les aliments, Les dents entretiennent différents anatomies et de multiples pathologies [55]

L'installation d'un biofilm dentaire ou plaque dentaire, contenant de  $10^9$  Bactéries dans 10mg de biofilm dentaire [56], c'est la cause principale des caries dentaires ; les caries précoces du jeune enfant(Early childhood caries) représentent une forme sévère des maladies[57].

La carie dentaire peut provoquer des pathologies soit locales (abcès, cellulite, nécroses gingivales, bactériémie....) ; des maladies loco-régionales(angines, pharyngites, laryngites, sinusites, otites, uvéites...) ; des pathologies à distance (cardiovasculaires,...) [58].

### 5. Amygdales

L'amygdale est une masse de tissu lymphoïde formant un anneau sur les parois du pharynx ou de la gorge.Elle est formée de cellules stimulaires aux lymphocytes de système sanguin fixée dans des tissus fibreux, ont un pouvoir de phagocytose ; elles aident également à protéger le pharynx des invasions bactériennes, car le pharynx représente le siège d'une flore microbienne commensale et opportuniste notamment « *les staphylococcus aureus, streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae et*

*Brahamellacatarrhalis* » [59].

Elles peuvent s'enflammer et progressivement s'infecter est généralement causée par streptocoques bêta hémolytique et *les staphylococcus aureus*[60 ; 61].

## **6. Muqueuse buccale**

C'est une muqueuse qui revêt la paroi interne des lèvres et de la cavité buccale [62], Constituée par une mosaïque de domaines adjacents, présente des modifications de sa localisation et de tissu qui lui sont sous-jacents, elle est caractérisé par trois types fonctionnels qui diffèrent selon leur composition « la muqueuse masticatrice, la muqueuse couvrante ou bordant, et la muqueuse spécialisée »[63].

Ses fonction sont multiples possède une fonction de protection primordiale ; elle est également une barrière vis-à-vis des bactéries ou virus grâce à une protection immunitaire permanente assurée par le système immunitaire locale et grâce à la salive par les brais des immunoglobulines et d'autre facteur (lysozyme ; lactoferrine) ; ainsi que, elle participe dans la guérison des lésions ; comprendre une fonction sensitive, sensoriels et gustative. [64].

## **7.Flore buccale**

La cavité buccale abrite l'un de microbiomes les plus divers de corps humain, elle est considérée comme la porte d'entrée principale d'infections dites focales, depuis de nombreuses années[65].

Elle est composée de plusieurs centaines à milliers d'espèces différentes de microorganisme, notamment des bactéries, des virus, des champignons, des protozoaires et des archées. Elle représente donc un grand réservoir potentiel de microorganismes potentiellement pathogènes [66].

La diversité bactérienne requiert, pour vivre et se développer dans ce milieu ; des surfaces d'adhésions favorables, des conditions nutritives et respiratoires riches et variées, et des facteurs physicochimiques compatibles. Le nombre d'espèces buccales est estimé entre 500 et 700 espèces, et chaque individu abrite 100 à 200 de ces 700 espèces [67 ; 68].

Le macrobiote buccal principalement constitué de bactéries a développé des stratégies de résistance et de perception de son environnement, il est plus au moins diversifié, ce sont principalement sous formes libres, mais il est surtout constitué de formes coloniales, consistant en biofilms organisées [69].

## Synthèse bibliographique

Le déséquilibre de la flore orale crée par un changement biologique dans la bouche cela pourra traduire par une modification qualitative et quantitative de la flore, avec la transformation de la flore résidente en pathogènes opportuniste et ainsi la survenue de maladie caries, parodontales (gingivite et déchaussement) [71,72].

Cette flore microbienne est complexe se composé de différents types de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, peuvent être aérobies ou anaérobies facultatives ou obligatoires (tableau III)[74].

**Tableau III** : Principale bactéries à Gram positif et négatif de la cavité buccale[75].

Gram		Genre	Espèces buccales
Gram positif	Bacilles facultatifs	Actinomyces	viscosus
		Corynebacterium	matruchoitii
		Lactobacillus	acidophilus, salivarius
	Bacilles anaérobies	Bifidobacterium	dentium
		Clostridium	sporogenes, subterminale
		Ebacterium	nodatum, saburreum
		Pseudoramibacterium	alactolyticuss
	Cocci facultatifs	Enterococcus	faecalis
		Staphylococcus	aureus, epidermidis
		Streptococcus-	mutans, anginosus
		Streptococcus oraux	mitis, oralis
	Cocci anaérobies	Anaerococcus	prevotii
		Micromonas	micros
Gram négatif	Bacillus anaérobies	Fsobacterium	nucleatum, periodonticum necrophorum
	Bacillus facultatifs-non mobiles	Haemophilus	Influenzae, segnis
		Klebsiella	Pneumoniae
		Pseudomonas	aeruginosa
	Bacillus facultatifs mobiles	Campylobacter	consisus, sputorum, rectus, curvus
	Cocci anaérobies	Veillonella	parvula, atipyca, dispar
Cocci anaérobies ou facultatifs	Neisseria	sicca	



## Synthèse bibliographique

Le genre *Staphylococcus* comporte 47 espèces et 24 sous-espèces, dont 17 sont retrouvées chez l'homme[76].

La localisation préférentielles de *Staphylococcus aureus* et le rhinopharynx (fosses nasales et la gorge) [77], mais il est également retrouvées sur la langue, les lèvres et dans la salive , responsable des maladies parodontales [78 ].

cette bactérie est typiquement porté de façon asymptomatique pour l'homme, cependant elle provoque un large éventail d'infections cliniques allant des infections courantes telles que les infections de la peau et des tissus mous (SSTI pour « *skin and soft tissue infections* ») incluant : la folliculite ; le furoncle ; l'anthrax, l'abcès, la cellulite, l'impétigo, les plaies chirurgicales postopératoires [79]. Et les ostéomyélites [80]. Certaines infections ORL (angine, otites, sinusites [81]. Les souches portant des toxines particulières peuvent être associées à des états pathologiques spécifiques ; y compris le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée (SSSS pour « *staphylococcal scalded skin syndrome* ») [82], elle provoque des infections meurtrières comme le syndrome de choc toxique ( TSS pour « *Toxic shock syndrome* ») [83]; la toxi-infection alimentaire [84] ; et la pneumonie nécrosante [85].

*S.aureus* peut aussi provoquer une septicémie ou sepsis[86] ; entre 1995 et 2002, 20% de septicémies nosocomiales aux États-Unis ont été causées par *S.aureus*[87] ; De plus, les infections à *S.aureus* aux États-Unis causées par le SARM (64% en 2003)[88], ont été associées statistiquement à une mortalité plus élevée [89].

La cavité buccale de fœtus est stérile non colonisée, la naissance marque le passage de la vie intra utérine stérile à la vie extra utérine et l'environnement, avec les autres individus [90].

Au cours des premiers jours de la vie, elle commence à être colonisée par *Streptococcus salivarius* et par la suite par d'autres bactéries ; *Staphylococcus*, *Nocardia*, *Veillonella*, *Bacteroides* espèces[91].

Une étude de Costello et al montrait que les bébés prématurés ayant un faible poids à la naissance, présentaient dans le mois suivant de leur naissance une forte proportion de *Staphylococcus* dans la cavité orale et une forte proportion de *Streptococcus* sur la peau contrairement à leur habitat classique [92].

Selon la structure anatomique de la bouche il existe de grandes variations en espèces et en nombre. Des rapports récents indiquent des taux de portage élevés des SARM dans la cavité buccale [93].

Une autre étude réalisée par Georgio Kouros et al en 2015 a montré que les *Staphylococcus aureus* qui peut être trouvé dans l'environnement buccale quelles que soient

## *Synthèse bibliographique*

les conditions parodontales et doit donc être considéré comme un membre de la flore transitoire ne participant pas à la pathologie parodontale sites sous-gingivaux et la surface de la langue semblent être un habitat inhabituel du SARM.

## *Matériel et méthodes*

## **I. Matériel et méthodes**

### **1. Cadre et objectif de l'étude**

Cette étude a été effectuée au niveau du pavillon pédiatrique et urgence pédiatrique (PUP) de l'EPH d'amizour ; durant une période d'un mois , allant d'avril à mai 2021. Elle inclus les enfants agés de 6 jours à 16 ans, consultant pour une angine, dans le but de la caractérisation moléculaire de la résistance de *Staphylococcus aureus* isolés de la cavité buccale, aux antibiotiques.

L'analyse microbiologique des prélèvements de la cavité buccale à été réalisée au niveau de laboratoire de bactériologie de l'EPH d'Amizour et au niveau de laboratoire de microbiologie du l'université.

### **2. Prélèvements**

La collecte des souches de *S.aureus*, isolées à partir de la cavité buccale des enfants malades par un écouvillonnage au niveau de la surface des dents, la langue, la gencive, et les amygdales, par abaissement de la langue par le patient pour bien voir ces amygdales. Les échantillons sont mis directement dans des tubes contenant 1 ml du bouillon BHIB (**Annexe N°2**) ; et mis en incubation dans une étuve à 37°C pendant 24h, afin d'enrichir la flore avant de faire un ensemencement sur gélose. Chaque prélèvement a été accompagné d'une fiche de renseignements remplie (numéro de patient, date, age, sex, maladie, prescription d'antibiotique) (**Annexe N°1**).

### **3. Isolement et purification des *S.aureus***

L'isolement a été effectué sur la gélose Chapman (**Annexe N°2**), par ensemencement par stries pour chaque prélèvement. Ce milieu permet d'isoler les bactéries halophiles car ils contient une forte teneur en NaCl (7,5%) et inhibe la croissance de la plupart des bactérie autres que les *Staphylocoques*. Ce milieu permet aussi d'étudier la fermentation du mannitol par virage de couleur du rouge au jaune de l'indicateur de pH, le rouge de phénol, autour des colonies. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48 h. Un résultat positif consiste à avoir un milieu jaune, dans le cas contraire la boîte reste rouge.

Après l'incubation de milieu sélectif ensemencé, il a été procédé à la purification des colonies bactériennes par réisolement sur le même milieu afin d'obtenir des souches pures pour entamer l'identification. Les colonies sont repérées selon leurs aspects et leurs morphologies.

#### **4. Identification**

Dans le but d'identifier les souches isolées, le protocole expérimentale suivant a été effectués :

##### **4.1. Coloration de Gram**

La coloration de Gram est utilisée dans le but de la classification des bactéries en deux groupes ; les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses, et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Cette information est importante car elle utilisée dans la taxonomie(Annexe N°3) .

##### **4.2. Test de catalase**

Certaines bactéries produisent de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), pendant leur respiration aérobie. Celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grace aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) selon la réaction :  $H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2$  ↗

Ce test permet de différencier les *staphylocoques* catalase(+) des *streptocoque* catalase (-).

##### **4.3. Test du coagulase libre**

Ce test consiste à mettre en évidence la capacité d'une bactérie à produire une coagulase, qui est une enzyme qui provoque la coagulation du plasma en convertissant le fibrinogène en fibrine insoluble qui forme alors le caillot.

Comment faire le test de la coagulase libre :

- Dans un tube à hémolyse en ajoutant 0,5 ml de plasma humain et 0,5 ml d'une culture de staphylocoques de 24 heures en bouillon.
- Placé le mélange à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.
- Observez la culture à l'intervalles réguliers au cours des quatre heures qui suivent. Toute formation de caillot est un résultat positif.
- Si aucun caillot n'est observé au bout de 4 heures, l'essai peut être poursuivi avec une incubation pendant une nuit à la température ambiante et une observation finale à 24 heures.

L'organisme de contrôle positif devrait présenter une coagulation au bout de 24 heures , contrairement à l'organisme de contrôle négatif( Figure 4).



**Figure 4 :** Représentation du test de coagulase (Contrôle +, Contrôle -)

## **5. Antibiogramme**

L'antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus. L'antibiogramme est effectué selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose, à partir de disques d'antibiotiques selon les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 2007) , ou d'un antibiotique liquide. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

### **5.1. Test de l'Oxacilline liquide**

Pour la préparation d'antibiotique ; dans 10 ml d'eau d'istillé stérile ,10 mg d'Oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1 g) sont dissous. Dans un tube stérile contenant 9 ml de BHIB, on ajoute 900 µl de la suspension bactérienne de 24 heures, et 100 µl de l'Oxacilline préparé.

Le résultat après 24 h :

- Présence d'un trouble : la souche bactérienne présente une résistance à l'Oxacilline.
- Absence d'un trouble : la souche bactérienne sensible à l'Oxacilline.

### **5.2. Test de diffusion du disque de cefoxitine**

Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement (Chapman). Quelques colonies bien isolées sont raclées à l'aide d'une pipette Pasteur, déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée . Le milieu Mueller-Hinton (MH), coulé en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4 mm, l'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées .

L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'une boîte de Petri est ensemencée.

Un disque d'antibiotique est appliqué par boîte ; à l'aide d'une pince stérile. Le disque ne doit pas être déplacé. Les boîtes sont ensuite incubées immédiatement pendant 24 heures à 37°C.

### **6. La mise en évidence de la capsule**

La capsule est l'enveloppe qui peut entourer la paroi de certaines bactéries. Elle est généralement de nature polysaccharidique . Néanmoins, certaines capsules sont de nature protéique.

Elle peut être mise en évidence au microscope par la réalisation d'une suspension bactérienne dans de l'encre de Chine. La capsule apparaît alors sous la forme d'un halo clair et réfringent.

### **7. Dosage des protéines par la méthode (Bradford, 1976)**

Le dosage des protéines totales est déterminé selon la technique de Bradford, (1976) .

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'adsorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (avec les acides aminés basiques tel que : Arg, Lys, His).

Une fois lié aux protéines sa couleur vire vers le bleu avec une absorbance maximale de 595 nm, dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

#### **7.1. Préparation de réactif de BRADFORD**

10 mg de bleu de Coomassie G-250 a été dissous dans 5 ml de méthanol, un volume de 10ml d'acide phosphorique à 85% a été ajouté à la solution, compléter avec l'eau distillée jusqu'à un volume de 100ml, ce mélange est soumis à une agitation pendant 1 heure à

l'obscurité.

Après avoir laissé sédimenter 24h, immédiatement filtrée deux fois, Ce réactif doit être conservé à 4°C et à l'abri de la lumière.

### **7.2.Solution BSA (Bovin Serum Albumin)**

Préparation de 0,1 µg/µl de solution de BSA comme solution de référence dont le principe repose sur la réalisation d'une courbe d'étalonnage par un spectrophotomètre UV/visible.

### **7.3.Elaboration de la courbe d'étalonnage des protéines**

Une gamme d'étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum-albumine bovine (BSA) (0,1µg/µl) selon les quantités suivantes : 0, 40, 80, 120,160 et 200 ml. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées dans l'eau distillée stérile. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 200ml.

Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation, la solution est laissée à l'obscurité 15min puis l'absorbance est mesurée à595 nm contre le blanc( tableau IV).( **Annexe 5**).

**Tableau IV** : Préparation de la gamme d'étalonnage de la BSA (0,1µg/µl).

<b>N° tube</b>	<b>Blanc</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>BSA (0,1µg/µl)</b>	0	40	80	120	160	200
<b>Eau distillée (µl)</b>	200	160	120	80	40	0
<b>Total (µl)</b>	200	200	200	200	200	200
<b>Réactif Bradford (µl)</b>	2000					

### **7.4.Préparation des échantillons**

Les échantillons bactériens résistants à l'Oxacilline ont été récupérés, ensuite centrifugés à 4000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant de chaque échantillon a été récupéré. Une gamme d'étalon est préparée à partir de ces surnageants (0,1µg/µl) selon les quantités suivantes : 0, 40, 80 et 120 ml. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées dans l'eau distillée stérile. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 200ml.

Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation, la solution est laissée à l'obscurité



## *Matériel et méthodes*

15min puis l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc (tableau V).

**Tableau V:** Préparation de la gamme d'étalonnage des protéines de *S.aureus* (0,1µg/µl).

<b>N° de tube</b>	<b>Blanc</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Surnagent (0,1µg /µl)</b>	0	40	80	120
<b>Eau distillée (µl)</b>	200	160	120	80
<b>Total (µl)</b>	200	200	200	200
<b>Réactif de Bradford (µl)</b>	2000			



## *Résultats et discussion*

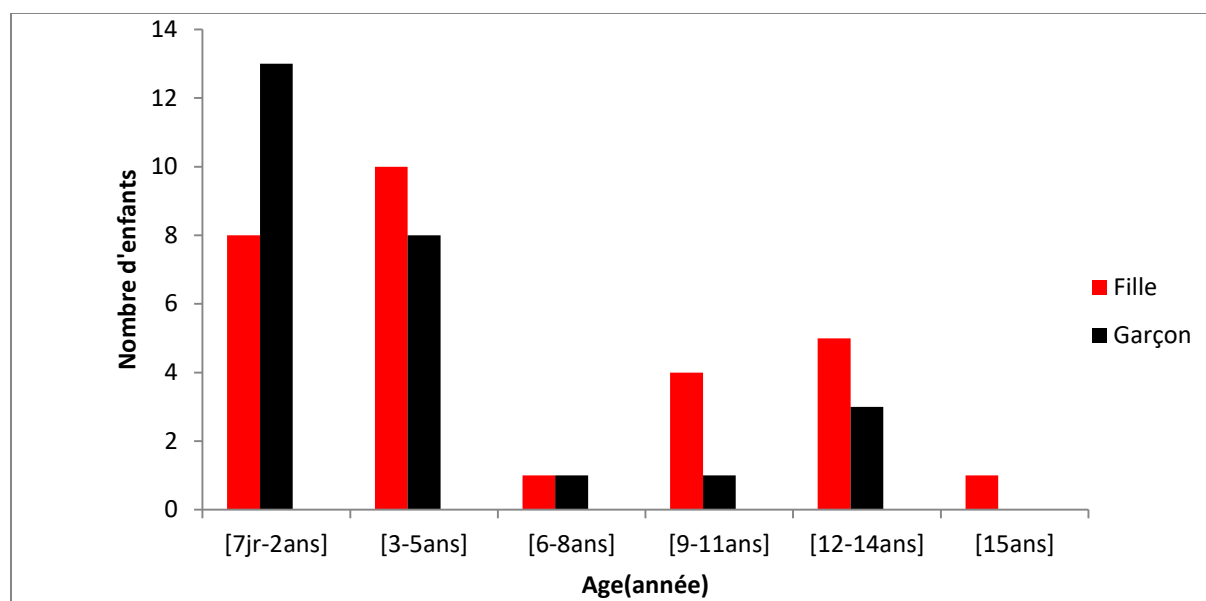
## II- Résultats

### 1.Résultats de la caractérisation de la population d'étude

Un total de 80 prélèvements de la cavité buccale des enfants infectés admis au service des urgences pédiatriques de l'hôpital d'Amizour a été réalisé, 43 chez les filles, et 37 chez les garçons. La caractérisation de la population incluse dans cette étude sont illustrées dans le tableau VI et la figure 05:

**Tableau VI :** Caractérisation des patients inclus dans l'étude.

Patients 80												
Age	[7jr-2ans]		[3-5]ans		[6-8]ans		[9-11]ans		[12-14]ans		[16 ans]	
Sex	G	F	G	F	G	F	G	F	G	F	G	F
Nombre de prélèvements	17	14	10	12	6	3	1	5	3	8	0	1



**Figure 5 :** Répartition des patients infectés selon la tranche d'âge et le sexe.

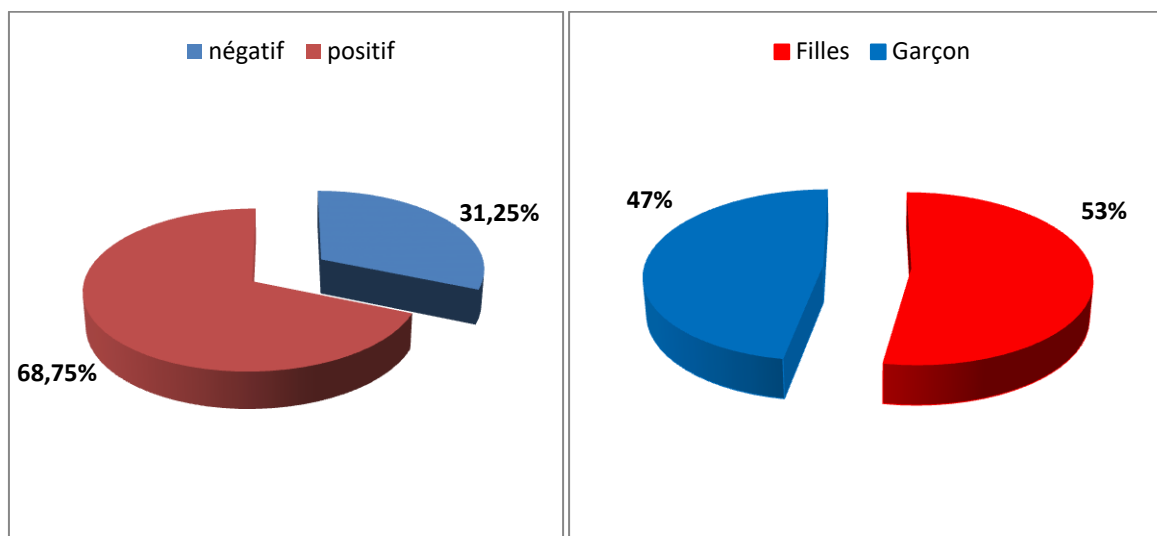
Les enfants inclus dans l'étude ont été classés en 6 différentes catégories d'âge. La fréquence la plus élevée des enfants infectés par *S. aureus* enregistrée durant la période d'étude, a été marquée chez les enfants ayant de 7 jours à 5 ans. D'une manière intéressante, nous avons constaté que la tranche d'âge [7 jours- 2ans] chez les garçons est la plus touchée ;

par contre la tranche d'âge [3-15]ans, est plus touché chez les filles.

## 2.Résultat de l'enrichissement, d'isolement et la purification de *S.aureus*

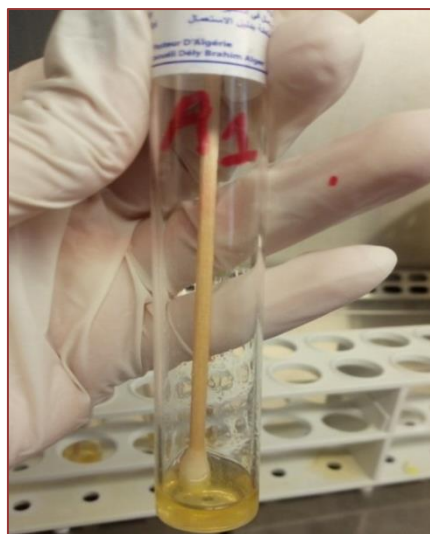
### 2.1 .Enrichissement

Après 24 heures d'incubation sur milieu BHIB, les tubes doivent présenter un trouble. Dans notre étude, sur les 80 échantillons pour lesquels nous avons effectué un enrichissement ; 55 (68,75%) d'entre eux était positive (présente un trouble) après incubation sur le BHIB.(Figure 6, 7 et 8).



**Figure 06:**Résultats des échantillons positif et négatif

**Figure 07 :**Résultats des échantillons positifs selon le sexe



**Figure 8 :** Résultat positif d'un échantillon incubé dans BHIB .

### 2.2.Isolement

## Résultats

Les souches ont été ensemencées par des stries sur la gélose Chapman, et incubées à 37°C pendant 24 heures. On observe des colonies arrondies à bords réguliers de 1 à 2 mm de diamètre, pigmentées et entourées d'une auréole jaune (fermentation de mannitol). (Figure 09)

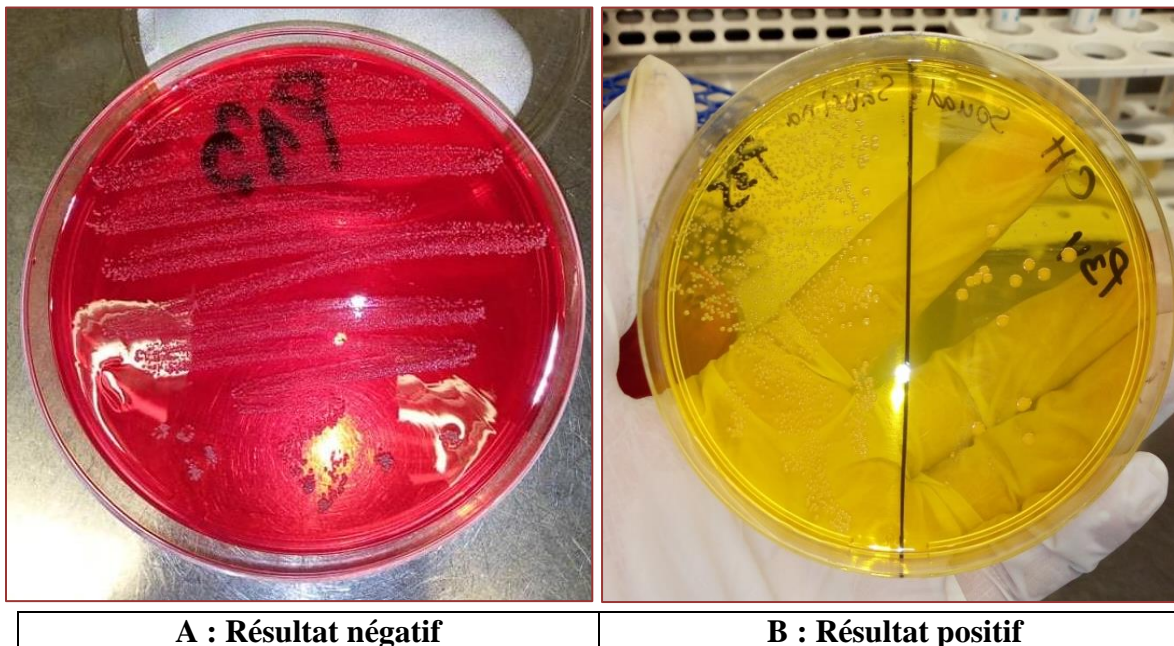


Figure 09 :Aspect macroscopique des colonies sur milieu Chapman.

### 2.3.Purification

Des isolements répétés sur le milieu Chapman, on permet de purifier les isolats. (Figure 10)



Figure 10 :Résultat de la purification sur Chapman.

#### 2.3.1.Vérification de la pureté des souches

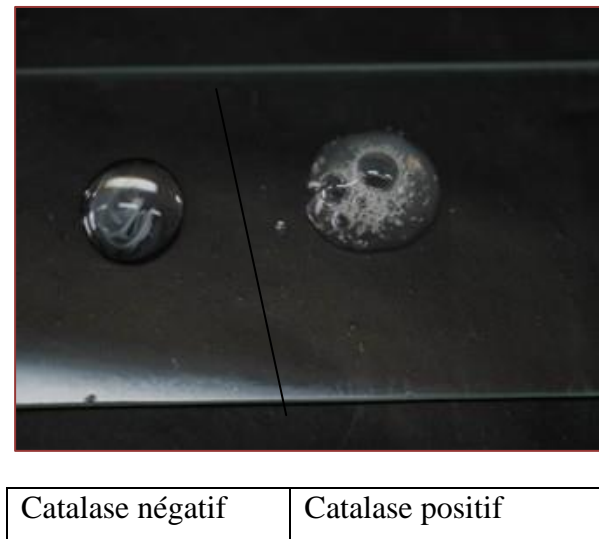
##### ➤ Coloration de Gram

Les résultats de la coloration de Gram des isolats ont révélé que les 55 isolats sont Gram +. *Staphylococcus aureus* se présente sous forme de cocci sphérique, en paires, des colonies

violette en grappe de raisin.

### **3. Test de catalase**

La totalité des isolats(55 souches) sont catalase +, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz. (Figure 11)



**Figure 11** :Résultat du test de catalase.

### **4. Test d'identification de *Staphylococcus aureus***

Les tests d'identifications ont permis de confirmer l'appartenance des souches isolées à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

#### **4.1. Test de coagulase**

Un test de coagulase est réalisé pour les 55 souches suspectés d'être de *S. aureus*. ( Les résultats obtenus montrent que la totalité des souches coagulase positifs)

### **5. Test de l'Oxacilline liquide**

Après 24 heures, on observe la présence d'un trouble pour la totalité des échantillons, donc toutes les souches bactérienne présentent une résistance à l'Oxacilline.

### **6. Test de diffusion du disque de Céfoxitine**

Le test d'antibiogramme réalisé à l'égard des 55 souches de *S. aureus* isolées révèle que ces dernières sont résistantes à céfoxitine.

## 7. La capsule

Tout les échantillons présentent une capsule sous forme d'un halo clair (figure 12).



Figure 12 : Observation de la capsule du S.aureus sous microscope optique

## 8. Dosage des protéines

Après l'utilisation d'un spectrophotomètre UV /Visible à 595 nm pour mesurer les absorbances ; les résultats obtenus sont représenté dans la figure 13 .

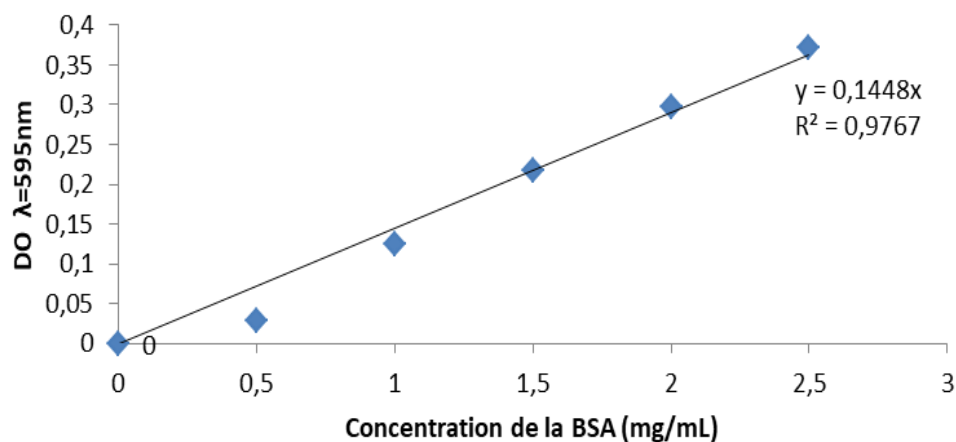


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la solution de BSA (1 mg/ ml) Bradford,(1976).

### 8.1. Dosage des protéines des *S.aureus*

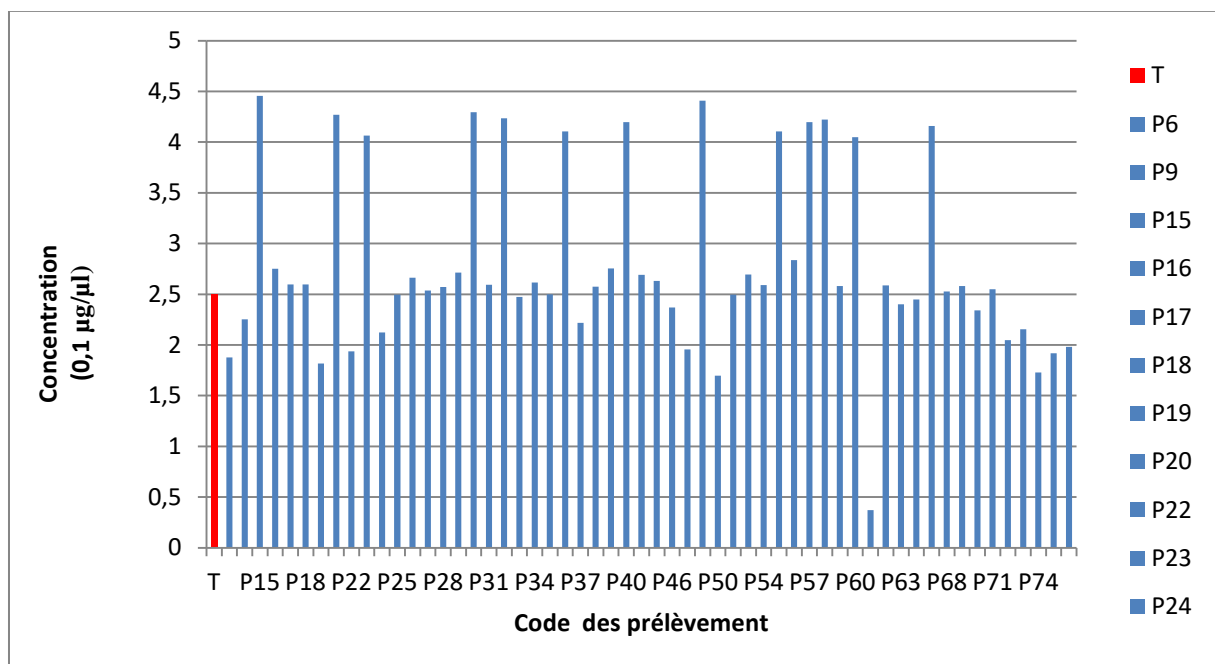
Les concentrations ont été calculées en utilisant la fonction de la courbe d'étalonnage ( $Y=0,1448X$ ) sachant que,  $Y$  :Absorbance,  $X$  :Concentration. Les résultats sont représentés dans la figure 14 .





**Figure 14 :** Résultat des réactions des protéines de *S.aureus* avec le réactif de Bradford

Une comparaison entre les concentrations des protéines du *S.aureus* en solution et la concentration des protéins du témoin sous forme d'un histogramme, représenté dans la figure 15.



**Figure 15 :** Les concentrations des protéines de *S.aureus* et le Témoin.

Après avoir mesuré les absorbances et calculé les concentration de chaque souche, nous avons obtenu des valeurs variée ; certaines sont inférieures à la concentration de témoin signifée que la souche a utilisée les proteintrs sans synthétisé d'autres. Par contre, nous avons d'autre valeurs supérieurs à celle de témoin , signifie que les souches ont synthétisée des nouvelles protéines.



## *Discussion*

La plupart des études se sont concentrées sur le portage nasal en tant que principal réservoir de *Staphylococcus aureus*, sans tenir compte des dommages potentiels causés par le portage buccal en tant que tel.

*S.aureus* est une cause majeure des infections bactériennes communautaires et hospitalières chez l'homme. La plupart des facteurs contribuant à sa pathogénèse sont sa persistance comme un commensal, sa capacité de résistance à plusieurs agents antimicrobiens et son pouvoir de synthèse de facteurs de virulence [92], [93], [94].

Au cours de notre étude, le taux de portage buccal général de *S. aureus* chez les enfants malades est de 69%. Ce résultat est supérieur à celui rapporté par Rita et ses collaborateurs, avec un taux de 67% aux sud-Est du Canada [95]. Par comparaison, le taux de portage oral de ces bactéries dans d'autres pays, comme au Danemark avec un taux de 50 à 80% [96], en Australie avec 59% [97], au Brésil avec 56,9% [98], en Inde avec 47% [99], au Japon avec un taux de 33% en 1991 [100] et avec un taux de 43% en 1997 [101], en Nouvelle-Zélande avec 27% [102], et en Israël avec un taux de 12% [103], et aux États-Unis avec 9,2% [104].

Le taux de portage enregistré chez les patients de sexe féminin est supérieur à celui enregistré chez le sexe masculin. Ce résultat est différent des données bibliographiques, notamment dans les travaux de Dossi et ses collaborateurs [105].

Concernant le sexe, les nouveau-nés du sexe masculin (50%) ont le taux de portage le plus élevé comparé à celui du sexe féminin (27,58%). Le même résultat a été obtenu par Alsubaie et al. 2012 [106]. Le facteur influençant le portage buccal des *S.aureus* chez les nouveau-nés liés au contact étroit avec le personnel et l'environnement ; Cependant, Lazenby et ses collaborateurs, ont rapporté dans leur étude que le taux de portage le plus élevé des SARM chez les nouveau-nés en raison d'un accouchement par césarienne [107].

Le taux de portage de *S. aureus* enregistré chez les patients grippés est plus élevé par rapport à celui enregistré chez les non grippés, l'analyse statistique a montré une association significative entre la prévalence des bactéries de *Staphylococcus aureus* et les infections de la gorge, Comme ce germe est plus fréquent responsable d'angine au cours des résultats que nous avons obtenus, peut être accordé avec les résultats de [108] et [109].

La deuxième partie de notre étude consiste à bien étudier et caractériser les 55 souches de *Staphylococcus aureus* isolées, Nous avons procédé à l'étude de leurs profils d'antibiorésistances, les testant à 2 différents antibiotiques (Cefoxitine, Oxacilline).

Staphylococcus aureus isolées dans notre étude affiche pratiquement une résistance marquée pour tous les antibiotiques utilisés, elles sont toutes résistantes à l'oxacilline 100% et à la céfoxitine 100%, Ces résultats corroborent avec ceux trouvés par [110]. Ce qui s'approche aussi des résultats de [111] ou il explique que la sécrétion de pénicillinases est présente chez 70 à 90% des Staphylococcus aureus.

Des résultats obtenus lors de notre étude ; il a été constaté que le taux de résistance à la méthicilline des 55 souches de *S. aureus* isolées est de 100%. Ce taux est supérieur de celui enregistré dans les hôpitaux algériens ont démontré une augmentation importante de staphylococcus aureus résistantes à la méthicilline avec un taux de 10% en 1997 [112] aux environs de 40% en 2005 [113], et à celui rapporté par Hala et ses collaborateurs avec un taux de 52,43% et 48,54% en Egypte et l'Arabie saoudite respectivement [114]. Cette résistance est conférée par la production d'une nouvelle PLP, appelée PLP2a et codé par le gène *mecA*

La dernière étape de notre étude comprend le dosage des protéines de la culture bactérienne de *S.aureus* , après avoir mesuré les absorbances et calculé les concentrations de chaque souche , nous avons obtenues valeurs variées certaines sont inférieures à la concentration de témoin signifiant que la souche elle est utilisée les protéines pour sa nutrition sans synthétiser d'autres protéines, par contre nous avons d'autres valeurs supérieures à celle de témoin, signifiant que les souches synthétisent des nouvelles protéines ; Ces protéines peuvent être :

- La protéine A, qui inhibe l'opsonisation et la phagocytose de la bactérie grâce à sa capacité de fixation au fragment FC des immunoglobulines de classe G et M [21].
- La toxine  $\gamma$ -hémolysines qui stimule la dégradation des phagocytes [27].
- La staphylokinase qui actionne le mécanisme de transformation du plasminogène en plasmine et provoque la dissolution du thrombus contenant les *S.aureus* et par conséquent leur dissémination [115].
- La production de  $\beta$ -lactamases ; induit le phénomène de résistance des bactéries contre les antibiotiques . La résistance à la méthicilline, il s'agit d'une résistance acquise par modification de la cible principale de nombreuses  $\beta$ -lactamines, la PLP2. [116]. Et peut être ces souches ont un autre mécanisme qui est une hyperproduction de la pénicillinase Staphylococcique [28].

La cavité buccale d'un enfant signalée comme l'un des réservoirs potentiels de *S.aureus* , bien

qu'elle soit considérée comme transitoire et non permanente [117],[118] cependant , on craint qu'il ne devienne potentiellement le principal réservoir de S.aures [119].Cela accentue l'importance d'une bonne hygiène bucco-dentaire

## *Conclusion*

## Conclusion

*Staphylococcus aureus* est bien désigné comme un agent pathogène clinique et épidémiologique. Cette étude s'étale sur 3 mois, effectuée dans l'EPH d'Amizour et laboratoire de microbiologie d'université A.MIRA-Béjaia.

Au cours de cette période, 80 prélèvements de la cavité buccale ont été réalisés pour des enfants venus consulter. Ces enfants sont repartis selon leur âge et leur sexe.

Les résultats bactériologiques et épidémiologiques de cette étude ont permis de révéler plusieurs points :

- Une prévalence de 68,75 de *S.aureus* dans la cavité buccale des enfants malades.
- Les enfants les plus touchés sont ceux qui appartiennent à la catégorie d'âge incluse entre [7jr-2 ans].
- Les enfants de sexe féminin présentent un nombre plus élevé de *S.aureus* dans la cavité buccale (53%) que chez les enfants de sexe masculin (47%).
- 100% des souches sont catalase et coagulase positifs.
- 100% des souches sont résistantes à la métécilline.

En perspective, ces résultats doivent être complétées par une série d'autres tests, beaucoup plus performants, à savoir :

- Mener une étude prospective sur une large gamme d'échantillons ;
- Etudier les mécanisme de la multirésistance aux antibiotique des souches isolées ;
- Caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques ;
- Etudier une population saine pour la comparaison qualitative des germes isolés ;
- Caractérisation moléculaire des isolats dans le but de déterminer leurs origines (commensale ou pathogène).





## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

- [1] :- **Orenstein A. (2011)**. The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus* . Gevonden Op.;Available: <http://WWW.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf>.
- [2] :-**Fasquelle R.,(1974)**.Elément de bactériologie médicale 9ème édition . Flammarion, Paris .27-36p.
- [3]: -**Spicer W. (2003)**. Pratique clinique en bactériologie mycologie et parasitologie. Flammarion Médecine-Sciences,Paris. 28-29.
- [4] :-**Hill LR. (1981)**.Taxonomy of the staphylococci .The staphilococci.Aberdeen University press.
- [5]:-**Solène ACCA RIAS.(16 décembre 2014)**.THESE ;Délivré par: Université Paul Sabatier Toulous 3.
- [6]:- **Camille D.,(2007)**.Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de controle sanitaire .Tec &Doc.Lavooisier,Paris.52p.
- [7] :-**Prescott L.M ,Harley J.P ,Klein D.(2010)**.Microbiologie.2eme Edition Française .De Boeck Université.
- [8] :- **Raymond J Zimmerman ,Wesley E Kloos. (1976)** . Canadian journal of microbiology.
- [9]:-**Bergdoll, M.S.,(1979)**.Staphylococcal intoxications.In:Riemann H,Bryan FL.Food-borne infections and Intoxications.Academiepress New York,443-494p.
- [10]:-**Tille PM.(2014)**;Bailey & Scott's diagnostic microbiology.
- [11]:-**FEDERIGHI M. (2005)**.Bactériologies alimentaire,compendium d'hygiène des aliments . 2<sup>ème</sup> édition, ECONOMICA ,Paris.p25-50.
- [12] :-**Leclere H ,Gaillard J.L,Simonet M.(1995)**.Microbiologie général : la bactérie et le mode bactérien. Doin ,Paris .
- [13] :-**Behme RJ,Shuttlework R, McNabb A , ColbyWD.(1996)**.Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. J clin Microbiol.
- [14]:-**Nandy P.Roys, Thakur AR,Chaudhuri SR.(2013)** Comparative study on caractérisation of ththree staphylococcal isolates from varied origin.
- [15]:- **Mee-Marquet N.V.,Blanchard M.,Domelier A.S, Quentin R.(2004)**.Survey Study Group of the Relais d'Hygiène du Centre :Virulence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from varions origins.Pathologie Biologie.
- [16]:-**Brown DFJ.(2005)**.Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibilty testing of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA).J Antimicrob Chemother .
- [17]:-**Foster T. (1996)** *Staphylococcus* . In: **Baron S**, editor. Medical Microbiology. 4 th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.

## Références bibliographiques

- [18]:-Vitko NP, Richardson AR.( 2013) Laboratory Maintenance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In: Coico R, Kowalik T, Quarles J, Stevenson B, Taylor R, editors. Current Protocols in MICROBIOLOGY. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.
- [19]:-Couture B. (1990). Bactériologie médical « Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris.15-32.
- [20]:-Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. (2004). Spa Typing Methode for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implication for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation.
- [21]:-Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. (2013) Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus*.
- [22]:-Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, et al. (2009). Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol.
- [23]:-El Kouri D., Pottier M.A., Tre wick D., Le Gallou F., Baron D., et Potel G., (1998) Infections à staphylocoques ; aspects cliniques et bactériologique . EMC(elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infect .
- [24] :Avril JL., Dabernat H., Denis F. et Monteil H. (2003).. Bactériologie clinique . 3<sup>ème</sup> édition. Ellipses, Paris p.8.28.
- [25]:-BHAKDI S. TRANUM J .(1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus* . Microbiol Rev .
- [26] :-Le Minor L, Veron M. (1990). Bactériologie médical : Staphylococcuse et Micrococcus. 2<sup>ème</sup> édition. Flammarion médecine \_science. Paris.
- [27] :-Labrecque O. (2007). Sensibilité d'isolats de *Staphylococcus aureus* d'origine bovine aux antimicrobiens et présence de gènes de résistance. Mémoire de Maîtrise en science , département de pathologie et microbiologie. Université de Montréal.
- [28] :-Tseng CW, Kyme P, Low J, Rocha MA , Alsabeh R, Miller LG , et al. (2009). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Contributes to Inflammation and Muscle Tissue Injury.
- [29] :-Grojec P.L. et Jeljzewicz J. (1985). Staphylococcal Leukocidin. Panton Valentine type. J. Toxicol .
- [30] :-Jupin C, Anderson S, Damais C, Alouf JE, Parant M, (1988). Toxic shock syndrome toxin 1 as an inducer of human tumor necrosis factors and gamma interferon. J Exp Med.
- [31]:-Elias PM, Fritsch P, Epstein EH. (1977). Staphylococcal scalded skin syndrome. Clinical features , pathogenesis, and recent microbiological and biochemical developments.
- [32]:-Aouati.H. (2009). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthiciline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Thèse de Magister en Microbiologie appliquée et Biotechnologies microbiennes. Université Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 81p.

## Références bibliographiques

- [33] :-**Félix Chagnon, (2014)**. Mémoire présenté au Département de chimie. Faculté des science, Université de Sherbrooke, Québec, Canada,12p.
- [34] :- **Corne P. (2004)**. *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Ecole doctorale : Science Biologique et chimique de la santé. Paris, 16-19.
- [35] :-**Hardy K, Hawkey P, Gao F, et Oppenheirn B, (2004)**. Methicilline resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. Br J Anesth.
- [36] :-**Benhamou D, Carrié AS, Lecomte F. (2005)**. [*Staphylococcus aureus*: role and impact in the treatment of nosocomial pneumonia].
- [37] :-**Lowy FD. (2003)**. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.
- [38] :- **Treblay C.(2008)**. Mise à jour du traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. Pharmactuel.
- [39] :-**Scharn CR, Tenover FC, Goering RV.(2013)**. Transduction of staphylococcal cassette chromosome mec elements between strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agent Chemother.
- [40] :-**Chambers HF, Deleo FR.(2009)**. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era.
- [41] :-**Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. (2008)**. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States.
- [42] :-**Gardet S, Tomasz A.(2014)**. Mécanismes de vancomycine résistance in *Staphylococcus aureus*.
- [43] :-**Goldberg M, (2016)**, Histologie de la muqueuse buccale EMC6Med Buccale.
- [44] :-**Christian meyer ;** Editeur scientifique ; Dictionnaire des sciences Animales, cirad ; Montpellier ; France.
- [45] :- **Nguyen H, Vallee B, Person H (1994)**. Nouveaux dossiers d'anatomie PCEM : Tête Paris : Heures de France, 257 p.
- [46] :-**Jung C.(2018)**.les infections bactériennes bucco-dentaire : conseil du pharmacien thèse.
- [47] :-Organisation Mondiale de la santé(OMS) (2012), santé bucco-dentaire-aide-mémoire ; Genève : OMS.
- [48] :-**Devals ; Anne. (2003)**, le conseil de pharmacien d'officine dans le domaine buccodentaire ; thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacien ; Toulouse ; université poulsebatier .
- [49] :-**Mary BATA-Balogh,Margaret J.FEHRE NBACH.(1997)**;illustrated; dental Embryology histology and Anatomy third edition.S.L.: Saunders; an imprint of Elsevier Inc, 2011,2006.

## Références bibliographiques

- [50]:-Lautrou A. Anatomie. (1998), dentaire; Paris, Milan ; Barcelone : Editions Masson ; 2<sup>n</sup> Edition ; Légale Edition Atlantique.
- [51] :-Vidaithet B. Robin O.,olo A,Bravetti P. Mahler P.(2008)«salivation». EMC-Médecine Buccale p1-8.
- [52] :-PELLAT ; B. (2010)«Salives est milieu Buccal» ;Médecine buccale 28-150-H-10 ;paris : EMC (Elsevier Masson SAS) .
- [53] :-Baraba A, Miletic I. (2013) {Le role de la salive et des bactéries}. In : EDP Dent, - Réf. Monde Dent. [En ligne].
- [54]:-Paster B.j, Boches S ;K, Galvin J,L, Ericson R.E, Lau C.N, Levanos V.A, Sahasrabudhe A, Dewhirst F.(2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. J.Bacteriol.
- [55]:-Heinrich- Weltzien R, Bartsch B, Eick S. (2014)Dental caries and microbiota in children with black stain and non- discoloured dental plaque. Caries Res.
- [56]:-Bonnaure-Mallet M.(2006), Chardin H., Barsohio Microbiologie en odontostomatologie paris : Maloine.
- [57] :-Elarabi S., Harchaoui J., Taabouz A., Msefer S. (2001),La polycarie infantile : facteurs de risque. Journal dentaire du Québec.
- [58]:-M. J.Koch,M.Bove, J. Schroff, P. Perlea, F. Garcia-Godoy, and H.-J.Staehle,(2001)”Black stain and dental caries in schoolchildren in Potenza, Italy”, Journal of Dentistry for Children.
- [59]:- Dedio RM., Tom LWC., MC Gowan K.L., Wetmore RF., Handler SD., et Pastic WP.(1988) Microbiology of the Tonsils and Adenoids in a pediatrics population. Arch. Otolaryugol.
- [60] :- Martin JM. (2015) .The Mysteries of Streptococcal pharyngites. Curr. Treat .Options pediatr.1.
- [61] :- Zoutner AE., Krause M., Stropahl G., Holtfreter S., Frinckmann H., Maletzki C., Kreikemeyer B., peau HW., et Podbielski A.(2010). Intracellular Persisling *Staphylococcus aureus* IS the major pathogen in recurrent tonsillitis plos ONE5.
- [62]:-Sobotta J, Welsch U.(2004)Précis d’histologie : cytologie, histologie, anatomie microscopique. Paris : Lavoisier ; 592p.
- [63]:- Auriol MM. Le charpentier Y. (2008)Histologie de la muqueuse buccale et des Maxillaires EMC (Elsevier Masson SAS ; paris) ; Stomatologie ; Médecine buccale .
- [64]:-Goldberg.M.(2016), Histologie de la muqueuse buccale. EMC-Med Buccale.
- [65]:- William G Wade.(2013),pharmacolres ,Mar.The oral microbiome in health and disease.
- [66]:- Roberts A.(2005).Bacteria in the mouth. Dent Update.

## *Références bibliographiques*

- [67]:-BjPaster, I. Olsen; JAAas& FE Déwhirst,(2006),“the Extent of Bacterial Diversity in the Human periodontal pocket and other oral sites”, periodontology, vol.
- [68]:-Arweiler NB &Netuschil L (2016), the oral Microbiota. In Microbiota of the human body (pp. 45-60). International Springer Editions.
- [69]:-JA Aas, BJ Paster, LN Stoke, I.Olsen, FE.Dewhirst.(2005), Defining the normal bacterialflora of the oral cavity. J.ClinMicrobiol.
- [70] :-Devals; Anne (2003) ; le conseil du pharmacien d’officine dans le domaine buccodentaire. Thèse pour le diplôme d’état de Docteur en pharmacie. Toulouse : université poulsabatier .
- [71]:- Philip D. MASH ; Michael V. MARTIN.(2009),Oral microbiology; fifth edition S.I; Churchill Livingstone Elsevier Limited.
- [72]:-Chardin H., Barsotti O., Bonnaure-Mallet M.(2006). Microbiologie en odontostomatologie. Paris : éditions Maloine,
- [73] :- Book I., Frazier E.H., Gher M.E.(1991), Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess, Oral Micobiol. Immunol.
- [74] :- Bonnaure-Mallet M., Chardin H., Barsohio. (2006),Microbiologie en odontostomatologie paris : Maloine.
- [75]:-Rossi T .LaineJ .Eerola E, Kotilaine P, Pettonen R.(1995),Denture Carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus .
- [76] :- Bergenholtz G, Cox C.F., Loesche W.J., Syed S.A.(1982), Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp, J. Oral pathol.
- [77]: -Cohen PR. (2007), Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. Int J Dermatol.
- [78]: - Cunningham R, Cockayne A, Humphreys H.(1996),clinical and molecular aspects of the pathogenesis of staphylococcus aureus bone and joint infections. J Med Microbiol.
- [79]: -M. Sixou, A. Diouf, D. Alvares. Elsevier Masson,(2007),Biofilm buccal et pathologies buccodentaires.
- [80]: - Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM.(1999),Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staohylococcus scalded-skin syndrome.
- [81]: - NovickRP ,Subedi A.(2007),The SaPIs: mobile pathogenicity islands of Staphylococcus. ChemImmunol Allergy.
- [82]: - Le Loir Y, Baron F, Gautier M.(2003), Staphylococcus aureusand food poisoning. Genet Mol Res GMR.

## *Références bibliographiques*

- [83]: - **Labandeira- Rey M, Couzon F, Boisset EL, Bes M, Bentio Y, et al.(2007)**, Staphylococcus aureus Panton- Valentine leucocidin causes necrotizing pneumonia. Science.
- [84]: - **Kopp BJ; Nix DE, Armstrong EP.(2004)**, Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and –resistant staphylococcus aureus infections. Ann Pharmacother.
- [85]: - **Wisplinghoff H; Bisvhoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.(2004)**, Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis Off publ Infect Dis Soc Am.
- [86]: - **Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R, et al.(2006)**, Changes in the epidemiology of methicillin- resistant Staphylococcus aureus in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. Clin Infect Dis OffPubl Infect Dis Soc Am.
- [87]: - **Cosgrove SE, Sakoulas G, perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y.(2003)**, comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin- susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: a meta- analysis. Clin Infect Dis OffPubl Infect Dis Soc Am.
- [88]: - **H.CHARDIN, O.BARSOTTI, M.Bonnaure-Mallet. (2006)**. Microbiologie en odontostomatologie, Paris : éditions Maloine.
- [89]: - **Jorn AAas et al; j.clin microbial.(2005)**, Defining the normal bacterial flora of the oral cavity.
- [90]: - **E.K.Costello, C. L. Launer, M. Hamady, Fierer, J. I, Gordon, and R, Knight. (2009)**, “Bacterial community variation in human body habitats across space and time.” Science, vol.
- [91]: - **Eric S Donkor et al. infect Dis (Auckl).( 2020)**, Methicillin- resistant Staphylococcus aureus in the oral cavity: implication for Antibiotic prophylaxis and surveillance.
- [92]: - **Gordon RJ et Lowy FD. (2008)**. Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. Clin Infect Dis..
- [93]: - **Sivaraman A, Seifried SE, Zhu L, Srivastava DK, Perkins R, Shenep JL, Bankowski MJ et Hayden RT. (2010)**. Increasing Prevalence of Nasal and Rectal Colonization with Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Children with Cancer. Ped Blood Cancer.
- [94]: - **Yan X, Song Y, Yu X, Tao X, Yan J, Luo F, Zhang H, Zhang J, Li Q, He L, Li S, Meng F, Zhang J et Grundmann H. (2014)**. Factors associated with Staphylococcus aureus nasal carriage among healthy people in Northern China. Clin Microbiol Infect..
- [95]: - **Rita Shahin, MD, MHSc, CCFP, FRCPC; Ian L. Johnson, MD, MAc, FRCPC; Frances Jamieson, MD, FRCPC; et al.(1999)** Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carriage in a Child Care Center Following a Case of Disease , Arch Pediatr Adolesc.
- [96]: - **Frederiksen Ms, Espersen F, Frimodt-Moller N, et al. (2007)**, Changing epidemiology of pediatric Staphylococcus aureus bacteremia in Denmark From 1971 through 2000.



## **Références bibliographiques**

- [97]:- **Ullman, A., Long, D. & Lewis, P. (2011)**, the oral health of critically ill Children: An observational cohort study. *Journal of Clinical Nursing*.
- [98]:- **Vanessa Bueris , Fabiana Cristina Pimenta, Izabel Yoko Ito , José Moacir Marin et al.(2005)**, Oral incidence of *Staphylococcus aureus* and antimicrobials agents resistance, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- [99]:- **Anil Kumar Patil , Srinivas Namineni , Sampath Reddy Cheruku , Chandana Penmetsa , Sarada Penmetcha , Sreekanth Kumar Mallineni.(2019)** , Prevalence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Oral and Nasal Cavities of 4 to 13-year-old Rural School Children: A Cross-sectional Study.
- [100]:- **Miyake Y, Iwai T, Sugai M, Miura K, Suginaka H, Nagasaka N.(1991)**, Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children.
- [101]:- **Suzuki J, Komatsuzawa H, Sugai M, Suzuki T, Kozai K, Miyake Y et al.(1997)**, A long-term survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of children. *Microbiol Immunol*.
- [102]:- **Hill PC, Wong CG, Voss LM et al.(2001)**, Prospective study of 125 cases of *Staphylococcus aureus* bacteremia in children in New Zealand. *Pediatr Infect* .
- [103]:- **Frank M, Gur E, Givon-Lavi N, Peled N, Dagan R, Leibovitz E.(2005)**, Nosocomial bloodstream infections in children and adolescents in southern Israel: A 10-year prospective study.
- [104]:- **Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, Bischoff I, Wenzel RP, Edmond MB,(2003)**, Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients, in United States hospitals : Epidemiology clinical features and susceptibilities.
- [105]:- **Dossi TCM, Zepeda FG et Ledermann DYW. (2007)**. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in a cohort of children with cancer. *Rev Chil Infect*.
- [106]:- **Alsubaie S, Bahkali K, Somily AM, Alzamil F, Alrabiaah A, Alkhattaf F, Kambal A, Al-Qahtani AA, Al-Ahdal MN. (2012)**. Nosocomial transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a well-infant nursery of a teaching hospital. *Pediatr Int*.
- [107]:- **Lazenby GB, Soper DE, Beardsley W, Salgado CD. (2012)**. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among women admitted for preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*.
- [108]:- **Jeong J H., Lee DW., Ryu R A. Lee Y S., Lee SH., Kang J O., et Tae K. (2007)**. Bacteriologic comparison of tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *The Laryngoscope*.
- [109]:- **Mallet E. (1997)**. Etiologie, expression Clinique de l'angine. *Médecine Mal. Infect*. 27, 418-423.

## Références bibliographiques

- [110]:-**Rebiahi S A (2011)**. Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur résistance aux antibiotiques au niveau du centre hospitalier universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat : université de Tlemcen, Option Microbiologie. 168.
- [111]:-**Leclercq, R. (2002)** Résistance des staphylocoques aux antibiotiques Ann Fr Anesth Réanim 2002;21 : 375-83. 2002 Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
- [112]:-**Bekkoucha SN, Cady A, Gautier P, Itim F, Donnio PY (2008)**. A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean sea: molecular characteristics of isolates from western Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- [113]:-**ANTRI K., ROUZIC N., DAUWALDER O., BOUBEKRI I., BES M., LINA G., VANDENESCH F., TAZIR M., RAMDANI-BOUGUESSA N. et ETIENNE J. (2010)**. « High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80IV in hospital and community settings in Algiers ». *Clinical Microbiology and Infection*.
- [114]:-**Hala MAS, Bakra AEA, Hashad ME et Alzohairy MA. (2015)**. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among outpatients attending primary health care centers: a comparative study of two cities in Saudi Arabia and Egypt. *Braz J Infect Dis*. 19, 68-76.
- [115]:-**Bokarewa, MI., Jin T., Tarkowski, A. Staphylococcus; Staphylokinase. (2006)**, *Int J Biochem Cell Biol*. p504-509.
- [116]:-**Tomasz, A., Nachman, S., Leaf, H. (1991)**. Stable class of phenotypic expression in methicillin-resistance clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*; p124-129.
- [117]:-**Koukos, G., Sakellari, D., Arsenakis, m., Tsalikis, L., Slini, T. and konstantinidis, A. (2015)**. Prevalence of *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. *Arch. Oral. Biol*.
- [118]:- **Marsh, P.D. (2000)**, Role of the oral microflora in health *Microbial Ecology in Health and Disease*.
- [119]:- **Smith, A., Jackson, M. et Bagg, J. (2001)**. The ecology of staphylococcus species in the oral cavity. *Journal of staphylococcus species in the oral cavity*. *Journal of Medical Microbiology*.



## *Annexes*

## Annexe 1 : Fiche des renseignements des patients inclus dans l'étude

Code	Mois	Age	Sexe	Maladie	Prescription D'antibiotique	Résultat
P1	Avril	12 ans	Fille	Angine	Oui	-
P2	Avril	14 ans	Fille	Diabétique	Oui	-
P3	Avril	2 mois 1/2	Garçon	Grippe	Oui	-
P4	Avril	9 mois	Garçon	Grippe	Oui	-
P5	Avril	14 mois	Garçon	Absence	Oui	-
P6	Avril	2 ans 1/2	Fille	Absence	Non	+
P7	Avril	7 ans	Fille	Absence	Oui	-
P8	Avril	9 mois	Fille	Absence	Non	-
P9	Avril	12 ans	Fille	absence	Non	+
P10	Avril	6 ans 1/2	Garçon	Lazme	Non	-
P11	Avril	4 mois	Fille	Grippe	Non	-
P12	Avril	2 ans	Garçon	Grippe	Oui	-
P13	Avril	5 ans	Garçon	Diabétique	Non	-
P14	Avril	6 ans	Garçon	Angine	Non	-
P15	Avril	9ans	Garçon	Angine	Non	+
P16	Avril	11 ans	Fille	Absence	Non	+
P17	Avril	2 mois 1/2	Fille	Grippe	Non	+
P18	Avril	3 ans	Garçon	Grippe	Non	+
P19	Avril	3 ans	Fille	Angine	Non	+
P20	Avril	2 mois 1/2	Garçon	Grippe	Non	+
P21	Avril	19 jours	Fille	Problème respiratoire	Non	-
P22	Avril	18 mois	Fille	Absence	Non	+
P23	Avril	6 jours	Garçon	Anémie	Non	+
P24	Avril	7 mois	Fille	Absence	Non	+
P25	Avril	13 ans	Garçon	Absence	Non	+
P26	Avril	3ans	Garçon	Problème respiratoire	Non	+
P27	Avril	3ans 1/2	Fille	Absence	Non	+
P28	Avril	2 ans	Garçon	Angine	Non	+
P29	Avril	1 an	Fille	Grippe	Non	+
P30	Avril	4 ans	Fille	Gastroentérite	Non	+
P31	Avril	2 ans 1/2	Garçon	Grippe	Non	+
P32	Avril	11 mois	Garçon	Grippe	Non	+
P33	Avril	3 mois	Garçon	Grippe	Non	+
P34	Avril	4 ans	Fille	Angine	Non	+
P35	Avril	10 ans	Fille	Absence	Non	+
P36	Avril	1 an	Garçon	Grippe	Non	+
P37	Avril	2 mois	Fille	Grippe	Non	+
P38	Avril	22 mois	Fille	Grippe	Non	+
P39	Avril	4 ans	Garçon	Toxication	Non	+
P40	Avril	2 mois	Fille	Grippe	Non	+
P41	Avril	13 mois	Fille	Absence	Non	-
P42	Avril	6 ans	Garçon	Grippe	Non	-

P43	Avril	6 mois	Fille	Grippe	Non	-
P44	Avril	3 ans 1/2	Fille	Grippe	Non	+
P45	Avril	14 ans	Fille	Absence	Non	-
P46	Avril	15 ans	Fille	Grippe	Non	+
P47	Avril	3 mois	Fille	Grippe	Non	+
P48	Avril	3 mois	Garçon	Grippe	Non	-
P49	Avril	1 semaine	Garçon	Anémie	Non	+
P50	Avril	8 mois	Garçon	Virus	Non	+
P51	Avril	13 ans	Fille	Infection urinaire	Non	+
P52	Avril	7 ans	Garçon	Absence	Non	-
P53	Avril	10 ans	Fille	Absence	Non	+
P54	Avril	2 mois	Garçon	Grippe	Non	+
P55	Avril	8 mois	Garçon	Térticoïde	Non	+
P56	Avril	6 mois	Garçon	Grippe	Non	+
P57	Avril	6 ans	Fille	Grippe	Non	+
P58	Avril	14 ans	Fille	Abcés de dent	Non	+
P59	Avril	3 ans	Fille	Grippe	Oui	+
P60	Avril	3 ans	Fille	Grippe	Non	+
P61	Avril	14 ans	Fille	Angine	Non	+
P62	Avril	14 ans	Fille	Absés de dent	Non	+
P63	Avril	3 ans 1/2	Garçon	Angine	Non	+
P64	Avril	9 ans	Fille	Angine	Non	+
P65	Avril	7 ans	Garçon	Angine	Non	+
P66	Avril	5 ans	Garçon	Angine	Non	-
P67	Avril	6 ans	Fille	Douleur abdominal	Non	-
P68	Avril	3 ans	Fille	Infection urinaire	Non	+
P69	Avril	3 ans	Garçon	Angine	Non	+
P70	Avril	14 ans	Garçon	Tuberculose	Non	+
P71	Avril	6 mois	Garçon	Grippe	Non	+
P72	Avril	5 ans	Fille	Opération (Hémigdales)	Non	+
P73	Avril	4 ans	Fille	Angine	Oui	+
P74	Avril	13 ans	Garçon	Grippe	Non	+
P75	Avril	4 ans 1/2	Garçon	Angine	Non	+
P76	Avril	15 joures	Garçon	Angine	Non	+
P77	Avril	1 ans	Fille	I.Urinaire	Non	-
P78	Avril	5 ans	Fille	Angine	Non	-
P79	Avril					-
P80	Avril	9 ans	Fille	Grippe	Non	-

## Annexe 2 : milieux de culture

Tableau 1 : Gélose Mueller-Hinton

Composition	Valeur
Infusion de viande de boeuf	300.0 ml
Peptone de caséine	17.5 g
Amidon de maïs	1.5 g
Agar	17.0 g
PH=7.4	

**Tableau 2 : Milieu Chapman**

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Extrait de viande (bovin ou porcin)	1 g
Peptone de caséine et de viande	10 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10 g
Agar	15 g
Rouge de phénol	0.025 g
PH=7.6	

Préparation : 111 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

**Tableau 3 : Bouillon cœur-cerveille (BHIB)**

<b>Composition</b>	<b>Valeur</b>
Infusion de cervelle de veau	12.5 g
Infusion de cœur de boeuf	50.0 g
Peptone	10.0 g
Glucose	2.0 g
Chlorure de sodium	2.0 g
Phosphatase de sodium	5 g
PH=7.4	

Préparation : 37 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 120°C à 20 minutes.

**Annexe 3 : Coloration de Gram**

**Tableau 01 : Violet de gentiane**

<b>Composition</b>	<b>Valeur</b>
Phénol	2 g
Violet de gentiane	1 g
Ethanol à 90°	10 ml
Eau distillée	100 ml

**Tableau 02 : Lugol**

<b>Composition</b>	<b>Valeur</b>
Iodure de potassium	2 g
Iode métalloïde	1 g
Eau distillée	300 ml

**Tableau 03 : Fuschine de Ziehl**

<b>Composition</b>	<b>Valeur</b>
Fuschine basique	1 g
Phénol	5 g
Ethanol à 90°	10 ml
Eau distillée	100 ml

Annexe 04 : Profils de résistances de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis des antibiotiques

Souches	TE	P	FC	OX	CIP	S	C	RD	RP	E
<b>P6</b>	®	®	(S)	®	(S)	®	®	(S)	(S)	(S)
<b>P9</b>	29(S)	®	>30(S)	®	28(S)	17(S)	/	>34(S)	23(S)	24(S)
<b>P10</b>	24(S)	®	>30(S)	®	26(S)	18(S)	/	>30(S)	/	25(S)
<b>P16</b>	®	®	®	®	22(S)	®	®	>30(S)	24(S)	25(S)
<b>P20</b>	®	®	>30(S)	®	>30(S)	®	>30(S)	>30(S)	28(S)	26(S)
<b>P31</b>	®	®	®	®	(S)	®	/	24(S)	/	/
<b>P32</b>	®	®	®	®	(S)	®	/	24(S)	/	/
<b>P33</b>	®	®	30(S)	®	(S)	®	/	40(S)	/	/
<b>P35</b>	®	®	38(S)	®	(S)	®	/	(S)	43(S)	/
<b>P36</b>	®	®	(S)	®	(S)	®	/	(S)	®	®
<b>P37</b>	®	®	(S)	®	(S)	®	/	(S)	®	®
<b>P40</b>	®	®	>30(S)	®	(S)	(I)	/	(S)	>30(S)	/



Code	Absorbance (nm)			Concentration (0,1 µg/µl)
	40	80	120	
P6		0,270		1,878
P9		0,326		2,253
P15		0,645		4,456
P16		0,398		2,750
P17		0,376		2,598
P18		0,376		2,598
P19		0,263		1,816
P20		0,618		4,269
P22		0,280		1,937
P23		0,588		4,065
P24		0,307		2,124
P25		0,361		2,494
P26		0,385		2,663
P27		0,367		2,538
P28		0,372		2,570
P29		0,393		2,713
P30		0,626		4,294
P31		0,375		2,593
P32		0,613		4,235
P33		0,358		2,474
P34		0,378		2,614
P35		0,362		2,499
P36		0,594		4,106
P37		0,321		2,218
P38		0,373		2,575
P39		0,398		2,753
P40		0,608		4,198
P41		0,389		2,690
P44		0,381		2,630
P46		0,343		2,368
P47		0,283		1,956
P49		0,638		4,407
P50		0,246		1,698
P51		0,361		2,495
P53		0,390		2,695
P54		0,375		2,591
P55		0,594		4,106
P56		0,410		2,835
P57		0,608		4,198
P58		0,611		4,223
P59		0,374		2,582
P60		0,586		4,049
P61		0,370		0,370
P62		0,374		2,587
P63		0,347		2,400
P64		0,354		2,448
P65		0,602		4,159
P68		0,366		2,527
P69		0,374		2,582

<b>P70</b>	<b>0,339</b>	<b>2,340</b>
<b>P71</b>	<b>0,369</b>	<b>2,550</b>
<b>P72</b>	<b>0,296</b>	<b>2,046</b>
<b>P73</b>	<b>0,312</b>	<b>2,154</b>
<b>P74</b>	<b>0,250</b>	<b>1,730</b>
<b>P75</b>	<b>0,278</b>	<b>1,919</b>
<b>P76</b>	<b>0,287</b>	<b>1,981</b>

## Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier la caractérisation moléculaire de la résistance de *Staphylococcus aureus* à la métécilline isolés de la cavité buccale des enfants malades.

80 prélèvements a été effectué au niveau de l' EPH d'Amizour. Les cultures des prélèvements de la cavité buccale ont été positives à *S.aureus* dans 68,75 % des cas. La fréquence la plus élevée d'isolement de la bactérie a été observée chez les enfants de 7 jours à 2 ans . Une prévalence de 53% de *S.aureus* chez les filles et 47% chez les garçons .

100 % des prélèvement ont été traitée par des antibiotiques et tous les échantillons sont résistants à la métécilline ; et aussi sont positifs aux tests de catalase et de coagulase . Un dosage des protéines de *S.aureus* a été également réalisée.

**Mots clés :** *Staphylococcus aureus* ; cavité buccale ; enfants ; antibiotiques .

## Abstrat

The objective of this work is to study the molecular characterization of the resistance of *Staphylococcus aureus* to metecillin isolated from the oral cavity of sick children.

80 samples were taken at the EPH of Amizour. Cultures of oral cavity samples were positive for *S.aureus* in 68,75 % of cases. The highest frequency of isolation of the bacteria was observed in children from 7 days to 2 years of age. A prevalence of 53% of *S.aureus* in girls and 47% in boys.

100% of samples were treated with antibiotics and all samples are resistant to metecillin; and also test positive for catalase and coagulase. A *S.aureus* protein assay was also performed.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; oral cavity; children; antibiotics.

