

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie du Secteur Biomédicale et Vétérinaire



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de la résistance aux macrolides et tétracyclines
chez *Staphylococcus aureus* isolé de différentes
origines**

Présenté par :

HITOCHE Tamazight & IDJER Fadila

Devant le jury composé de :

Mme. TAFOUKT	MAA	Présidente
Mme. MOUICI	MCB	Examinatrice
Mr. DJOUDI	MCA	Encadreur

Année universitaire : 2016-2017



Remerciements

Nous remercions Dieu le tout Puissant de nous avoir fait naître musulmane, de nous avoir donné la force, la santé, le courage et la patience de pouvoir accomplir ce travail

A monsieur Djoudi

Pour avoir proposé et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous a accordés et qui nous a permis de réaliser ce travail

A Madame Tafoukt

D'avoir accepté et fait l'honneur de présider ce jury

A Madame Mouici

D'avoir accepté d'examiner et de valoriser ce modeste travail

Nous voudrions remercier aussi le personnel des différents organismes, EPE Cazel de Bejaia ; CHU Moustapha Bacha d'Alger et CHU Nedir Mhemmed de Tizi-Ouzou, qui ont accepté de nous accueillir

Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie de l'université Abderrahmane MIRA de BEJAIA et particulièrement Mme REHMANI et Mme

BADRIA

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

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail à :

Ceux que j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très fière de les avoir et tous les mots de monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte :

Mes très chers parents :

Mohand said, Nouria

Ma très chère grand-mère :

Saadia

Mes frères :

Said, Salim, Lyes, Rabah

Mes sœurs et leurs maris:

Kamila, Yahia, Saloua

Mes belles sœurs :

Amel, Nesrine

Mes chers oncles et tantes et leurs enfants:

Salah, Rachid, Ghania, Lounis, Célia, youba, Aziz

Mes neveux et nièces :

Chams dine, Djalal, Axel, Alicia

Mes chers amis (e) :

Hamza, Ibtissem, katia, Khadidja

Mon cher binôme :

Tamazight

A toute la promotion MSBV 2016/ 2017

FADILA

Dédicaces

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail aux personnes les plus
chères au monde:*

Mes très chers parents :

Hassen & Tassaadit

*Sans eux je ne serai pas là. Eux qui m'ont appris que la vie est un défi à vivre
joyeusement et à ne jamais baisser les bras quelque soit les obstacles*

A la mémoire de ma grande mère qui m'a toujours comblée d'amour.

A mes très chers grands parents :

Yahia & Rbiha

A mes sœurs et mon frère :

Lila, Dihia, Mouhand

A ma nièce Sara, mon neveu Ilias et leur père Mheni

A mes chers oncles et tantes

A mes cousins et cousines surtout Amel

*Merci pour vos conseils, votre soutien, vos encouragements et surtout vos
bénédictions et votre amour*

A mes chers amis (e) :

Fatima, Fatma, Khadidja, Hafsa, Linda, Sousou, Thiziri.

*A tous mes amis (e) qui je n'ai pas cité mais qui existent au fond de mon
cœurs et de ma pensée.*

A mon cher binôme

Fadila

A toute la promotion MSBV 2016/ 2017

A toutes celles et ceux qui m'ont aidée et soutenue.

TAMAZIGHT

Table des matières

Glossaire	
Liste des abréviations	
Liste des Figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
I- Genre Staphylocoque	
I-1 /Historique	3
I-2/ Habitat	3
I-3 / Classification	3
II- Espèce <i>Staphylococcus aureus</i> (agent pathogène)	
II-1 / Caractères morphologiques	4
II-2 / Caractères culturels	4
II-3/ Caractères biochimiques	4
II-4/ Facteurs de virulence et infections staphylococciques	5
III- Résistance aux antibiotiques	
III- 1/ Tétracyclines	6
III-1-1/ Généralité	6
III-1-2/ Structure chimique	6
III-1-3/ Mécanisme d'action	6
III-1-4/ Mécanismes d'acquisition de la résistance aux Tétracycline	7
III-2/ MLS (Macrolides, Lincosamides, Streptogramines	7
III-2-1 / Généralité	7
III-2-2/ Structure chimique	8
III-2-3/ Mécanisme d'action	8
III-2-4/ Mécanismes d'acquisition de la résistance aux Macrolides et aux Lincosamides	9
Matériels et Méthodes	
I- Objectifs, durée et lieu de l'étude	12
II-Origine des souches	12
III- Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
III-1 / Isolement et purification	12
III-2/ Caractéristiques des colonies	12
III-3/ Identification biochimique	13
IV- Antibiogramme	15
Résultats	19
Discussion	27
Conclusion	32
Références Bibliographiques	
Annexes	

Glossaire

Abcès : Un abcès est une collection de pus se constituant dans une cavité et repoussant progressivement les tissus en périphérie.

Auto-infection : une infection par des organismes pathogènes déjà présents dans le corps, mais se développant dans une autre partie du corps

Flore transitoire : correspond à l'ensemble des micro-organismes présents chez l'homme ou l'animal durant un court laps de temps.

Furoncle : Infection qui touche le follicule pileux et le territoire avoisinant et qui peut conduire à des complications (septicémies)

Impétigo bulleux : une Infection épidermique superficielle contagieuse fréquente chez l'enfant liée à la présence d'une toxine sécrétée par un Staphylocoque Doré.

Intoxication alimentaire : est une infection contractée à la suite de l'ingestion de nourriture ou de boisson contaminées.

Panaris : Infection de la pulpe du doigt qui survient généralement après une blessure, entraînant une inflammation aigue

Porteur asymptomatique : est une personne qui héberge un agent infectieux sans que celui-ci provoque de symptômes visibles.

Septicémie : désigne une infection grave de l'organisme, se caractérisant par la présence dans le sang de germes pathogènes

Syndrome de la peau ébouillantée : est une maladie qui touche généralement les nourrissons et les jeunes enfants, ce caractérise par une destruction de l'épiderme avec un détachement de celui-ci sous forme de lambeaux

Syndrome de choc toxique staphylococcique : est une maladie infectieuse rare et aiguë, causée par une toxine bactérienne (TSST-1) qui pénètre dans la circulation sanguine à la suite d'une infection par un staphylocoque doré

Liste des abréviations

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

API 20 : Analytical Profile Index 20

ARN : Acide ribonucléique

BHIB : Brain Heart Infusion Broth (Bouillon cœur cerveau)

BMD : Broth MicroDilution (Microdilution en bouillon)

BMH : Bouillon Muller-Hinton

CA-SFM : Comité française de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIP : Ciprofloxacine

DA : Clindamycine

CMI : Concentration minimal inhibitrice

cMLS_B : macrolide, Lincosamide, Streptogramines B constitutif

CN : Gentamycine

C2G : Céphalosporine de 2^{ème} génération

E : Erythromycine

ERM : erythromycine resistance methylase

EUCAST: European, Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FA : Fusidique acide

FOX : Céfoxitine

HD : hazy D zone

iMLS_B : macrolide, Lincosamide, Streptogramines B inductible

MLS : Macrolide, Lincosamide, Streptogramine

MLS_B : Macrolide, Lincosamide, Streptogramine B

MS : Macrolide, Streptogramine

MS_B : Macrolide, Streptogramine B

MSCRAMM : Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules

NIT: Réactif nitrate

PVL : Panton-Valentine Leukocidin

R : Résistant

RA : Rifampicine

S : Sensible

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthiciline

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthiciline

Scc mec : Staphylococcal Cassette Chromosome mec

SXT : Sulfamethoxazole trimethoprim

TE : Tétracycline

TOB : Tobramycine

TSB : Tryptic Soy Broth

TSST : Toxic Shock Syndrom Toxin

VAN : Vancomycine

VP: Voges Proskauer

Liste des figures

FIGURE	TITRE	PAGE
Figure n° 1	Structure de la tétracycline et ces dérivés	6
Figure n° 2	Inhibition de la synthèse protéique par la tétracycline	6
Figure n° 3	Structure chimique de l'érythromycine et clindamycine	8
Figure n° 4	Le site de fixation des MLS au niveau de la sous unité 50s de ribosome	8
Figure n° 5	Procédure de lecture de la galerie API Staph	15
Figure n° 6	Protocole de dilution	18
Figure n° 7	Test de coagulase	20
Figure n° 8	Test de DNase	20
Figure n° 9	La mise en évidence des caractères biochimiques par API Staph	20
Figure n° 10	Répartition des souches de S.aureus en fonction du type de prélèvement	20
Figure n° 11	Les taux de résistance vis-à-vis 11 antibiotiques des souches de S.aureus isolées	21
Figure n° 12	La résistance à la tétracycline chez les isolats de SARM et SASM	21
Figure n° 13	La résistance à l'érythromycine et l'induction de la clindamycine par l'érythromycine	22
Figure n° 14	Phénotype D	22
Figure n° 15	Phénotype D+	23
Figure n° 16	Phénotype HD	23
Figure n° 17	Phénotype Sensible	24
Figure n° 18	Phénotype Résistant	24
Figure n° 19	Phénotype Neg	24

Liste des tableaux

TABLEAUX	TITRE	PAGE
Tableau I	Facteurs de virulence de S.aureus et leur implication dans les infections staphylococciques	5
Tableau II	Concentrations et diamètres critiques des antibiotiques testés	17
Tableau III	Répartition des prélèvements selon leur origine et type de prélèvements	19
Tableau IV	Association de résistance à la clindamycine et érythromycine avec la résistance à la méthiciline	25
Tableau V	La résistance associée à la tétracycline et érythromycine chez les isolats de S.aureus étudié	26
Tableau VI	Répartition des taux de résistance à la tétracycline et érythromycine selon le type du prélèvement	26

Introduction

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est une bactérie ubiquitaire qui peut occasionnellement coloniser la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux, elle est dotée d'un degré élevé de portage dans la cavité nasopharyngée (**Berche & al., 1988 ; Gillespie, 2006**).

Alors qu'il s'agit d'un commensal parmi les plus fréquents de notre flore normale, *S. aureus* est un pathogène redoutable et polyvalent, à l'origine de plusieurs infections (**Dumitrescu & al., 2010 ; Djoudi, 2015**), et représente la raison de la plus grande appréhension au monde de part sa virulence intrinsèque et sa capacité de s'adapter rapidement aux conditions environnementales (**Abbas & al., 2015**).

C'est l'un des principaux agents étiologique des infections suppuratives superficielles et profondes (infection de plaie, furoncle, panaris...), des syndromes liée à l'action des toxines (le syndrome du choc toxique et syndrome d'exfoliation) ainsi que des pathologies mettant en jeu le pronostic vital comme les septicémies, endocardites (**Lowy, 1998 ; Djoudi & al., 2014**).

La gravité de ces infections est due essentiellement à des facteurs de virulence, tel que la protéine A, TSST1, PVL..., et des gènes de résistances acquis par cette espèce, ce qui constitue une menace majeure pour la santé publique, en raison de la complication du traitement et la circulation des souches résistantes dans l'environnement (**Bekhoucha & al., 2009 ; Djoudi, 2015**).

Dans les années quarante, la pénicilline était l'antibiotiques de choix pour traiter les infections staphylococciques, dans peu de temps, des souches résistantes furent leur apparition (**Garbacz & al., 2001**). De nouvelles molécules anti-staphylococcique ont été commercialisées, cependant *S. aureus* a su développer des résistances à chaque nouvel antibiotique introduit (**Dumitrescu & al., 2010**).

Les tétracyclines et les macrolide, lincosamide, streptogramine (MLS), constituent l'un des groupes d'antibiotiques utilisés contre les infections causées par ce germe (**Piątkowska & al., 2012**). Les tétracyclines et MLS ont pour but l'inhibition de la synthèse protéique par fixation sur la sous-unité 30S et 50S respectivement du ribosome bactérien (**Djoudi, 2015 ; Speer & al., 1992**). L'utilisation excessive de ces médicaments induit l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance.

Chez *S. aureus*, l'acquisition des gènes *tetK* et *tetM* confère une résistance à la tétracycline par un système d'efflux et une protection ribosomale (**Burdett, 1991**).

Par contre, Une modification de la cible, une inactivation enzymatique et une pompe d'efflux sont les principaux mécanismes de résistance aux MLS, codés par plusieurs gènes : *erm*, *linA*, *mph* et *msrA*. Ces gènes assurent une résistance à ces antibiotiques d'une manière constitutive ou inductible (**Ding & al., 2012**)

Les différents phénotypes sont détectables par des méthodes phénotypiques et génotypiques.

La présente étude sera focalisée sur les phénotypes de résistance de *S. aureus* vis-à-vis ces deux familles d'antibiotique, tétracyclines et macrolides

L'objectif de ce travail consiste à :

- Détermination des phénotypes de résistance MLS_B
- La mise en évidence du phénotype inductible érythromycine- clindamycine par test D
- Etude de la résistance aux Tétracyclines
- Etude de la résistance de ces souches envers plusieurs antibiotiques de différentes familles

Synthèse bibliographique

I- Genre Staphylocoque :

I-1 /Historique :

Les premières descriptions des Staphylocoques isolées à partir de pus d'abcès en 1871 mais ce n'est que quelques années plus tard que ces travaux permettront de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1880, Louis Pasteur en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine (Fasquelle, 1974 ; Spicer, 2003). Plus tard, en 1883, Ogston crée le nom de « Staphylocoques », et différencie ainsi les Staphylocoques des Streptocoques (Spicer, 2003 ; Breche, 1988 ; Gillespie, 2006). En 1884, en Allemagne Rosenbach a donné la première description du genre Staphylococcus en obtenant des cultures pures de ces bactéries sur milieu solide. Il différencie ainsi *S. aureus* de *S. albus* par la coloration des pigments produits par les colonies (blanches ou Dorées) (Avril & al., 1992 ; Karthik, 2007).

I-2/Habitat :

Ils sont largement disséminés dans l'environnement, retrouvés dans le sol, l'air, l'eau et dans certains produits alimentaires (Rodgers et Shimeld, 1999), ils font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques ». Cependant ces Souches peuvent être à l'origine d'auto-infections ou contaminer d'autres individus (avril & al., 1992). Ils jouent un rôle important, dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière de colonisation, empêchant l'implantation des bactéries de la flore transitoire (Wyllie & al., 2005 ; Hirsh & al., 2004). Cependant, l'habitat préférentiel de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. (Flandrois, 1997 ; Eveillard, 2007). La présence de *S. aureus* dans l'environnement est essentiellement due à une contamination par l'homme ou par les animaux (Le Loir et Gantier, 2009 ; Breche & al., 1988)

I-3 /Classification :

Selon le Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est :

Domaine : *Bacteria*

Phylum : *Firmicute*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *aureus* (Garrity & al., 2007)

II /Espèce *Staphylococcus aureus* (agent pathogène)

S. aureus est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus* est la première cause d'infection bactérienne à travers le monde (Corne, 2004). Les infections à *S. aureus* sont très polymorphes, allant d'atteintes cutanées bénignes (furuncles ou panaris) à des pathologies mettant en jeu le pronostic vital comme les septicémies, les intoxications alimentaires et les infections du système nerveux central (Lowy, 1998).

II-1 /Caractères morphologiques :

Les Staphylocoques sont des analogues de Microcoques, il s'agit de cocci de 0,5 à 1µm de diamètre, disposées le plus souvent en grappes de raisin, immobiles, non sporulés (Nauciel & Vildé, 2005). La grande majorité des souches sont capsulées in vivo mais perdent progressivement leur capsule en culture. (Avril & Fauchere, 2002; Guiraud et Rosec, 2004). *S. aureus* élabore un pigment caroténoïde qui donne aux colonies une coloration jaune ou orange d'intensité très variable selon les souches (Bourgeois & al., 1988).

II-2 /caractères culturaux :

Les Staphylocoques sont peu exigeants sur le plan nutritif, aéro- anaérobies facultatifs c'est à dire qu'ils sont capables de se développer à la surface de la peau et dans les tissus mal oxygénés. Ils croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7,5, mais de grandes variations sont tolérées respectivement de 10 à 45 °C et de 5,6 à 8,1 (Denis & al, 2007). En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (Kloos, 1999). Sur milieux ordinaires *S. aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif de Chapman à 7,5 % de NaCl). Il existe, des variantes exigeantes en facteurs de croissance : thiamine, acide pantothénique... (Avril & al., 1992).

II-3/Caractères biochimiques :

Toutes les souches du genre *Staphylococcus* produisent une catalase, permettant ainsi de les distinguer des souches du genre *Streptococcus* qui n'en produisent pas (Minor & Veron, 1990), *S. aureus* peut aussi produire de nombreuses enzymes : protéases, lipases, nucléases thermostables (thermonucléases), coagulase libres. Cette dernière représente le critère de base de leur classification. (Bourgeois & al., 1988)

II-4/ Les facteurs de virulence et infections staphylococciques:

La pathogénie de *S. aureus* est liée à la synthèse de nombreux facteurs de virulence dont des facteurs structuraux et des composants de la paroi, des protéines de surface et des protéines secrétés, jouant ainsi un rôle dans l'infection (**Dowling & al., 2013**).

Tableau n° I : Facteurs de virulence de *S. aureus* et leur implication dans les infections staphylococciques (**Dinges & al.,2000; Nauciel & Vildé,2005; Barrio & al., 2006 ; Denis & al., 2007; Djoudi & al., 2013**).

Facteur de virulence	Rôles	Infections causés
<p><u>Composé structurale :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Adhésines (protéine A, protéines de liaison au : collagène, fibronéctine, fibrinogène) - Le peptidoglycane, acide teichoïque et la capsule. 	<ul style="list-style-type: none"> - l'adhérence aux caillots plasmatiques, au cartilage - fixation sur le fragment Fc des IgG - induction de la production de cytokines et échappement à la phagocytose 	<ul style="list-style-type: none"> d'infections articulaires ou osseuses infections des plaies
<p><u>Les enzymes :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - nucléases, protéases, Hyaluronidase, lipases, - coagulase 	<ul style="list-style-type: none"> - destruction tissulaire par hydrolyse des molécules biologique (lipides protéines) et diffusion - coagulation du plasma, agglutination par fixation au fibrinogène et une activité protéolytique grâce à la fixation sur la prothrombine 	<ul style="list-style-type: none"> infections endovasculaires infections intra-vasculaires
<p><u>Les toxines :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Hémolysines - Leucocidine de Penton-Valentine (PVL) - Toxine exfoliative - Toxine du syndrome du choc toxique TSST - Entérotoxines 	<ul style="list-style-type: none"> - Action sur la membrane cellulaire : lyse de cellules sanguines par formation de pores - Destruction des polynucléaires, création des pores et induction de l'apoptose - rupture des liaisons intracellulaire par l'adhérence aux kératinocytes, puis décollement des couches de l'épiderme. - Joue un rôle de super antigène par stimulation des lymphocytes T (état de choc) - action sur les fibres nerveuses digestives 	<ul style="list-style-type: none"> - d'impétigo bulleux et de diarrhées post-antibiotiques - Pneumonie nécrosante, pneumopathie hémorragiques, Furoncles - syndrome d'exfoliation généralisé (ou syndrome de la peau ébouillantée) - syndrome du choc toxique staphylococcique - intoxications alimentaires

III- 1/ Tétracyclines

III-1-1/ Généralité :

Il s'agit d'une famille d'antibiotique à large spectre contre les pathogènes intracellulaire et extracellulaire, Gram positives et Gram négatives. (Trzcinski & al., 2000). Le peu d'effets secondaire que peut induire cette famille a conduit à son utilisation intensive dans la thérapie humaine et animale. Dans certains pays, ils sont également utilisés comme facteurs de croissances pour les animaux (Chopra & al., 2001).

Cette famille représente un groupe important et diversifié de composés, allant de la chlorotétracycline produite naturellement, aux dérivés semi-synthétiques de la deuxième et de la troisième génération de la tétracycline, tels que la doxycycline, la minocycline et plus récemment la glycylicycline tigecycline (Fluit & al., 2005 ; Nguyen & al., 2014).

III-1-2/ Structure chimique :

La structure de base de la tétracycline est représentée dans la **Figure n° 1 (A)**. Dans les différents dérivés de la tétracycline (illustré dans la **Figure n° 1 (B)**), seuls les résidus dans la zone en caisse sont modifiés (Speer & al., 1992).

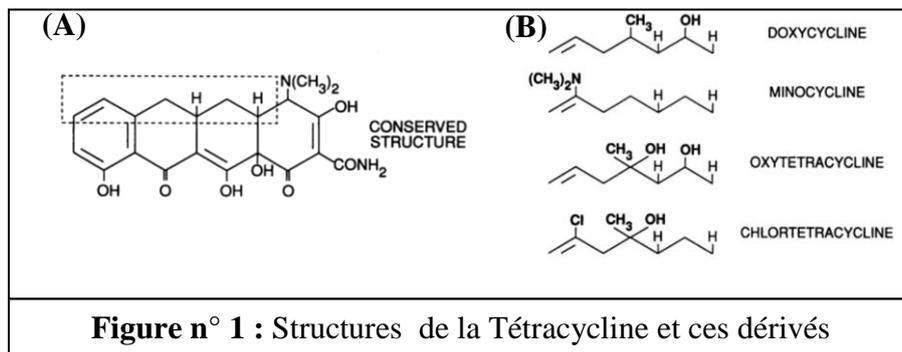


Figure n° 1 : Structures de la Tétracycline et ces dérivés

III-1-3/ Mécanisme d'action

Tétracycline est un inhibiteur de la synthèse des protéines elle agit en se liant à la sous-unité 30S du ribosome bactérien, de sorte que l'ARNt chargé en acide aminé ne peut plus se rapporter au site A (Salyers & al., 1990) (Figure n° 2). La liaison à cet antibiotique est transitoire, ces agents sont bactériostatiques (Neu & Gootz, 1996)

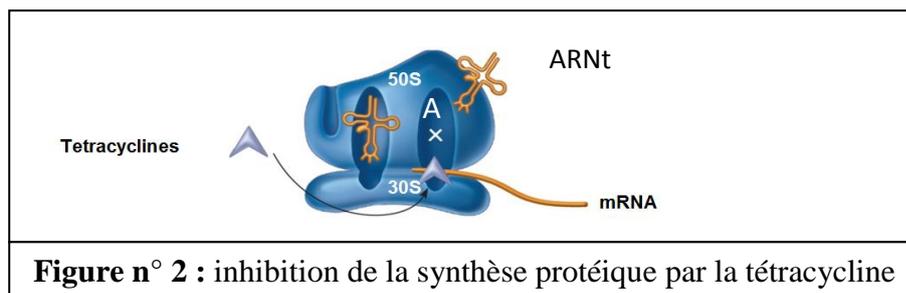


Figure n° 2 : inhibition de la synthèse protéique par la tétracycline

III-1-4/ Mécanismes d'acquisition de la résistance aux Tétracycline:

La résistance à la tétracycline est une préoccupation majeure car elle se situe souvent sur des plasmides, La résistance chromosomique est rare (**Neu & Gootz, 1996**)

Cette résistance peut être due à trois mécanismes différents, à savoir : l'efflux, protection ribosomale ou une modification de cible. Mais chez cette espèce deux mécanismes ont été identifiés (**Lyon & al., 1987**) :

- **Système d'efflux** : Le rôle physiologique des pompes à efflux repose sur l'élimination des déchets endogènes et des substances néfastes pour les bactéries tels que les antibiotiques (**Doléans-Jordheim & al., 2008**), ce phénomène représente un mode de résistance de plus en plus fréquemment décrit (**DeMarco & al., 2007**). Chez *S. aureus* cette résistance résulte de l'acquisition de deux gènes *tet K* et *tet L* portés par un plasmide (**Emaneini & al., 2013**). L'existence du gène *tet K* seul assure une résistance aux tétracyclines et ne confère pas une résistance à la minocycline (**Trzcinski & al., 2000**)
- **Protection de cible (protection ribosomale)** : qui est médiée par des gènes *tet M* et *tet O* localisés au niveau des transposons ou du chromosome. Le gène *tet M* confère une résistance à tous les antibiotiques de la famille des tétracyclines (**Bergeron & al., 1996 ; Brudett, 1991 ; Emaneini & al., 2013**).

Les deux génotypes *tet K* et *tet M* peuvent coexister assurant ainsi une résistance croisée (**Trzcinski & al., 2000**)

III-2/ MLS (Macrolides, Lincosamides, Streptogramines)

III-2-1 / Généralité :

Ces molécules, différenciées par leur structure chimique, sont regroupées par leur mode d'action proche, caractérisé par une inhibition de la synthèse protéique, spectre d'activité comparable et sites de liaison communs au ribosome ce qui confère une résistance croisée. On peut citer:

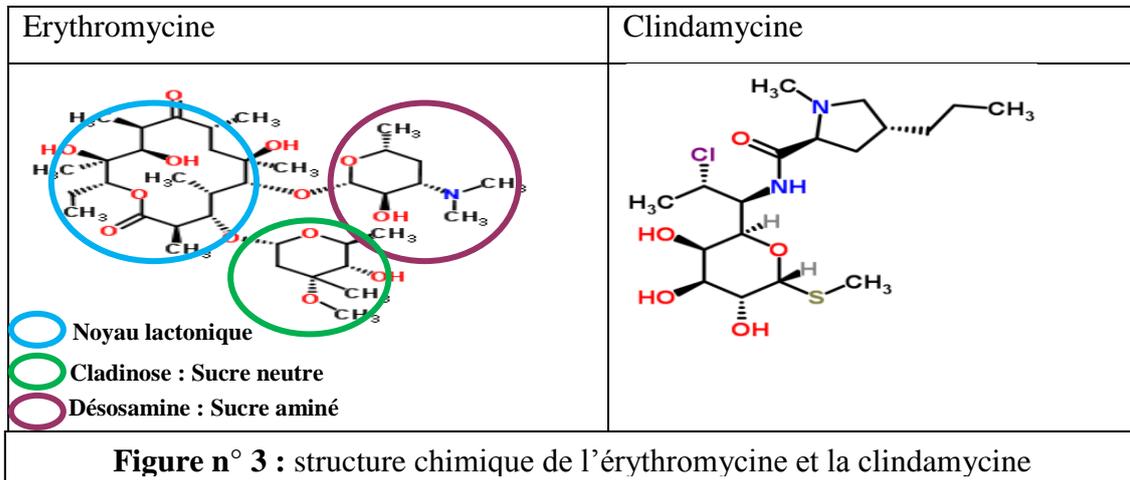
- Macrolides d'un noyau à 14-atomes (érythromycine)
- Macrolides d'un noyau à 15-atomes (Azithromycine)
- Macrolides d'un noyau à 16-atomes (Spiramycine)
- Lincosamides (Clindamycine)
- Streptogramines :

Synergistine A: Dalfopristine

Synergistine B: Quinupristine (**Meyohas, 1998**).

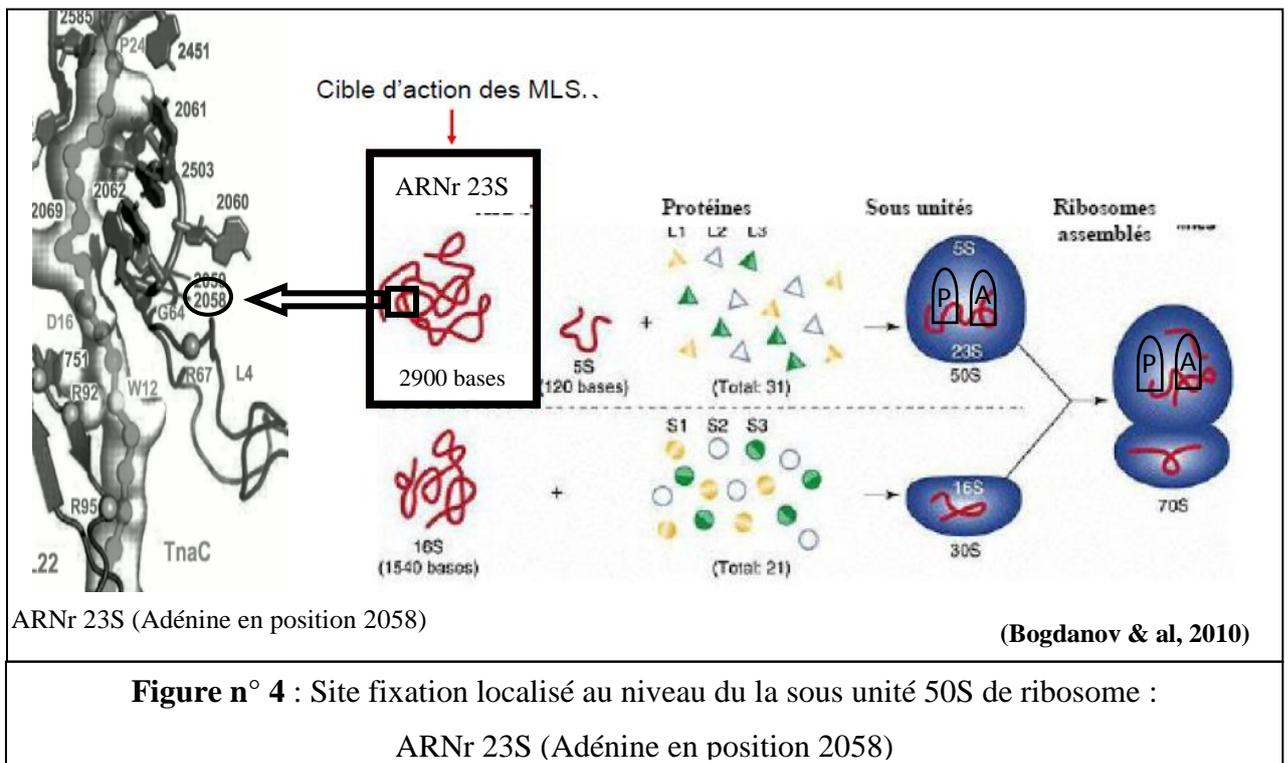
III-2-2/ Structure chimique :

Les MLS représentent un groupe de composés ayant un noyau lactonique, auxquels sont liés des sucres amino et/ou neutres via des liaisons glycosidiques (Roberts, 1999), l'érythromycine et clindamycine représentent deux classes d'agents antimicrobiens avec une structure chimique distincte illustrée dans la **Figure n° 3** :



III-2-3/ Mécanisme d'action :

Les MLS inhibent la synthèse protéique par fixation à l'ARNr 23s au niveau de la sous unité 50s de ribosome (Quincampoix & Mainardi, 2001), (**Figure n° 4**)



- Ils se lient de façon réversible à la sous-unité 50S des ribosomes, au niveau du site P
- Ils empêchent ainsi la translocation depuis le site A vers le site P, ce qui entraîne une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique. (Marilyn, 1999).

III-2-4/ Mécanismes d'acquisition de la résistance aux Macrolides et aux Lincosamides :

Les bactéries résistent aux antibiotiques macrolides et lincosamides de 3 façons: modification du site cible par méthylation ce qui empêche la liaison de l'antibiotique à sa cible ribosomale, par efflux de l'antibiotique et par inactivation du médicament. L'impact des 3 mécanismes est inégal en termes d'incidence et d'implications cliniques, La modification de la cible ribosomale confère une résistance à large spectre aux macrolides et aux lincosamides, alors que l'efflux et l'inactivation affectent seulement certains de ces molécules (Leclereq, 2002)

a. Modification du la cible (Méthylation ribosomale) :

Le mécanisme de résistance le plus connu est la modification de la cible ribosomale, cette cible est modifiée par une attaque enzymatique, une enzyme nommée ‘Méthylase’ réalisant la méthylation d'une adénine en position 2058 de l'ARNr 23S (Robert, 2013). Le résidu A2058 est situé dans une région conservée du domaine V de l'ARN ribosomique 23S, qui joue un rôle clé dans la liaison des antibiotiques MLS_B. En conséquence de la méthylation, la liaison de l'érythromycine à sa cible est altérée. Les sites de liaison superposés des macrolides, lincosamides et streptogramines B (MLS_B) dans ARNr 23S confèrent une résistance croisée aux 3 classes d'antibiotiques (phénotype MLS_B) (Schmitz ,2000) Ces enzymes en cause sont codées par les gènes *erm* (*erythromycin resistance methylase*) dont il existe au moins 20 classes, leur support peut être chromosomique ou plasmidique (Quincampoix & Mainardi, 2001). *erm A* et *erm C* sont les gènes les plus impliquée chez *S. aureus* (Schmitz ,2000). Les gènes *erm A* sont principalement répandus dans les souches résistant à la méthiciline et sont portés par des transposons liés au Tn 554, tandis que les gènes *erm C* sont principalement responsables de la résistance à l'érythromycine dans les souches sensibles à la méthiciline et sont portés par des plasmides (Leclereq, 2002).

➤ La diversité de l'expression de résistance pour le phénotype MLS_B :

La résistance MLS_B peut être soit constitutive ou inductible (**Drinkovic, 2001**):

- Phénotype inductible : les bactéries produisent un ARNm inactif qui ne peut pas coder la méthylase. L'ARNm devient actif uniquement en présence d'un inducteur de macrolide (C14, C15), ce qui permet la traduction du gène codant le peptide leader, qui est en amont du gène *erm*. Cette protéine conduit à des réarrangements de l'ARNm du gène *erm*, permettant ainsi la traduction de ce dernier. Les phénotypes de résistance conférés par l'expression inductible des deux déterminants (*erm A* et *erm C*) sont similaires. Les souches sont résistantes aux macrolides à anneau à 14 et 15 atomes de carbones qui sont des inducteurs. En revanche, les macrolides à anneau de 16 atomes, les Lincosamides et les Streptogramines B, qui ne sont pas inducteurs restent actifs (**Leclereq, 2002**).

- Phénotype constitutive : dans l'expression constitutive, l'ARNm de la méthylase toujours active est produit en l'absence d'un inducteur. L'expression constitutive du gène *erm* est généralement associée à des altérations structurelles dans l'atténuateur de transcription de l'*erm*, y compris les suppressions, les duplications et les mutations ponctuelles dans le gène *erm* (**Roberts, 1999**). La production constitutive d'un méthylase confère généralement un phénotype caractéristique à haut niveau de résistance croisée aux MLS_B (**Leclereq, 2002**).

La distinction entre ces 2 phénotypes se fait par test D : le phénotype inductible est caractérisé par une zone d'inhibition en forme « D » sur la gélose lorsque un disque d'inducteur (érythromycine) est placé à côté d'un disque de non inducteurs (clindamycine) (**Daurel & Leclercq, 2008**).

b. Efflux actif :

Un deuxième mécanisme de résistance est assuré par la présence d'une pompe ATP-dépendante, codée par le gène plasmidique *msrA*. Ce qui diminue l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule (**Pichere, 2001**).

- **Gène *msr* (A) :** codent pour les protéines de transport (efflux). Ceux-ci ne modifient ni l'antibiotique ni la cible d'antibiotiques, mais pompent l'antibiotique hors de la cellule ou de la membrane cellulaire, en maintenant les concentrations intracellulaires faibles (**Roberts, 1999**). Ce qui confère une résistance aux Macrolides de 14 et 15 membres et les Streptogramines de type B (phénotype MS_B) qui peut être inductible ou constitutif :

- Phénotype inductible : L'érythromycine et d'autres macrolides à 14 et 15 atomes sont des inducteurs, alors que les Streptogramines B ne le sont pas. Par conséquent, ce phénotype confère une résistance seulement à des macrolides à 14 et 15 atomes et des streptogramines de type B et non aux lincosamides, comme la clindamycine. Pour les infections dues à ces souches, la clindamycine peut être une option thérapeutique importante (**George & al., 2003**)

- Phénotype constitutif : les mutants constitutifs sont résistants à la fois à l'érythromycine et aux streptogramines B, mais restent complètement sensibles à la clindamycine (**Leclereq, 2002**).

Il est important pour les laboratoires de distinguer entre MS et iMLS_B. Cependant, les deux sont indistinctibles lorsque l'on utilise des tests de microdilution de bouillon de routine (BMD). Mais ces deux phénotypes peuvent être distingués par le test d'approximation du disque d'érythromycine-clindamycine ou le test D. Lorsqu'une bactérie exprime le phénotype iMLS_B, la zone d'inhibition autour du disque de clindamycine est aplatie pour donner une forme "D" (test D positif), alors que dans le phénotype MS, la zone de clindamycine reste circulaire (test D négatif) (**Matthew & al., 2006**)

c. Modification de l'antibiotique :

Contrairement à la modification de la cible, l'inactivation des antibiotiques confère uniquement une résistance aux antibiotiques liés à la structure. Ces enzymes, modifient l'antibiotique lui-même, chez *S. aureus* les enzymes les plus impliqués sont :

- Nucléotidyltransférase: codé par le gène *linA*, confère une résistance aux Lincosamides seules, sans résistance aux Macrolides ni aux Streptogramines (**Quincampoix & al., 2001**)
- Phosphotransférase : codées par des gènes *mph* (C) (**Leclereq, 2002**), des enzymes intracellulaires capables de transférer la γ -phosphate de triphosphate de nucléotide au groupe 2'-OH de 14, 15, et les antibiotiques macrolides à 16 chaînes, perturbant ainsi l'interaction clé du macrolide avec A2058 (**George & al., 2003**)

Le support de ces gènes est souvent plasmidique (**Quincampoix & al., 2001**).

Matériels et méthodes

I/ Objectifs, durée et lieu de l'étude :

Notre étude a débuté en février 2017 et à durée 3mois .Les analyses ont été réalisées au niveau de laboratoire microbiologie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Le premier objectif consiste à la détermination des phénotypes de résistance MLS_B , ainsi que le phénotype inductible érythromycine-clindamycine par test D

En second, l'étude du profil de résistance de *S. aureus* isolée vis-à-vis plusieurs familles d'antibiotiques est évalués dont la Tétracycline

II/Origine des souches:

II.1/ Souches d'origine nasal :

- ✓ Souches isolées à l'EPE Cazal (Bejaia)
- ✓ Souches isolées au CHU Mostapha Bacha (Alger)
- ✓ Souches isolées au CHU Nedir Mhemmed (Tizi-Ouzou)
- ✓ Souches isolées de Chameau (Bechar)

II.2/ Souches d'origine infectieuse :

- ✓ Souches isolées au CHU EL Kettar (Alger)

III/Recherche de *Staphylococcus aureus*:

III-1/Isolement et purification:

Un isolement sélectif sur une gélose Chapman a été réalisé :

- ✓ A l'aide d'une anse de platine, prélever une goutte du milieu d'enrichissement (tube qui présente un trouble)
- ✓ Ensemencer par la méthode des stries puis incubé à 37C° pendant 24/48h
- ✓ Afin d'obtenir des colonies bien isolées nous avons effectuée des repiquages successifs sur gélose Chapman

III-2/Caractéristiques des colonies:

➤ Aspect macroscopique

Sur le milieu de Chapman, les colonies jaunes dorées entourées d'une zone jaune (fermentation de mannitol) sont des *S. aureus* (Delarras, 2007; Kloos, 1999)

➤ Aspect microscopique (coloration de Gram)

La coloration de Gram (**Annexe II**): est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose Chapman, les *S. aureus* apparaissent sous forme de coque Gram positive plus souvent en amas dits en grappes de raisin

III-3/Identification biochimique:

En plus des caractères morphologiques, l'identification est aussi effectuée à la base de quelques caractères biochimiques:

➤ **Test catalase:**

- ✓ Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée
- ✓ A l'aide d'une pipette Pasteur, ajouter 2 à 3 colonies identiques
- ✓ Observation immédiate
- ✓ L'apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase (+)
- ✓ Absence de bulles : catalase (-)

➤ **Test staphylocoagulase:**

Ce test consiste à :

- ✓ réaliser une subculture dans un bouillon cœur-cerveau (B.H.I.B), puis incubé 24h à 37°C
- ✓ Dans un tube à hémolyse, mélanger 0.5 ml de la culture sur B.H.I.B avec 0.5ml de plasma humain
- ✓ Incuber le tube à hémolyse à 37°C et effectuer des lectures après 1h, 4h et 24h

Un résultat positif se manifeste par la formation d'un caillou semi-solide au fond du tube à hémolyse.

➤ **Test DNase:**

Ce test est effectué comme suit:

- ✓ A l'aide d'une anse de platine prendre quelques colonies et tracer une ligne de 3 à 4 cm sur une plaque d'agar DNA
- ✓ Incuber 18/24h à 37°C
- ✓ Inonder la plaque avec de l'acide chlorhydrique(HCl) 1N
- ✓ Attendre 2 min afin de permettre à l'acide de pénétrer toute la surface du milieu
- ✓ Décanter l'excès d'acide chlorhydrique puis examiner la plaque dans les 5 minutes contre un fond sombre

Un halo clair autour de la strie est observé en cas d'hydrolyse de l'ADN.

• **Détermination du profil biochimique (API®Staph)**

La galerie API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres Staphylococcus, Micrococcus, comprenant des tests biochimiques miniaturisés sous forme de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests étudiés par cette galerie sont principalement la dégradation de différents sucres ou polyalcools ; Recherche de nitrate réductase, de phosphatase, d'arginine dihydrolase et d'uréase (Chaala, 2013).

Les réactions produites se traduisent par des virages colorés après incubation visualisé directement ou après addition de réactifs, tels que : VP 1 + VP 2 ; NIT 1 + NIT 2 ; ZYM A et ZYM B (**Annexe III**)

Technique :

1/ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide

2/ Ensemencement de la galerie par une suspension bactérienne d'environ 5 McF préparée sur 6 ml d'eau Staph Medium. A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie sans atteindre les cupules. Dans les tests ADH et URE on remplit leur cupule d'huile de paraffine pour crée une anaérobiose, renfermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures

3/ La lecture peut s'effectuer directement par rapport aux résultats du tableau d'identification (**Annexe IV**),ou bien après transformation de ces résultats en code chiffré dont la signification est donnée par un indice numérique (API web)

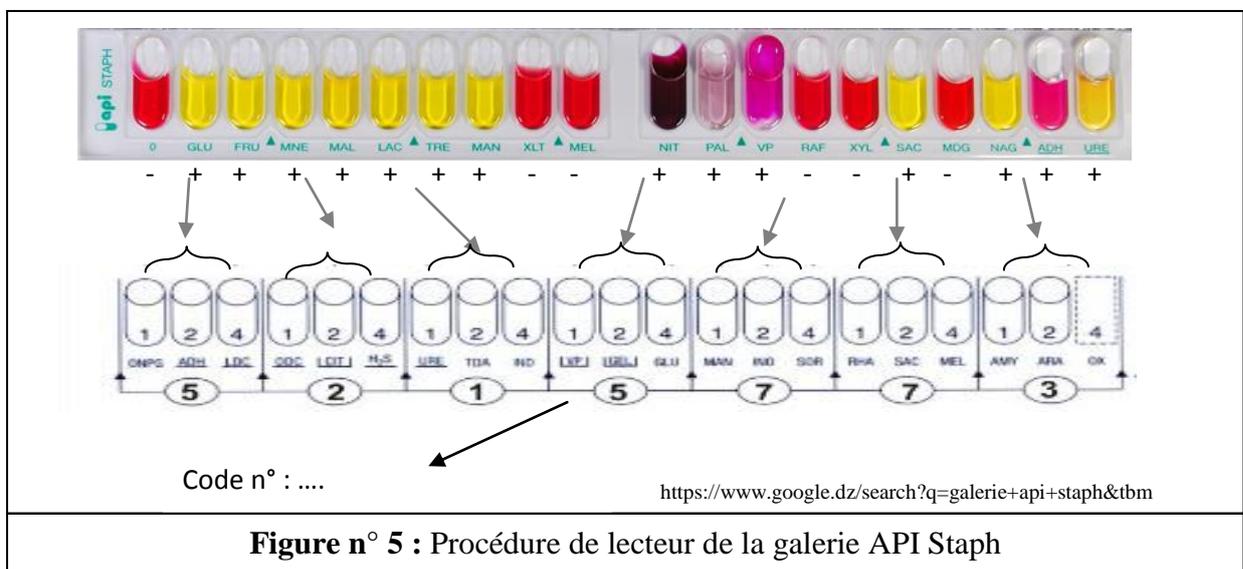


Figure n° 5 : Procédure de lecture de la galerie API Staph

IV/Antibiogramme :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de toutes les souches de *S. aureus* identifiées a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieux gélose Mueller-Hinton selon les normes et les recommandations du European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2017) :

➤ **Technique de l'antibiogramme: (EUCAST 2017)**

- ✓ Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement (gélose nutritive, Chapman). Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont repiquées à l'aide d'une anse de platine, déchargée dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9%
- ✓ La suspension bactérienne est bien homogénéisée à l'aide d'un vortex
- ✓ L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 min qui suivent sa Préparation, son emploi doit être fait au plus tard dans les 60 min qui suivent sa préparation
- ✓ Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube
- ✓ Ensemencer sur la totalité de la surface de la gélose sèche de haut en bas en stries serrées
- ✓ Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose
- ✓ Appliquer les disques d'antibiotiques dans les 15min qui suivent l'inoculation des boîtes
- ✓ Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé
- ✓ Un maximum de six disques convient pour les boîtes de 90 mm de diamètre
- ✓ Incuber dans les 15min qui suivent l'application des disques à 37c° pendant 18h

➤ **Test D :**

La procédure de test D est :

- ✓ Préparé une suspension bactérien (*S. aureus*)
- ✓ Ensemencé sur une boîte gélose Muller-Hinton
- ✓ Le disque de clindamycine (15µg) a été placé à une distance de 15mm à partir du disque de clindamycine (2µg)

- ✓ Incubation 24h à 37C°

L'aplatissement de la zone (en forme de D) autour de la clindamycine dans la zone entre les deux disques, indique une résistance à la clindamycine inductible

➤ **Lecture des résultats:**

Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurants dans le tableau de lecture, puis la bactérie est classée dans l'une des catégories: sensible ou résistante (**Tableau n° 2**)

Tableau n° II : Concentrations et diamètres critiques des antibiotiques utilisés selon l'EUCAST 2017					
Familie	Antibiotiques testés	Symbole	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
				Sensible ≥ S	Résistant < R
Fusidanes	Acide fusidique	FA	10	24	24
Aminosides	Gentamycine	CN	10	18	18
	Tobramycine	TOB	10	18	18
β-lactamines(C2G)	Céfoxitine	FOX	30	22	22
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	21	21
Lincosamides	Clindamycine	DA	2	22	19
Macrolides	Erythromycine	E	15	21	18
Rifampicines	Rifampine	RA	5	26	23
Sulfamides	Sulfamethoxazole	SXT	1.25	17	14
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30	22	19
Glycopeptides	Vancomycine	VAN	30	17	17

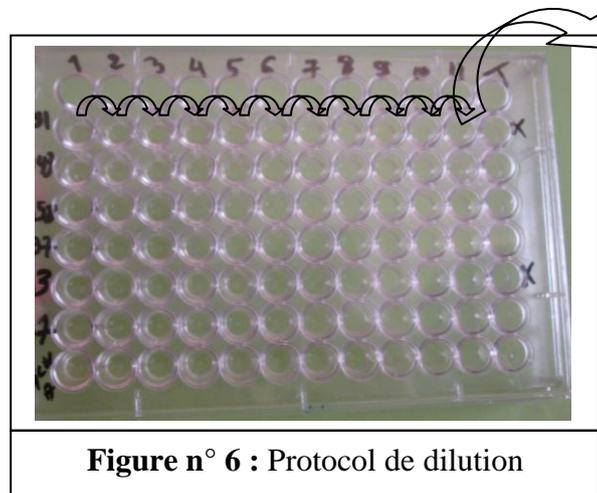
➤ **Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :**

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée. Dans ce présent travail la CMI a été mise en évidence (chez les souches révélées résistantes à la Vancomycine par méthode de diffusion de disque) par la technique de microdilution sur des microplaques, pour cela :

- ✓ Une solution d'antibiotique de concentration finale égale à 256µg/ml a été préparée depuis une solution mère à 100mg/ml ($C_0.V_0 = C_1.V_1$). La solution mère est obtenue par ajout de 50ml d'eau distillée stérile dans un flacon contenant 500mg de la Vancomycine en poudre.
- ✓ Une suspension bactérienne a été préparée sur bouillon Muller Hinton.

Protocole de dilution :

- ✓ A l'aide d'une micropipette on distribue dans un premier temps un même volume de BMH (50 μ l) dans les cupules de la microplaque
- ✓ On ajoute dans la cupule de la première colonne de la microplaque un volume de 50 μ l de la solution d'antibiotique préparée. Bien mélanger avec la micropipette.
- ✓ puis on procède à une dilution de façon à obtenir des concentrations décroissantes selon une progression géométrique de raison de 2. Pour cela :
 - on Prélève 50 μ l du contenu de la cupule de la colonne 1 et on le transfert dans la cupule de la colonne 2 (**Figure n°6**), On procède ainsi jusqu'à la colonne 11 (50 μ l en excès sont rejeté)
 - La dernière colonne est considérée comme un témoin sans antibiotique (contient 50 μ l du bouillon MH et la suspension bactérienne).
- ✓ Puis on ensemence toutes les cupules de la colonne 1 jusqu'à 12 de la même rangée par 50 μ l de suspension bactérienne allant d'ordre décroissant de la concentration d'antibiotique.
- ✓ Recouvrir la microplaque par son couvercle et l'incuber à 37°C pendant 18h à 24 heures.



Résultats

I. Répartition des prélèvements selon leur origine:

Au cours de notre étude, un totale de 792 prélèvements de différents origines ont été analysés. Il s'agit de prélèvements animaux et de prélèvements humains qui sont réalisés au niveau de plusieurs services au sein des trois hôpitaux ; dont des prélèvements nasaux et des prélèvements infectieux (pus d'un abcès, d'une plaie, sécrétion de muqueuses, sérosités...), qui sont répartis comme suit :

Tableau n° III: Répartition des prélèvements selon leurs origines et type du prélèvement					
Origine du prélèvement	Type du prélèvement	Lieu du prélèvement	Nombre de prélèvement	Pourcentage %	Pourcentage globale %
Animal		EPE CAZEL Bejaia (vaches)	55	6.94	20.83
		Bechar (chameaux)	110	13.89	
Humain	Nasals	Hôpital Moustapha Bacha (Alger)	49	6.19	79.17
		Hôpital Nedir Mhemmed (Tizi-Ouzou)	32	4.04	
	Infectieux	Hôpital El- Kettar (Alger)	546	68.94	
Totale			792	100	100

II. Identification de l'espèce *S. aureus* :

- Un échantillon est considéré positif et envisagé porteur de *S. aureus* après culture sur Chapman est une séries d'identification
- Sur un total de 792 prélèvements, 506 (63.89%) souches isolées correspondent aux caractères macroscopiques et microscopiques du genre *Staphylococcus*
- Un totale de 133 souches de *S. aureus* ont été identifiés par la mise en évidence, de la coagulase libre (**Figure n° 7**), de la DNase (**Figure n° 8**) et par la galerie biochimique API STAPH (**Figure n° 9**)



Figure n° 7 : Test de coagulase



Figure n° 8 : Test de DNase



Figure n° 9 : La mise en évidence des caractères biochimiques par API Staph

III. Répartition des souches de *S. aureus* en fonction de type de prélèvement :

La majeure partie des souches *S. aureus* a été isolée à partir de prélèvement nasal, 87 sur les 133 souches. Cependant, que 46 souches ont été isolées à partir des prélèvements d'origines infectieux. La répartition des souches de *S. aureus* selon le type de prélèvement est donnée par la **Figure n° 10**

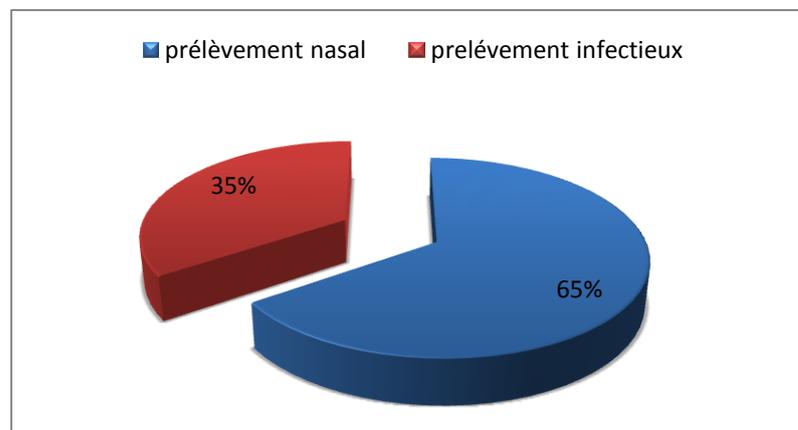
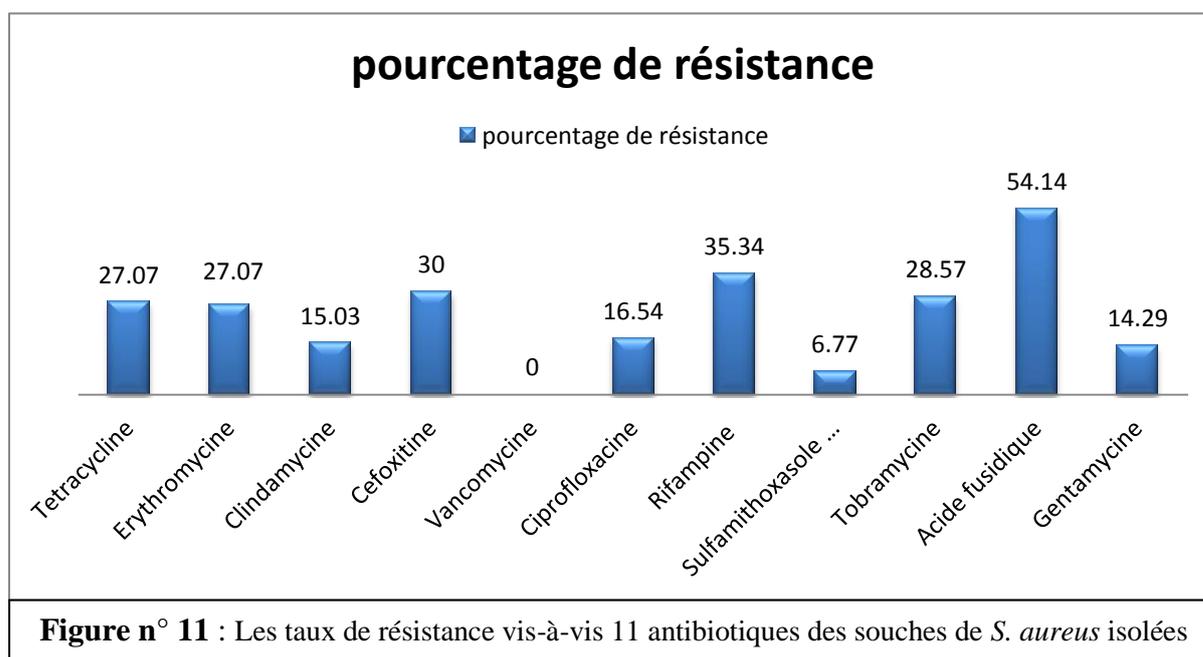


Figure n° 10: Répartition des souches de *S. aureus* en fonction de type de prélèvement

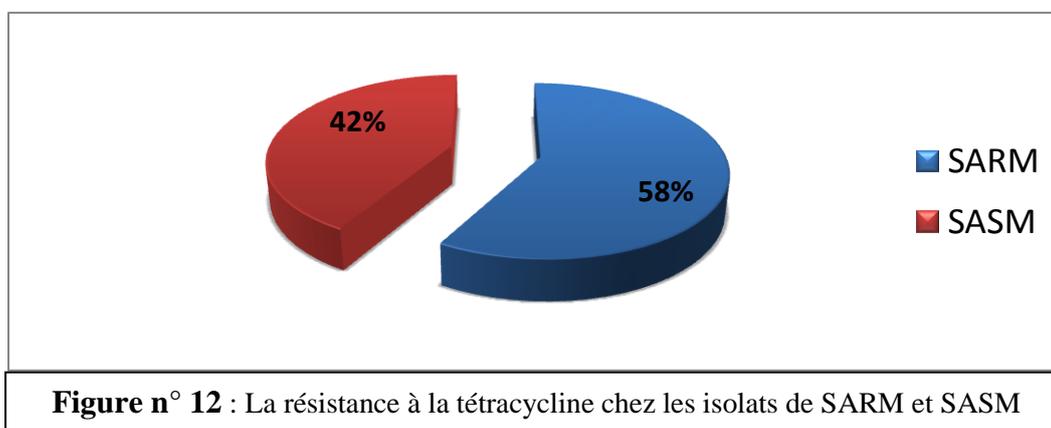
IV. Résistance aux antibiotiques chez les souches de *S. aureus* isolées :

- Le profil de résistance à l'érythromycine et tétracycline ainsi que pour 9 autres antibiotiques est donné dans la **Figure n° 11**, à noter que 30.08% des isolats sont résistants à la Céfoxitine, et aucune résistance n'a été marquée vis-à-vis la Vancomycine.
- Un taux de résistance de 27.07% a été marqué vis-à-vis la tétracycline
- Sur les 133 isolats de *S. aureus*, 27.07% étaient résistants à l'érythromycine



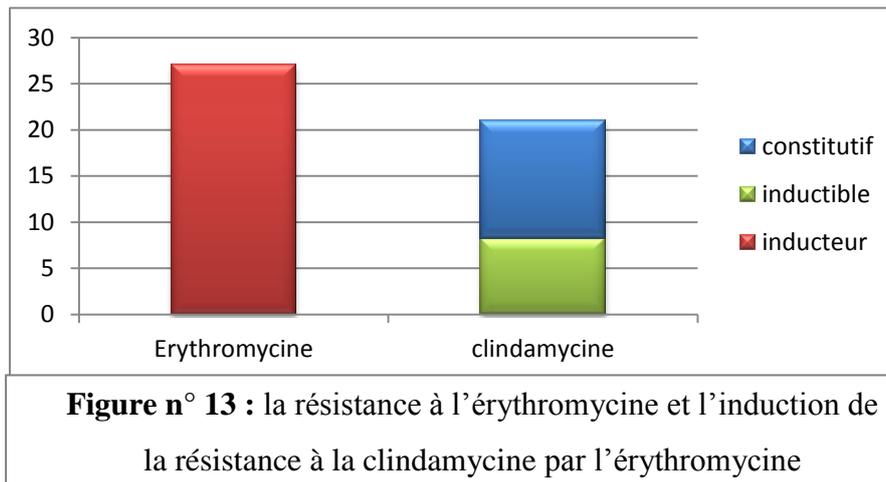
IV.2/ La résistance à la tétracycline :

Sur un total de 133 isolats de *S. aureus*, 36 étaient résistants à la tétracycline, dont 21 souches (58.33%) ont été des SARM et 15 (41.67%) souches des SASM, ce qui montre une résistance plus importante chez les isolats de SARM que ceux des SASM (**Figure n° 12**)



IV.3/ Résistance à l'érythromycine :

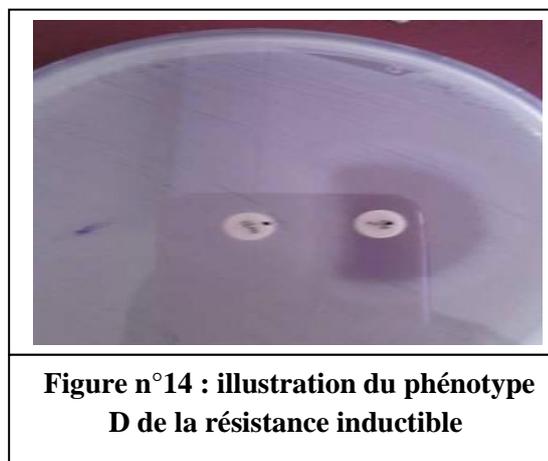
Toutes les 133 souches de *S. aureus* isolées de différentes origines ont été testées vis-à-vis de l'érythromycine, ainsi l'induction à la clindamycine par le test D, cette étude a montré que environ 1/3 des souches résistantes à l'érythromycine affiche un phénotype inducible pour la clindamycine (**Figure n° 13**)



IV.3.1/ Différents phénotypes de résistance clindamycines et érythromycines :

Pour un aperçu précis sur la possibilité d'une interprétation erronée de la résistance de *S. aureus* à la clindamycine, nous avons procédé au test D ce qui nous a permis de marquer deux phénotypes d'induction distincts et cinq phénotypes de non-induction:

- Phénotype D : 6 isolats avec une zone d'inhibition claire en forme D autour du disque clindamycine ont été observé, (**Figure n° 14**)



- Phénotype D+ : 5 isolats avec une zone en forme D contenant des colonies intérieures qui poussent vers le disque clindamycine, (**Figure n° 15**)

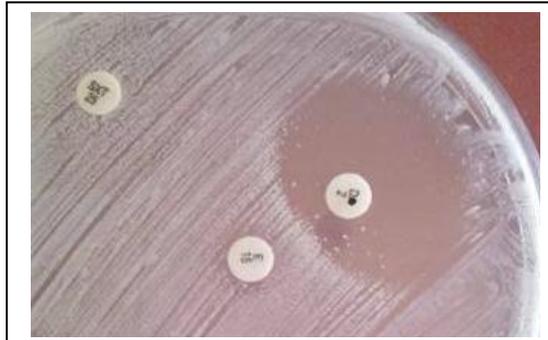


Figure n° 15 : illustration du phénotype D+ de la résistance inducible

Ces deux phénotypes sont considéré comme un résultat positifs et indique que l'érythromycine a induit une résistance à la clindamycine (test D positif)

- Phénotype HD : 2 isolats qui présentent une double zone d'inhibition avec une bague intérieure de croissance réduite jusqu'au bord du disque clindamycine, (**Figure n° 16**)

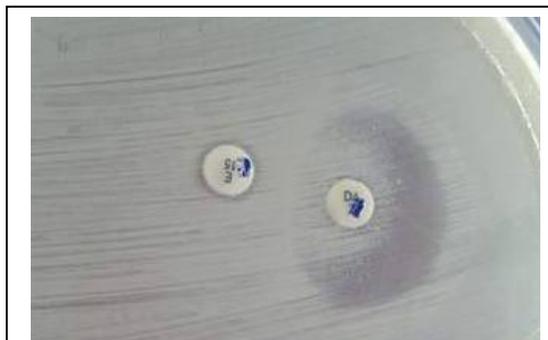


Figure n° 16 : illustration du phénotype HD de la résistance inducible

Ce phénotype n'a pas été considéré comme indicatif d'induction puisque la croissance s'est étendue jusqu'au bord du disque (indiquant la résistance a la clindamycine)

- Phénotype sensible : 87isolats ont montré de grandes zones d'inhibition autour des disques E et DA (**Figure n° 17**)



Figure n° 17 : illustration du phénotype sensible

- Phénotype résistant : 8 isolats qui présentent une croissance solide autour des disques DA et E, sans zone interne d'inhibition (**Figure n° 18**)



Figure n° 18 : illustration du phénotype résistant

- Phénotype Négatif : 15 isolats résistent à l'érythromycine et sensible à la clindamycine, mais ils ne sont pas inductible et aucun émoussement de la zone DA (**Figure n° 19**)

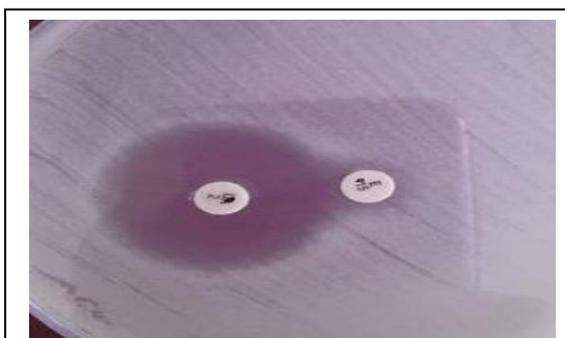


Figure n° 19 : illustration du phénotype Négatif de la résistance inductible

IV.1.2/ Pourcentage de résistance inductible et constitutive chez les isolats de SARM et SASM :

Les résultats de notre étude montrent que le pourcentage de résistance inductible et constitutive à la clindamycine était plus élevé chez les isolats de SARM par rapport aux SASM, ainsi que la dominance de phénotype MS dans notre étude par rapport au phénotype MLS_B (Tableau n° IV).

Tableau n° IV : Association de résistance à clindamycine et érythromycine avec la résistance à la méthiciline			
Phénotype	Total	SARM (n=40)	SASM (n=93)
E-S, DA-S	87(100%)	17(19.54%)	70(79.31%)
E-R, DA-R, MLS _B constitutive	10(100%)	6(60.00%)	4(40.00%)
E-R, DA-R, D test (+), MLS _B inductible	11(100%)	7(63.64%)	4(36.36%)
E-R, DA-S, D test(-), MS	15(100%)	8(53.33%)	7(46.67%)
E-S, DA-R, D test (-)	10 (100%)	2 (20%)	8 (80%)
E-S : érythromycine sensible, DA-S : clindamycine sensible, E-R : Erythromycine résistant, DA-R : clindamycine résistant, MS : phénotype macrolide Streptogramines Résistants			

IV.3/ La résistance associée à l'érythromycine et tétracycline chez les souches de *S. aureus* isolées :

Les résultats de cette étude ont montré un total de 23(17.29%) souches avec une résistance associée à la tétracycline et l'érythromycine, à partir de 133 souches *S. aureus* (Tableau n° V)

Tableau n° V: La résistance associée à la tétracycline et érythromycine chez les souches de <i>S. aureus</i> isolées			
	Tétracycline résistant	Erythromycine résistant	Tétracycline et érythromycine résistant
EPE- CAZEL	6	2	1
Bechar (chameaux)	3	4	2
Hôpital Mostapha Bacha	4	5	3
Hôpital Nedir Mhemmed	12	10	10
Hôpital EL-Kettar	11	15	7
Total	36	36	23

Tableau n° VI : Répartition des taux de résistance à la tétracycline et érythromycine selon le type de prélèvement			
	Taux de résistance à la tétracycline	Taux de résistance à l'érythromycine	Taux de résistance tétracycline- érythromycine
Nasales	69.44	58.33	69.57%
infectieux	30.56	41.67	30.43%

IV.1/ Résistance à la vancomycine :

Toutes les souches testées sont sensibles à la vancomycine avec des CMI égale à 1µg/ml (EUCAST, 2017).

Discussion

Staphylococcus aureus est un agent important dans les infections hospitalières et communautaires, causant une morbidité et une mortalité élevées. L'introduction des nouvelles classes d'antibiotiques pour ce pathogène a été habituellement suivie par l'émergence de souches multi résistantes (**Seifi & al., 2012**). Néanmoins Les fosses nasales antérieures sont le site de portage préférentiel de *S. aureus*. Ce portage est permanent chez 20% environ de la population, intermittent chez 50%, et absent chez 30% de la population générale (**Ferry & al., 2007**)

Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques ont confirmé la multi-résistance de 133 souches de *S. aureus* vis-à-vis les 11 antibiotiques testés. Des résultats similaires vis-à-vis ces 11 antibiotiques ont été reportés par Zmantar à partir de 117 souches de *S. aureus* testées isolées d'un hôpital. (**Zmantar & al., 2011**)

Les (MLS) sont largement utilisés dans le traitement des infections staphylococciques. La résistance aux macrolides (l'érythromycine) et les lincosamides (clindamycine) est fréquente chez les *Staphylococcus* (**Lina & al., 1999**). Bien que la résistance à l'érythromycine chez *S. aureus* a été signalée peu de temps après que cet agent antimicrobien a été introduit dans la pratique clinique dans les années 1950 (**Nicola & al., 1998**)

Les résultats de notre étude ont montré que les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à l'érythromycine représentent un taux de 27.07% de la totalité des souches de *S. aureus* isolées. Ce résultat est semblable à celui rapportés par Yildizlen Turquie qui est de 25.03% établi sur 397 isolats (**Yildizl & al., 2014**).

Cependant, il est loin de ceux rapportés par Abbas en Inde, Lina en France, ainsi que Dingen Chine, qui ont rapportés des taux de 40.20%, 53.3% et 76.9% respectivement (**Lina & al., 1999**., **Ding & al., 2012**., **Abbas & al., 2015**)

Des études génotypiques ont démontré l'intervention de la pompe à efflux dans la résistance au macrolide. Comme le signalent Lina et al, au cours de leur étude, la présence du gène *msr A* à été détectée pour seulement 2,1 % des isolats de *S. aureus* résistants aux macrolides, lincosamides, et/ou streptogramine (souches à la fois méthiciline résistantes et/ou sensibles) (**Lina & al., 1999**).

Dans notre étude un test d'induction (test D) a été effectué en plaçant un disque DA (2 µg) à environ 15 mm d'un disque E (15 µg) sur des isolats résistant à l'érythromycine pour détecter le phénotype inductible. Nous avons trouvé une prévalence globale de résistance à la clindamycine inductible de 8.27% (11). Kavitha a rapporté un résultat presque similaire qui est de 10.52% (**Kavitha & al., 2011**)

On a également observé que les pourcentages de résistance inductible étaient plus élevés chez les SARM par rapport au SASM (63.64% et 36.36%, respectivement). Ceci était en concordance avec quelques études rapportées auparavant (**Ghasemian & al., 2014**). Cela peut s'expliquer par le pouvoir qu'a le SARM à porter ces gènes de résistances via les différentes cassettes chromosomiques de SCC mec (**Djoudi & al., 2014**)

Au contraire, peu d'études ont montré un pourcentage plus élevé de résistance inductible dans le SASM par rapport au SARM (**Schreckenberger & al., 2004 ; Levin & al., 2005**)

Une prévalence plus élevée du phénotype iMLS_B dans les infections à SARM par rapport aux infections par SASM suggère que le traitement à la clindamycine pour les infections par SASM est réussi dans de nombreuses circonstances, alors qu'il peut conduire à un échec thérapeutique pour les infections à SARM.

Nos résultats d'induction à la DA pour le test de diffusion du disque ont montré deux phénotypes, dont chacun avait un flou distinct de la zone d'inhibition proximale au disque E, l'un avec une zone d'inhibition claire (phénotype D) et l'autre avec de petites colonies dans la zone d'inhibition (phénotype D+). Les petites colonies dans la zone D+ sont résistance constitutive à la clindamycine lorsqu'elles ont été testées de nouveau. Bien qu'il n'y ait pas en clinique une différence significative entre les phénotypes D et D+, et les deux phénotypes sont considérés comme des résultats positifs pour le test D (**Steward & al., 2005**)

Notre étude suggère que l'apparition du phénotype de résistance iMLS_B varie considérablement selon les hôpitaux et la région géographique. La non-identification de la résistance inductible à la clindamycine lorsque il s'agit de phénotype E-R et DA-S, peut entraîner une insuffisance clinique du traitement par la clindamycine. À l'inverse, l'étiquetage de tous les Staphylocoques E-R comme DA-R empêchera probablement

l'utilisation de DA dans le traitement des infections qui pourraient répondre à la thérapie DA (**Zelazny & al., 2005**).

Les données présentées ici indiquent l'importance de la reconnaissance correcte de mécanismes de résistance à la clindamycine dans les souches de *S. aureus* et la nécessité de réaliser le test D pour interpréter correctement la résistance à la clindamycine. Les conséquences d'une mauvaise identification de ces mécanismes est la considération d'une résistance inductible comme étant sensible.

Ces résultats suggèrent une attention particulière dans le diagnostic et le traitement des infections causé par *S. aureus* qui présente une résistance à l'érythromycine dans cet hôpital, afin de pouvoir prescrire des traitements efficaces.

Dans la présente étude, environ 12.78% des isolats de *S. aureus* ont montré une résistance constitutive à la clindamycine,

Les données de notre étude ont montré la fréquence de phénotype MS avec une prévalence de 11.28%, l'efflux codé par *msr* semble augmenter chez les staphylocoques. Une surveillance des isolats dans des hôpitaux français publié en 1999 a montré que 2,1% des isolats SARM / SASM portant le gène *msr* (**Lina & al., 1999**), 15% en Tunisie (**Bouchami & al., 2007**), et un taux très élevé (72.7%) a été marqué en 2011 à l'hôpital de l'Université de Caen en France (**Bouter & al., 2011**)

Globalement, la comparaison des taux de résistance à la clindamycine et érythromycine chez *S. aureus* avec le Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotique a donné ces différences, ou nos résultats signale un taux de 27.07% concernant l'érythromycine, qui reste proche de celui rapporté par le réseau algérien qui est de 32.82%. Cependant, notre étude semble avoir un résultat élevé pour la clindamycine qui est de 21.05% comparé à celui signalé par le réseau algérien qui est de 13.02% pour le totales des hospitalier et communautaires

Dans notre étude, nous avons étudié la résistance à la tétracycline de toutes les souches de *S. aureus* isolées, 36 souches étaient résistantes à la tétracycline ce qui donne un taux de 27.07%. Ce taux est moins important par rapport à celui rapporté par l'étude de Hamze au Nord du Liban (44,33 %) (**Hamze & al., 2003**)

La prévalence de la résistance à la tétracycline parmi les isolats de *S. aureus* testé varie de 42% chez les SASM à 58% chez les SARM. La résistance à la tétracycline est

également plus répondeuse dans le SARM en Angleterre et au Pays de Galles (**Marples & al., 1992**), ainsi qu'en Algérie (**Djoudi & al., 2014**). La coexistence des gènes *tet* K et *tet* M qui confère une résistance à la tétracycline a été démontrée et une faible fréquence de détection des gènes *tet* L et *tet* O a été aussi rapportée (**Emaneini & al., 2013**)

Nous avons constaté que 19 des 36 isolats (52.66%) étaient résistants à la méthiciline et qu'il existait une relation évidente entre la résistance à la méthiciline et la résistance aux tétracyclines, cette relation peut être expliquée par la présence des gènes de résistance à la tétracycline *tet* et les gènes *mec* responsable de la résistance à la méthiciline sur la même cassette SCC *mec* de type III (**Marples & al., 1992**).

Doléans-Jordheim, suggère une possible association entre le phénotype SARM et le phénomène d'efflux responsable de la résistance à la tétracycline et, en raison d'un spectre large de certaines pompes, les pompes à efflux peuvent engendrer des résistances croisées (**Doléans-Jordheim & al., 2008**).

Sur un total de 133 souches de *S. aureus* 36 (27.03%) étaient résistantes à la tétracycline, 36 (27.07%) à l'érythromycine, ce qui donne des taux de résistance identiques pour ces deux familles d'antibiotiques. Ceci peut être expliqué par la présence des deux gènes *erm* et *tet* sur la même cassette *Sc* *mec* de type III.

Une résistance associée érythromycine-tétracycline a été marquée avec une prévalence de 16.54%, cependant des études précédentes ont montré qu'il n'y avait aucune association significative entre ces deux antibiotiques (**Hraoui & al., 2012**)

L'étude de la sensibilité des souches de *S. aureus* vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques a révélé que toutes les souches étaient sensibles à la vancomycine, ce qui est en accord avec les études précédentes en Algérie qui ont marqué une sensibilité totale vis-à-vis de cet antibiotique (**Djoudi, 2014 ; Ouchenane & al., 2010**). Les mêmes résultats sont rapportés également par le Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en 2017

Ce qui montre également que la vancomycine est l'antibiotique de choix contre les infections à Staphylocoques

Sur les 133 souches de *S. aureus* étudiées, 40 (30.08%) ont été des SARM, plusieurs études ont montrés des résultats similaires. Par contre un taux plus élevé de 63% a été rapporté par Zerouki en Algérie (**Zerouki & al., 2015**)

Les SARM étaient rarement isolés avant décembre 1996. Après cette date, une augmentation soutenue a été observée, avec des pics marqués de pourcentage de SARM observés en avril 1998 (22%), en avril 1999 (30,5%) et en février 2000 (38,2%), (**Monnet & al., 2004**)

Sur les 40 souches de SARM isolées, 21 étaient résistantes à la tétracycline, 19 à l'érythromycine et 11 à la clindamycine, cette multi résistances du SARM est assurée par d'autre éléments génétiques intégrés dans la cassette SCCmec comme le transposon (Tn 554 porté par trois cassettes II, III et VIII, ainsi que le plasmide pBR 322. (**Nour & al., 2005**)

Pour les 133 souches de *S. aureus* isolées testées vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques, on a enregistré un taux de résistance élevé de 54.14% à l'acide fusidique. Ce taux est trop supérieur à celui rapporté par Bernard et ces collaborateurs en France qui est de 4.4% (**Bernard & al., 2008**). Les souches de *S. aureus* testé ont exprimé des niveaux de résistance à la rifampicine de 35.34%, ce taux est élevé par rapport à celui rapporté par le Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en 2017 qui est de 7.02%.

conclusion

En conclusion, les micro-organismes multirésistants aux antibiotiques constituent un problème pour la santé publique au niveau mondial. Les bactéries de genre *Staphylococcus*, en particulier *S. aureus*, ont développé divers mécanismes qui les rendent résistants à plusieurs familles d'antibiotiques. Pour cette raison, l'utilité de mettre en œuvre de l'observation régionale pour gérer des programmes de surveillance de l'évolution de cette résistance semble évidente.

Un quart des isolats résistants à l'érythromycine auraient été détectés sensibles à la clindamycine si le test D n'a pas été effectué. Cela a conduit à remettre en question la sécurité de l'utilisation de la clindamycine contre tout *Staphylocoque* résistant à l'érythromycine, en raison de l'incidence élevée de la résistance inductible iMLS_B en particulier chez *S. aureus*.

Le test-D est un test simple et efficace qui devrait être réalisé sur tous les isolats de *S. aureus* résistants à l'érythromycine pour un traitement approprié et une utilisation judicieuse des antibiotiques.

L'incidence de phénotype MLS constitutive et inductible peut varier en fonction de différentes régions géographiques et même de l'hôpital à l'hôpital. Cette variabilité est généralement associée à l'utilisation non uniforme de l'érythromycine dans différents institutions

Il est recommandé, que quel que soit le traitement antibiotique probabiliste initié, de réévaluer l'efficacité thérapeutique, de réajuster le traitement antibiotique selon les données de l'antibiogramme, de rationaliser l'utilisation des antibiotiques surtout à large spectre et le respect strict des mesures d'hygiène afin d'éviter la dissémination de ces souches aussi bien dans la population animale que dans la population humaine.

Notre travail ouvre de nombreuses perspectives, parmi lesquelles:

- Etudier une population plus importante, pendant une période plus longue, dans le but d'avoir des résultats statistiquement significatifs
- Recherche de nouveau probable phénotypes et génotypes MLS
- Etudier l'aspect génétique de cette résistance par des techniques moléculaires
- Le développement de solutions à l'échelle moléculaire pour lutter contre l'antibiorésistance

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Abbas A., Srivastava P., Nirwan P.** (2015). Prevalence of MLS_B resistance and observation of *erm A* & *erm C* genes at a tertiary care hospital. Journal of Clinical and Diagnostic Research, Vol.9, n° 6.
- **Avril J.P., Dabernat H., Denis F., Monteil H.** (1992). Bacteriologie clinique. 2^{ème} édition : ellipses. Paris : p. 9-30
- **Avril J.P., Fauchere J.L.** (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris.

B

- **Barrio M., Rainard P., Prevost G.** (2006). LukM/LukF-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. Microbes and Infection, vol. 8, p. 2068-2074.
- **Bekhoucha S., cady A., gautier P., itim F., donnio P.** (2009). A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean sea: molecular characteristics of isolates from Western Algeria. European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases, vol. 28, p.553–5.
- **Bergeron J., Ammirati M., Danley D., James L., Norcia M., Retsema J., Strick C., Su W., Sutcliffe J., Wondrack L.** (1996). Glycylcyclines bind to the high-affinity tetracycline ribosomal binding site and evade tet(m)- and tet(o)-mediated ribosomal protection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 40, n° 9, p. 2226-2228.
- **Bernard P., Jarlier V., Santerre Henriksen A.** (2008). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains responsible for community-acquired skin infections. Annales de Dermatologie et de Vénérologie, vol. 135, n° 1.
- **Breche P.** (1988). Collection de la biologie à la clinique : Bacteriologie bactéries des infections humaines. Edition : Flammarion médecine- sciences. Paris : p. 267-270.
- **Bouchami O., Achour W., Ben Hassen A.** (2007). Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. Clinical Microbiology and Infection, vol. 13, n°1, p. 103-106.
- **Bourgeois M., Leveau Y., Yee-Chak D.** (1988). Microbiological control for foods and agricultural products, Volume 2. Edition: VCH, université du Michigan: 542p.

- **Bouter A., Leclercq R., Cattoir V.** (2011). Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus saprophyticus* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 37, n° 2, p.118-123.
- **Burdett V.** (1991). Purification and Characterization of Tet(M), a Protein That Renders Ribosomes Resistant to Tetracycline. *Journal of Biological Chemistry*, vol.266, n° 5, p. 2872-2877.

C

- **Chaalal W.** (2013). Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaires. Mémoire de magister en microbiologie fondamentale et appliquée. Université d'Es-Snia Oran, faculté des sciences, Oran, 115p.
- **Chopra I., Roberts M.** (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 65, n°2, p. 232-260
- **Corne P.** (2004). *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation: étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de doctorat en science biologiques et chimiques de la santé. Université de Montpellier I, faculté de médecine, France, 174p.

D

- **Daurel C., Leclercq R.** (2008). L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires*, vol. 38, n° 407, p. 81-90.
- **Delarras C.** (2007). *Microbiologie pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. 1er éd., Éditions Tec & Doc - EM Inter – Lavoisier, Paris, 476p
- **Delarras C.** (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Edition : Lavoisier, Paris, 772p.
- **Demarco C., Cushing L., Frempong-Manso E., Seo S., Jaravaza T., Kaatz G.** (2007). Efflux-Related Resistance to Norfloxacin, Dyes, and Biocides in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, n° 9, p. 3235-3239

- **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R.** (2007). Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Edition : Elsevier Masson. Paris: 615p
- **Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M.** (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Review, vol. 13, p. 16–34.
- **Ding Z.F., Zhang H., Tang W., Tong C.Y., Li R.T., Chen L.X., Pu, L.J., Zhu Z.B., Cui Y.D.** (2012). Methylase Genes-Mediated Erythromycin Resistance in *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis in China. Israel Journal of Veterinary Medicine, vol. 67, n°3.
- **Djoudi F.** (2015). Caractérisation moléculaire et épidémiologie de la résistance aux antibiotiques de souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat de microbiologie. Université A.Mira de Bejaia, Faculté des Science de la Nature et de la Vie. Bejaia, 202p
- **Djoudi F., Benallaoua S. Aleo A., Touati A., Challal M., Bonura C., Mammina C.** (2014). Description epidemiology of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and méthiciline- resistant *Staphylococcus aureus* among patients admitted to tow healthcare facilities in Algeria. Microbial Drug Resistance, vol.21, n° 2.
- **Djoudi F., Bonura C., Benallaoua S., Touati A., Touati D., Aleo A., Cala C., Fasciana T., Mammina C.** (2013). Panton-Valentine leukocidin positive sequence type 80 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a staphylococcal cassette chromosome mec type IVc is dominant in neonates and children in an Algiers hospital. New Microbiologia, vol. 36, p. 49-56.
- **Doleans-Jordheim A., Michalet S., Bergeron E., Boisset S., Souard F., Dumontet C., Dijoux-Franca M.G., Freney J.** (2008). Les phénomènes de résistance aux antibiotiques liés aux pompes à efflux : exemple de *Staphylococcus aureus*. Ann Biol Clin, vol. 66, n°5, p. 499-508
- **Dowling M., Giguare S., Prescott J.** (2013). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Edition: John Wiley & Sons, 704 p.
- **Drinkovic D., Fuller E., Shore K., Holland D., Ellis-Pegler R.** (2001). Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 48, n° 2, p. 315-316.
- **Dumitrescu O., Dauwalder O., Boisset S., Reverdy M.E., Tristan A., Vandenesch F.** (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. Medicine Sciences, vol. 26, n° 11, p. 943-949

E

- **Emaneyni M., Bigverdi R., Kalantar D., Soroush S., Jabalameli F., Noorazar B., Asadollahi P., Taherikalani M.** (2013). Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. *Annals of Burns and Fire Disasters*, vol. 26, n°2, p. 76-80
- **European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing.** (2017). Société Française de Microbiologie.
- **Eveilard 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 en Biologie cellulaire. Université d'Angers, France, 161p.

F

- **Fasih N., Irfan S., Zafar A., Khan E., Hasan R.** (2010). Inducible clindamycin resistance due to expression of *erm* genes in *Staphylococcus aureus*: Report from a Tertiary Care Hospital Karachi, Pakistan. *Journal of Pakistan Medical Association*, vol. 60, n° 9, p. 750-753.
- **Fasquelle R.** (1974). *Eléments de bactériologie médicale*. Edition : Flammarion médecine- science. Paris : 27-40.
- **Ferry T.** (2007). Rôle des exotoxines super antigéniques dans le choc toxique et le choc septique à *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en microbiologie. Université Claude Bernard, Lyon 1, Faculté de médecine. France : 279p.
- **Flandrois J.P.** (1997). *Bactériologie médicale*. Presses universitaires de Lyon : 309p.
- **Fluit A., Florijn A., Verhoef J., Milatovic D.** Presence of Tetracycline Resistance Determinants and Susceptibility to Tigecycline and Minocycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2005); vol. 49, n° 4, p. 1636-1638

G

- **Ghasemian A., Peerayeh S., Bakhshi B., Mirzaee M.** (2014). Inducible Clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, vol. 9, n° 2.

- **Garbacz K., Piechowicz L., Galinski J.** (2006). Characteristics of clumping factor- and protein A-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in Poland. *Médecine et Maladies Infectieuses*, vol. 36, n° 9, p. 469-472.
- **Garrity G.M., Johnson K.L., Bell J., Searles D.B.** (2007). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. New York.
- **George K., Tsigereda T., Karen C., Dick J.** (2003). Failure of Clindamycin Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Expressing Inducible Clindamycin Resistance In Vitro. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 37, n° 12, p. 57–60
- **Gillespie S.H., Hawkey P.M.** (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. 2nd edition: John Wiley and Sons. England.
- **Guiraud J., Rosec J.** (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Edition AFNOR. Paris: p 170-174.

H

- **Hamze M., Dabboussi F., Daher W., Izard D.** (2003). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* at north Lebanon: place of the méthiciline resistance and comparison of detection methods. *Pathologie Biologie*, vol. 51, p. 21-26.
- **Hirsh D.C., Maclachlan J., Walker L.** (2004). *Veterinary Microbiology*. 2nd edition: Wiley- Blackwell. California: 536p.
- **Horieh S., Behzad E., Parviz O.** (2011). Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Medical Science Monitor*, vol. 17, n° 2, p. BR48-53.
- **Hraoui M., Boutiba-Ben Boubaker I., Rachdi M., Slim A., Ben Redjeb S.** (2012). Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Tunisia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol.61, p. 1109-1113

K

- **Karthik S.** (2007). Role of MSA in the regulation of virulence and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *The Aquila Digital Community*. University of Southern Mississippi, p. 20-24.

- **Seifi N., Kahani N., Askari E., Mahdipour S., Naderi Nasab M.** (2012). Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. Iranian Journal of Microbiology, vol. 4, n° 2, p. 82-86.
- **Kloos W., Freney J., Hajek V., Webster J., Bes M., Brun Y., Vernozy C.** (1999). Recommended minimal standers for description of new Staphylococcal species. International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 49, p. 489-502.

L

- **Le Loir Y., Gantier M.** (2009). *Staphylococcus aureus*. Edition: Lavoisier. 300p
- **Levin T., Suh B., Axelrod P., Truant A., Fekete T.** (2005). Potential Clindamycin resistance in clindamycin susceptible erythromycin resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol.49, n° 3, p.1222-1224.
- **Leclercq R.** (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clinical Infectious Diseases, vol. 34, n° 4, p. 82-92.
- **Lina G., Quaglia A., Reverdy M.E., Leclercq R., Vandenesch F., Etienne J.** (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamide, and streptogramins among Staphylococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 43, n° 5, p. 1062-1066.
- **Lowy M.D.** (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. The New England Journal of Medicine [en ligne]. vol. 339, p.520-532. Disponible sur: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/> (consulté le 7/04/2017)
- **Lyon B., Skurray R.** (1987). Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. Microbiological Reviews, vol. 51, n° 1, p. 88-134.

M

- **Marples R., Reith S.** (1992). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in England and Wales. Communicable Disease Report, vol. 2, n° 3, p. 9-25.
- **Mathew V., O'Sullivan N., Yongwei C., Fanrong K., Xianyi Z., Gwendolyn G.** (2006). Influence of Disk Separation Distance on Accuracy of the Disk Approximation

Test for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus* spp. Journal of Clinical Microbiology, vol. 44, n° 11, p. 4072-4076.

- **Meyohas M.C.** (1998). Antibiotiques à activité antistaphylococcique. AKOS encyclopédie pratique de médecine, 5-0120. Elsevier. Paris : 4 p
- **Minor L., Veron M.** (1990). Bactériologie médicale : Staphylococcus et Micrococcus. 2^{ème} édition : Flammarion Médecine-Science. Paris : p. 770- 791.
- **Monnet D., Mackenzie F., López-Lozano J.M., Beyaert A., Camacho M., Wilson R., Stuart D., Gould I.** (2004). Antimicrobial Drug Use and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996–2000. Emerging Infectious Diseases, vol. 10, n° 8, p. 1432-1441.

N

- **NAUCIEL C., VILDE J.L.** (2005). Bactériologie médicale : Abrégés connaissances et pratique. 2^{ème} édition: Elsevier Masson. Paris : 272p.
- **Neu H.C., Gootz T.D.** (1996). Antimicrobial Chemotherapy. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 11.
- **Nguyen F., Starosta A., Arenz S., Sohme D., Donhofer A., Wilson D.** (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. Biological Chemistry [en ligne]. vol. 395, n° 5, p. 559-575. Disponible sur: <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0292> (consulté le 6/2/2017).
- **Nicola F., Mcdougal L., Biddle J., Tenover F.** (1998). Characterization of Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus* Recovered in the United States from 1958 through 1969. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 42, n° 11, p. 3024-3027.
- **Nour M., Mastouri M., Ben Nedjma M.** (2005). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: emergence and molecular basis. Pathologie Biologie, vol. 53, n° 6, p.334-340.

O

- **Ouchenane Z., Smati F., Raoult D.** (2010). Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. Pathologie Biologie, vol. 59, n° 6, p. 129-132.

P

- **Patra K., Vanchiere J., Bocchini J.** (2011). Adherence to CLSI Recommendations for Testing of *Staphylococcus aureus* Isolates in Louisiana Hospitals: Report of a Clinical Failure and Results of a Questionnaire Study. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 49, n° 8, p. 3019-3020.
- **Piatkowska E., Piatkowski J., Przondo-Mordarska A.** (2012). The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cellular and Molecular Biology Letters* [en ligne], vol. 17, p. 633-645. Disponible sur : <http://www.cmbi.org.pl> (1/05/2017).
- **Kavitha P., Sunil R., Venkatakrishna R.** (2011). Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Journal Of Laboratory Physicians* [en ligne], vol. 3, n° 1. Disponible sur : <http://www.jlponligne.org> (consulté le 11/05/2017).

Q

- **Quincampoix J.C., Mainardi J.L.** (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, vol. 10, n° 75, 267p

R

- **Robert D.** (2013). *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (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 en pharmacie. Université d'Angers, UFR science pharmaceutiques et ingénierie de la santé. France, 126p.
- **Robert M., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J., Seppala H.** (1999). Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 43, n° 12, p. 2823-2830.
- **Rodgers A.T., Shimeld L.A.** (1999). *Essentials of diagnostic microbiology*. Edition: Delmar Publishers. New York: 690p.

S

- **Salyers A., Speer S., Shoemaker N.** (1990). New perspectives in tetracycline resistance. *Molecular Microbiology*, vol. 4, n°1, p. 151-156.
- **Schmitz F.J., Krey A., Sadurski R., Verhoef J., Milatovic D., Fluit, A.C.** (2000). Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 47, p. 239-240.
- **Schreckenberger P., Ilendo E., Ristow K.** (2004). Incidence of constitutive and inducible clindamycine resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, n° 6, p. 2777-2779.
- **Steward C., Raney P., Morrell A., Williams P., Mcdougal L., Jevitt L., Mcgowan J., Tenover F.** (2005). Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, n° 4, p. 1761- 1721.
- **Speer B., Shoemaker N., Salyers A.** (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, , vol.5, n° 4, p. 387-399.
- **Spicer W.J.** (2003). *Pratique Clinique en bactériologie mycology et parasitologie*. Edition: Flammarion médecine- sciences. Paris.

T

- **Trzcinski K., Cooper B., Hryniewicz W., Dowson C.** (2000). Expression of resistance to tetracyclines in strains of méthiciline- resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 45, p. 763-770.

W

- **Wylie J., Nowicki D.** (2005). Molecular epidemiology of community- and health care-associated méthiciline-resistant *Staphylococcus aureus* in manitoba, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, n°6, p. 2830–2836.

Y

- **Yıldız1 Ö., Yılmaz A., Şener A., Coşkuner S., Bayramoğlu G., Güdücüoğlu H., Özyurt M., Tatman-Otkun M., Karabiber N., Özkütük N., Aktepe O., Öncü S., Arslan U., Bozdoğan B.** (2014). Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 Hospitals in Turkey. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 13, n° 1, p. 1-6.

Z

- **Zelazny A., Ferraro M., Glennen A., Hindler J., Mann L., Munro S., Murray P., Reller B., Tenover F, Jorgensen J.** (2005). Selection of Strains for Quality Assessment of the Disk Induction Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococci: a CLSI Collaborative Study. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.43, n° 6, p. 2613-2615.
- **Zerouki A., Abada S., Tali-Maamar H., Rahal K., Naim M.** (2015). Caractérisation des infections du site opératoire à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline en chirurgie orthopédique et traumatologique dans un hôpital algérien. *Revue de Chirurgie Orthopedique et Traumatologique*, vol. 101, n°2, p. 176-180.
- **Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H., Bakhrouf A.** (2011). Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*, vol. 4, n° 453.

Annexes

Annexe I : Milieux de culture, matériel et réactifs utilisés

I- Matériels, solutions et réactifs utilisés :

I.1. Matériel

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

I.2. Solutions

- Sérum physiologique à 0.9% (Na Cl)
- Acide chlorhydrique (Hcl 1N)
- Eau distillée
- Plasma humain

I.3. Réactifs de la coloration de Gram (SIGMA-ALDRICH)

- Violet de gentiane
- Lugol
- Ethanol
- Safranine ou fushine

II-Milieux de culture et composition :

• Bouillon Trypticase Soja (TSB)

1. Composition

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

pH= 7.3

2. Préparation

Faire dissoudre 25g de poudre dans 1L d'eau distillée

Chauffer en agitant fréquemment

Laisser bouillir

Ajuster le pH à 7.3

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

• **Bouillon au cœur-cerveau (BHIB)**

1. Composition :

Infusion de cœur cerveau.....37g
pH= 7.4 ± 0.2

2. Préparation :

37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 min

• **Gélose Chapman**

1. Composition

Chlorure de sodium75g
D-
mannitol.....10g
Extrait pancréatique de la caséine.....5g
Digestion peptique du tissu animal.....5g
Extrait de bouf1g
Rouge de phénol.....0.025g
Agar15g
pH= 7.6

2. Préparation :

111g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20min

• **Gélose Mueller- Hinton**

1. Composition

Amidon1.5g
Hydrolysate de caséine.....17.5 g
Solides à la perfusion de bœuf.....2g
Agar.....17g
pH=7.3

2. Préparation :

38g par litre d'eau distillée à l'autoclave à 120°C pendant 20min

• **Gélose DNase**

1. Composition

Peptone de caséine.....15g
Peptone de soja.....5g
Chlorure de sodium.....5g
Acide Désoxyribonucléique.....2g
Agar bactériologique.....15g
pH=7.3

2. préparation :

42g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20min

• **Gélose nutritive**

1. Composition

Extrait de bœuf.....	1g
Extrait de levure.....	2g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	15g

pH=6.8

2. Préparation :

28g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20min

ANNEXE II : Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer en bactéries Gram+ et Gram-

Les bactéries *S.aureus* apparaissent en violet (Gram +), regroupé en amas le plus souvent en grappe de raisin

Protocole

a) Préparation du frottis

b) Coloration :

Déposer quelques gouttes de solution de **violet de gentiane** sur le frottis fixé (Colore le cytoplasme des bactéries). Laisser agir 1 minute



Rincer en faisant couler de l'eau distillée sur la lame



Déposer quelques gouttes de **Lugol** sur le frottis (Le Lugol est un composé iodé qui permet de fixer le violet dans les bactéries). Laisser agir 1 minute



Rincer en faisant couler de l'eau sur la lame



Faire couler une solution d'**alcool** sur le frottis (Permet la décoloration des bactéries Gram – déjà coloré par le violet de gentiane). Laisser agir 1 minute



Contre-colorer en déposant la solution de **safranine** (rose) pendant 1 minute



Rincer en faisant couler de l'eau sur la lame



Observer au microscope (avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x)

Annexe III: Tableau de lecture de la galerie API® Staph

Tests	Composants actifs	QTE (mg/cup.)	Reactions / enzymes	Resultat	
				Negatif	Positif
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 min	
				incolore-rose pâle	rouge
PAL	β-naphtylphosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min	
				jaune	violet
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (VogesProskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				incolore-rose pâle	violet-rose
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFFinose)	rouge	jaune
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32 1,28	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl-aD-glucopyranoside		acidification (Méthyl-aD-Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
ADH	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

Annexe IV : Tableau d'identification de la galerie API ® Staph

API STAPH V4.1	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0
<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp <i>cohnii</i>	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0
<i>Staph. cohnii</i> ssp <i>urealyticum</i>	0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0
<i>Staphylococcus xylosum</i>	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
<i>Kocuria kristinae</i>	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
<i>Kocuria varians/rosea</i>	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95
<i>Micrococcus</i> spp	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91

Résumé

Objectif : cette étude consiste à évaluer la résistance à la tétracycline, ainsi la détermination de différents phénotypes de résistance érythromycine et clindamycine des souches de *S. aureus* d'origine humaine et animale. **Méthodologie :** Un total de 236 prélèvements d'origine animale et humaine ont été effectués et 156 souches de *S. aureus* isolées de divers prélèvements pathologiques. L'identification des souches a été réalisée par les tests classiques (coagulase, galerie API-Staph). La résistance aux antibiotiques a été déterminée en utilisant l'antibiogramme par diffusion sur gélose Muller-Hinton. L'estimation des CMI à la vancomycine est effectuée par la technique de dilution en milieu liquide et l'induction clindamycine-érythromycine est déterminée par le test D. **Résultats :** On a constaté que sur 133 isolats de *S. aureus* identifiés, 36 étaient résistants à la tétracycline dont 58% des SARM et 42% des SASM ; 21.05% résistants à la clindamycine et un taux de résistance à l'érythromycine de 27.07% a été marqué. Cependant, aucune souche n'a exprimé de la résistance à la vancomycine. **Conclusion :** Les souches résistantes ainsi les techniques inappropriées pour l'étude de la résistance limitent les choix de traitements et compliquent la prise en charge correcte des patients et pour ce là il est recommandé d'effectuer le test d'induction pour une souche impliquée dans une infection avant de prescrire la clindamycine comme traitement.

Mots clés : tétracycline, érythromycine, clindamycine, induction, *Staphylococcus aureus*

Abstract

Objective: This study consists on the evaluation of tetracyclin and MLS_B resistance, as well, determination of diverse inducible and non inducible phenotypes among *Staphylococcus aureus* isolates, from different origins (human and animal). **Methodology:** A total of 236 samples were gathered and over 156 isolates of *S. aureus* were already isolated from various pathological samples. The strains were identified by conventional tests (coagulase, API-Staph gallery). Antibiotic resistance was determined using Muller-Hinton agar disc diffusion method; evaluation of MIC to Vancomycin was performed by the broth microdilution; and clindamycin-erythromycin induction was carried out by the D test. **Results:** On 133 *S. aureus* isolates identified, 27.07% were resistant to tetracyclin, 58% of which were MRSA and 42% were MSSA, 21.05% were resistant to clindamycin, and a rate of 27.07% of erythromycin resistance was marked. However, no strain has shown resistance to vancomycin. **Conclusion:** Resistant strains and inappropriate techniques for resistance studies limit the choice of treatments and complicate the correct management of patients and for this it is advisable that whenever clindamycin is intended to be used for *S. aureus* infections, the test D should be performed.

Key words: tetracyclin, erythromycin, clindamycin, induction, *Staphylococcus aureus*