

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

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Fondamentale



Réf :.....

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

MASTER

Thème

Etude de la pathogénicité des souches de Staphylococcus aureus d'origine clinique.

Présenté par :

MERAR SOUAD

Soutenu le : 30 Juin 2024

Devant le jury composé de :

Mme YANAT B.	MCA	Président
Mme BENACHOUR K.	MAA	Encadreur
Mr BENJEDDOU K.	MCA	Examineur

Année universitaire : 2023 / 2024

Remerciement

Avant de commencer, je remercie « le bon Dieu » de m`avoir donné la santé, le courage et la volonté pour réaliser mon rêve et l`achèvement de ce travail.

*Je tiens à présenter mes grandes reconnaissances à ma promotrice **Mme BENACHOUR KARIMA**, pour son encadrement, ses conseils et orientation tout au long de ce travail.*

*Je tiens également à exprimer mes vifs remerciement à **Mme YANAT** pour m`avoir fait l`honneur d`accepter de présider ce jury, et **Mr BENJEDDOU** d`avoir accepté de faire partie du jury et d`examiner ce présent travail.*

Je remercie les cadres de laboratoire Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et la Vie.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

SOUAD

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À la mémoire de mon père Hachemi qui a toujours été présent pour nous et qui l'est toujours dans nos cœurs, paix à ton âme mon chère père.

À ma mère qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation et qui m'a beaucoup aidée, encouragée et soutenue le long de mon parcours scolaire et universitaire, que Dieu la préserve une longue vie. Cette graduation est dédiée spécialement pour toi ma chère maman.

À mes très chères sœurs : Ghania et son marie Dalil, Lila, Katia, sabiha, Hanifa et Zahoua.

À mes chers frères : Nacer, Said, Ali et Ferhat.

À mes nouveau : Yacine, Walid, Ghilase, Aksel et Massinissa.

À mes adorables nièces : Sidra, Thiziri, lilia, Cylia et Chahed-lyticia.

SOUAD

Listes des figures

Figure 1 : Aspect de *S. aureus* suite à une coloration de Gram.

Figure 2 : Facteurs de virulences du *S. aureus*.

Figure 3 : Aspect macroscopique de *S. aureus* sur gélose Chapman.

Figure 4 : *S. aureus* producteurs de slim.

Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la protéine standard BSA (mg/ml).

Figure 6 : Histogramme de la concentration des protéines dans les surnageant des cultures de souches *S. aureus* dans le bouillon nutritif.

Figure 7 : Histogramme de la concentration des protéines dans les surnageant des cultures de souches *S. aureus* dans le bouillon MH.

Figure 8 : Histogramme de la concentration des protéines dans les surnageant des cultures de souches *S. aureus* dans le bouillon BHIB.

Figure 9 : Histogramme de la concentration des protéines dans les surnageant des cultures de souches *S. aureus* dans le bouillon BHIB additionnée de l'oxacilline.

Figure 10 : Résultat de test d'antibiogramme par l'oxacillines chez *S. aureus*.

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des souches bactériennes étudiée.

Tableau II : préparation de la gamme étalon de la BSA.

Tableau III : Résultat de production de biofilm par *S. aureus*.

Tableau IV : Résultat de l'absorbance de la protéine standard BSA.

Tableau V : la concentration des protéines des souches des *S. aureus* dans le bouillon nutritive (BN).

Tableau VI : La concentration des protéines des souches des *S. aureus* dans le bouillon Muller-Hinton (MH).

Tableau VII : La concentration des protéines des souches des *S. aureus* dans le bouillon BHIB.

Tableau VIII : La concentration des protéines des souches des *S. aureus* dans le milieu BHIB additionnée de « l'oxacilline ».

Liste d`abréviation

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

Agr : Accessory gen regulator.

ARN III : Acide Ribonucléique.

AW : Activité Water (activité en eau).

BHIB : Brain Heart Infusion Broth (Bouillon cœur cervelle).

BN : Bouillon Nutritive .

BSA : Bovin Serum Albumin.

CMH II : Major Histocompatibility complexe class II.

Dnase : Désoxyribonucléase.

DO : Densité optique.

Eap : Extracellular Adherence Protein.

Efb : Extracellular Fibbrinogen Binding Protein.

FAME : Fatty Acide Modifying Enzyme.

Fc : Récepteur Fc.

FnBP : Fibronectin-Binding Protein.

H₂O₂ : Hydrogen Peroxide.

Hémolysine α : hémolysine alpha.

Hémolysine β : hémolysine beta.

Hémolysine γ : hémolysine gamma.

Hémolysine δ : hémolysine delta.

Ig G : Immunoglobuline G.

LTA : les acides téichoïques.

LukF-PV: Fast eluted Panton Valentine.

LukS-PV: Slow eluted Panton Valentine.

MEC : Matrix extracellulaire.

MH : Muller-Hinton.

MSCRAMM : Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules.

PBP2a : Penicillin Binding Protein 2a.

PG : peptidoglycane.

pH : Potentiel Hydrogène.

PSM : Phenol Soluble Modulins.

PVL /LPV : Leucocidine de Panton Valentine.

RCA : Rouge Congo Agar.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

SCN : Staphylocoques à coagulase négative.

SCP : Staphylocoques à coagulase positive.

SE : Entérotoxine Staphylococcique.

SEIs : enterotoxin-like.

SERAMs : Secretable Expanded Repertoire Adhesiv Moleculs.

TCR : Récepteur des lymphocytes T.

TSST-1: Toxic shock syndrome toxin 1.

Table des matières

Table des matières

List des figures

List des tableaux

List des abbreviations

Introduction	1
I. <i>Staphylococcus Spp</i>	2
I.1. Historique.....	2
I.2. Taxonomie.....	2
I.3. Caractéristique bactériologique.....	2
I.3.1. Morphologies.....	2
I.3.2. Caractères culturels.....	3
I.3.3. Caractères biochimique.....	3
I.4. Niches écologique.....	4
I.5. Mode de transmission.....	4
I.6. Pathogénicité.....	4
I.7. Facteurs de virulence.....	5
II. Matériel et méthodes	
II.1. Origines des souches.....	15
II.2. Revivification et verification de la pureté des souches bactériennes.....	15
II.3. Determinacion de la presencia de factores de virulencia en <i>S. aureus</i>	16
II.3.1. Test de catalase.....	16
II.3.2. Test de coagulase.....	16
II.3.3. Test de DNase.....	16
II.3.4. Recherche de production de biofilm.....	17
II.3.5. Détection de la capsule.....	17
II.3.6. Dosage des protéines des cultures bactériennes par la méthode de Bradford (1976)...	17
II.3.7. Etude de la sensibilité à l'Oxacilline.....	18
III. Résultats et Discussion	
III.1. Revivification et vérification de la pureté des souches.....	21
III.2. Détermination de la présence des facteurs de virulence chez les <i>S. aureus</i> utilisés.....	21
III.2.1. Test de la catalase	21
III.2.2. Test de DNase	21

III.2.3. Recherche de production de biofilm	22
III.2.4. Détection de la capsule.....	23
III.2.5. Dosage des protéines des cultures par la méthode de Bradford (1976).....	23
III.2.6. Résultat de etude de la sensibilité à l'Oxacillin.....	27
Conclusion	29

Références bibliographique

Annexes

Résumé

Introduction

Introduction

De nombreuses recherches portent sur *Staphylococcus aureus*, à cause de la gravité des infections engendrées chez les humains et les animaux, et cela grâce aux plusieurs facteurs de virulence qu'elle présente et sa capacité à développer une résistance aux différents antibiotiques.

C'est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses, en particulier les narines et les voies gastro-intestinales de l'Homme. La colonisation nasale concerne environ 30-50% de la population générale (Wertheim, 2005). *S. aureus* peuvent également coloniser le pharynx, l'intestin, le périnée, la peau et les aisselles.

Ce micro-organisme est responsable d'infections très polymorphes : communautaires ou nosocomiales, superficielles ou profonde, bénignes ou létale. Ainsi, causant des infections cutanées telles que la folliculite et les furoncles, les infections muqueuses comme les otites et la conjonctivite. Ces infections peuvent se développer en septicémies, bactériémies, pneumonies, ostéomyélites et endocardites (Kim, 2014).

La pathogénicité de *S. aureus* est liée à la synthèse de nombreux facteurs de virulence, parmi eux on trouve les enzymes (coagulases, fibrinolysines et protéases) et des toxines (entérotoxines, leucocidines) (Bergon, 2016).

Le présent travail a pour objectif de détecter certains facteurs de virulence de *S. aureus*, et parmi eux ont à : la présence d'une capsule polysaccharidiques, la révélation positif au test de la coagulase vis-à-vis du plasma Humain, ainsi la résistance à l'antibiotique « Oxacilline », et cela afin de répondre à la problématique suivantes : la pathogénicité de *S. aureus* est due à plusieurs facteurs de virulences, quels sont ces facteurs ?

Pour cela nous avons structuré ce travail en trois parties interdépendantes :

Partie 1: est destinée à présenter la bactérie *S. aureus* ainsi que ces niches écologique et facteurs de virulence.

Partie 2: est consacrée aux matériel, méthodes et techniques utilisées pour l'identification de *S. aureus* et la mise en évidence de ces facteurs de virulence.

Partie 3: concerne les résultats obtenus et les discussions, suivis d'une conclusion générale.

Synthèse Bibliographique

I. *Staphylococcus Spp*

I.1. Historique

Plusieurs travaux réalisés dans les années 1870 ont mis en évidence la présence de cocci dans des pus et des abcès. Considérés comme une entité unique, ils furent nommés *Cocco bacteria septicum* par Billroth en 1874 (**Pascale, 2013**).

Ainsi en 1878, Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans des pus d'origine Humaine (pus de furoncles et d'ostéomyélites). La même année, en Ecosse, Alexander Ogston propose le nom « Staphylococcus » (staphylê : grappe et kokkos : grain) car les bactéries se regroupent en amas irréguliers ressemblant à une grappe de raisin (**Hennekinne, 2009**). Les premiers isolats et cultures *in vitro* ont été réalisés par Ogston en 1881 (**Claire, 2012**).

I.2. Taxonomie

Selon la 2^{ème} édition du « Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology », le *Staphylococcus aureus* aussi appelée « *Staphylococcus doré* » étant classée parmi les bactéries à Gram positif (**Garrity et al., 2007**), dans le phylum des Firmicutes, à la classe des Baccilli, et à l'ordre des Bacillales.

Le genre *Staphylococcus* est rattaché à la famille des *Staphylococcaceae* qui contient 4 autres genres : *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macroccus* et *Salinicoccus*.

Actuellement, plusieurs espèces et sous-espèces ont été détectées au sein du genre *Staphylococcus*, qui sont scindées en deux groupes selon qu'elles produisent ou non la coagulase :

- Coagulase positive : dont *S. aureus* considéré comme l'espèce la plus pathogène.
- Coagulase négative : contient les espèces *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis*... (**Le**

loir et Gautier, 2010).

I.3. Caractères bactériologiques

I.3.1. Morphologie

S. aureus est immobile, non sporulé, après une coloration de Gram, il se révèle être des cocci à Gram positif, d'environ 0,5 à 1 µm de diamètre (**Figure 01**) (**Touatia, 2016 ; Eyque et al., 1998**).

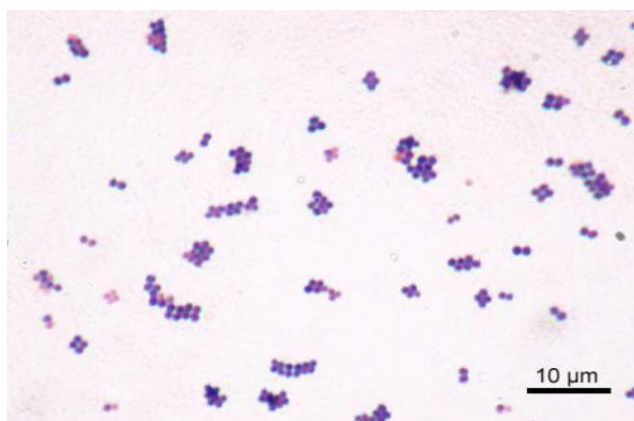


Figure 01: Aspect de *S. aureus* après à une coloration de Gram.

Sur milieux solides, il se dispose en amas irréguliers polyédriques évoquant l'aspect de grappe de raisin (Aouati, 2009 ; Fauchere et Avril, 2002). Cependant sur milieu liquide, il est souvent isolé, en diplocoques, ou en tétrades, ou en très courtes chainettes (Le Minor et Veron, 1990).

La majorité des souches de *S. aureus* sont dépourvues de capsule. Néanmoins, quelques souches peuvent former des colonies mucoides qui sont entourées d'une pseudo-capsule « Le Slime » dans un milieu riche (Le Minor et Veron, 1990).

I.3.2. Caractères cultureux

S. aureus est une bactérie aéro-anaérobie facultatif, sa croissance est plus rapide et plus abondante en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies. C'est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. Elle est capable de se multiplier à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un pH optimal de croissance de 7 à 7,5. Elle est halotolérante et peut se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (en général jusqu'à 10 %) (Brisabois et al., 1997 ; Schleifer et Bell, 2009). Elle peut aussi tolérer une activité en eau très réduite ($A_w = 0,83$) (Verdier et al., 2012).

Cependant, les souches small colony variant de *Staphylococcus aureus* sont au contraire punctiformes, non hémolytiques et non pigmentée.

I.3.3. Caractères biochimiques

S. aureus est caractérisé par la production d'une catalase et d'une coagulase mais pas d'oxydase, et aussi la production d'une endonucléase thermostable et la fermentation du mannitol (Shittu et al., 2007 ; Durand, 2009).

Les souches de *S. aureus* sont : indole (-), acétone (+), uréase (+), réduisent le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisent de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Aouati, 2009 ; Le Minor et Veron, 1990).

I.4.Niches écologiques

I.4.1. Dans l'environnement

S. aureus est une bactérie très répandue dans l'environnement. Elle est capable de survivre dans un large éventail de biotopes. Ces capacités expliquent en partie la difficulté à éradiquer cette bactérie. Elle possède la capacité d'adaptation et de résistance au stress importants, on le trouve de façon très répandue dans la nature, fréquemment dans l'eau, l'air, les poussières cette bactérie peut être aussi isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer et la surface des plantes (Dworkin, et al., 2006).

I.4.2. Chez l'être vivant

S. aureus est un germe ubiquitaire (Le Minor et Veron, 1990). Son réservoir naturel est l'homme et les animaux à sang chaud (Touatia, 2016). Dans les heures qui suivent la naissance, *S. aureus* colonise la peau, l'ombilic, le tube digestif et le périnée du nouveau-né. Cette colonisation fluctue jusqu'à l'âge de 6 ans où l'on considère qu'elle est représentative du portage à l'âge adulte.

Chez l'adulte, *S. aureus* est présent dans les zones cutanées humides et colonise surtout les muqueuses des fosses nasales et de l'oropharynx mais aussi le périnée. La peau, particulièrement celle des mains, est régulièrement colonisée (Mallet et al., 2004).

Le site de colonisation préférentiel de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. 20 à 30% des adultes sont porteurs de *S. aureus* au niveau des fosses antérieures du nez. 20% sont également au niveau digestif et entre 8 et 15% au niveau vaginal.

I.5.Mode de transmission

La transmission intra-ou interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage) (Nauciel et Vilde, 2005). Plus rarement, elle peut être indirecte à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériels médicaux), ou aussi par l'intermédiaire des aliments (la multiplication d'une souche produisant de l'enterotoxine peut être responsable d'une toxi-infection alimentaire collective) (Avril et al., 2003).

I.6.Pathogénicité

S. aureus est à la fois une bactérie commensale et pathogène de l'Homme. Cette apparente contradiction a rendu cette bactérie particulièrement intéressante à explorer au niveau

moléculaire. Les travaux de séquençage du génome de *S. aureus* ont permis de percer le secret de ce pouvoir d'adaptation (Holtfreter et al., 2007).

Le génome de *S. aureus* est formé de deux domaines fonctionnels distincts. La majeure partie du chromosome (75%) appelé « core » contient les gènes qui assurent le métabolisme de la bactérie. La deuxième partie du génome (25%) est constituée d'éléments génétiques accessoires et mobiles comme des plasmides, transposons, prophages ou des îlots de pathogénicité portant la plupart des gènes associés à des facteurs de virulence (Issartel et al., 2005 ; Juuti et al., 2004).

L'expression de la majorité de ces facteurs de virulence est régulée par de nombreux systèmes dont le plus général est appelé Accessory Gene regulator (Agr) (Robert, 2013).

I.7. Facteurs de virulence

La virulence des souches de *S. aureus* est liée à la production d'une grande variété de composés. Ces composés sont soit associés à la paroi de la bactérie (protéine A, adhésines), soit excrétés dans l'environnement de la bactérie (toxines, enzymes) (Figure 2).

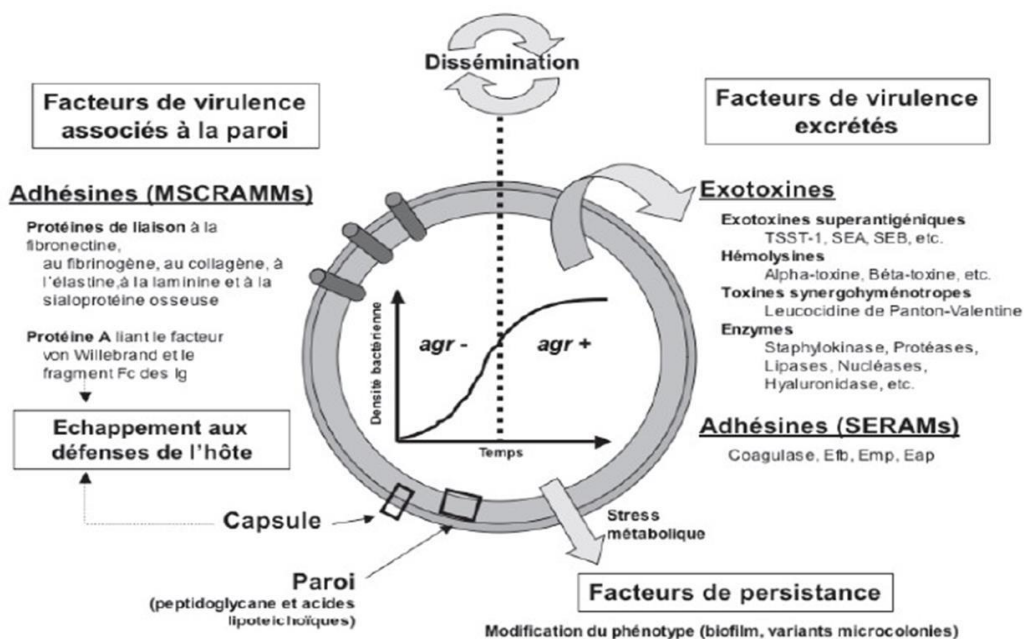


Figure 02 : Facteurs de virulences du *S. aureus* (LAYS, 2012).

I.7.1. Facteurs de virulence sécréter lors de la colonisation de l'hôte :

A. Adhésines

S. aureus possède des composantes de surfaces, appelées adhésines, reconnaissant différentes protéines du plasma et/ou de la matrice extracellulaire.

Les adhésines les mieux caractérisé sont celles qui reconnaissent le fibrinogène ou la fibrine, le collagène ou la fibronectine.

-Adhésines ancrés dans la paroi (MSCRAMMs)

Les MSCRAMMs (Microbial Surface Components Reconizing Adhesive Matrix Molecules) sont des protéines associées au peptidoglycane de la bactérie par des liaisons covalentes. Ces adhésines sont responsables de l'attachement de la bactérie à différentes matrices extracellulaires comme le collagène, le fibrinogène ou la fibronectine et initient la colonisation (**Patti et Hook, 1994 ; Patti et al., 1994a ; Foster et Hook, 1988**).

- **Protéine de liaison au fibrinogènes ou Clf**

Les plus décrites sont ClfA et ClfB qui sont des coagulases liée à la paroi cellulaire, agissant comme des facteurs d'agglutination. ClfA se lie au fibrinogène de la matrice extracellulaire à différents sites, ce qui joue un rôle dans l'activation des plaquettes et la formation de caillots sanguins. ClfB se lie à la kératine 10 et à la loricine, jouant un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales nasales desquamées.

- **Protéine de liaison au collagène Cna**

Elle permet l'attachement au collagène de *S. aureus* lors d'infections articulaires ou osseuses. Et elle se lie également à la protéine complémentaire C1q, inhibant ainsi l'activation du système immunitaire de l'hôte.

- **Protéine de liaison à la fibronectine ou FnBP**

Les plus connus sont FnBPA et FnBPB qui sont des protéines qui se lient à plusieurs composant de la matrice extracellulaire, notamment la fibronectine, l'élastine et le fibrinogène.

FnBPA et FnBPB contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques mais également aux biomatériaux comme les cathéters, quand ces derniers ont un contact prolongé avec le sang (**Menzies, 2003**). Elles jouent un rôle important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers (**Eveillard, 2007**).

-Adhésines sécrétés (SERAMs)

Une deuxième classe d'adhésines a été décrite plus récemment, les SERAMs (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules) (Joël, 2014). Elle regroupe les protéines suivantes:

- **Protéine Eap**

Son rôle est de faciliter sa propre phagocytose par les cellules phagocytaires, mais aussi de se fixer aux produits de dégradation de la matrice extracellulaire. Ainsi, *S. aureus* s'attaque de préférence aux tissus lésés et il masque les récepteurs des leucocytes pour limiter leur infiltration. Donc elle inhibe la réaction inflammatoire qu'elle a elle-même provoquée (Robert, 2013).

- **Protéine Efb**

La protéine Efb interagit avec le fragment C3 du complément, cette interaction contrecarre l'activation du complément et l'opsonisation (Lee et al., 2004). De plus, elle se lie aux plaquettes via le fibrinogène ou via les récepteurs GPIIb/IIIa et inhibe ainsi l'agrégation plaquettaire.

I.7.2. Facteurs de virulence sécrétés lors de la prolifération tissulaire

A. Enzymes

-DNase thermostable

La DNase thermostable appelée également thermonucléase est une endonucléase qui coupe les acides désoxyribonucléiques (ADN) en nucléotides ou polynucléotides en hydrolysant les liaisons phosphodiester (Delarras, 2007).

-Catalase

S. aureus possède une catalase permet la dégradation du peroxyde d'oxygène en eau et dioxygène. Elle est très utile en pratique pour différencier les staphylocoques des streptocoques (Robert, 2013).

-Coagulase

La coagulase ou staphylocoagulase codée par le gène *coa* est une protéine de 40 kDa. Elle est retrouvée libre ou associée à la membrane (Kaida et al., 1989). Cette enzyme a été rattachée à la classe des SERAMs car elle ne possède pas de motif LPXTG (Boden et Flock, 1989). C'est une exo-enzyme (protéine extracellulaire), son domaine N-terminal s'associe à la prothrombine pour former la staphylothrombine responsable de la polymérisation du fibrinogène en fibrine d'où la coagulation du plasma d'homme ou de lapin (le loir et Gautier, 2010). Le caillot sanguin formé protège la bactérie de la phagocytose.

-Fibrinolysine

La fibrinolysine, également connue sous le nom de staphylokinase, est une enzyme sécrétée de 15,5 kDa codée par un bactériophage (**Sako et Tsuchida, 1983 ; Van Wamel et al., 2006**).

C'est une protéine qui se fixe au plasminogène et active la production de plasmine qui digère la fibrine des caillots permettant ainsi la dissémination des bactéries au foyer d'infection (**Robert, 2013 ; Prescott et al., 2003 ; Sneath, 1986**).

Elle est impliquée dans la résistance à la réponse immunitaire innée de l'hôte, et possède également la propriété d'empêcher la phagocytose (**Jin et al., 2004**).

-Protéase

Les protéases sécrétées par *S. aureus* ont comme propriété de contrôler l'adhésion de la bactérie. Il en existe quatre majeurs et elles ont en commun la même cascade enzymatique qui veut dire elles s'activent entre elles : la sérine protéase (SspA ou protéase V8), la cystéine protéase 1 (Ssp B ou staphopain B), la cystéine protéase 2 (ScpA) et la métalloprotéase (auréolysine ou Aur) (**Robert, 2013**).

Lors de l'infection, la protéase V8 peut cliver certaines protéines de l'hôte comme les chaînes lourdes des immunoglobulines, indépendamment de leur classe ou l'inhibiteur de protéase α , induisant une augmentation de l'activité protéolytique de l'hôte. Elle assure la protection de *S. aureus* en clivant certains peptides antimicrobiens cationiques tels que la cathélicidine LL17 produite par les kératinocytes et les neutrophiles. Parallèlement, la protéase V8 agit également sur les protéines bactériennes elles-mêmes, notamment par clivage de la coagulase liée, entraînant une diminution de l'adhérence aux cellules hôtes et donc une meilleure dissémination.

Les cystéines protéases sont également impliquées dans la dégradation des élastines, des immunoglobulines G, des peptides antimicrobiens et des protéines du plasma (**Kulig, 2007**). Les protéases de *S. aureus* sont relativement insensibles à la plupart des inhibiteurs de protéases du plasma Humain (**Dubin, 2002**).

-Lipases et Estérase

Les principales lipases sont la glycéroester hydrolase (gène *geh*) et une estérase (gène *lip*) qui hydrolysent respectivement les chaînes longues et les chaînes courtes des triacylglycérols (**Fischetti et Tedesco, 2006**). Les lipases ont démontré un chimiotactisme envers les granulocytes et permettent une diminution de la phagocytose (**Rollof et al., 1988**).

L'association des lipases et d'une enzyme appelée FAME (Fatty Acid Modifying Enzyme), capable d'estérifier les acides gras en cholestérol, permet de favoriser l'entrée de la

bactérie au niveau cutanée. En effet, les acides gras retrouvés dans les abcès ont montré des propriétés toxiques pour *S. aureus*. Leur estérification abolit cet effet et permet à la bactérie de coloniser les lésions cutanées (**Chamberlain et Brueggemann, 1997 ; Lu et al., 2012**).

-Hyaluronidase

C'est une enzyme qui cible l'acide hyaluronique, un composant essentiel de la matrice extracellulaire (MEC). En dégradant l'acide hyaluronique, cette enzyme facilite la diffusion des bactéries à travers les tissus en modifiant la structure de la MEC. Ainsi, *S. aureus* peut se propager plus facilement à travers les tissus de l'hôte. L'hyaluronidase agit en tant que facteurs de diffusion, permettant aux bactéries de coloniser de nouveaux sites et d'éviter les réponses immunitaires.

-Phosphatase

Les phosphatases alcaline (pH optimal 10,8) et acide (pH optimal 5,2) sont localisées sur la membrane cytoplasmique ou les acides teichoïques. Leur rôle physiologique n'est pas connu. Seule la phosphatase acide qui est partiellement libérée dans le milieu (**Aouati, 2009**).

B. Toxines

✓ Les exotoxines

Les exotoxines produites par *S. aureus* sont des protéines toxiques qui jouent un rôle majeur dans la virulence de la bactérie, ciblent les membranes des cellules eucaryotes, par la formation de pores membranaires laissant s'échapper les ions, agissent par lyse enzymatique ou agissent sur le système immunitaire (Super-antigène).

✓ Leucocidine de Pantone Valentine

La leucocidine de Pantone Valentine (PVL) est une toxine synergohyménotrope composée de deux sous-unités protéiques : LukF-PV et LukS-PV, codés respectivement par les gènes LukF-PV et LukS-PV. Ces deux composés sont capables de s'assembler en oligomères et de se fixer spécifiquement sur la membrane des cellules phagocytaires de l'humain et du lapin (**Williams, 1963**).

La PVL appartient à la famille des toxines formant des pores, elle induit une lyse des cellules sanguines mononucléée de l'hôte comme les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages. Elle possède la capacité de créer des pores dans les membranes plasmiques des cellules cibles sur lesquelles elle se fixe et provoque la formation des canaux membranaires laissant passer les cations divalent ce qui induit un désordre ionique majeur, libération des cytokines, activation intracellulaire des protéases, induction de l'apoptose et enfin la mort cellulaire. A forte dose, la PVL a un effet nécrotique sur les

polynucléaires humain tandis qu'à faible concentration, elle induit une apoptose dépendant de la voie mitochondriale (**Martin et al., 2000**).

❖ **Hémolysines**

Les hémolysines représentent des classes cruciales de toxines produites par *S. aureus*, jouant un rôle central dans sa pathogénèse.

-Hémolysine α (alpha)

L'hémolysine α ou α -toxine, codée par le gène *hla*, est une des toxines les plus puissantes caractérisées chez *S. aureus*. L'hémolysine α est sécrétée sous forme de monomère. Lors de la liaison à son récepteur ADAM-10 qui est à la surface de la membrane plasmique des cellules cibles, les monomères s'oligomérisent en hexamère ou heptamère pour former un pore transmembranaire, dans les lymphocytes, les érythrocytes, les plaquettes, les cellules endo- et épithéliales. Les dommages causés à la membrane entraînent la lyse des cellules cibles (**Song et al., 1996**).

L'hémolysine α se lie aussi à des récepteurs spécifiques et induit la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (**Cheung et al., 2002**), ses effets délétères sont doubles : mort des cellules impliquées dans l'immunité innée et acquise, mais également stimulation du métabolisme de l'acide arachidonique, exocytose et dysfonctions de la contractilité, aboutissant à la dissémination bactérienne et à des altérations de l'hémostase (**Dinges et al., 2000**).

-Hémolysine β (beta)

L'hémolysine β est codée par le gène *hlb*. Cette toxine est une phospholipase C possédant une activité sphingomyélinase permettant la dégradation de la sphingomyéline présente sur la membrane des érythrocytes. Selon l'espèce, la teneur en sphingomyéline des érythrocytes est plus ou moins importante. Cette différence explique le fait que les hématies murines, pauvres en sphingomyéline ne soient pas lysées par Hlb contrairement aux hématies de mouton, riches en sphingomyéline qui sont fortement lysées (**Dinges et al., 2000**).

-Hémolysine γ (gamma)

Le gène *hlg* code 3 polypeptides : deux composés S, HlgA et HlgC et un composé F, HlgB. Les gènes *hlgB* et *HlgC* font partie d'un opéron alors que *hlgA* est transcrit seul. L'hémolysine γ est responsable de la lyse des érythrocytes et des leucocytes. Il existe deux combinaisons possibles pour former l'hémolysine γ : HlgA/HlgB ou HlgB/HlgC, la première étant particulièrement active sur les hématies murines, alors que la deuxième est active sur les hématies humaines et de lapin (**Vandenesch et al., 2012**). Selon la combinaison, la spécificité de l'hémolyse est plus ou moins importante (**Dinges et al., 2000**).

-Hémolysine δ (delta)

L'hémolysine δ est une toxine singulière par sa taille de seulement 26 aa, sa stabilité à la chaleur et sa capacité à agir comme un surfactant au niveau des membranes. Cette toxine, codée par le gène *hld*, se présente sous la forme d'une hélice alpha possédant des domaines hydrophobes (Janzon et al., 1989). Sa structure lui permet de former des cylindres hydrophobes pour perméabiliser la membrane des cellules cibles. Cette toxine est aujourd'hui rattachée à une famille de petits peptides sécrétés sans peptide signal et possédant une activité cytolytique, les Phenol Soluble Modulins (PSM). Le gène *hld* possède la particularité d'être codé par l'ARN III, effecteur du système Agr et ARN régulateur. L'expression d'*hld* est initiée en phase exponentielle et est régulée par le système Agr lui-même (Dinges et al., 2000).

-Super-antigènes

S. aureus sécrète une variété de toxines appartenant à la famille des super antigènes (plus de 20 super antigènes) qui est également nommée famille de toxines pyrogènes. Ces toxines induisent une prolifération non spécifique et massive des cellules T, atteignant jusqu'à 20% de toutes les cellules T. Elles agissent en se liant aux chaînes variables du TCR (récepteur des lymphocytes T) $V\beta$ des lymphocytes T et aux chaînes α et β du CMH II (Major Histocompatibility Complex Class II) sur les cellules présentatrices d'antigène. Cette liaison détourne l'activation normale des cellules T, provoque une libération massive des cytokines et entraînant une « tempête de cytokines ».

S. aureus sécrète 2 groupes de super antigènes : la « Toxic Shock Syndrome Toxin-1 » (TSST-1) et les entérotoxines staphylococciques (SEs ou « Staphylococcus Entérotoxines ») avec les protéines « enterotoxin-like » (SEls) (Lina et al., 2004).

-Toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1) est à l'origine de plus de 90 % des chocs toxiques menstruels, sa mortalité est faible proche de 0 %, et 50 % des chocs non menstruels (Bohach et al., 1990), mais peut être aussi secondaire à une bactériémie, la mortalité dans ce dernier cas étant de l'ordre de 20 % (Bernal et al., 1999 ; Becker et al., 2003).

TSST-1 est très soluble dans l'eau, n'a pas de résidus cystéine et elle est généralement résistante à la chaleur et à la protéolyse (Dinges et al., 2000).

-Entérotoxines staphylococciques (SE) comprennent SEA, SEB, SEC, SED, SEG, SEH, SEI, SER et SET. Ces SE ont une résistance intermédiaire à la chaleur et à la digestion par la pepsine.

Ces super antigènes causent des intoxications alimentaires et se distinguent par leur capacité de provoquer des vomissements suite à l'ingestion d'une ou plusieurs SE présente sur les aliments qui ont été contaminés par *S. aureus* (**Dinges et al., 2000**).

-Toxines épidermolytiques ou Exfoliatines (ET)

Les exfoliatines sont responsables de l'impétigo bulleux staphylococcique et du syndrome d'exfoliation généralisée. Ces infections sont surtout retrouvées chez les nourrissons et les enfants (**Bailey et al., 1995**).

Quatre exfoliatines ont été décrites. Les exfoliatines A et B respectivement codées par les gènes *eta* (support bactériophagique) et *etb* (support plasmidique), sont les mieux caractérisées et les plus souvent retrouvées lors d'infection humaine. Les exfoliatines C et D sont respectivement codées par les gènes *etc* et *etd* (support chromosomique).

Les exfoliatines clivent la desmogléine-1(DSG-1), une glycoprotéine transmembranaire du desmosome présente dans les couches superficielles de la peau, qui maintient l'adhésion entre les kératinocytes, reliant les cellules granuleuses de l'épiderme. Ce clivage induit l'apparition de lésions bulleuses (**Ladhani, 2003**).

Les exfoliatines A et B sont considérées comme des superantigènes grâce à leur fonction activatrice de la prolifération des lymphocytes T (**Ladhani, 2003**).

I.7.3. Facteur de virulence sécréter lors de contournement du système immunitaire

A. Capsule

Les polysaccharides capsulaires (dit également Capsule) sont retrouvés dans 90% des isolats cliniques de *S. aureus*, mais la bactérie perd sa capsule généralement après la culture (**Robert, 2013**).

La capsule améliore la virulence en conférant à la bactérie une meilleure résistance face au système immunitaire de l'hôte, notamment en interférant avec la phagocytose et en empêchant les anticorps d'accéder aux épitopes de surface (**Nilsson et al., 1997 ; Cunnuion et al., 2003 ; O'Riordan et Lee, 2004 ; Nanra et al., 2013**).

La capsule possède des exo-polysaccharides qui peuvent constituer un biofilm, élément majeur de virulence, permettant une adhésion accrue aux surfaces des dispositifs médicaux implantable. Cette propriété pourrait favoriser la formation d'abcès (**Dauwalder et al., 2006 et 2007**).

B. Paroi cellulaire

La paroi de *S. aureus* est composée d'acides téichoïques et de peptidoglycane. Le peptidoglycane (PG) possède une activité endotoxine-like proche du lipopolysaccharide,

provoque la libération des cytokines par les macrophages et l'activation du système complément. Il provoque aussi l'agrégation des plaquettes, pouvant ainsi, déclencher une coagulation intra-vasculaire disséminée (**Durand, 2009**).

Le peptidoglycane permet également la liaison de plusieurs protéines de surface, désignées MSCRAMM, ces dernières vont permettre l'adhésion à la surface des cellules à infecter. Les acides téichoïques (LTA) sont des polysaccharides antigéniques liés de façon covalente aux chaînes de peptidoglycane (**AVRIL, 1992**). Ils provoquent une réponse inflammatoire en induisant la sécrétion de cytokines et chimiokines par les phagocytes mononuclés.

I.7.4. Protéines de surface

Les protéines de surfaces peuvent intervenir dans la colonisation, l'adhésion, la diffusion et l'invasion dans un organisme cible (**Robert, 2013**).

-Protéine A

La protéine A codée par le gène *spa* est considérée comme un facteur de virulence majeur et pléiotropique chez *S. aureus*. Cette protéine de surface possède de multiples rôles dans l'interaction avec les cellules hôtes durant le cycle infectieux (**Foster, 2005**).

La protéine A est une protéine de 42 kDa qui peut être présente sous deux formes : sécrétée ou associée à la paroi bactérienne. Elle possède 5 domaines extracellulaires (A, B, C, D, E). Et elle fait partie de la famille des MSCRAMMs. Cette protéine a un intérêt important en biochimie du fait de son affinité pour les immunoglobulines G (Ig G). L'interaction se fait par la chaîne lourde des immunoglobulines, au niveau de la queue Fc.

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Abderrahmane-Mira Bejaia durant la période allant de mois de Mars au mois de Juin 2024. Le but principal de cette étude était d'étudier les facteurs de virulence des souches de *Staphylococcus aureus*.

II. Matériel et méthodes

II.1. Origines des souches

Au cours de cette étude, neuf souches de *S. aureus* ont été utilisées (tableau I). Elles ont été isolées à partir des angines infantiles et conservées dans le bouillon cœur-cerveille (BHIB) à 4°C.

Tableau I : Liste des souches bactériennes étudiées

Souche	Référence	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	P58 1	Angines infantiles (Clinique)
	P58 2	
	P58 3	
	P58 4	
	P58 5	
	P59 1	
	P59 2	
	P59 3	
	P59 4	

II.2. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes

La revivification des souches des *S. aureus* a pour but d'obtenir des cultures jeune, fraîche et pure. La purification se fait par des repiquages successifs sur un milieu d'isolement (Gélose Chapman) et sur le bouillon (BHIB).

Un volume de 1ml de la culture conservée de *S. aureus* estensemencé dans un tube contenant 9 ml du bouillon BHIB puis une incubation est effectuée, dans l'étuve, à 37°C pendant 18-24heures. Une fois une croissance est détectée ; des repiquages sur gélose Chapman sont réalisés.

La vérification de la pureté des bactéries utilisée est assurée par la coloration de Gram qui permettra de distinguer le Gram mais aussi la morphologie des bactéries après observation au microscope optique à l'objectif (GX 100).

Les bactéries à Gram positive seront colorées en violet tandis que les bactéries à Gram négatif seront colorées en rose.

II.3. Détermination de la présence des facteurs de Virulence chez les *S. aureus* utilisés

II.3.1. Test de catalase

La catalase est une oxydoréductase intervenant dans le mécanisme de résistance et permettra également la décomposition de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par la souche. Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques.

La recherche de cette enzyme consiste à mettre sur une lame stérile une colonie de *Staphylococcus aureus*, prélevée à partir de la gélose Chapman, en contact direct avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

L'observation se fait à l'œil nu, s'il y a une effervescence (apparition des bulles d'air).

✚ Catalase+: présences d'effervescence.

✚ Catalase - : absence d'effervescence.

II.3.2. Test de la coagulase

Afin de différencier entre les staphylocoques à coagulase positive (SCP) et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), on réalise le test de la coagulase. Pour réaliser ce test, on procède comme suite :

Quelques colonies caractéristiques sur gélose Chapman ont étéensemencées dans un bouillon BHIB, puis incubée à 37°C pendant 18-24heures. Après croissance, dans des tubes à hémolyse, on met 0,5 ml de plasma Humain en lui ajoute 0,5 ml de chaque bouillon BHIB présentent un trouble. Puis les tubes sont bien mélanger au vortex et incubée à 37°C pendant 30 minutes, 1 heure, 4 heures et 24 heures. Un résultat positif se traduit par la prise en masse du plasma dans le tube à hémolyse.

Une coagulation put être observée après les 30 minutes premières d'incubation, mais la lecture doit être poursuivis jusqu'à 24 heures, car la réaction est plus au moins lent selon les souches.

II.3.3. Test de DNase

Ce test permet l'identification et la différenciation de *S. aureus* des autres espèces bactériennes. Il est réalisé sur la gélose à la DNase, à l'aide d'un écouvillon stérile, nous avonsensemencé par striés toutes les souches de *S. aureus*.

Après incubation à 37°C pendant 24heures, nous avons inondé la boîte pétrie avec le HCl à 1N. Après contact de 5 minutes, nous avons éliminé l'excès de HCl.

Le test DNase est positif lorsqu'un halo claire est apparait autour des colonies et le reste de la gélose est opaque.

II.3.4. Recherche de production de biofilm

Afin de détecter la capacité de production d'un biofilm chez les souches de *S aureus*, nous avons choisi la méthode de culture sur la gélose Rouge Congo (**Rewatkar et Wadher, 2013 ; Kara Terki, 2014**).

Sur gélose RCA, à partir des cultures bactériennes de 24 heures sur bouillon BHIB, nous avons ensemencé par striés à l'aide d'anse de platine bien stériliser, toutes les souches de *S. aureus*. Puis incubée à 37°C pendant 24 heures.

Les souches de *Staphylococcus aureus* productrice de biofilm donnent des colonies noires, tandis que le non producteur reste rouge.

II.3.5. Détection de la capsule

La mise en évidence de la capsule se fait au microscope optique par la réalisation d'une coloration de capsule.

Sur une lame stérile, on met une goutte d'une suspension bactérienne (bouillon BHIB), et à une distance de 0.5 cm on dépose une goutte de l'encre de chine, puis on recouvre les deux gouttes avec une lamelle. L'observation se fait à l'objectif (GX 40).

La capsule polysaccharidique, apparaît sous forme d'un halo claire entourant le corps bactérienne.

II.3.6. Dosage des protéines des cultures bactériennes par la méthode de Bradford (1976)

La méthode de Bradford est un dosage spectrophotométrique, basé sur le changement d'absorbance après la fixation d'un colorant, se manifestant par le changement de la couleur du Bleu de Coomassie G250 après liaison avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés (aromatique) présents dans la ou les protéines. La forme liée (anionique) du colorant est bleu, et possède un spectre d'absorption maximal 595 nm. Les formes libres (cationiques) du colorant sont rouges et marrons, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

A-Elaboration de la courbe d'étalonnage standard

La réalisation d'une gamme étalon se fait à partir de quelque tube de concentration connues. On utilise généralement la BSA (Bovin Sérum Albumine) comme protéine standard (tableau II). Cette gamme permet d'établir une courbe d'étalonnage de la concentration en fonction de l'absorbance (DO) mesurée. Pour ce faire plusieurs réactifs ont été préparés : le réactif Bradford et la solution mère de BSA (0,1g/L).

Tableau II : préparation de la gamme étalon de la BSA.

Numéro de tubes	Blanc	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Eau distillé (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2
[BSA] (mg/ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Bradford (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

La mesure de la DO se fait avec le spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 595 nm. La valeur obtenue permet de tracer un droit étalon : absorbance = f (concentrations).

B-Préparation des échantillons

A partir des cultures bactériennes fraîches de 24 heures, dans différents bouillons BHIB, Muller Hinton(MH) et Bouillon nutritif, on centrifuge 5 ml de chaque souche de *S. aureus* à 4000 rpm pendant 15 minutes. Après la centrifugation on récupère le surnageant dans un tube stérile.

Pour évaluer la concentration des protéines présents dans le surnageant des souches de *S. aureus*, on prend un volume égal à celui utilisé pour la gamme d'étalonnage standard de la BSA (le volume total et le volume de Bradford), puis lire la DO au spectrophotomètre à 595 nm, au final ; les mesures sont apportées sur la courbe étalon pour obtenir la concentration correspondante aux mesures, ou bien calculer directement à partir de l'équation de la courbes d'étalonnage ($Y = aX$).

II.3.7. Etude de la sensibilité à l'Oxacilline

La méthode de l'antibiogramme est la technique la plus couramment utilisée pour évaluer la sensibilité des micro-organismes aux agents chimio-thérapeutiques. C'est une méthode analytique permettant de définir *in vitro*, l'antibiotique le plus actif sur un germe, celui qui a le plus de chance de guérir le malade infecté par le germe identifié.

Le protocole de standardisation et de dilution de l'inoculum est décrit dans les recommandations émises par CA-SFM.

A-Technique d`antibiogramme

- A partir d`une culture pure de 48 heures sur Gélose Chapman pour les souches P58₅ et P59₃, à l`aide d`une anse de platine on prend 3 colonies bien isolées et parfaitement identiques, on les met dans 10 ml de bouillon BHIB, puis incubée dans l`Etuve à 37°C pendant 18-24 heures.
- Après incubation, une dilution au 1/10 a été réalisée, on prend 9 ml de l`eau physiologique en lui ajoute 1ml de bouillon BHIB présent un trouble, ce qui correspond approximativement à une charge de 10⁷ UFC/ml, puis bien mélanger la suspension bactérienne au vortex.
- La Gélose Muller-Hinton est coulé dans des boites de pétrie simple compartiment a une épaisseur de 3 mm et laissée refroidir à fin d`ensemencé l`inoculum. Pour cela un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactériennes, ensuite en le décharge en le pressant fermement sur la paroi interne des tubes, puis en ensemence par strié serrée toute la surface de la gélose. L`opération répétée deux fois en tournant la boite de 60° à chaque fois et faire pivoter l`écouvillon sur lui-même, et sans oublier de passer l`écouvillon sur la périphérie de la gélose a cette étape l`ensemencement est terminer.
- A l`aide d`une pince, on prend l`antibiotique « Oxacilline », et en le dépose au centre de la gélose, puis incubée dans l`Etuve à 37°C pendant 24 heures.
- Après incubation, on constate la présence ou l`absence de la zone d`inhibition autour de l`oxacilline, et mesurer le diamètre de la zone.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Revivification et vérification de la pureté des souches

A- Sur bouillon BHIB

La croissance des souches de *S. aureus* dans le milieu BHIB est révélée par la présence d'un trouble.

B-Sur gélose Chapman

La croissance des souches de *S. aureus* sur la gélose Chapman se résume par l'apparition des colonies jaune, bombée avec des bords réguliers. On observe aussi un virage de couleur du milieu vers le jaune, ce qui indique la capacité des souches à fermenter le mannitol (**Figure 03**).



Figure 03 : Aspect macroscopique de *S. aureus* sur gélose Chapman.

L'observation microscopique de l'ensemble des souches de *S. aureus* après coloration de Gram a montré des cellules sous forme de cocci, Gram positif de couleur violet, arrangées en diplocoque et en grappe de raisin.

III.2. Détermination de la présence des facteurs de Virulence chez les *S. aureus* utilisés

III.2.1. Test de la catalase

Une effervescence a été observée chez les 9 souches de *S. aureus*, ce qui indique sa capacité à produire l'enzyme de la catalase issue de la dégradation de H_2O_2 et dégagement de l'oxygène.

III.2.2. Test de DNase

L'ensemble des souches de *S. aureus* ensemencé sur la gélose DNase, et après inondation avec HCl 1N, nous avons observé une zone (halo) claire autour des colonies, ce qui indique que *S. aureus* présente l'enzyme DNase.

III.2. 3. Recherche de production de biofilm

La gélose Rouge Congo est un milieu particulièrement utilisé pour détecter les souches productrices de slim. Sur ce milieu, les souches qui présente le PIA (polysaccharide intercellulaire adhésine) donnent des colonies noires tandis que les souches qui ne présente pas le PIA donnent des colonies rouges (**Chaieb et al., 2005**).

Les 9 souches de *S. aureus* ont été ensemencées sur milieu Rouge Congo afin de détecter leur capacité à produire de slim. Les souches de *S. aureus* producteurs de cette structure présentent le phénotype positif (+) lorsque les colonies sont noires ou phénotype variable lorsque y'avait un mélange de couleur des colonies rouge et noire, et présentent le phénotype (-) lorsque les colonies sont rouges (**Tableau III**).

Tableau III : Résultat de production de biofilm par *S. aureus*

Souche de <i>S. aureus</i>	Couleur de colonie	Phénotype
P58 ₁	Colonie noire et rouge.	Variable
P58 ₂	Colonie noire	Positive
P58 ₃	Colonie rouge	Négative
P58 ₄	Colonie noire et rouge	Variable
P58 ₅	Colonie noir	Positive
P59 ₁	Colonie noir	Positive
P59 ₂	Colonie noir	Positive
P59 ₃	Colonie noir et rouge	Variable
P59 ₄	Colonie noir et rouge	Variable

Après incubation de 24 heures, la production de slim est observée chez toutes les souches de *S. aureus* qui présente un phénotype positif ou variable (**Figure 04**), à l'exception la souche P58₃ qui présente un phénotype négatif.



Figure 04 : *S. aureus* producteurs de slim.

III.2.4. Détection de la capsule

L'observation microscopique d'une coloration à l'état frais, avec l'encre de chine a indiqué l'existence d'une capsule polysaccharidique sous forme d'un halo clair entourant le corps bactérien, ce qui assure la capsulation des souches de *S. aureus* testés.

La capsule est un élément génétique mobile qui mène à l'obtention des facteurs de virulences et une résistance aux antibiotiques (**Haudiquet et al., 2021**).

Le premier mécanisme de protection développé par *S. aureus* est représenté par la formation d'une capsule, qui est une structure polysaccharidique entourant la paroi cellulaire bactérienne. L'expression de deux principaux sérotypes CP5 et CP8 améliore la virulence et la survie de *S. aureus* in vivo (**Kuipers et al., 2016**).

Il a été démontré que l'expression de la capsule polysaccharidique de *S. aureus* dépend la présence ou l'absence de CO₂. Comme résultat, la densité des capsules et donc l'inhibition de la phagocytose dépendent de la localisation de la bactérie dans l'organisme (**Soell et al., 1995**).

La capsule facilite l'adhérence de *S. aureus* aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes (**Nabti et Tieb, 2019**).

III.2.5. Dosage des protéines des cultures bactériennes par la méthode de Bradford (1976)

A-Elaboration de la courbe d'étalonnage standard :

Les résultats de la mesure de l'absorbance (DO) des différentes concentrations de la protéine standard BSA (Bovin Sérum Albumine) sont montrés dans le (**tableau IV**) (**Annexe 4**). A partir de ces résultats, on a réalisé une courbe d'étalonnage (**Figure 05**).

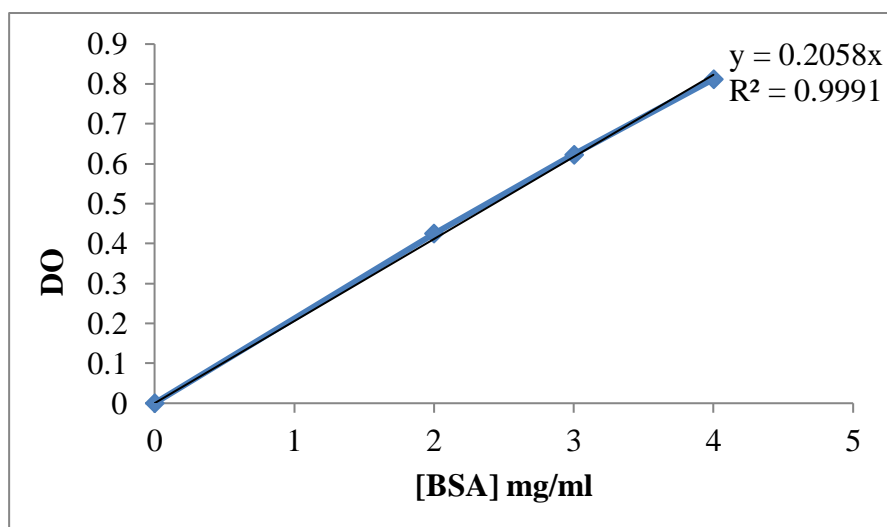


Figure 05 : Courbe d'étalonnage de la protéine standard BSA (mg/ml).

B-Résultats du dosage des protéines dans les surnageant des cultures bactériennes

A partir de la courbe d'étalonnage précédente, nous avons déterminé l'équation de la droite à partir de laquelle nous avons calculés les concentrations protéiques de nos échantillons.

Cette équation se présente sous la forme suivante : $Y = 0.2058X$, avec Y = absorbance et X = concentration protéique. Les résultats des concentrations se résument dans (**Tableaux V, VI, VII, et VIII**) (**Annexe 4**).

Une différence caractéristique des concentrations en protéine a été observée chez les souches de *S. aureus* en fonction des milieux de culture (BHIB, BN, MH).

❖ Dans le milieu BN

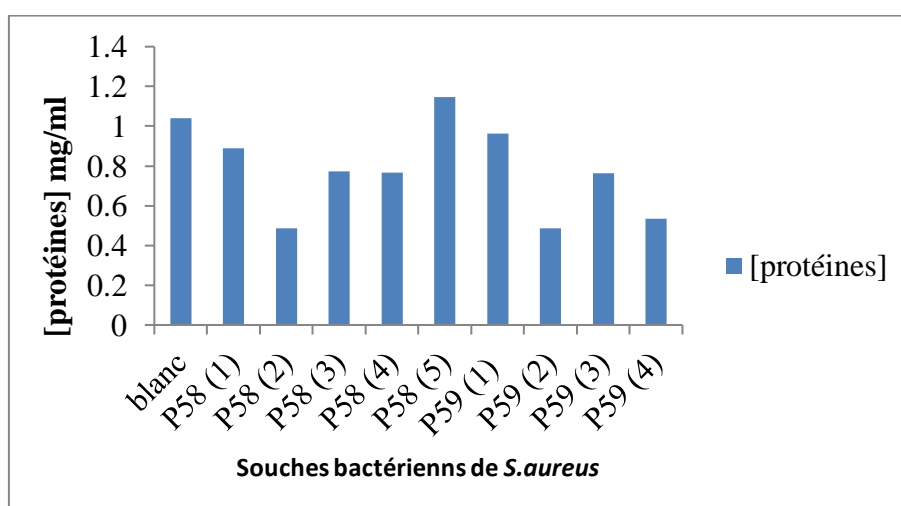


Figure 06 : Histogramme de la concentration des protéines dans les surnageant des cultures des souches *S. aureus* dans le bouillon nutritif.

Résultats et discussion

La concentration des protéines des souches P58 (1, 2, 3 et 4) et P59 (1, 2, 3 et 4) sont toutes inférieures à celle de blanc (1,039 mg/ml), à l'exception la souche P58₅ qui présente une concentration (1,146 mg/ml) qui est supérieure à celle du blanc, cette augmentation de concentration peut être considérer comme une souche virulente et les protéines surproduites peuvent être des facteurs de virulence.

❖ Dans le milieu MH

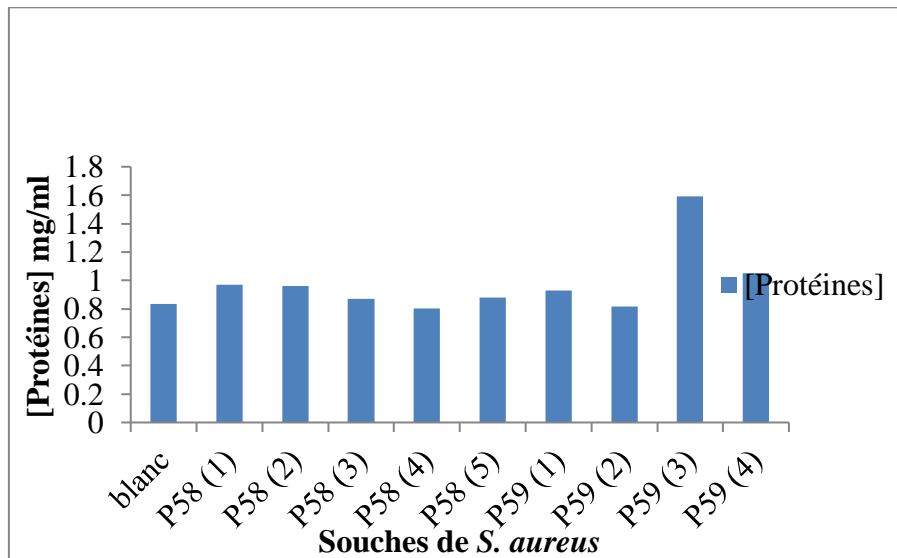


Figure 07 : Histogramme de la concentration des protéines dans les surnageant des cultures des souches *S. aureus* dans le bouillon MH.

Dans ce milieu en a constaté :

Les souches de *S. aureus* P58₁, P58₂ et P59₁ montrent une augmentation significative de la concentration en protéines, tandis que les souches P58 (3, 4, 5) et P59₂ présentent une concentration de protéine légèrement supérieure à celle de blanc qui est à (0,835 mg/ml).

Les souches P59₃ et P59₄ montrent un pic d'augmentation de la concentration en protéine comparé avec le blanc jusqu'à atteindre respectivement les valeurs (1,593 mg/ml) et (1,049mg/ml).

Cette variation de concentration en protéine peut correspondre à la capacité des souches de *S. aureus* à synthétiser des facteurs de virulence telles que la protéine A (Ferry et Timsit, 2020), les adhésines (Timothy, 2019).

❖ Dans le milieu BHIB

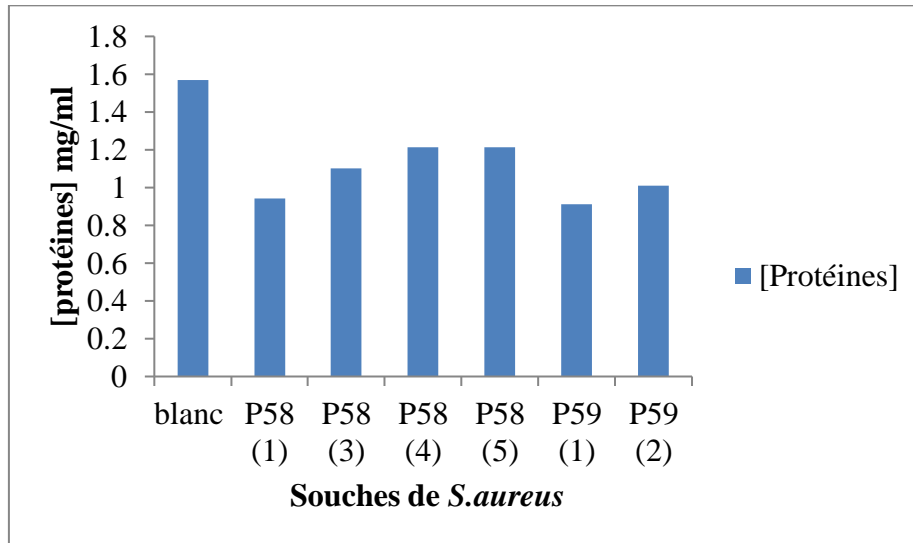


Figure 08 : Histogramme de la concentration des protéines dans les surnageants des cultures des souches *S. aureus* dans le bouillon BHIB.

Dans ce milieu on a observé une légère diminution chez toutes les souches de *S. aureus* par rapport au blanc qui est à (1,569mg/ml).

❖ Le milieu BHIB avec l'oxacilline

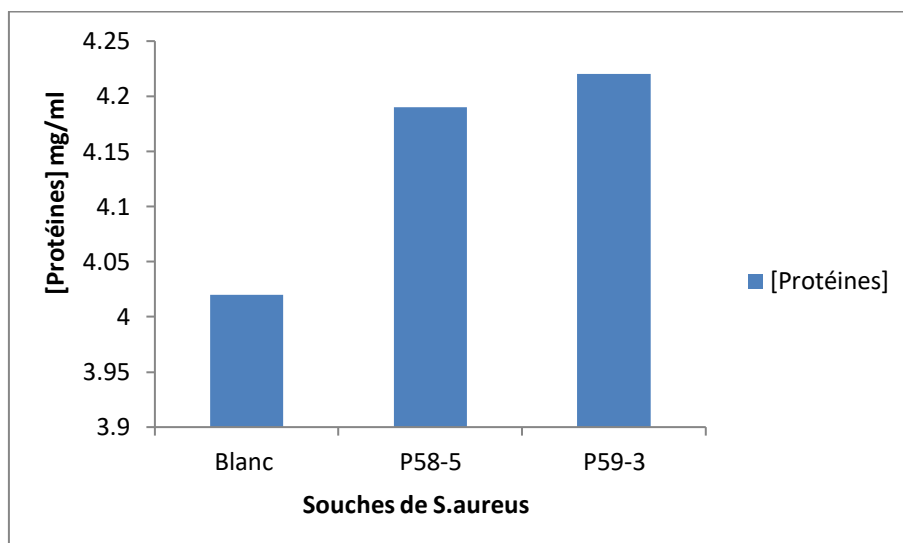


Figure 09 : Histogramme de la concentration des protéines dans les surnageants des cultures des souches *S. aureus* dans le bouillon BHIB additionné de l'oxacilline

Dans ce milieu on a observé une forte concentration en protéine notamment la souche P59₃ qui présente une concentration plus haute.

Après avoir interprété les résultats des concentrations en protéines chez les souches de *S. aureus*, et après avoir comparé au résultat de blanc, nous avons constaté une variation de

Résultats et discussion

valeur qui sont supérieures à celles de blanc, ce qui révéla une synthèse récente de protéines qui semble être des facteurs de virulence, et parmi eux on peut citer :

S. aureus produit une protéine caractéristique qui est la protéine A présente chez la majorité des souches Humain (Sutra et Poutrel, 1994).

La protéine A présente un rôle essentiel dans le développement de biofilm et la protection des bactéries vis-à-vis des agents antimicrobiens élaborés par les cellules immunitaires (Merino et al., 2009).

Comme elle a aussi une capacité à synthétiser une substance thermostable nommée la fibrinolyse produite par les souches pathogènes.

La fibrinolyse joue un rôle majeur dans la création des micro-abcès purulents responsable de la métastase septique (Flandrois, 1997 ; Jin et al., 2003).

III.2.6. Résultat de l'étude de la sensibilité à l'Oxacilline

Le test de l'antibiogramme par l'oxacilline chez les souches de *S. aureus* a pour objectif de déterminer la sensibilité de cette bactérie aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines particulièrement la méthicilline et ses dérivés comme l'oxacilline (Jorgensen et Ferraro, 2009).

Après 24 heures d'incubation, l'antibiogramme par la méthode des disques sur gélose MH réalisé pour les souches P58₅ et P59₃ a révélé des zones d'inhibition des diamètres différents (Figure 10).



Figure 10: Résultat de test d'antibiogramme par l'oxacilline chez *S. aureus*.

S. aureus peut développer une résistance à l'oxacilline par la production de gène *mecA* qui code pour la protéine PBP2a (Pénicilline Binding Protein 2a), cette protéine transformée a une

Résultats et discussion

faible affinité pour les pénicillines notamment l'oxacilline, ce qui favorise le développement et la croissance de *S. aureus* malgré l'existence de l'oxacilline (**Lowy FD, 2003**).

Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) possèdent souvent des îlots de pathogénicité qui codent pour divers facteurs de virulence, tels que : les toxines, les enzymes, et les protéines de surface. (**Otto M, 2014**).

Les régulateurs globaux de la virulence, comme Agr (accessory gene regulator) peut influencer à la fois la résistance antibiotique et l'expression des facteurs de virulence. (**Novick RP, 2003**).

Conclusion

Conclusion

Staphylococcus aureus, est un agent pathogène qui possède la capacité à coloniser les muqueuses chez les Humains et les animaux, et qui peut causer différentes maladies et infections à cause de son pouvoir pathogène (facteurs de virulence).

S. aureus, a démontré une capacité à stimuler un mécanisme de résistance à chaque antibiotique récent, particulièrement à la famille des beta-lactamine comme la méthicilline et l'oxacilline.

Le présent manuscrit a porté sur l'étude de la pathogénicité des souches de *S. aureus* dans différentes niches écologiques.

Neufs souches de *S. aureus* ont été utilisées et sont coagulase et catalase positive, possède une capsule polysaccharidique et une capacité à former le biofilm.

Pendant cette recherche, on a constaté que *S. aureus* a produit différents facteurs de virulence, et développée une résistance à l'oxacilline.

Perspectives

Les résultats de cette étude sont préliminaires, et des recherches plus approfondies sont nécessaires pour détecter à quelle phase de croissance les facteurs de virulence sont produits, et vérifier la formation de biofilm chez *S. aureus* ainsi sa résistance aux antibiotiques et réaliser des PCR.

Références bibliographiques

A

- Aouati, H. (2009). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistante à la Méricilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire. Université Mentouri Constantine-1. Microbiologie appliquée et biotechnologies microbiennes, Algérie. 94p.
- Avril, JL., Dabernat, H., Denis F. et Monteil, H. (2003). Bactériologie clinique. 3ème Edition. Ellipses, Paris. 602 p.
- Avril, JL. Livre Bactériologie clinique 2ème édition. 1992.

B

- Bailey, C.J., B.P. Lockhart, M.B. Redpath and T.P. Smith. 1995. The epidermolytic (exfoliative) toxins of *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol.* 184: 53-61.
- Becker, K., Friedrich, AW., Lubritz, G. (2003). Prevalance of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clinical Microbiology.* 41 P : 1434-1439.
- Bergon L. (2016). *S. capitis*, *S. caprae* et *S. lugdunensis* : Rôle dans les infections ostéo articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques.
- Bernal, A., Proft, T., Fraser, JD., Posnett, DN. (1999). Superantigens in human disease. *J Clin Immunol.* 19 (3) P : 149-57.
- Boden, M.K. and J.I. Flock. 1989. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 57: 2358-2363.
- Bohach, GA., Fast, DJ., Nelson, RD. and Schlievert, PM. (1990). Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev Microbiol* 17 P : 251-272.
- Brisabois et *al.*, 1997 ; Schleifer et Bell, 2009.

C

- Chaieb K., Mandouani K., Bakhrouf A. (2005). Detection of *icaA* and *icaD* loci by Polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit, *Journal of Hospital Infection*, (61) 225-230.
- Chamberlain, N.R. and S.A. Brueggemann. 1997. Characterisation and expression of fatty acid modifying enzyme produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 46:693-697.

-
-
- Cheung, AL., Projan, SJ. and Gresham, H. (2002). The Genomic Aspect of Virulence, Sepsis, and Resistance to Killing Mechanisms in *Staphylococcus aureus*. *Curr Infect Dis Rep*, 4 (5) P : 400-410.
 - Claire, L. (2012). ARN régulateurs de *Staphylococcus aureus* : Rôle de RsaA dans la Formation du biofilm et de la capsule, Niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements Cliniques. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon 1, France. 214 p.
 - Couture B. Bactériologie médicale: Étude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical. Montréal: Décarie 1990. 13-32
 - Crosby, HA., Kwiecinski, J., & Horswill, AR. (2016). *Staphylococcus aureus* Aggregation and Coagulation Mechanisms, and Their Function in Host–Pathogen Interactions. *Advances in Applied Microbiology*, 96 P : 1–41.
 - Cunnuion, KM., Zhang, HM., Frank, MM.(2003). Availability of Complement Bound to *Staphylococcus aureus* To Interact with Membrane Complement Receptors Influences Efficiency of Phagocytosis. *Infect Immun*. 71 P : 656-662.

D

- Dauwalder O, Lina G, Durand G, et al. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3454-3458.
- Delarras, C. (2007). Microbiologie pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. 1er éd., Éditions Tec & Doc - EM Inter – Lavoisier, Paris. 476 p.
- Dinges, MM., Orwin, PM. and Schlievert, PM. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 13 (1) P : 16-34.
- Dubin, G. (2002). Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biol Chem*. 383 P :1075-1086.
- Durand, G. (2009). Caractérisation, épidémiologie et pathogénie d'un clone de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon 1, France. 209 p.
- Dworkin, M. et al. (2006). *The Prokaryotes : Bacteria : Firmicutes, Cyanobacteria*. 3^{ème} éd. Springer, New-York,. Vol 4

-
-
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schkeufer, K.H., Stackebrandt, E. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd. ;Springer, New-York, 2006. Vol 4, Chap.1.2.1. The genera Staphylococcus and Micrococcus, p4-75.

E

- Eveillard, M. (2007). Politique de dépistage de Staphylococcus aureus résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de Doctorat, Université d'Angers, France. 158 p.
- Eyque, MA., Alouf, J. and Montagnier, L. (1998). Traité de Microbiologie Clinique «Staphylocoques» Nevine EL SOLH. PICCIN NUOVA, Italie. P : 567-591.

F

- Fauchere, J.L. and Avril, J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris. P : 213-217.
- Fischetti, F. and F. Tedesco. 2006. Cross-talk between the complement system and endothelial cells in physiologic conditions and in vascular diseases. Autoimmunity 39:417-428.
- Flandrois J.P. (1997). Bacteriologie médicale. Presse Universitaire de Lyon. p 108-109.
- Ferry T et Timsit, (2020). Infections à staphylocoques. Chapitre 205. P : 305-318.
- Foster, T.J. 2005. Immune evasion by staphylococci. Nat. Rev. Microbiol. 3: 948-958.
- Foster, T.J. and M. Hook. 1998. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. 6: 484-488.

G

- Garrity, GM., Johnson, KL., Bell J. and Searles, DB. (2007). Bergey 's Manul of Systematic Bacteriology. 2ème Edition. New York.

H

- Haudiquet M, Buffet A, Rendueles O, Rocha, EPC Plos Biology, 06 juillet 2021. <http://doi.org/journal.pbio.3001276>.
- Hennekinne, JA. (2009). Nouvelles approches pour la caractérisation des toxoinfections Alimentaires à staphylocoques à coagulase positive, thèse de Doctorat. Université Agro Paris Tech, France. p : 16-17.

-
-
- Holtfreter, S., D. Grumann, M. Schudde, H. T. Nguyen, P. Eichler, B. Strommenger, K. Kopron, J. Kolata, S. Giedrys-Kalemba, I. Steinmetz, W. Witte, and B. M. Broker. 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 45:2669-2680.

I

- Issartel, B., A. Tristan, S. Lechevallier, F. Bruyere, G. Lina, B. Garin, F. Lacassin, M. Bes, F. Vandenesch, and J. Etienne. 2005. Frequent carriage of Panton- Valentine leucocidin genes by *Staphylococcus aureus* isolates from surgically drained abscesses. *J Clin Microbiol* 43:3203-3207.

J

- Janzon, L., S. Lofdahl and S. Arvidson. 1989. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 480-485.
- Javad A. M. et Al *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* Volume 28, Issue Number 1, (2010).
- Jin T., Bokarewa M., McIntyre L., Tarkowski A, Corey G.R., Reller L.B. Fowler V.G. (2003). Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with staphylokinase deficient *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Medical Microbiology* 52, 919–923.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T. et al. (2004). *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol Baltim Md.* 172 P : 1169–76.
- Joël, L. (2014). Cytosquelette d'actine et déformations membranaires : du liposome à la reconstruction cellulaire. Thèse de Doctorat. l'Université Paris Diderot (Paris 7) : Interface Physique-Biologie, France. P : 46.
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749-1755. doi: 10.1086/647952.
- Juuti, K. M., B. Sinha, C. Werbick, G. Peters, and P. I. Kuusela. 2004. Reduced adherence and host cell invasion by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing the surface protein PIs. *J Infect Dis* 189:1574-1584.

K

- Kaida, S., T. Miyata, Y. Yoshizawa, H. Igarashi and S. Iwanaga. 1989. Nucleotide and deduced amino acid sequences of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic Acids Res.* 17: 8871.
- Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. (2014). Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*, *J. Immunol.Methods.* 84, 577-601.
- Kara Terki, I. (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 Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Kulig, P., Zabel, BA., G. Dubin, SJ. et al. (2007). *Staphylococcus aureus*-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma chemerin. *J. Immunol.* 178: 3713-3720.
- Kuipers A et al., (2016). La capsule polysaccharidique de *staphylococcus aureus* et le bouclier fibrinogène dépendant de l'Efb agissent de concert pour protéger contre la phagocytose. P : 1185-1194.

L

- Ladhani, S. 2003. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39: 181-189.
- LAYS. C.ARN régulateurs de *Staphylococcus aureus* : Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, Niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques (thèse) .Lyon. Université CLAUDE BERNARD LYON 1.2012.
- Le loir. Y. Gautier. M *Staphylococcus aureus*. Chapitre Taxonomie et habitat. Monographies de microbiologie ; Collection dirigée par Jean Paul Larpent. France. Édition Lavoisier.2010
- Le Minor, L. and Veron, M. (1990). Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*» J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. P : 773-794.
- Lee, LY., Hook, M., Haviland, D. et al. (2004). Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J infect Dis.* 190 (3) P : 571-579.
- Lina, G., Bohach, GA., Nair, SP. Et al. (2004). Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis* 189 P : 2334-2336.

-
-
- Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1265-1273. doi:10.1172/JCI18535.
 - Lu, T., J.Y. Park, K. Parnell, L.K. Fox and M.A. McGuire. 2012. Characterization of fatty acid modifying enzyme activity in staphylococcal mastitis isolates and other bacteria. *BMC Res. Notes* 5: 323.

M

- Mallet E, Maitre M, Delalande-Dutilleul L, Marguet C, Mouterde O. Évaluation des complications de la varicelle à partir d'une enquête hospitalière rétrospective menée dans un service de pédiatrie pendant 16 ans en France. *Arch Pediatr*. 2004;11:1145-1151.
- Martin, MD., Orwin, PM., Schlevert, PM.. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 2000,13, 16-36.
- Menzies, BE. (2003). The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin infect Dis*. 16 (3) P : 225-229.
- Merino, N., A. Toledo-Arana, M. Vergara-Irigaray, J. Valle, C. Solano, E. Calvo, J.A. Lopez, T.J. Foster, J.R. Penades and I. Lasa. (2009). Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. 191: 832-843.
- M-Javad A. et al. (2010). Structural model of the pre-pore ring-like structure of Panton-Valentine. *Journal of Bimolecular Structure & Dynamics*. 28 (1) P : 1-12.

N

- Nanra, JS., Buitrago, SM., Crawford, S. et al. (2013). Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccines Immunother*. 9 P : 480-487.
- Nabti I et Tieb C. (2019). Les infections à *staphylococcus aureus* au CHU de Constantine. Mémoire fin d'étude. Université Frères Mentouri Constantine 1.
- Nauciel, C., Vilde, JL. (2005). *Bactériologie médicale*. 2^{ème} Edition Masson, Paris. 258p.
- Nilsson, IM., Lee, JC., Bremell, T. et al. (1997). The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect Immun*. 65 P :4216-4221.

-
-
- Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol.* 2003 Dec;48(6):1429-1449. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x.

O

- O’Riordan, K., Lee, JC. (2004). Staphylococcus aureus Capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 17 P : 218-234.
- Otto M. Staphylococcus aureus toxins. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Feb;17:32-37. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.

P

- Pascale, P. (2013). Typage de Staphylococcus aureus par MLVA : étude de faisabilité de La détection par HRM. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine. Faculté de médecine de Nancy, France. 121 p.
- Patti, J.M. and M. Hook. 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 752-758.
- Patti, J.M., B.L. Allen, M.J. McGavin and M. Hook. 1994a. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 585-617.
- Prescott, Harley, and Klein. (2003). *Microbiologie, 2ème française ed.* De Boeck Université.

R

- Rewatkar A. R., Wadher B. J. (2013). Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa- Biofilm formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.
- 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 Doctorat. Université angers, France. 115 p.
- Rollof, J., J.H. Braconier, C. Soderstrom and P. Nilsson-Ehle. 1988. Interference of Staphylococcus aureus lipase with human granulocyte function. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 505-510.

S

- Sako, T. and N. Tsuchida. 1983. Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from Staphylococcus aureus. *Nucleic Acids Res.* 11: 7679-7693.

-
-
- Shittu, A., Lin, J. and Morrison, D. (2007). Molecular identification and characterization of mannitol-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 57(1) P: 5-93.
 - Sneath, PHA. (1986). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
 - Song, L., M.R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley and J.E. Gouaux. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274: 1859-1866.
 - Soell M et al., (1995). Les polysaccharides capsulaires de types 5 et 8 de *Staphylococcus aureus* se lient spécifiquement aux cellules épithéliales humaines (KB), aux cellules endothéliales et aux monocytes et induisent la libération de cytokines. *Immunité aux infections*.
 - Sutra L, Poutrel B. (1994). Virulence factor involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*40,79-89.

T

- Tchougoune ML (2007). Prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline au CHU du Point G. Thèse de doctorat : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontostomatologie. 89.
- Timothy J. Foster, (2019). The MSCRAMM Family of cell-wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive cocci. *Trends in Microbiology*. Vol: 27, N°11.
- Touatia, R. (2016). *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : Emergence et Mécanismes de résistance. Thèse de Doctorat. Université Badjit Mokhtar – Annaba, Algérie. 105 p.

V

- van Wamel, W.J., S.H. Rooijackers, M. Ruyken, K.P. van Kessel and J.A. van Strijp. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188: 1310-1315.
- Vandenesch, F., Lina, G. and Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bicomponent Leukocidins, and Cytolytic Peptides : A Redundant Arsenal of Membrane Damaging Virulence Factors. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2 P : 12.
- Verdier, I., Lina, G., Gillet, Y., Vandenesch, F. (2012). *Staphylococcus* [en ligne], <http://www.microbe-edu.org/etudiant/staph.html> consulté en novembre.

W

- Wertheim HF, Melles DC, Vos, et al.(2005).The role of nasal carriage in sataphylococcus aureus infections. *Lancet Infect Dis*.5:751-62.
- Williams REO. HEALTHY CARRIAGE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS: ITS PREVALENCE AND IMPORTANCE¹. *Bacteriol Rev* 1963;27:56–71.

Annexes

Annexe

Annexe 1 : composition des milieux de cultures.

1. Bouillon cœur cervelle (BHIB) :

Pour 1 litre d'eau distillée :

Infusion de cervelle de veau.....	12,5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5g
Peptone.....	10g
Glucose.....	2g
Chlorure de sodium.....	2g
Phosphatase di sodique.....	5g

pH= 7,4

Stérilisation a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

2. Bouillon nutritive (BN) :

Pour 1 litre d'eau distillée :

Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2,5g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g

pH= 7,2

Stérilisation a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3. Bouillon Muller-Hinton ((MH) :

Pour 1 litre d'eau distillée :

Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Infusion de viande.....	2g
Amidon.....	1,5g

pH = 7,4

Stérilisation a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

4. Gélose Chapman :

Pour 1 litre d'eau distillée :

Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	10g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	0,025g

Annexe

Agar.....15g

pH = 7,4

Stérilisation a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

5. Gélose Muller-Hinton (MH) :

Pour 1 litre d'eau distillée :

Hydrolysats de viande.....17,5g

Infusion de viande2g

Amidon.....1.5g

Agar.....17g

pH = 7,4

Stérilisation a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

6. Gélose Rouge Congo Agar (RCA) :

Pour 1 litre d'eau distillée :

BHIB.....37g

Saccharose.....50g

Agar.....10g

Rouge Congo.....0,8g

pH= 7,4

Stérilisation a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

7. Gélose DNase :

Pour 1 litre d'eau distillée :

Tryptose.....20g

Acide désoxyribonucléique.....2g

Chlorure de sodium.....5g

Agar.....12g

pH = 7,4

Stérilisation a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

8. Eau physiologique :

NaCl.....9g

Eau distillée.....1 litre

Ph = 7,4

Stérilisation a l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe

Annexes 2 : Composition des réactifs utilisés lors de la coloration de Gram.

1. Violet de gentiane :

Violet de gentiane.....	1g
Phénol.....	2g
Ethanol à 90°.....	10ml
Eau distillée.....	100ml

2. Lugol :

Iodure de potassium.....	2g
Iode métalloïde.....	1g
Eau distillée.....	300ml

3. Fuschine de Ziehl :

Fuschine basique.....	1g
Phénol.....	5g
Ethanol à 90°.....	10ml
Eau distillée.....	100ml

Annexes 3 : Composition des réactifs utilisée pour le dosage.

1. Réactif de Bradford :

Bleu de Coomassie G250.....	5mg
Acide phosphorique 88%.....	5ml
Ethanol à 95%.....	2,5ml
Eau distillée.....	50ml

Ce réactif doit être filtré puis, il peut être conservé pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

2. La solution mère BSA :

Bovin Sérum Albumine (BSA).....	10mg
Eau distillée.....	100ml

Annexe

Annexe 4

Tableau IV : Résultat de l'absorbance de la protéine standard BSA.

Concentration de la BSA (mg/ml)	DO à 595 nm
0	0
1	0,362
2	0,425
3	0,623
4	0,812
5	0,814
6	0,825
7	0,839
8	0,894

Tableau V : la concentration des protéines des souches de *S. aureus* dans le bouillon nutritive (BN)

Souche	blanc	P58 ₁	P58 ₂	P58 ₃	P58 ₄	P58 ₅	P59 ₁	P59 ₂	P59 ₃	P59 ₄
DO à 595 nm	0,214	0,183	0,100	0,159	0,158	0,236	0,198	0,100	0,157	0,100
[protéine] (mg/ml)	1,039	0,889	0,485	0,772	0,767	1,146	0,962	0,485	0,762	0,534

Tableau VI : La concentration des protéines des souches de *S. aureus* dans le bouillon Muller-Hinton (MH).

Souche	blanc	P58 ₁	P58 ₂	P58 ₃	P58 ₄	P58 ₅	P59 ₁	P59 ₂	P59 ₃	P59 ₄
DO à 595 nm	0,172	0,200	0,198	0,179	0,165	0,181	0,191	0,168	0,328	0,216
[protéine] (mg/ml)	0,835	0,971	0,962	0,869	0,801	0,879	0,928	0,816	1,593	1,049

Tableau VII : La concentration des protéines des souches de *S. aureus* dans le bouillon BHIB.

Souche	blanc	P58 ₁	P58 ₃	P58 ₄	P58 ₅	P59 ₁	P59 ₂
DO à 595 nm	0,323	0,194	0,227	0,250	0,250	0,188	0,208
[Protéines] (mg/ml)	1,569	0,942	1,103	1,214	1,214	0,913	1,010

Tableau VIII : La concentration des protéines des souches de *S. aureus* dans le bouillon BHIB additionnée de « l'oxacilline ».

Souche	Blanc	P58 ₅	P59 ₃
DO à 595 nm	0,828	0,862	0,869
[Protéine] (mg/ml)	4,02	4,19	4,22

Résumé

L'objectif de notre travail étant d'étudier la pathogénicité des souches de *Staphylococcus aureus* dans différents niche écologique.

Au cours de ce travail, un total de 9 souches de *S. aureus* est testé pour son pouvoir de produire des facteurs de virulence de nature protéique. Les résultats obtenus révèlent que les souches utilisées produisent une catalase, une coagulase et une Dnase. Elles sont caractérisées par la formation des biofilms, d'une capsule. Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) a montré une synthèse de molécules de nature protéiques dans les différents milieux de culture utilisés probablement jouent un rôle dans la virulence de ces bactéries.

Mots clé : *Staphylococcus aureus* ; ; coagulase ; facteur de virulence.

Abstract

The objective of our work is to study the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* strains in different ecological niches.

During this work, a total of 9 strains of *S. aureus* are tested for their power to produce virulence factors of a protein nature. The results obtained reveal that the strains used produce a catalase, a coagulase and a DNase. They are characterized by the formation of biofilms and a capsule. The determination of proteins by the Bradford method (1976) showed a synthesis of protein molecules in the different culture media used, probably playing a role in the virulence of these bacteria.

Keywords : *Staphylococcus aureus* ; coagulase ; virulence factor.