

TLEMCEM N° D'ORDRE

UNIVERSITE DE TLEMCEM- ABOU-BEKR BELKAID

FACULTE SNV/STU- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie

Mémoire

Présenté pour obtenir le grade

DE MASTER II EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Option : **MICROBIOLOGIE**

par

Warda MEZIANE

Soutenu le

29/09/2011

Intitulé :

INFECTION A SARM ET NOx

JURY :

**Pr CHABANE- SARI Daoudi
Dr ARIBI Mourad
M. HADDOUCHE Moustapha
M. REBIAHI Sid-Ahmed**

**Professeur
Maitre de conférences A
Maître-assistant A
Maître-assistant A**

**Président
Encadreur
Examineur
Examineur**

Pr Gérard LEFRANC

Professeur

Université Montpellier II

29 Septembre 2011

Résumé

Introduction : L'infection à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) constitue à l'heure actuelle un sérieux problème thérapeutique, associé aux maladies nosocomiales ainsi qu'à la mortalité chez le nouveau-né.

Objectifs : Étudier la relation qui peut exister entre l'infection à SARM et les niveaux du NOx circulants d'une part, et la supplémentation en sélénium d'autre part.

But : Montrer que le sélénium pourrait avoir un rôle à jouer dans la diminution des taux circulants du NOx induits par l'infection à SARM.

Matériels et méthodes : Quarante (40) hamsters ont été suivis dans cette étude. Quinze (15) hamsters répartis en trois groupes : Groupe 1; infecté par SARM (SARM+), supplémenté en sélénium (Se+), n=5, sexe; mâles, âge; 38 jours, Groupe 2; (SARM+), (Se-), 4 mâles, 1 femelle, 38 jours, Groupe 3; (SARM-), (Se-), 5 mâles, 28 jours; Ont été soumis à une étude rétrospective cas/témoins.

Résultats : les niveaux circulants du monoxyde d'azote sont significativement diminués chez les hamsters infectés par SARM, supplémentés ou non en sélénium, comparés aux contrôles sains, non infectés ($p = 0,000$). De même, les taux sériques du monoxyde d'azote sont nettement en baisse chez les hamsters infectés par SARM, supplémentés en sélénium, comparés à ceux infectés par SARM, non supplémentés en sélénium ($p = 0,000$). Parallèlement, les concentrations sériques du monoxyde d'azote sont aussi significativement diminués chez les Hamsters infectés par SARM ($n = 10$) comparés aux contrôles, non infectés par SARM ($n = 5$, $p = 0,000$). Enfin, Le fractionnement électrophorétique par SDS-PAGE montre une présence d'un mélange de protéines du SARM, différent par rapport à la souche SARM de référence ATCC 33862.

Conclusion : Le SARM diminue la concentration sérique en oxyde nitrique (NOx) chez les hamsters infectés; le sélénium diminue encore davantage ce taux. La prise de sélénium est de ce fait déconseillée lors d'une infection à SARM.

Mots clés : SARM, NOx, Sélénium, nosocomiale, Oxyde nitrique.

Abstract

Introduction: Nowadays, many medical issues like nosocomial infections and newborn mortality are facing therapeutic solutions. In this context, Methicillin Resistant Staphylococcus aureus infections constitute also a serious problem which needs to be treated.

Objectives: Investigate the relationship that may exist between the MRSA and different levels of circulating NOx on the one hand, as well as selenium supplementation on the other.

Aim: Demonstrate that selenium may have a role to play in reducing levels of circulating NOx induced by MRSA.

Materials and methods: Forty (40) hamsters were followed in this study. Fifteen (15) hamsters divided into three groups: Group 1, infected with MRSA (MRSA +), supplemented with selenium (Se +), n = 5, sex male, age 38 days; Group 2; (MRSA +), (Se-), 4 males, 1 female, 38 days; Group 3, (-MRSA), (Se-), 5 males. 28 days were subjected to a retrospective study case / control.

Results: Levels of nitric oxide serum were significantly reduced in hamsters infected with MRSA, supplemented or non supplemented with selenium, compared with healthy controls uninfected ($p = 0,000$). Similarly, serum levels of NOx were significantly lower in hamsters infected with MRSA, supplemented with selenium, compared to those infected with MRSA, non supplemented with selenium ($p = 0,000$). Also, serum concentrations of nitric oxide are significantly reduced in hamsters infected with MRSA (n = 10) compared to controls, not infected with MRSA (n =5, $p = 0,000$). Finally, electrophoretic fractionation by SDS-PAGE shows that protein mixture of MRSA is different from that of the strain MSSA ATCC 33862.

Conclusion: For infected hamsters, MRSA decreases the serum concentration of nitric oxide (NOx). Moreover, it has been found that selenium reduces this rate further. Therefore, taking selenium is not recommended during an MRSA infection.

Keywords: MRSA, NOx, Selenium, Nosocomial, Nitric oxid

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier tout particulièrement les membres du jury pour leur ferveur et dévotion, ainsi que leur honorable présence.

- Professeur LEFRANC Gérard, Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire. CNRS – Institut de Génétique Humaine. Université Montpellier 2
- Professeur CHABANE SARI Daoudi, Directeur du Laboratoire LAPRONA, UABT
- Docteur Mourad ARIBI, Directeur du laboratoire BIOMOLIM, UABT
- Monsieur Sid-Ahmed REBIAHI, Maître-assistant B, UABT
- Monsieur HADDOUCHE Moustapha, Maitre assistant A, UABT

Il me faut remercier également :

- Docteur Said NEMMICHE, Université de Mostaganem
- Monsieur MEDJAHED Mostafa, Université de Mostaganem
- Monsieur Rachid AZZI, Maitre assistant A, UABT
- Monsieur Mounaim KHADIR, doctorant en biologie Moléculaire option Microbiologie

J'exprime aussi ma sincère gratitude à mes enseignants pour leur soutien et leurs conseils durant les cinq années universitaires.

Ce travail a pour objectif d'étudier la relation qui peut exister entre l'infection à SARM et les niveaux du NOx circulants d'une part, et la supplémentation en sélénium d'autre part. Il a été réalisé au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie, sous la direction du docteur Mourad ARIBI. Qu'il soit persuadé de mes vives reconnaissances.

Le présent mémoire est structuré en six chapitres : Revues de la littérature, Matériels et méthodes, Résultats et interprétation, Discussion, Conclusions et Perspectives, Bibliographie. Il s'inscrit dans le cadre de ma formation universitaire pour l'obtention du grade de Master II de biologie moléculaire et cellulaire, option : Microbiologie.

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents et à toutes les personnes que j'estime

TABLE DES MATIERES

Résumé	iii
Abstract	iv
Avant-propos	v
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xi
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> - Etat de connaissances-.....	3
1.1.1 Historique.....	3
1.1.2 Classifications	3
1.1.2.1 Classification de Bergey (1994)	3
1.1.2.2 Classification phylogénique.....	3
1.1.3 Données bactériologiques.....	4
1.1.3.1 Caractères morphologiques.....	4
1.1.3.2 Caractères biochimiques	4
1.1.3.3 Caractères moléculaires.....	4
1.1.4 Epidémiologie du <i>S.aureus</i>	4
1.1.4.1 <i>S.aureus</i> : Un agent commensal.....	4
1.1.4.2 <i>S.aureus</i> : Un agent pathogène.....	5
1.1.5 Virulence du <i>S.aureus</i>	5
1.1.5.1 Facteurs de virulence	5
1.1.5.2 Pouvoir d'échappement au système immunitaire de l'hôte	6
1.1.6 <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM)	7
1.1.6.1 La résistance aux antibiotiques : beta-lactamines	8
1.1.6.1.1 Mode d'action des Beta-lactamines.....	8
1.1.6.1.2 Support génétique de la résistance	8
1.1.6.1.3 Mécanismes moléculaires de la résistance	9
1.1.6.2 SARM : Agent infectieux nosocomial et communautaire.....	10
1.1.6.2.1 Infection à SARM communautaire.....	10

1.1.6.2.2	Infection à SARM nosocomial.....	10
1.1.6.3	Facteurs de transmission et d'acquisition du SARM hospitalier.....	10
1.1.6.4	Population vulnérable au portage de SARM.....	11
1.1.6.5	Stratégie de prévention de la diffusion du SARM.....	11
1.1.6.6	Antibiothérapie des infections à SARM.....	12
1.1.6.7	Identification moléculaire du SARM par SDS-PAGE.....	12
1.1.6.7.1	Intérêt de l'application de SDS-PAGE.....	13
1.2	Oxyd nitriqueNOx	14
1.2.1	Définition	14
1.2.2	Historique.....	14
1.2.3	Synthèse du NO.....	15
1.2.4	Rôle immunitaire du NO.....	16
1.2.4.1	Réponse inflammatoire et production de NO.....	16
1.2.4.2	Effet microbicide de NO.....	17
1.2.5	Rôle Physiologique de NO.....	17
1.2.5.1	Rôle vasodilatateur	18
1.2.5.2	Rôle neurotransmetteur.....	18
1.2.6	Dosage deNOx sérique.....	18
1.3	Effet du Sélénium sur le système immunitaire.....	19
1.3.1	Définition.....	19
1.3.2	Historique.....	20
1.3.3	Apports journaliers recommandés.....	20
1.3.4	Aliments riches en sélénium.....	20
1.3.5	Effet de la supplémentation en Se sur l'immunité.....	20
1.3.5.1	Effet sur la réponse inflammatoire.....	21
1.3.5.2	Effet sur l'immunité acquise	21
Chapitre 2. Matériels et méthodes.....		22
2.1	Partie bactériologique.....	22
2.1.1	Origine du SARM étudié.....	22
2.1.2	Méthodes.....	22
2.1.2.1	Mode de prélèvement et de purification	22

2.1.2.2	Tests de confirmation.....	22
2.1.2.2.1	Identification morphologique.....	22
2.1.2.2.2	Coloration de Gram.....	23
2.1.2.2.3	Recherche de la catalase	24
2.1.2.2.4	Recherche de la coagulase	28
2.1.2.2.5	Tests biochimiques : Galerie Api Staph.....	29
2.1.2.2.6	Criblage ou screening.....	30
2.1.2.3	Identification moléculaire de SARM par SDS-PAGE	32
2.2	Partie immunologique.....	39
2.2.1	Sujets étudiés : Hamsters.....	39
2.2.2	Éthologie de l'hamster.....	39
2.2.3	Méthodes expérimentales.....	40
2.2.3.1	Préparation de la suspension bactérienne.....	41
2.2.3.2	Injection de la suspension bactérienne.....	41
2.2.3.3	Prélèvement sanguin.....	42
2.2.3.4	Dosage du NOx par la méthode de Griess.....	43
Chapitre 3. Résultats et interprétation		43
Chapitre 4. Discussion.....		46
Chapitre 5. Conclusion et perspectives.....		49
Chapitre 6. Bibliographie.....		50

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Principaux modes d'évasion du <i>S.aureus</i> à l'immunité de l'hôte.....	7
Figure 1.2 Évolution des résistances chez <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Figure 1.3 Illustration simplifiée de l'emplacement des gènes de résistance du SARM.....	10
Figure 1.4 Voie de synthèse du Monoxyde d'azote NO.....	17
Figure 1.5 Voie de synthèse inductible du NO macrophagique.....	19
Figure 2.1 Aspect des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman.....	26
Figure 2.2 Coloration de Gram.....	27
Figure 2.3 Test de catalase.....	28
Figure 2.4 Test de coagulase.....	29
Figure 2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> identifié sur galerie API Staph.....	30
Figure 2.6 Croissance de <i>S.aureus</i> sur l'oxacilline.....	32
Figure 2.7 Dosage des protéines totales (méthode de biuret)	34
Figure 2.8 Ensemble du dispositif d'électrophorèse SDS-PAGE.....	35
Figure 2.9 Le hamster syrien <i>Mesocricetus auratus</i>	40
Figure 2.10 Préparation de la suspension bactérienne.....	41
Figure 2.11 Mode de contention de l'hamster et injection intrapéritoniale.....	41
Figure 2.12 Technique de prélèvement sanguin.....	42
Figure 3.1 Niveaux circulants du monoxyde d'azote chez les Hamsters infectés par <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline, supplémentés en Sélénium, et chez les contrôles.....	43

Figure 3.2. Niveaux circulants du monoxyde d'azote chez les Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, non supplémentés en Sélénium, et chez les contrôles.....43

Figure 3.3 Niveaux circulants du monoxyde d'azote chez les Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, supplémentés ou non en Sélénium.....45

Figure 3.4 Niveaux circulants du monoxyde d'azote chez les Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline et chez les contrôles.....45

LISTE DES ABREVIATIONS

agr : Accessory gene regulator

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ccrAB : Cassette chromosomal recombinase genes A and B

CHIPS : Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*

CMI : Concentration minimale d'inhibition

COx : Cyclooxygenase

EARSS : European antimicrobial persistence surveillance system

Ecb : Extracellular complement-binding protein

Epb : Extracellular fibrinogen-binding protein

GMP : Guanosine monophosphate

IL1- β : Interleukine 1 beta

INF γ : Interféron gamma

Lipox : Lipoxygenase

LPV : Leucocidine de Panton Valentine

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NF κ B : nuclear factor-kappa B

NO : Nitric oxide

NOS : Nitric oxide synthase

NOS_e : Nitric oxide synthase endothéliale

NOS_i : Nitric oxide synthase inductible

NOS_n : Nitric oxide synthase neuronale

ORF : Open reading frame

PFTs : Pore-forming toxins

PLP2a : Protéine liant la pénicilline 2a

PLP : Protéine liant la pénicilline

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SCIN : Staphylococcal complement inhibitor

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis

Se : Sélénium

SSCmec : Staphylococcal cassette chromosome mec

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

Introduction

Les infections nosocomiales sont des infections qui se répandent dans un hôpital et sont produites par un agent pathogène infectieux, détecté chez une personne ayant fréquenté le milieu hospitalier pour un séjour de 24 heures ou plus dans les 12 derniers mois et ayant présenté, après cette exposition, une colonisation au germe prouvée (Lepelletier *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2003). Elles peuvent affecter les patients, mais également quiconque ayant un contact avec les établissements de soins de santé; causant ainsi des maladies infectieuses de gravité variable à près de 5-10 % de la population admise dans les hôpitaux (Prescott *et al.*, 2003).

Les infections nosocomiales sont généralement dues à des bactéries, la plupart non invasives et faisant partie de la microflore humaine normale (Prescott *et al.*, 2003); dont le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) qui constitue à l'heure actuelle, l'agent pathogène nosocomial incriminé par excellence, et un véritable problème de santé publique par sa diffusion dans les établissements hospitaliers (Muller *et al.*, 2003). En effet, les infections que peuvent provoquer les SARMS sont très polymorphes, allant d'infections bénignes comme les furoncles et les panaris à des infections mettant en jeu le pronostic vital comme les états de choc, les endocardites, les pneumonies et les infections du système nerveux central (Baltard *et al.*, 2007).

La prévalence mondiale du SARM est mal connue (Tiemersma *et al.*, 2004). L'étude effectuée par l'« European Antimicrobial Persistence Surveillance System » (EARSS) de 1999 à 2002 sur la prévalence du SARM dans 26 pays Européens, s'en est sortie avec un taux global de prévalence égal à 20 %, variant de 0,5 à 44,4 % selon un gradient croissant nord-sud (Tiemersma *et al.*, 2004). La situation ne demeure pas meilleure aux Etats-Unis et au Canada, puisque la proportion des SARMS isolés au sein des établissements hospitaliers est passée de 35,9 % en 1992 à 64,4 % en 2003 avec une incidence d'environ 1.600.000 victimes par an aux Etats-Unis (Klevens *et al.*, 2006); Au Canada la prévalence est passée de 16,6 % en 2002 à 48 % en 2003 avec une mortalité moyenne de 30 % des cas (Honeyman *et al.*, 2002).

En revanche, les données épidémiologiques en Afrique s'estiment rares. La prédominance du

SARM a été déterminée dans huit pays Africains entre 1996 et 1997 et a été relativement élevée au Nigeria, au Kenya et au Cameroun (21 à 30 %) et inférieure à 10 % en Tunisie (Keshah *et al.*, 2003).

En Algérie, la fréquence de l'infection à SARM était estimée à 14 % au cours de l'année 2001 (Ramdani-Bouguessa *et al.*, 2006). Les hôpitaux algériens ont de ce fait, démontré une augmentation importante de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline en ces dernières années (Bekhoucha *et al.*, 2008), avec un taux passé de 10 % en 1997 aux environs de 40 % en 2005 (Antri *et al.*, 2009).

Il paraît que ces bactéries sont caractérisées par leur capacité à acquérir des mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques, compliquant ainsi le traitement des infections sévères et profondes (Damon *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le rôle physiologique du monoxyde d'azote (NOx) s'affirme de plus en plus comme l'un des plus importants facteurs de protection vasculaire, par son caractère vasodilatateur relaxant et vasomoteur du muscle lisse (Tritilli, 1998). Aussi son rôle dans le système immunitaire s'est affirmé par plusieurs études (Guenane *et al.*, 2006; Karpuzoglu *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2002; Saron., 1996) comme marqueur inflammatoire, sécrété par les macrophages et les neutrophiles sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires (Paul *et al.*, 2002).

Toutefois, son caractère d'agent microbicide très puissant s'était vu confirmer par un grand nombre d'études réalisées auparavant (Tadié *et al.*, 2009 ; Karpuzoglu *et al.*, 2006). Ce rôle serait lié à son activité signalisatrice en tant qu'agent neurotransmetteur, sous l'induction de l'expression d'enzymes biosynthétiques (COX; cyclooxygénase, LIPOX; lipoxygénase), suite à la stimulation de la ganylate cyclase (Baker *et al.*, 2009). Cependant, généré en quantité non régulée et prolongée, le NO peut engendrer un stress oxydant et un stress azoté (Paul *et al.*, 2002).

Bien que bénéfique et indispensable dans l'élimination d'agents pathogènes, la réponse inflammatoire peut toutefois causer des effets délétères à l'organisme lorsqu'elle persiste longtemps (Baufreton *et al.*, 2006). Un certain nombre d'aliments s'est montré efficace dans la régulation de la réponse inflammatoire; le rôle prépondérant du sélénium dans l'immunité humorale et cellulaire comme agent anti-inflammatoire au cours des infections a été mis en évidence (Tirosh *et al.*, 2007 ; Conley *et al.*, 1987). Il s'agit d'un oligoélément indispensable, présent à l'état de trace dans les aliments (Droke *et al.*, 1998).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1 *Staphylococcus aureus* - État de connaissances -

1.1.1 Historique

Le Staphylocoque est observé la première fois par Pasteur en 1879 dans un pus de furoncle et ensuite identifié par Ogston en 1881 à travers la description d'observations cliniques et bactériologiques, relatives à son rôle dans les infections des plaies et la formation d'abcès (Pasteur, 1877 ; Ogston, 1882). En 1884, Rosenbach a pu isoler ces bactéries en une culture pure et les décrire en *Staphylococcus aureus* vue leur apparence jaune-orangée dans les colonies (Rosenbach, 1884), la même année les Staphylocoques ont été classés parmi les cocci à Gram Positif d'après la coloration bactérienne au violet de Gentiane mise au point par le microbiologiste Gram (Gram, 1884). Plus d'un siècle plus tard, le Staphylocoque reste un danger pathogène humain. Plus de 44 espèces sont actuellement identifiées.

1.1.2 Classifications

1.1.2.1 Classification de Bergey (1994)

- Embranchement : Firmicutes.
- Groupe 17 : cocci Gram+.
- Ex-famille des *Micrococcaceae* (famille des *Micrococcaceae* dans la 8^{ème} édition du *Bergey's Manual*, 1974).
- Genre : *Staphylococcus*.
- Espèce : *Staphylococcus aureus*. (Delarras C, 2007).

1.1.2.2 Classification phylogénique

- Domaine : Bacteria ou Eubacteria.
- Phylum XIII : firmicutes.
- Classe : *Bacilli*.
- Ordre : Bacillales.
- Famille : Staphylococcaceae.
- Genre : *Staphylococcus*.

- Espèce : *Staphylococcus aureus*. (Delarras C, 2007).

1.1.3 Données bactériologiques

1.1.3.1 Caractères morphologiques

S. aureus est une bactérie Gram positive appartenant à la classe des Bacilli et à la famille des Staphylococcaceae. L'observation au microscope, les fait apparaître comme des cocci d'environ 1µm de diamètre, immobiles, dépourvus de spores et de capsules ; groupés en amas « grappes de raisin » ou en diplocoques. Les colonies en culture sont lisses, rondes et brillantes de couleur dorée (*aureum* en latin).

C'est des bactéries aéroanaérobies facultatives, mésophiles (37°C de croissance optimal), neutrophiles (pH 7 optimal) et halophiles (se développent à fortes concentrations de NaCl (Spohr *et al.*, 2011).

1.1.3.2 Caractères biochimiques

L'identification biochimique du *S. aureus* peut se faire par la galerie biochimique classique, comme elle peut être faite par des galeries de tests prêts à l'emploi (ex : API Staph, Biomérieux) (Bes *et al.*, 2002) ; elle révèle une présence d'enzymes de catalase (à la différence des Streptocoques qui n'en possèdent pas), coagulase, désoxyribonucléase, phosphatase, fibrinolyse, lipase et proteolysine ainsi qu'une fermentation du glucose sans gaz et absence de l'oxydase (Dehasq *et al.*, 2008). *S. aureus* possède aussi une DNAase thermostable et la protéine A (recherchée par sérotypage pour son identification) (Delarras C, 2007).

1.1.3.3 Caractères moléculaires

Le staphylocoque doré possède un génome porté par un chromosome circulaire formé d'environ 2800 paires de bases et d'éléments extra chromosomiques que sont les prophages et les transposons, son contenu en GC est de 33 % (Holden *et al.*, 2004). Ce plasmide comporte environ 20 000 à 25 000 pb (Kuroda *et al.*, 2001). Il a déjà été séquencé pour 6 souches de *S. aureus* (Baba *et al.*, 2002).

1.1.4 Epidémiologie du *S. aureus*

1.1.4.1 *S. aureus* : Un agent commensal

Le réservoir naturel du *S. aureus* est l'Homme. Considéré comme un commensal naturel de la peau et des muqueuses (Deleo *et al.*, 2011); ce germe ubiquitaire (Nour *et al.*, 2004) colonise rapidement après la naissance la peau, le tube digestif et la région périnéale des nouveau-nés (Lowy.,1998). Généralement, Ces bactéries ne causent aucun problème de santé, jusqu'à avoir traversé la première barrière physique qu'est la peau, par le biais de coupures, de plaies ou d'autres incidents (Guilfoile, 2007).

Il colonise un quart à un tiers de la population en bonne santé (Tattevin., 2011), dont 10 à 20 % de façon permanente, que ce soit par des *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM) ou par des *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) (Diller *et al.*, 2007), et environ 30 % des individus sains n'étant pas en institution, hébergent de manière asymptomatique *S. aureus* au niveau des fosses nasales.

Ces données ne sont pas anodines car le portage nasal de *S. aureus* est souvent associé à une infection ; les sujets colonisés sont donc plus à risque d'infection (Gener *et al.*, 2008) trois à six fois plus importants que ceux non porteurs (Laudat *et al.*, 2011).

1.1.4.2 *S. aureus* : Un agent pathogène

Staphylococcus aureus est un des principaux agents pathogènes pour l'homme, il représente la première cause d'infections humaines (Tattevin, 2011) et deuxième cause de bactériémies nosocomiales à travers le monde (Weems, 2001 ; Emori *et al.*, 1993).

La sévérité de ces infections varie considérablement, allant d'une infection cutanée mineure à la pneumonie nécrosante fatale, Il est aussi responsable chez l'Homme d'infections suppuratives (Deleo *et al.*, 2011). Des pathologies invasives sont également rapportées : bactériémies, endocardites, fasciites nécrosantes, pyomyosites, infections ostéoarticulaires, y compris sur prothèse, syndrome de Waterhouse-Friderichsen, empyèmes et thrombo-phlébites septiques (Tattevin, 2011).

Ces infections invasives à *S. aureus* étaient souvent fatales avant l'avènement des antibiotiques, avec une mortalité de l'ordre de 80 % pour les bactériémies (Tattevin, 2011).

Plusieurs facteurs expliquent la fréquence et la gravité des de ces infections à *S. aureus* notamment le caractère ubiquitaire de la bactérie, la multirésistance de certaines souches aux antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, ainsi qu'une diminution des défenses immunitaires des patients hospitalisés. Mais la pathogénicité de cette bactérie est également reliée à l'expression de facteurs de virulence (Vincenot *et al.*, 2008).

1.1.5 Virulence du *S. aureus*

1.1.5.1 Facteurs de virulence

De part sa résistance, *Staphylococcus aureus* possède un arsenal impressionnant de facteurs de virulence. *S. aureus* a en effet la capacité de sécréter, après invasion, des facteurs d'adhésion, des toxines ou encore des enzymes. Les composés toxiques peuvent être classés en superantigènes, en toxines formant des pores ou « pore forming toxins » protéases et toxines ADP-ribosylantes à activité cytolytique (Vincenot *et al.*, 2008).

Un ingénieux système de régulation, *accessory gene regulator*, ou *agr*, lui permet d'adapter sa synthèse protéique à ses besoins, avec une expression préférentielle des gènes assurant son adhésion et sa persistance au contact des cellules de l'hôte au stade de colonisation (adhésines, protéine A), et une expression préférentielle des gènes contribuant à son extension locorégionale et à sa dissémination au stade d'infection (exo-enzymes, toxines) (Tattevin, 2011).

Un faible pourcentage de *S. aureus* hospitalier est sécréteur de la leucocidine de Pantone Valentine (LPV), une toxine impliquée dans des infections cutanées, furoncles et de pneumopathie nécrosante (Libert *et al.*, 2008), d'autres souches sont aussi capables de produire des toxines causant un empoisonnement des aliments ou responsables du syndrome du choc toxique (Guilfoile, 2007).

1.1.5.2 Pouvoir d'échappement au système immunitaire de l'hôte

S. aureus a la capacité d'inhiber bon nombre des défenses immunitaires que son hôte pourrait lui opposer, grâce à la diversité des sérotypes de ses toxines (Vincenot *et al.*, 2008).

Ce pouvoir d'évasion face à l'immunité, se traduit par :

- Une lyse des leucocytes (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes) ciblés par les leucotoxines « pore-forming toxins » (PFTs), et la leucocidine de Panton Valentine qui détruisent les cellules par formation de pores actifs à la surface (Vincenot *et al.*, 2008 ; Parker *et al.*, 2005).

- Le clivage de chaînes lourdes des immunoglobulines par la sérine protéase V8, et leur séquestration par la protéine A (Vincenot *et al.*, 2008).

- L'inhibition du chimiotactisme des neutrophiles et monocytes par fixation de la « chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* - CHIPS » sur l'extrémité C5 du complément et sécrétion des inhibiteurs du C3 comme les « Staphylococcal complement inhibitor - SCIN », « extracellular fibrinogen-binding protein - Efb », « extracellular complement-binding protein - Ecb ».

Ces molécules seraient aussi capables de minimiser l'opsonisation de la bactérie, et de limiter le recrutement des polynucléaires au site de l'infection (Vincenot *et al.*, 2008).

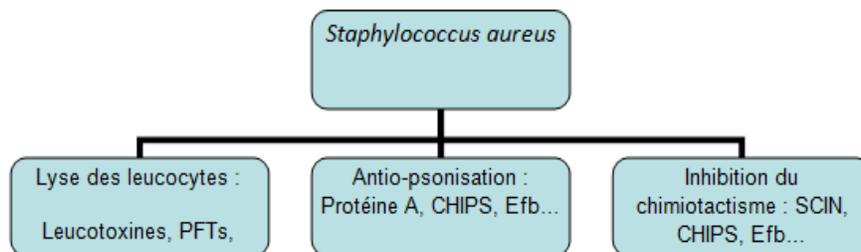


Figure 1.1 Principaux modes d'évasion du *S. aureus* à l'immunité de l'hôte

1.1.6 *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)

A partir de 1950 dix ans après la découverte de la pénicilline, sont apparues les premières souches résistantes à la Pénicilline identifiées chez près de 50 % des patients hospitalisés aux USA et au Royaume Uni (Prescott *et al.*, 2003). Leur résistance à cet antibiotique est liée à la production d'une pénicillinase (qui hydrolyse la Pénicilline G).

En 1960, la mise au point d'une pénicilline semi-synthétique résistante à cette pénicillinase, la méthicilline (anciennement méthicilline), a permis de contourner cette résistance des *S. aureus* à

la pénicilline, avec un antibiotique à spectre étroit, rapidement bactéricide et bien toléré (Tattevin, 2011).

Dès 1961, les premières souches cliniques de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) sont observées. Cette résistance est liée à la synthèse d'une protéine de liaison à la pénicilline, la PLP2a ou PLP2' (Nour *et al.*, 2004) codée par le gène de résistance *mecA* (Laudat *et al.*, 2011), qui entraîne une résistance à l'ensemble des bêtalactamines disponibles en 2010 (Tattevin, 2011).

C'est l'émergence du SARM, qui est disséminé à travers le monde durant les années suivantes jusqu'à devenir endémique dans la plupart des hôpitaux des pays industrialisés (Deleo *et al.*, 2011).

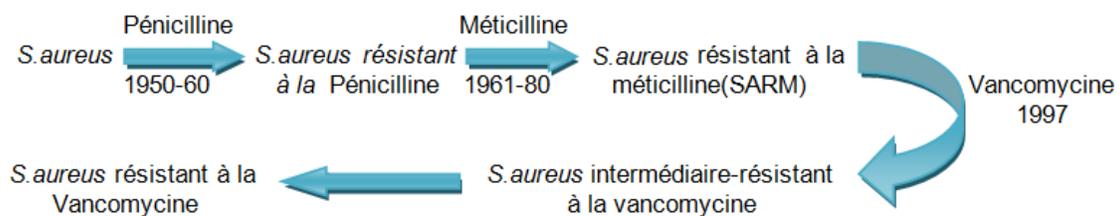


Figure 1.2 Évolution des résistances chez *Staphylococcus aureus*

1.1.6.1 La résistance aux antibiotiques : beta-lactamines

Les souches de *S. aureus* sont considérées comme résistantes à la métilcilline si la CMI à l'oxacilline est supérieure à 2 mg/L (diamètre de l'inhibition < 20mm pour un disque de 5µg) (Bertrand *et al.*, 2004).

1.1.6.1.1 Mode d'action des beta-lactamines

Les β-lactamines qui comprennent les pénicillines et les céphalosporines, exercent leur effet antibiotique sur les germes possédant une paroi riche en peptidoglycane et sont sans effet sur les organismes dépourvus de paroi, comme les mycoplasmes (Muller *et al.*, 2003).

La cible des beta-lactamines est un ensemble d'enzymes de la membrane cytoplasmique nécessaires à la formation du peptidoglycane de la paroi. Les b-lactamines se fixent d'une manière irréversible à l'une ou à l'autre de ces protéines appelées, pour cette raison, (PLP) « Protéine liant la pénicilline » (Nour *et al.*, 2004).

Le substrat normal de ces PLP est l'acétyl-D-alanyl-D-alanine. La pénicilline et les autres beta-lactamines dont la méticilline agissent comme des analogues de substrats empêchant la synthèse de la paroi cellulaire. Ainsi, en présence d'une beta-lactamine, les bactéries sensibles ont de ce fait une paroi fragilisée et sont incapables de résister aux chocs osmotiques (Nour *et al.*, 2004).

1.1.6.1.2 Support génétique de la résistance

Les *Staphylococcus aureus* sensibles (SASM) ou résistants à la méticilline (SARM) diffèrent par l'acquisition du gène de résistance à la méticilline (MecA) pour le SARM (Laudat *et al.*, 2011).

La résistance à la méthicilline du *S. aureus* est due à des mutations chromosomiques (Kempf, Zeitouni., 2009) ou à l'insertion dans le chromosome bactérien d'un élément génétique mobile appelé SCCmec « staphylococcal cassette chromosome mec » abritant le gène *mecA* dont, l'expression dépend au moins de deux systèmes régulateurs au niveau transcriptionnel : le système de gènes *mec1* et *mecR1* situés en amont du gène *mecA* et du système *bla1* et *blaR1* situés en amont du gène *blaZ* de la pénicillinase (Hougardy *et al.*, 2006).

Le site d'intégration de l'extrémité 3' des éléments SCCmec dans le génome de *S. aureus* est situé au niveau d'une séquence hautement conservée : le gène *OrfX*. Il s'agit d'un cadre de lecture ouvert (ORF ou open reading frame) de fonction inconnue (Hougardy *et al.*, 2006). Pour ses mouvements, le SCCmec porte une paire de gènes codant pour les recombinases A et B appelés « cassette chromosomal recombinase genes A and B » (*ccrAB* ou *ccrA* et *ccrB*). Ces recombinases sont capables de mobiliser cet élément génétique (Nour *et al.*, 2004).

Le SCCmec n'a été retrouvé que dans le genre *Staphylococcus* mais le premier donneur demeure toujours inconnu (Katayama *et al.*, 2003).

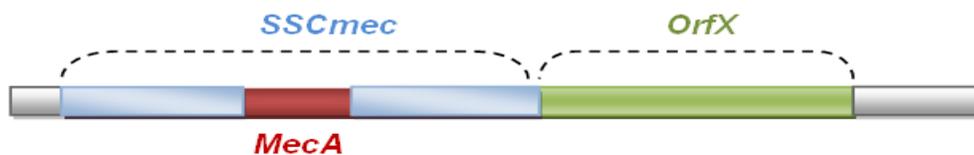


Figure 1.3 Emplacement des gènes de résistance du SARM

1.1.6.1.3 Mécanismes moléculaires de la résistance

Deux principaux mécanismes sont impliqués dans la résistance acquise de *S. aureus* aux beta-lactamines : la production de beta-lactamase et ; la modification de la cible des antibiotiques (Nour *et al.*, 2004).

La beta-lactamase est une enzyme inductible, elle hydrolyse la pénicilline G et ses analogues de structure (Katayama *et al.*, 2003) .

La résistance à la méthicilline par modification de la cible, appelée aussi résistance intrinsèque, est due à la production de la PLP (PLP2a ou PLP2') présentant peu d'affinité pour la méthicilline et toutes les autres beta-lactamines. La PLP2a est codée par le gène *mecA* dont l'expression est régulée par : le système de gènes *mecI* et *mecR1* et le système *bla1* et *blaR1*. La protéine MecR1, produit du gène *mecR1*, agirait comme transducteur de signal : MecR1 détecte la présence de b-lactamine grâce à son domaine extracellulaire. Une fois l'antibiotique lié, il y a activation du domaine intracellulaire.

Celui-ci subirait une activation par protéolyse limitée lui conférant une activité protéasique. Cette dernière conduit à la dégradation du MecI (represseur de la transcription codé par *mecI*) qui est fixé au niveau de l'opérateur d'où libération de ce dernier et expression du *mecA* (Nour *et al.*, 2004).

1.1.6.2 SARM : Agent infectieux nosocomial et communautaire

1.1.6.2.1 Infection à SARM communautaire

D'une manière générale, une infection à SARM est définie comme communautaire lorsqu'elle survient chez un patient qui n'était pas hospitalisé ou qui était hospitalisé depuis moins de 48

heures, lorsque les premiers symptômes sont apparus (Tattevin, 2011).

Les deux éléments génétiques les plus caractéristiques des SARM communautaires sont : la présence des gènes codant la toxine PVL (> 99% des SARM communautaires versus 2% des SARM hospitaliers et des SASM) ; la nature de la cassette chromosomique qui porte la résistance aux bêtalactamines, SCC*mec* de type IV, plus rarement V, mais jamais de type I, II ou III, propres au SARM hospitalier (Nour *et al.*, 2004).

1.1.6.2.2 Infection à SARM nosocomial

Une infection nosocomiale est définie comme une infection acquise après hospitalisation, généralement, 48 à 72 heures après admission du patient jusqu'à 5 jours après son hospitalisation (Nour *et al.*, 2004).

Parmi les pathogènes hospitaliers les plus fréquents, le *staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline est considéré comme premier responsable d'infections nosocomiales qui alourdit le bilan de la morbidité, de la mortalité et du coût des soins (Hougardy *et al.*, 2006).

Selon les enquêtes européennes récentes, 5 à 10% des patients hospitalisés ont une ou plusieurs infections acquises lors de l'hospitalisation, cette proportion est bien plus élevée chez les patients les plus fragiles (affections chroniques graves, immunodéprimés, procédures invasives, réanimation) (Desenclos *et al.*, 2011).

Les infections nosocomiales contribuent aussi à la mortalité hospitalière : selon une étude multicentrique française menée en 2000, ces infections causeraient jusqu'à 2,8% de décès par an, en plus des épidémies qu'elles provoquent et dont la propagation est dangereuse (Desenclos *et al.*, 2011).

Le surcoût financier est considérable, atteignant 2,4 à 6 milliards d'euros, beaucoup plus que ne coûteraient les programmes de prévention (Kempf *et al.*, 2009).

1.1.6.3 Facteurs de transmission et d'acquisition du SARM hospitalier

Le principal mécanisme d'acquisition du SARM en milieu hospitalier résulte d'une transmission manu portée, favorisée par le non respect des règles d'hygiène (Charbonneau *et al.*, 2005) en interaction avec d'autres facteurs :

- La pression de sélection exercée par l'usage souvent excessif des antibiotiques.
- La transmission de souches résistantes de patients à patients via les soins et les soignants.
- La grande susceptibilité aux infections de certains patients (Desenclos *et al.*, 2011).

Ainsi qu'un séjour hospitalier antérieur, un coma, l'hospitalisation prolongée en réanimation et en chirurgie, présence d'un cathéter ou autre dispositif invasif et le travail dans une structure de soins (Hougardy *et al.*, 2006).

Enfin, une transmission par l'air est plus exceptionnelle. Elle semble possible dans des conditions particulières, telle que chez un sujet porteur au niveau de l'arbre trachéo-bronchique (Minery *et al.*, 2011) .

1.1.6.4 Population vulnérable au portage de SARMs

Les patients porteurs de SARMs sont significativement plus âgés que les non porteurs (71 ans *versus* 57 ans d'âge médian) (Gener *et al.*, 2008).

Ce portage est significativement plus fréquent chez les patients qui avaient été hospitalisés à au moins une reprise dans les 12 mois précédents, tous types d'hospitalisation confondus. Les séjours en services de réanimation, en soins de suite ou en long séjour apparaissaient comme favorisant le portage du SARM, de même qu'une hospitalisation en service traditionnel (Gener *et al.*, 2008).

1.1.6.5 Stratégie de prévention de la diffusion du SARM

L'expérience acquise dans de nombreux hôpitaux dans le monde a montré que les infections nosocomiales sont évitables et que des mesures de prévention adaptées et un diagnostic précoce d'infection peuvent réduire notablement les risques (Martres *et al.*, 2003).

Les mesures de prévention recommandées comprennent d'une part :

- Le dépistage des patients porteurs de SARM dans les services à haut risque (Martres *et al.*, 2003).
- Le signalement du statut du patient à l'ensemble de l'équipe de soins (Laudat *et al.*, 2011),

récemment à l'aide d'un nouveau logiciel informatique e-SIN, au service du signalement des infections nosocomiales dans les hôpitaux français (Coignard *et al.*, 2011).

- L'isolement technique des porteurs et des patients colonisés et/ou infectés. Cet isolement provisoire n'est levé qu'au retour négatif des résultats, à 48 heures, des prélèvements d'hygiène (Martres *et al.*, 2003).
- La décolonisation nasale des porteurs détectés par application de mupirocine (Martres *et al.*, 2003).
- L'isolement des patients porteurs, maintenu pendant toute la durée de l'hospitalisation (Martres *et al.*, 2003), qui peut réduire de façon conséquente l'acquisition de SARM à l'hôpital (Laudat *et al.*, 2011).

Pas mal d'études ont reporté une diminution significative du taux d'infection à SARM suite à :

- Un dépistage rapide, moins d'un jour à l'aide de techniques moléculaires récentes (Cunningham *et al.*, 2008 ; Cunnigham *et al.*, 2007) , telle que la PCR (Laudat *et al.*, 2011).
- Le port d'un tablier à usage unique et de gants lors de soins contaminants ainsi que l'individualisation du matériel (Martres *et al.*, 2003).

Enfin, le lavage antiseptique des mains qui est la mesure la plus efficace pour prévenir la transmission manuportée des SARMs (Martres *et al.*, 2003), ainsi que l'utilisation de solutions hydroalcooliques dont l'implantation en 2002 a pu contribuer à maintenir cette tendance à la baisse (Rouzik *et al.*, 2011).

1.1.6.6 Antibiothérapie des infections à SARM

Il faut rappeler d'abord les antibiotiques qu'il est inutile d'envisager, encore moins en monothérapie, pour cause d'inactivité, il s'agit de :

La totalité des beta-lactamines ; la totalité des macrolides ; les fluoroquinolones ; les cyclines ; et parmi les aminosides, l'amikacine et la tobramycine (Katayama *et al.*, 2003).

Le traitement de référence actuel est la vancomycine, associée ou non à d'autres glycopeptides (Téicoplanine) avec une posologie de 2 g/jour (soit environ 30 mg/kg/jour) pour la vancomycine. La dose usuelle est de 500 mg toutes les 6 heures ou de 1 g toutes les 12 heures, chez les sujets adultes aux fonctions rénales et hépatiques normales mais elle peut-être augmentée jusqu'à 4 g/jour (60 mg/kg/jour). L'administration se fait par voie veineuse à

perfusion continue ou discontinuée (Trémolières, 2007).

1.1.6.7 Identification moléculaire de SARM par SDS-PAGE

La technique SDS-PAGE consiste en l'électrophorèse des protéines totales d'une cellule bactérienne sur gel de polyacrylamide en présence d'un composé dénaturant chimique, le sodium dodecyl sulfate (SDS) (Kerstens *et al.*, 2008).

Ses applications sur la systématique microbienne ainsi que l'identification de différentes espèces du genre *Staphylococcus* a été un succès, notamment pour *S. aureus* y compris le SARM (Costas *et al.*, 1989).

SDS-PAGE s'est avérée être une technique puissante de caractérisation bactérienne, car en effet une bactérie renferme plus de 2000 protéines différentes ce qui constitue une source d'informations très riche pour son identification (Kerstens *et al.*, 2008).

1.1.6.7.1 Intérêt de l'application de SDS-PAGE

L'intérêt principal de l'application de la technique SDS-PAGE sur le SARM traité dans cette étude, est d'obtenir le profil électrophorétique (ou électrophorégramme) qui est caractéristique de la souche étudiée afin de déterminer le polymorphisme bactérien (Kerstens *et al.*, 2008). Ce profil peut être considéré comme un critère en plus, pour la description de cette bactérie.

1.2 Oxyde nitrique NO

1.2.1 Définition

L'oxyde nitrique (NO) ou Monoxyde d'azote (De Laet *et al.*, 1996), est un gaz très instable et très réactif sécrété par toutes les cellules de l'organisme notamment, les cellules endothéliales et les macrophages (Pariante, 2003).

Il est produit par une famille d'enzymes : les NO synthétases (NOS1 et NOS3 constitutives, formation continue de NO et NOS2 inductible, stimulée notamment en condition d'agression telle une infection) (Blaise *et al.*, 2005; Tadié *et al.*, 2009). Ces enzymes produisent le NO à partir de son substrat la L-arginine et l'oxygène moléculaire (Drapier *et al.*, 1996).

Le NO est un médiateur totalement ubiquitaire, aux actions aussi bien intra- qu'extracellulaires (tadié *et al.*, 2009). Il a été impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques, en particulier la neurotransmission et la communication intercellulaire (Blaise *et al.*, 2005), la vasodilatation et la relaxation du muscle lisse, la reproduction (Drapier *et al.*, 1996) ainsi que la régulation et la stimulation des fonctions immunes ; il est donc utile à la phase initiale de la réponse immunitaire innée en servant de molécule pro-inflammatoire (Blaise *et al.*, 2005) et microbicide à large spectre contre les agents infectieux (De Laet *et al.*, 1996 ; tadié *et al.*, 2009).

Plusieurs études (pariente *et al.*, 2004 ; Panaro *et al.*, 2001 ; Fritzsche *et al.*, 2010) ont montré récemment que le taux de NO sérique était significativement plus élevé chez beaucoup d'espèces animales porteuses d'une inflammation, due aux infections microbiennes et que ce taux baisse sous traitement anti-inflammatoire, ce qui permet ainsi d'évaluer le niveau d'efficacité du traitement administré.

1.2.2 Historique

Le monoxyde d'azote (NO) à été découvert pour la première fois en 1980 par Furchgott et Zawadzki (Sabry *et al.*, 1996). En 1986 Robert Furchgott et Louis Ignarro (Vanhoutte, 2008; Drapier *et al.*, 1996) proposèrent que ce gaz était libéré par les cellules endothéliales, jouant un rôle dans le contrôle du tonus vasomoteur, par l'inhibition du processus de contraction musculaire lisse (Vanhoutte, 2008).

Depuis la démonstration de la justesse de cette proposition par Salvador Moncada, une multitude d'études furent établies, avec la découverte en 1987 d'une voie de biosynthèses de NO par les l'endothélium vasculaire des mammifères (Drapier *et al.*, 1996); puis la révélation de l'existence d'une enzyme endothéliale, la *nitric oxide synthase* (NOS) qui transforme la L-arginine en citrulline et NO et enfin la découverte des inhibiteurs du NO (Vanhoutte, 2008).

1.2.3 Synthèse du NO

Le NO est formé à partir des groupements azote de la L-arginine, d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O₂) d'autre part. Cette synthèse s'accompagne de la production de la L-citrulline, qui participe à son tour à la production de la L-arginine (Sabry *et al.*, 1996). La réaction de biosynthèse de NO et de la L-citrulline est catalysée par des cytochromes P450, les NO

synthases (NOS) suite à leur activation (Drapier *et al.*, 1996).

Trois isoformes de NO synthases ont été isolées jusqu'à présent : la NOS neuronale (NOSn ou NOS1), la NOS inducible (NOSi ou NOS2) et la NOS endothéliale (NOSe ou NOS3) (Baker *et al.*, 2009).

Les NOS1 et 3 sont présentes de manière constitutive dans les cellules où elles sont inactives, leur activation est due à une élévation du taux intracellulaire de calcium et se traduit par une production transitoire de faibles quantités de NO au rôle de messager inter et intracellulaire (Drapier *et al.*, 1996). La NOS2 en revanche, normalement absente des cellules; son activité est contrôlée par sa transcription qui est induite par les phénomènes inflammatoires et par différentes cytokines (Blaise *et al.*, 2005). L'activation de NOS2 se traduit par la production d'importants taux de NO de fonction délétère (Drapier *et al.*, 1996).

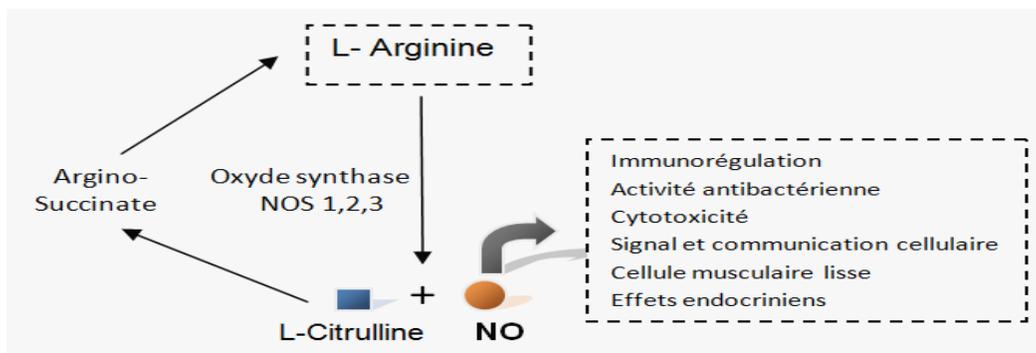


Figure 1.4 Voie de synthèse du Monoxyde d'azote NO

1.2.4 Rôle immunitaire du NO

Le NO est impliqué dans de nombreuses fonctions immunes, où il agit comme une molécule stimulatrice du système immunitaire et régulatrice de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les monocyte/macrophage (Baker *et al.*, 2009). Il régule aussi la migration des polynucléaires neutrophiles lors de l'inflammation (Tadié *et al.*, 2009).

1.2.4.1 Réponse inflammatoire et production de NO

Suite à une infection bactérienne, virale ou parasitaire, les macrophages tissulaires ou sanguins constituent la première ligne de défense non spécifique, qu'est la réaction inflammatoire (Mossalayi *et al.*, 1999).

L'inflammation est une réponse tissulaire locale à une blessure ou une lésion produite par un agent pathogène, elle s'accompagne de signes classiques connus : une rougeur (*rubor*), une chaleur (*calor*), une douleur (*dolor*), un gonflement (*tumor*) et une altération de la fonction (Prescott *et al.*, 2003 ; Roitt *et al.*, 2002). Elle est dite chronique lorsqu'elle s'accompagne de lésions tissulaires et d'une durée longue de deux semaines ou plus (Coleman, 2001).

Le pouvoir de persistance de certaines bactéries par divers mécanismes stimule l'inflammation chronique, comme *S.aureus* qui persiste par : L'insensibilité à la phagocytose, la résistance aux antibiotiques et la sécrétion de toxines qui endommagent les tissus même après la mort des bactéries (Prescott *et al.*, 2003).

La réponse inflammatoire débute lorsque les cellules du tissu lésé libèrent des signaux chimiques, les médiateurs de l'inflammation, qui activent l'endothélium interne des capillaires proches et attirent les leucocytes (neutrophiles, monocytes, macrophages) vers le site de l'infection (Coleman, 2001).

Stimulée par différentes cytokines ($\text{INF}\gamma$, $\text{IL1-}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$) au cours du processus inflammatoire/infectieux ou en présence d'endotoxine bactérienne (Mossalayi *et al.*, 1999), la NOS2 des macrophages recrutés fournit lentement et après activation de facteurs transcriptionnels ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), de grandes quantités de NO (ordre nanomolaire) (Mahut *et al.*, 2006), capables d'avoir une activité régulatrice paracrine sur les cellules voisines, NK par exemple (Kolb, 2001) ou une activité au sein même de la cellule productrice (Mahut *et al.*, 2006). Le NO est de ce fait considéré comme un agent pro-inflammatoire (Coleman, 2001).

Par ailleurs, le NO peut réagir localement pour former des peroxy-nitrites, puissants toxiques des micro-organismes, et est considéré dans ce cas comme microbicide (Blaise *et al.*, 2005).

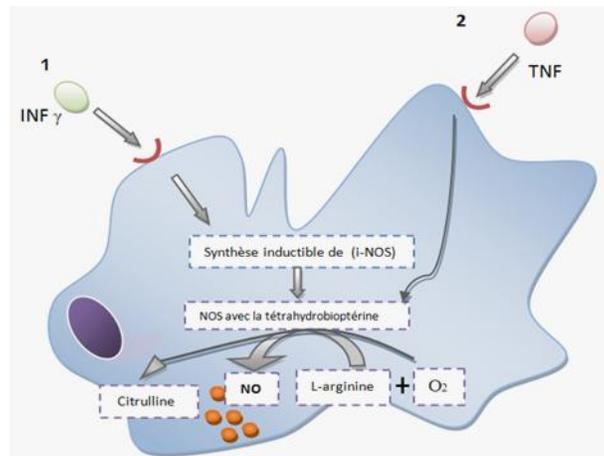


Figure 1.5 Voie de synthèse inductible du NO macrophagique.

La synthèse inductible de l'oxyde nitrique synthase (i-NOS) combine l'oxygène avec l'azote de la L-arginine pour donner le NO, qui est toxique pour les bactéries. La tétrahydrobioptérine est nécessaire comme co-facteur. Dans les macrophages l'INF γ active la voie (1), qui est alors activée de manière optimale par le TNF (2).

1.2.4.2 Effet microbicide de NO

Quand une grande quantité de NO est produite durant le processus inflammatoire, le NO peut réagir avec l'anion superoxyde (O_2^-) (Blaise *et al.*, 2005), qui lui confère sa toxicité (Drapier *et al.*, 1996).

Cette réaction entraîne la production de $ONOO^-$, un puissant oxydant particulièrement toxique pour les cellules, pouvant être à la fois pro-apoptique et pro-nécrotique (Baker *et al.*, 2009; Kolb, 2001). Il possède notamment une activité microbicide (Tadié *et al.*, 2009) qui s'oppose au développement de virus, bactéries et parasites (Coleman, 2001; Drapier *et al.*, 1996) ainsi qu'un rôle tumoricide qui s'oppose au développement tumoral (Fritzsche *et al.*, 2010).

1.2.5 Rôle Physiologique de NO

À côté de l'enzyme NOS2 principalement immunitaire, il existe des isoformes constitutives (NOS1 et NOS3) à rôle physiologique prouvé (Blaise *et al.*, 2005).

Ces NOS1 et 3 sont inactives dans les cellules et leur activation, suite à une élévation de calcium et à leur liaison à la calmoduline, se traduit par une production rapidement et

brèvement de faibles quantités de NO (ordre picomolaire) (Mahut *et al.*, 2006), qui agissent soit à petite distance de la cellule (effet paracrine), soit directement dans la cellule cible (second messenger) (Mahut *et al.*, 2006).

Ces modes de signalisation permettent au NO synthétisé d'agir en tant qu'agent neurotransmetteur, ou vasodilatateur relaxant (Coleman, 2001).

1.2.5.1 Rôle vasodilatateur

Le monoxyde d'azote produit suite à l'activation de NOSe, diffuse librement vers la cellule musculaire lisse et y active la guanilate-cyclase conduisant à la production de l'acide guanosine-monophosphorique (GMP) et l'accumulation de l'(AMPC), qui inhibe le processus de contraction musculaire (Vanhoutte, 2008). Ce qui a pour finalité de relaxer le muscle, et de contrôler le tonus vasculaire par une vasodilatation (Kolb, 2001).

NO peut ainsi prévenir des hypertensions artérielles et des défaillances myocardiques (Drapier *et al.*, 1996).

1.2.5.2 Rôle neurotransmetteur

NO est considéré comme un neurotransmetteur atypique (Drapier *et al.*, 1996). Étant lipophile et très diffusible cette molécule traverse facilement et librement les membranes cellulaires, sans avoir recours aux récepteurs de surface, elle permet ainsi la transmission extra et intercellulaire des signaux aux cellules cibles, (neurones ou cellules musculaires) (Coleman, 2001).

En effet, NO est impliqué dans la neurotransmission mise en jeu par le glutamate -acide aminé excitateur le plus abondant dans le cerveau des mammifères- *via* la stimulation des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Drapier *et al.*, 1996). Le NO semble ainsi intervenir dans la plasticité neuronale - phénomène mis en jeu au cours des processus de mémorisation et d'apprentissage - et dans le développement du système nerveux (Kolb, 2001).

1.2.6 Dosage de NOx sérique

De nombreuses tentatives ont été faites pour évaluer l'activité *in vivo* du NO. Un des moyens pour déterminer cette activité serait de mesurer les métabolites de la réaction d'oxydation du NO, notamment les nitrates et les nitrites (NOx) dans les liquides biologiques, tels que le

plasma et les urines (Sabry *et al.*, 1996).

NO libéré dans la lumière vasculaire a une demi-vie très courte. Ce qui rend sa mesure directe très difficile. Car une fois il atteint la circulation, il est rapidement capté par l'hémoglobine circulante, et transformé en NO₃, diminuant ainsi sa demi-vie à quelques millisecondes et limitant son action à son site de production ou d'administration (Blaise *et al.*, 2005).

Plusieurs études auparavant, ont mesuré la concentration de NOx dans le sérum (Choi *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2006) par l'utilisation de différentes méthodes de dosage, dont celle de Griess, actuellement la plus sollicitée pour sa simplicité, sa rapidité et son faible cout (Ghasemi *et al.*, 2007).

1.3 Effet du Sélénium sur le système immunitaire

1.3.1 Définition

Le sélénium (Se) de masse atomique 79 est un métalloïde qui se trouve à l'état de trace dans notre organisme, d'où son appartenance à la famille des oligoéléments (Ducros *et al.*, 2004). Il a une importance fondamentale en santé humaine par son implication principalement dans les systèmes de défenses antioxydants, le métabolisme thyroïdien et la fonction immune (Ducros *et al.*, 2004 ; Pincemail *et al.*, 1999).

Le taux plasmatique moyen de Se dans le corps humain est de 80µg/L (70-110µg/L) (Pincemail *et al.*, 1999) avec une teneur dans l'organisme qui varie de 3 à 14,6 mg, en fonction des apports alimentaires en sélénium qui sont eux-mêmes fonction de la richesse en sélénium des sols (Wood *et al.*, 2000).

Deux organes sont riches en ce minéral : le foie et le rein. Le muscle squelettique comte à lui, semble fonctionner comme un organe de stockage qui représente 45 % du sélénium corporel total (Ducros *et al.*, 2004).

De nombreuses études ont montré le bénéfice d'une supplémentation ou d'une alimentation riche en sélénium dans la prévention de certains cancers, de maladies cardio-vasculaires et inflammatoires (Wood *et al.*, 2000) ainsi qu'une contribution du Se dans le renforcement de la défense immune antibactérienne et antivirale (Popham *et al.*, 2004).

Cependant, en cas de surdose le sélénium n'est pas dépourvu de toxicité comme l'illustre l'histoire des chevaux utilisés par Marco Polo en 1295 à l'Ouest de la Chine qui perdaient leurs sabots suite à la consommation d'une plante de teneur élevée en sélénium (Pincemail *et al.*, 1999).

Par ailleurs, la carence en sélénium a été associée dans plusieurs cas à une baisse de la fonction immunitaire où, elle semble augmenter la virulence et la progression de certaines infections virales (Ducros *et al.*, 2004).

1.3.2 Historique

Le Sélénium fut découvert en 1817 dans des boues de chambre de plombs par le chimiste suédois Berzelius qui en a déterminé ses principales caractéristiques.

Il fut en 1295 décrit comme élément toxique pour l'organisme puis suspecté d'avoir des propriétés carcinogènes en 1943, ce qu'il a interdit d'utilisation. Il faut attendre de ce fait l'année 1957 pour que Schwartz et Foltz apportent la preuve que le sélénium est en fait essentiel dans le métabolisme général chez l'animal et ce n'est qu'en 1978 que les chercheurs ont vraiment pris conscience de l'importance du sélénium dans notre alimentation (Pincemail *et al.*, 1999).

1.3.3 Apports journaliers recommandés

Les apports journaliers en sélénium dépendent fortement d'une région du globe à l'autre, en raison des différences quantitatives de cet élément dans le sol (Pincemail *et al.*, 1999).

Les apports nutritionnels conseillés en sélénium définis aux États-Unis en 2000 sont de 55 µg/j quel que soit le sexe, apport qui a été considéré comme suffisant. En France, par contre les autorités sanitaires optent pour une dose journalière de 1 µg/kg de poids corporel (Ducros *et al.*, 2004).

1.3.4 Aliments riches en sélénium

Ce sont les aliments protéiques (viandes, poissons, crustacés, abats, œufs, céréales, etc), qui sont les plus riches en sélénium mais leur biodisponibilité est variable : 20 à 50 % pour les produits de la mer contre plus de 80 % pour les céréales ou la levure de bière. Cependant, pour

les céréales, leur teneur en sélénium est très dépendante du contenu en sélénium des sols où elles ont été cultivées (Ducros *et al.*, 2004).

Les huiles aussi sont considérées comme source importante en Se (Mckenzie *et al.*, 1998), par leur richesse en sélénométhionine et sélénocystéine, acides aminés identifiés comme composés majeurs de certaines céréales (blé, soja), des levures et des viandes (Ducros *et al.*, 2004).

1.3.5 Effet de la supplémentation en Se sur l'immunité

Plusieurs études expérimentales sur des animaux ont démontré l'existence d'une relation positive entre la supplémentation en sélénium et la résistance immunitaire contre les infections (Dhur *et al.*, 2004; Popham *et al.*, 2004; Styblo *et al.*, 2006).

Des travaux récemment, ont même suggéré que le sélénium pouvait être un inhibiteur potentiel de la réplication du virus VIH in vitro. Pour d'autres virus à ARN, type hépatite B, C, une supplémentation en sélénium ralentirait la progression virale (Ducros *et al.*, 2004).

1.3.5.1 Effet sur la réponse inflammatoire

La supplémentation en Se chez un sujet dont la carence en Se n'est pas manifeste, stimule la réponse immune. Le Se intervient de ce fait comme modulateur des réponses inflammatoires (Ducros *et al.*, 2004).

Lors de la réaction inflammatoire, le Se maintient d'une part la régulation de la concentration en peroxydes au site inflammatoire, en diminuant la production des leucotriènes (molécules pro-inflammatoires); et inhibe d'autre part, l'activation de NF-kappaB (Facteur de transcription de i-NOS) par la modulation de l'expression de gènes de sélénoprotéines (Duntas *et al.*, 2009; Mckenzie *et al.*, 1998).

Ainsi, il contribue à la diminution de la production de NO et par conséquent la diminution de la réaction inflammatoire. Le Se est considéré de ce fait comme agent anti-inflammatoire (Duntas *et al.*, 2009).

1.3.5.2 Effet sur l'immunité spécifique

En plus de son rôle sur la réponse inflammatoire, la supplémentation nutritionnelle en sélénium jouerait aussi un rôle dans l'immunité spécifique. Notamment dans la régulation de l'expression des cytokines et par conséquent dans la différenciation des cellules T activées en cytotoxiques (Ducros *et al.*, 2004). Mais aussi, dans la réponse humorale où elle stimule la production d'anticorps par les lymphocytes B auxiliaires activés (Dhur *et al.*, 2004; McKenzie *et al.*, 1998).

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1 Partie bactériologique

2.1.1 Origine du SARM étudié

L'étude présente repose sur la manipulation d'une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, isolée à partir de 120 prélèvements nasaux chez 60 nouveau-nés admis au service néonatal du CHU de Tlemcen.

Cet isolement a fait objet d'une étude bactériologique approfondie, dans le cadre d'un projet de Doctorat, mené par Mademoiselle Hydayet Heyfa OURAGHI, sous la Direction du Docteur Mourad ARIBI.

2.1.2 Méthodes

2.1.2.1 Mode de prélèvement et de purification

Les prélèvements nasaux sont effectués par technique d'écouvillonnage, puis acheminés au laboratoire de microbiologie afin d'être incubés pendant 24H à 37°C dans un bouillon Giolitti Cantoni, additionné de 5 gouttes de tellurite de Potassium.

L'isolement du *S. aureus* s'effectue ensuite par repiquage sur bouillon nutritif puis sur gélose Chapman.

Dans notre étude on procède à une vérification de la pureté de la souche de SARM, à l'aide d'un ensemble de tests de confirmation appropriés.

2.1.2.2 Tests de confirmation

2.1.2.2.1 Identification morphologique

Sur boîte gélosée contenant le milieu Chapman, la souche de *S. aureus*ensemencée présente après 24/48H d'incubation à 37°C des colonies pigmentées en jaune, entourées d'une auréole jaune formée suite à la fermentation du mannitol et virage de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies.

La colonie de *S. aureus* apparaît souvent sous cet aspect: diamètre d'environ 1 mm, rond, opaque, crémeux, lisse, brillant et pigmenté en jaune.

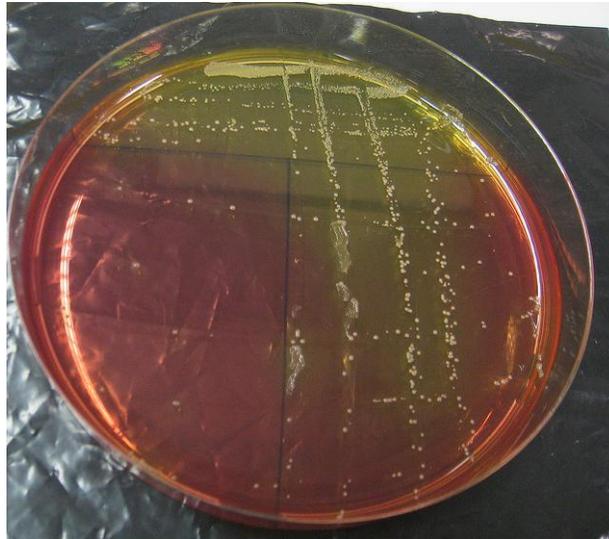


Figure 2.1 Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman

2.1.2.2.2 Coloration de Gram

Elle permet de différencier les bactéries par rapport à la composition de leur paroi et de connaître leur morphologie ainsi que leur mode de regroupement.

Grâce à cette méthode les bactéries Gram + sont colorées en violet et les bactéries Gram - sont colorées en rose. Elle nécessite les étapes suivantes:

- **Le frottis: fixation à la chaleur**

Sur une lame propre, déposer une goutte d'eau physiologique stérile, ajouter une colonie bactérienne raclée à l'aide de l'anse de platine, étaler puis fixer à la flamme environ 10 à 15 min, laisser refroidir la lame.

- **La coloration**

1. Immerger les lames dans la solution de Violet de gentiane ou Cristal Violet pendant 1min. Rincer à l'eau.
2. Immerger les lames dans du Lugol en les agitant pendant 20 sec.
3. Laver à nouveau à l'eau.

4. Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool (Méthanol) en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée durant 10 sec.
6. Laver à l'eau.
7. Recolorer avec la solution de safranine ou Fushine pendant 20 à 30 secondes.
8. Laver à l'eau et sécher à l'air durant 10 min.

- **Observation microscopique**

Se fait à l'objectif x100, en immersion avec de l'huile. On observe ainsi, des cocci colorés en violet (Gram +), assemblés en amas et en grappes de raisin (Delarras, 2007).

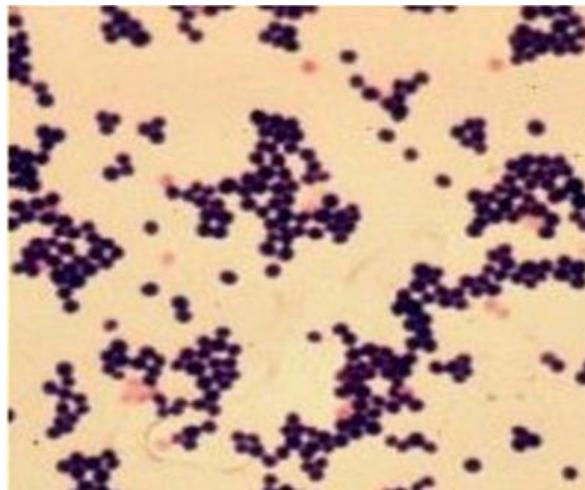


Figure 2.2 Coloration de Gram

2.1.2.2.3 Recherche de la catalase

La bactérie *S. aureus* possède une enzyme, la catalase, qui la protège des substances toxiques formées par la réduction de l'O₂, dont le peroxyde d'hydrogène (Prescott *et al.*, 2003).

La catalase catalyse la destruction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction suivante :



Technique

1. Déposer sur une lame, une goutte d'eau oxygénée H₂O₂.

2. A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, prélever une colonie bactérienne à partir de la gélose Chapman, et la mettre en contact avec la goutte d' H_2O_2 .

Résultat

Le résultat positif se traduit par l'apparition d'une effervescence et formation immédiate de bulles gazeuses.

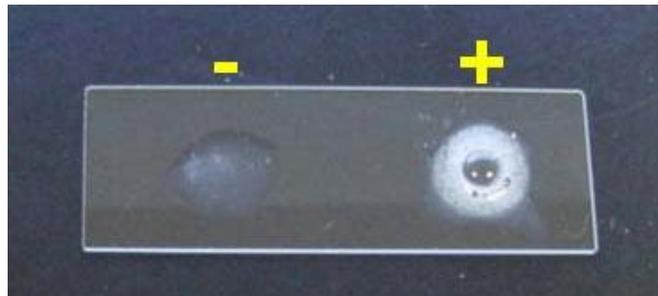


Figure 2.3 Test de catalase

2.1.2.2.4 Recherche de la coagulase

Contrairement aux autres Staphylocoques communs, *Staphylococcus aureus* produit une coagulase, une enzyme responsable de la coagulation du plasma sanguin en formant un caillot (Prescott *et al.*, 2003).

Le principe de ce test est de mettre en contact du plasma oxalaté avec une culture bactérienne sur bouillon Cœur – Cerveau (BHIB).

Technique

1. Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0.5 mL de plasma humain ou de lapin.
2. Additionner 0.5 mL de la souche bactérienne de 18 heures, cultivée sur bouillon cœur-cerveau.
3. Incuber le tube à 37°C. Procéder à la lecture toutes les heures en moins pendant les cinq premières heures.

Résultat

Le résultat positif se traduit par l'apparition d'un caillot au fond du tube suite à la coagulation du plasma. Ce résultat est la conséquence de transformation du fibrinogène (protéine de la coagulation soluble dans le plasma), en fibrine solide (Delarras, 2007).



Figure 2.4 Test de coagulase

2.1.2.2.5 Tests biochimiques : Galerie Api Staph

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée en API Staph (Biomerieux). Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

Technique

1. A partir d'une culture de 18heuresensemencée sur gélose Chapman, racler une colonie distincte de la souche étudiée.

2. Préparer dans un tube une suspension bactérienne, d'opacité égale à 0,5 McFarland, équivalente à une densité optique de 0,08 - 0,1 mesurée à 625 nm par un colorimètre.
3. Vortexer la suspension bactérienne.
4. Répartir de l'eau distillée stérile dans les alvéoles que comporte le couvercle de la galerie, afin de créer une atmosphère humide.
5. Ouvrir et déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation humidifiée.
6. A l'aide d'une pipette Pasteur, Introduire la suspension dans les cupules de la galerie en évitant la formation de bulles.
7. Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine.
8. Incuber 24 heures à 37°C.

Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture, en ajoutant une goutte de réactifs à chacun des tests suivants:

-Test VP : VP1 et VP2

Après 10 minutes d'attente, une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive et une couleur rose pale ou rose claire est considérée négative.

-Test NIT : NIT 1 et NIT 2.

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge après 10 min.

Résultat



Figure 2.5 *Staphylococcus aureus* identifiés sur galerie API Staph

2.1.2.2.6 Criblage ou screening

Cette technique a pour but de rechercher, ou confirmer la résistance d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques aux quels elle est supposée être résistante.

Les souches de *S. aureus* sont considérées comme résistantes à la méticilline si la CMI à l'oxacilline est supérieure à 2 mg/L (diamètre de l'inhibition < 20 mm pour un disque de 5 µg) (Bertrand *et al.*, 2004).

Technique

1. Dans 5mL du bouillon cœur-cervelle, repiquer une colonie pure de *S. aureus* de 24 heures cultivée sur gélose Chapman.
2. Incuber la préparation à 37°C pendant 6 à 7 heures sous agitation.
3. Après 18 heures d'incubation et grâce à un colorimètre, ajuster la turbidité de la suspension bactérienne sur BHIB à 0,08 - 0,1 à 625 nm.
4. 15 min après l'ajustement de la turbidité, ensemercer l'inoculum préparé par technique d'épuisement sur gélose Mueller Hinton à l'aide d'un écouvillon, afin d'obtenir une distribution égale de l'inoculum.
5. Préparation de la solution d'antibiotique (Oxacilline) :
Diluer 0.6 g d'oxacilline (Poudre injectable 1g ; Nom commercial : Bristopen) dans 100 mL d'eau distillée stérile, puis faire deux dilutions décimales à $1/10^{\text{ème}}$ puis $1/100^{\text{ème}}$ pour obtenir une solution à 60 µg/mL.
6. Verser 2 mL de cette solution à (60µg/mL) sur la gélose Mueller Hintonensemencée puis jeter le liquide excédentaire.
7. Incuber à 37°C durant 24 heures.

Résultat

Après 24 heures d'incubation on observe la croissance de plusieurs colonies de *Staphylococcus aureus* malgré la présence de l'oxacilline ; ceci indique la résistance de cette bactérie sous le nom de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline .

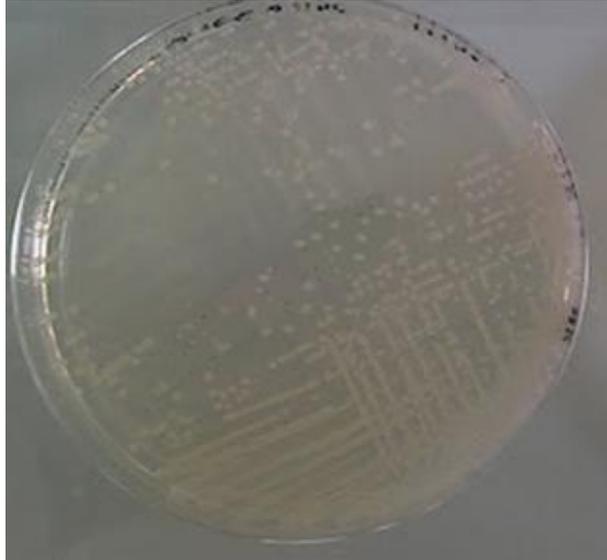


Figure 2.6 Croissance de *S. aureus* sur l'oxacilline

2.1.2.3 Identification moléculaire de SARM par SDS-PAGE

Principe

La technique SDS-PAGE consiste en la séparation des protéines d'une souche bactérienne par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, elle résulte en un électrophorègramme (ou profil électrophrétique) complexe, dont chaque bande est composée de plusieurs polypeptides de structure différentes mais de mobilité identique (Kerstens *et al.*, 2008).

Le but de son utilisation est d'ajouter le profil électrophorétique obtenu aux critères de caractérisation de la souche SARM étudiée, et de comparer ce dernier au profil électrophoretique d'une souche de référence sensible à la méthicilline du type « ATCC 33862 ».

Pour procéder, il faut une culture bactérienne de quantité suffisante de la souche SARM et SARM de référence d'environ 5 boîtes par souche, une lyse cellulaire, un dosage des protéines totales et enfin une analyse numérique des profils électrophorétiques par assistance informatique à haute résolution.

Technique

A. Préparation et récolte des bactéries

- Recueillir dans des tubes stériles une quantité bactérienne suffisante, à partir d'une culture d'environ 5 boîtes ensemencées.
- Faire une centrifugation à 1000xg durant 12 min.
- Jeter le surnageant puis récupérer le culot et y ajouter 3mL du tampon PBS (0,01M) pour le lavage des bactéries du milieu de culture.
- Centrifugation à 1000xg durant 12 min.
- Récupérer le culot puis faire deux autres lavages à l'aide du NaPBS

B. Lyse des cellules bactériennes

- Récupérer le culot bactérien issu des lavages précédents dans un tube Eppendorf
- Additionner 100µL de tampon STB.
- La lyse des cellules s'effectue après ajout de 15µL de SDS (10 %)
- Chauffage des échantillons pendant 10 min à 95°C, afin d'inhiber les protéases présentes
- Centrifugation et récupération du culot puis conservation à -20°C

C. Dosage des protéines totales de la cellule bactérienne par la réaction du biuret

L'utilisation de la méthode de biuret pour le dosage des protéines est utilisée depuis 80 ans (Okutucu *et al.*, 2007). Elle est préférée par les laboratoires cliniques pour sa simplicité, rapidité, fiabilité et spécificité (Shrivastaw *et al.*, 1995).

Le réactif de biuret utilisé est celui amélioré par Goodwin *et al* en 1965 (Goodwin *et al.*, 1965).

Le total protéique obtenu, sert dans la technique SDS-PAGE à connaître la concentration des protéines qu'il faut mettre dans le puits pour la migration.

Technique

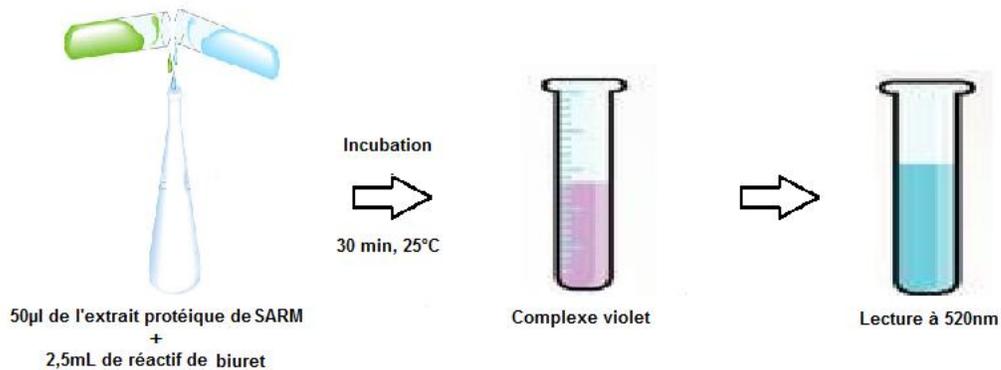


Figure 2.7 Dosage des protéines totales (méthode de biuret)

Résultat

La D.O mesurée à 520 nm est de 0,22. La concentration protéique calculée est donc de 40g/L.

D. Préparation des marqueurs de taille

C'est des protéines à poids moléculaire connu, mis en électrophorèse avec l'échantillon étudié. Ce sont la gélatine et les Igm.

E. Application des échantillons et électrophorèse

L'électrophorèse en gel polyacrylamide-SDS est réalisée sur des appareils à gels verticaux.

- Préparer le gel de séparation (10%) et le gel de concentration (4%)
- Préparer l'échantillon protéique à appliquer
 - Prendre 200µL d'extrait protéique
 - Centrifuger à 1000xg/20 min
 - Prélever 50 µL du surnageant et y ajouter 100µL du tampon échantillon
 - Chauffer à 100°C pendant 5 min

- Numérotter les puits, puis déposer les échantillons dedans à l'aide d'une seringue à 5cc. Le volume à appliquer dépend de la concentration des protéines de chaque échantillon.
- Le réservoir du tampon d'électrode est rempli de tampon d'électrode fraîchement préparé (âgé de moins d'une semaine)
- Le courant est branché à 160 Volt environ
- Le courant est arrêté après environ 1 heure et demi d'électrophorèse



Figure 2.8 Ensemble du dispositif d'électrophorèse SDS-PAGE

F. Coloration et décoloration

- La cassette est démontée, le gel résolutif est récupéré et mis immédiatement dans un récipient contenant une solution de coloration de Noir amido qui colore les protéines durant 30 min. La limite de détection du noir amido est \geq à 50 ng.
- La décoloration est ensuite effectuée en remplaçant le liquide colorant par une solution de décoloration.
- Le séchage du gel de polyacrylamide se fait entre deux feuilles de cellophane perméables à l'air libre. Le gel séché est conservé sec en sac de plastique à l'obscurité.

G. Interprétation du profil électrophorétique

L'analyse par l'ordinateur est la méthode la plus objective et reste la plus souhaitable pour l'interprétation des profils d'extraits protéiques bactériens (Kersters *et al.*, 2008) .

H. Mode de préparation des solutions pour SDS-PAGE**Tampon NaPBS:**0,2 M Na₂HPO₄.12H₂O: 40,5 g0,2 M NaH₂PO₄. 2H₂O: 9,5 mL

NaCl: 8,0 g

H₂O qsp 1000 mL

pH 7,3

Conserver à 4°C

Tampon STB:

Tris : 0,75 g

β Mercaptoéthanol: 5,0 mL

Sucrose: 5,0 g

H₂O qsp 100 mL

pH 6,8

Conserver à -18°C

Solution (A) :

194,8 g : acrylamide

5,2 g : bis-acrylamide

H₂O qsp 500 mL

Conserver à 4°C dans une bouteille brune.

Attention ! l'acrylamide et son monomère le bis- acrylamide sont des neurotoxiques.

Solution (B) : Gel de séparation 4X

Dissoudre 91 g Tris base dans 300 mL

H₂O

Ajuster le pH à 8,8 P/NaOH

Ajouter 0,4 g SDS

H₂O qsp 500 mL. Filtrer**Solution (C) : Gel de concentration 4X**Dissoudre 6,05 g Tris base dans 40 mL de H₂O

pH 8,8

0,4 g SDS

Qsp H₂O 500 mL. Filtrer .**Tampon échantillon: 5X**

0,6 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8)

5 mL 50 % glycerol

0,5 mL β Mercaptoethanol

1 mL Bleu de bromophénol (1 %)

0,9 mL H₂O**Solution de SDS 20 %**

20 g de sodiumdodécylsulfate dissous dans 100 mL d'eau distillée. Conserver à température ambiante

Solution PSA 10 %

0,5 g Persulfate d'ammonium PSA

5,0 mL H₂O

Tampon d'électrophorèse: 10X

30 g Tris Base

144 g Glycine

10 g SDS

Qsp 1 L H₂O

pH 8,3

Gel de séparation 10 %

Solution (A) : 3,75 mL

solution (B) : 3,75 mL

H₂O : 7,5 mL

TEMED : 5 µL

APS : 75 µL

Remarque : Ajouter APS et TEMED en dernier. APS polymérise la solution et TEMED étant un catalyseur de la réaction de polymérisation.

Solution de coloration

Noir Amidon : 1,25 g

Acide acétique à 5 % : 500 mL

Gel de Concentration 4%

Solution (A) : 0,6 mL

Solution (C) : 1,5 mL

H₂O : 3,96 mL

APS : 40 µL

TEMED : 10 µL

Solution de décoloration

Acide acétique à 5 %

2.2 Partie immunologique

2.2.1 Sujets étudiés : Hamsters

Quarante (40) Hamsters ont été recrutés dans cette étude.

Les Hamsters ont été répartis en trois groupes comparables pour le poids, l'âge et le sexe:

- Groupe 1 ; 20 Hamsters supplémentés en sélénium [Se+]. Le Sélénium a été administré, par voie orale sous forme de sélénite de sodium (Poulsen *et al.*, 1989), à raison de 0,6 mg/kg/j, 15 j avant l'infection jusqu'au moment du sacrifice (période minimale 23 jrs; période maximale 43 jrs).
- Groupe 2 ; 20 Hamsters non supplémentés en sélénium [Se-].
- Groupe 3 ; 5 hamsters sains, témoins.

Les groupes 1 et 2 ont été infectés par une dose de 10^7 bactéries/mL, administrée par voie intrapéritoniale.

Les animaux ont été soumis à une étude transversale cas/témoins sur quatre semaines. A la fin de chaque semaine, 5 hamsters de chaque groupe ont été sacrifiés.

Le hamster est devenu après le rat et la souris l'animal de laboratoire le plus utilisé de part sa grande capacité de reproduction, son cycle court, sa résistance aux maladies naturelles ainsi que pour l'installation rapide de la maladie provoquée en lui (Boussari, 1999).

2.2.2 Éthologie de l'hamster

Le hamster appartient à la famille des Muridés, sous-famille des Cricétinés. C'est un petit animal compact à queue et pattes courtes mesurant quinze à dix-huit centimètres, pesant entre soixante et cent cinquante grammes selon l'âge.

Il a la particularité d'avoir des poches jugales ou bajoues dans lesquelles il stocke de la nourriture et parfois ses petits en cas de danger (Brugere-Picoux, 1995).

Comme le rat, le hamster est omnivore avec une préférence pour les fruits, les céréales et les laitages. Il apprécie la viande également. Pour son alimentation, on distribue cinq à sept grammes d'aliment et huit à dix millilitres d'eau pour cent grammes de son poids vif par jour.

Le hamster est d'un caractère plutôt solitaire. Il est difficile à manipuler, mord facilement et peut se montrer agressif surtout s'il est dérangé pendant son sommeil. Il est principalement actif la nuit.

Le comportement de coprophagie est normal chez le hamster. La femelle se montre dominante par rapport au mâle.

Le modèle qu'a servi à cette étude est le hamster syrien ou hamster doré *Mesocricetus auratus*, présentant une longévité de 2 à 3 années (4 maximum) et 8mL/100g de volume sanguin (Boussari , 1999; Brugere-Picoux, 1995).



Figure 2.9 Le hamster syrien *Mesocricetus auratus*

2.2.3 Méthodes expérimentales

L'expérimentation débute par la préparation de la suspension bactérienne à injecter puis son injection. La mesure du taux de NOx sanguin est effectuée après 28 jours suivant l'infection par dissection de l'hamster et prélèvement du sang.

2.2.3.1 Préparation de la suspension bactérienne

1. Dans un tube à hémolyse stérile mettre de l'eau physiologique stérile, pour préparer le témoin d'ajustement du colorimètre.
2. Dans un 2^{ème} tube à hémolyse stérile, mettre de l'eau physiologique stérile et quelques colonies de SARM raclées à partir de la gélose Chapman.
3. Vortexer afin de bien disperser les bactéries.

4. Ajuster spectrophotométriquement la suspension à 10^7 bactéries/mL avec une longueur d'onde de 550 nm. La DO affichée étant de 0,08.



Racler une colonie de SARM



Additionner la colonie à de l'eau physiologique



Cribler le colorimètre



Vortexer la suspension



Ajuster la DO de la suspension

Figure 2.10 Préparation de la suspension bactérienne

2.2.3.2 Injection de la suspension bactérienne

1mL de la suspension bactérienne préparée est prélevé dans une seringue à fine aiguille (afin de minimiser la douleur de la piqure vis-à-vis de l'animal).

L'injection se fait par la voie intrapéritoniale car elle est moins difficile à manier que l'intraveineuse. L'inflammation est alors provoquée au bout de 14 à 28 jours.



Figure 2.11 Mode de contention de l'hamster et injection intrapéritoniale

2.2.3.3 Prélèvement sanguin

L'animal est d'abord pesé puis euthanasié par l'injection d'une solution d'hydrate de chloral (10 %), avec une dose de 0,3 mL par 100 g de son poids. L'hydrate de chloral étant un produit hypnogène, sédatif, analgésique et anesthésiant qui attaque le cerveau en provoquant la confusion, puis des convulsions musculaires est choisi principalement pour son efficacité et sa rapidité d'agir.

Ensuite, on procède à la dissection du rongeur, réalisée dans le plus grand soin à l'aide de matériel stérilisé et dans des conditions éthiques rigoureusement respectées.

Le prélèvement sanguin est retiré à partir de l'aorte abdominale qui donne naissance à la totalité des vaisseaux sanguins irrigant les organes abdominaux ; Pour cela on utilise une seringue à 5Cc pour une prise d'un volume avoisinant les 2mL de sang, car en moyenne un hamster de 150 g contient un volume sanguin total de 9.75-12ml au quel 2 mL est idéale pour un prélèvement (Baumans *et al.*, 1992).

Le sang est collecté dans des tubes secs codés et numérotés pour chaque hamster.

Après 10 minutes de chaque prise, les tubes sont centrifugés à 3000 tour/min pendant 15minutes. A l'aide d'une micropipette, le surnageant obtenu dit sérum est soumis à un ensemble de tests biochimiques et immunologiques.

Cette étape est suivie par l'ajout du réactif de Griess qui absorbe le NO₂ en formant une coloration diazoïque rose. L'absorbance est ensuite mesurée à 520nm et les concentrations de NO_x sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage établie à l'aide du nitrate sodique NaNO₃ (Asghar *et al.*, 2007).

Technique

1. Déprotéiniser le sérum par addition de 99µL de TCA (5%) à 11µL de sérum. Vortexer, puis centrifuger (1000xg/10min).
2. Dans un tube Eppendorf, mettre 100µl du surnageant récupéré de l'étape précédente et 100µl de Vanadium III chloride (8mg/ml).
3. Ajouter 50µL du réactif de Griess. Une couleur rose est ainsi formée.
4. Incuber à 37°C durant 30min.
5. Lire la densité optique à une longueur d'onde de 520nm.
6. Les concentrations du NO_x dans les échantillons de sérums sont ensuite déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage établie par 0-150 µmol/L de nitrate sodique NaNO₃.

Chapitre 3. Résultats et interprétation

Le fractionnement électrophorétique par SDS-PAGE a montré la présence d'un mélange de protéines différentes par rapport à la souche de référence de *Staphylococcus aureus* non résistante à la méthicilline.

Comme indiqué dans les figures 1 et 2, les niveaux circulants du monoxyde d'azote sont significativement diminués chez les Hamsters infectés par SARM, supplémentés ou non en sélénium, comparés aux contrôles sains, non infectés ($p = 0,000$).

Aussi, d'après la figure 3, les taux sériques du monoxyde d'azote sont nettement diminués chez les Hamsters infectés par SARM, supplémentés en sélénium, comparés aux Hamsters infectés par SARM, non supplémentés en sélénium ($p = 0,000$).

Enfin, la figure 4 montre que les concentrations sériques du monoxyde d'azote sont significativement diminués chez les Hamsters infectés par SARM ($n = 10$) comparés aux contrôles, non infectés par SARM ($n = 5$, $p = 0,000$).

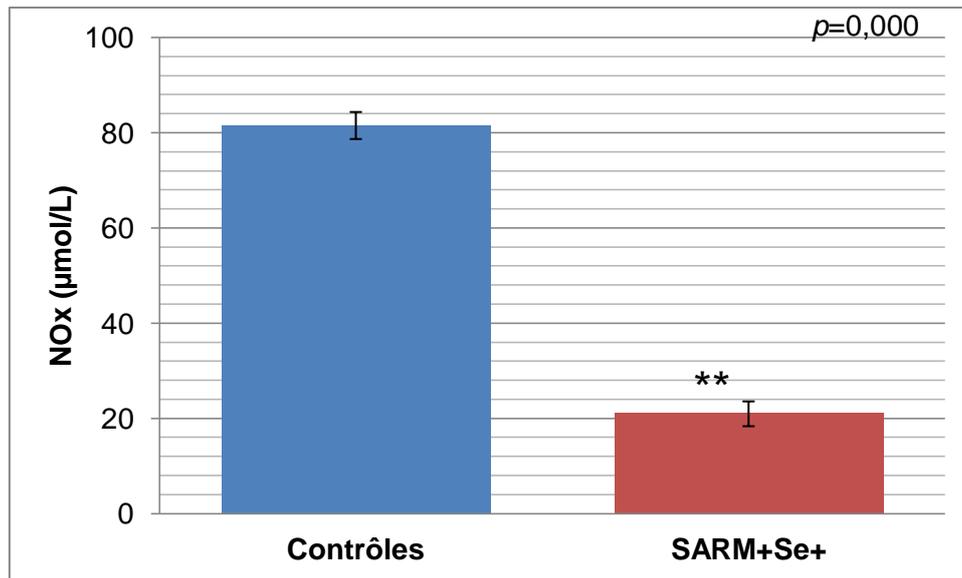


Figure 3.1 Niveaux circulants du monoxyde d'azote chez les Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, supplémentés en Sélénium, et chez les contrôles. NOx : oxyde d'azote, SARM+ : Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, Se+ : Hamsters supplémentés en Sélénium.

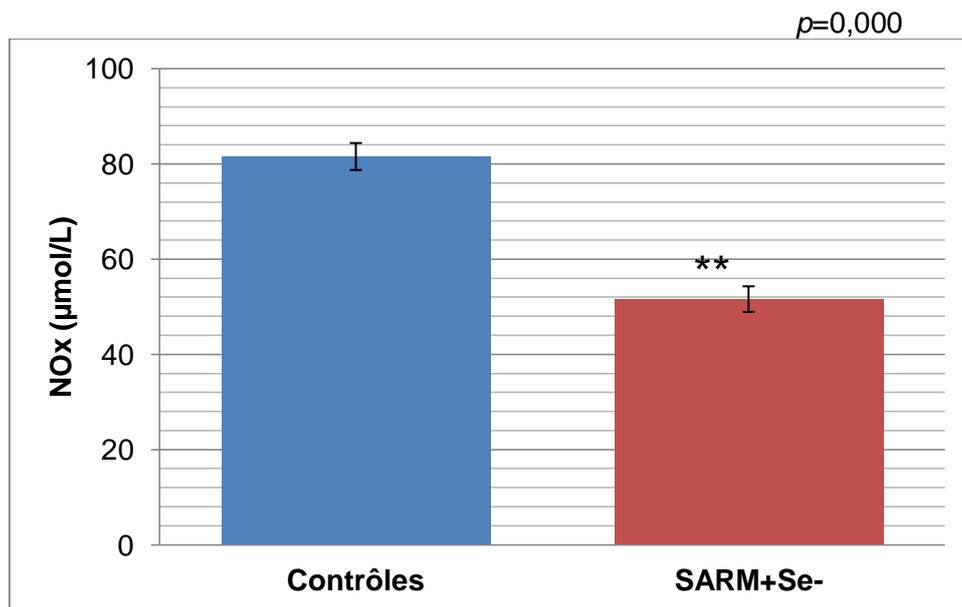


Figure 3.2 Niveaux circulants du monoxyde d'azote chez les Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, non supplémentés en Sélénium, et chez les contrôles. NOx : oxyde d'azote, SARM+ : Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, Se- : Hamsters non supplémentés en Sélénium.

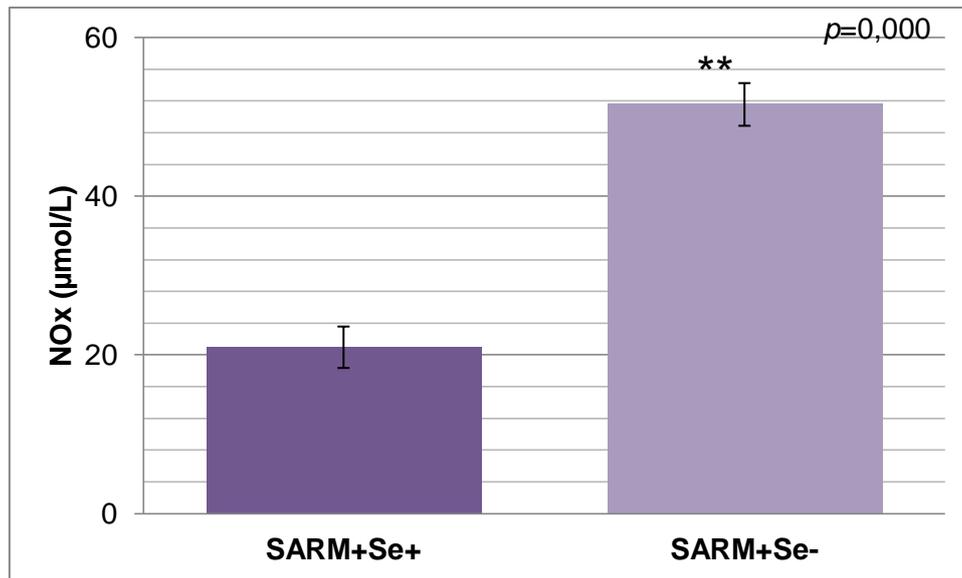


Figure 3.3 Niveaux circulants du monoxyde d'azote chez les Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, supplémentés ou non en Sélénium. NOx : oxyde d'azote, SARM+ : Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, Se+ : Hamsters supplémentés en Sélénium, Se- : Hamsters non supplémentés en Sélénium.

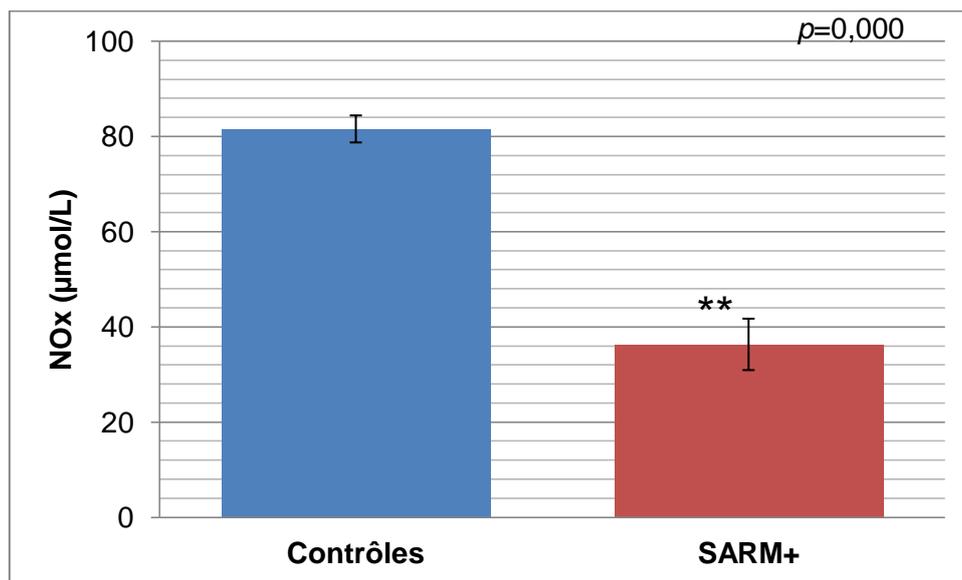


Figure 3.4 Niveaux circulants du monoxyde d'azote chez les Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline et chez les contrôles. NOx : oxyde d'azote, SARM+ : Hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline,

Chapitre 4. Discussion

Ce travail consiste en une étude microbiologique et immunologique de prélèvements sanguins à partir d'hamsters témoins et d'hamsters infectés par *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, tantôt supplémentés en sélénium et tantôt dépourvus de supplémentation en sélénium dans leur nourriture quotidienne.

Le but étant de démontrer que le sélénium, oligoélément à effet anti-inflammatoire (Duntas *et al.*, 2009; Ducros *et al.*, 2004), pourrait avoir un rôle à jouer dans la diminution des taux de NO sérique, molécule pro-inflammatoire (Baker *et al.*, 2009).

Selon Hougardy (2006), le SARM constitue à l'heure actuelle un véritable pathogène responsable d'infections nosocomiales, qui alourdit le bilan de la morbidité, de la mortalité et le coût des soins (Strulens *et al.*, 2005). On le sait aussi impliqué dans de nombreuses infections communautaires (Tattevin, 2011) qui font de lui un défi majeur en santé publique (Worngwoort *et al.*, 2005).

Sa capacité à résister aux beta-lactamines se traduit par l'acquisition du gène de résistance à la méticilline MecA (Laudat *et al.*, 2011), qui le différencie du *S. aureus* sensible à la méthicilline par l'expression de nouvelles protéines de résistance PLP2a ou PLP2' (Nour *et al.*, 2004). Fait qui explique notre résultat de fractionnement électrophorétique par SDS-PAGE qui montre un électrophoregramme de SARM, constitué de protéines différentes par rapport à la souche de référence de *Staphylococcus aureus* non résistante à la méthicilline.

La meilleure stratégie permettant de tenir SARM en échec de nos jours, reste cependant sa recherche et sa destruction aux moyens d'antibiotiques encore efficaces (Worngwoort *et al.*, 2005).

Pour cela, envisager une nouvelle stratégie de lutte contre le SARM demeure une idée très sollicitée depuis la découverte de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Indirectement, on cherche dans la présente étude à stimuler le système immunitaire par le biais d'une alimentation enrichie en sélénium, afin de diminuer lui même l'activité pathogène de SARM tout en maintenant la réponse inflammatoire régulée.

Il est important de rappeler que l'infection à SARM s'accompagne de réactions inflammatoires (Roitt *et al.*, 2002).

Là, il faudra rappeler que la réponse inflammatoire est un processus de défense naturel, indispensable à l'élimination de l'agent pathogène (Mossalayi *et al.*, 1999). Mais bien que bénéfique,

elle peut toutefois causer des effets délétères à l'organisme lorsqu'elle persiste longtemps (Baufreton *et al.*, 2006).

Cette réaction est contrôlée par de nombreuses cytokines et protéines inflammatoires, régulatrices de la synthèse du NO (Paul *et al.*, 2002), et ce dernier à son tour régule la production de ces molécules pro-inflammatoires (Baker *et al.*, 2009).

D'autre part, l'enrichissement en Se chez un sujet dont la carence n'est pas manifeste stimule la réponse immune. Le Se intervient aussi comme modulateur des réponses inflammatoires (Ducros *et al.*, 2004). Ainsi, il inhibe l'activation de NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) spécifique à i-NOS (*inductible nitric-oxide synthase*) par la modulation de l'expression de gènes de sélénoprotéines (Duntas *et al.*, 2009; McKenzie *et al.*, 1998).

Le Se contribue, par ailleurs, à la diminution de la production du NO et par conséquent à la diminution de la réaction inflammatoire (Duntas *et al.*, 2009).

Plusieurs études récentes (Pariante *et al.*, 2004 ; Panaro *et al.*, 2001 ; Fritzsche *et al.*, 2010) ont montré que les taux du NO sérique sont significativement plus élevés chez beaucoup d'espèces animales au cours de réactions inflammatoires, en réponses aux d'infections microbiennes, et que ces taux baissent sous traitement anti-inflammatoire.

D'après les figures 3.1 et 3.2, les niveaux circulants du NOx sont significativement diminués chez les hamsters infectés par SARM, supplémentés ou non en sélénium, comparés aux contrôles sains, non infectés ($p = 0,000$). Ce qui pourrait indiquer que SARM serait doté d'un effet inhibiteur sur la production du NO sérique. Cette baisse du NOx pourrait être expliquée par la liaison des dérivés du monoxyde d'azote avec les acides gras présents (NO₂-Acide gras), en vue de réguler la réponse inflammatoire (Baker *et al.*, 2009). Ou bien à la dérégulation d'une des voies de sa synthèse du NO, la voie enzymatique des NOS par exemple (Pariante, 2004).

Cependant, l'étude menée par Borgonio (1999) démontre une diminution marginale de la synthèse du NOx, survenue lors d'hypertension artérielle.

Aussi, d'après nos résultats, les taux sériques du NOx s'avèrent nettement diminués chez les hamsters infectés par SARM, supplémentés en sélénium, comparés aux hamsters infectés par SARM, non supplémentés en sélénium ($p = 0,000$). Résultats qui s'accordent avec les données de la littérature (Duntas *et al.*, 2009; Ducros *et al.*, 2004 ; McKenzie *et al.*, 1998), suggérant l'activité modulatrice du Se *vis-à-vis* de la baisse de la réponse inflammatoire et la baisse de la production du

NO. L'enrichissement nutritionnel en sélénium est de ce fait déconseillé au cours de l'infection à SARM.

Enfin, beaucoup de facteurs pourraient influencer l'augmentation et la diminution des concentrations sériques du NO hormis l'infection microbienne (Haiqi *et al.*, 2007; Drapier *et al.*, 1996).

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Les infections à SARM sont observées dans de multiples situations cliniques, aussi bien en pathologie communautaire qu'en pathologie nosocomiale. SARM reste une cause importante d'infections chez les patients immunodéprimés, avec une morbi-mortalité mondiale assez élevée.

A l'issu de ce travail, portant sur l'effet de la supplémentation nutritionnelle en sélénium chez des hamsters infectés par SARM, comparés aux hamsters non supplémentés et aux hamsters témoins, nous remarquons deux principaux faits :

D'une part, une diminution significative des taux du NOx sérique, observée chez les animaux infectés supplémentés ou non en Se, par rapport aux contrôles non infectés par SARM. Et d'autre part, une baisse marginale de ces taux du NOx chez les hamsters infectés supplémentés en Se comparés à ceux infectés et non supplémentés en Se.

Nous pouvons de ce fait conclure que le SARM ainsi que la supplémentation en Se font baisser significativement les taux du NOx circulants chez les hamsters.

La supplémentation alimentaire en Se serait donc déconseillée au cours d'une infection à SARM.

La réalisation de l'électrophorèse SDS-PAGE sur la souche SARM étudiée, en comparaison avec une souche SASM de référence « ATCC 33862 », a révélé différents profils électrophoretiques pour les deux souches. Ceci serait du à la présence de protéines de résistance à la méthicilline chez SARM et leur absence chez SASM.

Chapitre 6. Bibliographie**A**

Antri K, Rouzik N, Boubekri I, et al. Forte prévalence des infections communautaires et nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et portant le gène de la leucocidine de Panton-Valentine dans l'Algérois. PATBIO. 2009 Avr;58,2:15-20.

B

Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet. 2002;359:1819-1827.

Baker P, Schpfer F, O'Donnell B, et al. Convergence of Nitric oxide and Lipid Signaling: Anti-inflammatory Nitro-Fatty Acids. Biol Med. 2009 Avr;15:989-1003.

Batard D, El Kouri G, et al. Aspects cliniques et bactériologiques. Elsevier Masson, 2007.

Baufreton C, Corbeau J, Pinaud F. Réponse inflammatoire et perturbations hématologiques en chirurgie cardiaque: vers une circulation extracorporelle plus physiologique. Ann fran d'annest et de reanim. 2006 Mai;25:510-520.

Baumans V, Van Herck H, Van der Craats NR, et al. Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture. Lab Anim. 1992;26:53-58.

Bekhoucha SN, Cady.A, Gautier P, et al. A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean Sea: Molecular characteristics of isolates from Western Algeria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Doi. 2008;1007:10096-0660.

Bertrand X, Muller A, Thouverez M, et al. Retour vers la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline SARM : relation entre génotype et antibiotype. PATBIO. 2004 Avr;52 :480-485.

Bes M, Brun Y. Staphylococcus: actualités taxonomiques et identification. Rev Fr Lab. 2002 Mai;23-30.

Blaise G, Gauvin D, Ben Othmen L. Le rôle du monoxyde d'azote dans la transmission de la douleur. *Prat Anesth Réa.* 2005;9:2.

Borgonio A, Witte K, Stahrenbeng R, et al. Influence of circadian time, ageing, and hypertension on the urinary excretion of nitric oxide metabolites in rats. *Mech Ageing Dev.* 1999 Juill;111:23-37.

Boussari D. Spécificités des rongeurs et lagomorphes de compagnie et leurs conséquences. *Le Point Vétérinaire.* 1999;30:539-544

Brugere-Picoux J. Dominantes pathologiques chez le hamster. *Maisons-Alfort.* 1995;221-233.

C

Charbonneau P, Parienti J.J, Thibon P, et al. Facteurs d'acquisition du SARM à l'hôpital : rôle des Fluoroquinolones. *Med et Mal infect.* 2005;35:35-37.

Choi JW, Pai SH, Kim SK, et al. Increase in nitric oxide concentrations correlate strongly with body fat in obese humans. *Technical Briefs.* 2001;47:1106-9.

Chow JW, Yu VL. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in hemodialysis patients, its role in infection and approaches to prophylaxis. *Arch Intern Med.* 1989 Jui;149,6:1258-62.

Coignard B, Poujol I, Alleaume S, et al. e-SIN: un nouvel outil au service du signalement des infections nosocomiales. *Bull Epidémiol Hebdp.* 2011 Avr;203-204.

Coleman J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int IMM Pharm.* 2001;1:1397-1406.

Cunningham R, Cooper S, et al. Impact of preoperative screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by real-time polymerase chain reaction in patients undergoing cardiac surgery. *J Hosp Infect.* 2008;69:124-30.

Cunningham R, Jenks P, Northwood J, et al. Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patients admitted to critical care. *J Hosp Infect.* 2007;65:24-8.

D

Dehasq E, Duhamel P, Descoster A, Lemahieu JC. Cour de bactériologie. 2008.

Desenclos J.C. L'avenir des infections transmises par les vecteurs en France. *Med Mal inf.* 2011 Juin;41,6:293-294.

De Laet MH, Vanderwinden JM, Vanderhaeghen JJ. L'oxyde nitrique (Monoxyde d'azote), le système non adrénérgique-non cholinérgique et la motilité digestive. *Arch Pédiatr.* 1996;3:287-291.

Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire. Paris: Lavoisier ; 2007.

Deleo F, Otto M. Un demi-siècle de SARM. *Rev franc des lab.* 2011 fev;429 :27.

Dhur A, Galan P, Hercberg S. Relationship between selenium, immunity and resistance against infection. *Comp biochem phys.* 2004 Juin;96.2:271-280.

Diller R, et al. Evidence for cost reduction based on pre-admission MRSA screening in general surgery. *Int J Hyg Environ Health.* 2007.

Drapier J.C, Payen D, Verrecchia. Monoxyde d'azote, un gaz à facettes. *SANT.* 1996 Fev;153.

Droke E.A, Loerch S.C. Effects of parenteral selenium and vitamin E on performance, health and humoral response of steers new to the feed lot environment. *Journal of animal science.* 1998;67:1350-59.

Ducros V, Favier A. Métabolisme du sélénium. *EMC-Endocrinologie.* 2004;1:19-28.

Duntas LH. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. *Epub.* 2009 Mai;41:443-7.

E

Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 1993;16:428-442.

F

Fritzsche C, Schleicher U , Bogdan C. Endothelial nitric oxide synthase limits the cutaneous leishmaniasis inflammatory response in mouse. *Immunobiology*. 2010;215:826-832.

G

Gener G, Dupuy A, Rouveau M. Dépistage systématique du portage nasal du *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) chez les patients hospitalisés en dermatologie : expérience à l'hôpital Saint Louis. *Ann dermat et vénéro*. 2008;135:815-821.

Ghasemi A, Hedayati MI, Biabani H. Protein Precipitation Methods Evaluated for determination of Serum Nitric Oxide End Products by the Griess Assay. *JMSR*. 2007;15:2.

Gillet Y, Issartel B, Vanhems, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine Leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;359:753-759.

Gram H. Uber die insolite Farbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medizin*.1884;2.

Graham P, Lin S, Larson E. U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Ann Intern Med*. 2006 Mar;7,144,5:318-25.

Guenane H, Hartani D, Chachoua L, et al. Production des cytokines Th1/Th2 et du monoxyde d'azote au cours de l'uvéite « Behçet » et de l'uvéite « idiopathique ». *Journal fran d'ophtalmo*. 2006 Fév;29:146-152.

Guilfoile P.G. Antibiotic-resistant bacteria. New York: Chelsea house publisher. 2007.

H

Haiqi He, Genovese K.J, Swaggerty C.I, et al. Differential induction of nitric oxide, degranulation, and oxidative burst activities in response to microbial agonist stimulations in monocytes and heterophils from young commercial turkeys. *Veterinary Imm and Immunopath*. 2008;123:177–185.

Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;101:143-144.

Honeyman AL, Fridman H, Bendinelli M. *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Kluwer Academic Publishers. 2002;143-144.

Hougardy N, Louahabi A, Goffinet P . Détection directe et rapide du portage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline par extraction automatisée de l'acide nucléique et PCR en temps réel. PATBIO. 2006 Oct;54:477-481.

J

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, et al. relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. Inf and Imm. 2002 Fev;70:631-641.

K

Karpuzoglu E, Asnar Ahmed S. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. Nitric oxide. 2006 Nov;15:177-186.

Katayama Y, Zhang H, Hong D, Chambers H. Jumping the barrier to lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2003;185:5465-72.

Kempf I, Zeitouni S. Cout biologique de la résistance aux antibiotiques : Analyse et conséquences. PATBIO. 2009 Oct;2852:6.

Kesah C, Ben Redjeb S, Odugbemi TO, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. Clin Microbial Infect. 2003;9:153-56.

Klevens RM, Morrison MA, Fridkin SK, et al. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. 1999-2002.

Kolb J.P. Rôle pro- et anti-apoptotique du monoxyde d'azote, NO. Life Scie. 2001 Jan;324: 413–424.

Kondo T, Ueyama J, Imai R, et al. Association of abdominal circumference with serum nitric oxide

concentration in healthy population. *Environmental Health and Preventive Medicine* 2006;11:321-5.

Kuroda M, Ohta t, Uchiyama I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001;257:1225-1240.

L

Laudat P, Demondion E, Jouannet C. Dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) par biologie moléculaire (Cepheid GeneXpert IL, GeneOhm BD, LightCycler Roche, HyplexEvigene I2A) versus dépistage par culture: stratégie économique-pratique pour le laboratoire. *PATBIO*. 2011 Mai;2965:6.

Lepellier D. Evolution de la résistance et des facteurs de risque d'infection. *Antibiotiques*. 2004,6:69-72.

Libert N, Batjom E, Cirodde A, et al. Traitements antibiotiques et pneumopathies nécrosantes à *Staphylococcus aureus* sécréteurs de leucocidine de Panton-Valentine. *Med et Mal Inf*. 2008 Déc;39:14-20.

Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998;339,8:520-32.

M

Mahut B, Delclaux C. Place de la mesure du NO expiré dans l'asthme. *Rev Mal Respir*. 2006;23:6S37-6S43.

Martres P, Thibault M, Lémann F. Surveillance des bactéries multirésistantes : diminution significative du taux et de l'incidence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) dans un centre hospitalier général entre 1999 et 2001. *PATBIO*. 2003 Juil;51:474-478.

McKenzie R.C, Rafferty T.S, Beckett G.J. Selenium: an essential element for immune function. *Immunology today*. 1998 Aou;342.19:8.

Minery P, Bourderont D, Gravet A. et al. Surveiller pour conduire à évaluer la politique de prévention des infections nosocomiales d'un établissement de Santé : L'expérience du centre hospitalier de Mulhouse, France. *BEH*. 2011 Juin;15,16,17:181-184.

Mossalayi M.D, Appriou M. Intérêt du monoxyde d'azote dans la défense antiparasitaire des macrophages humains. Bull Soc Pharm.1999;138:7-17.

Muller A, Thouverez M, Talon D, Bertrand X. Contribution de la pression de sélection antibiotique dans l'acquisition de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) dans un centre hospitalier universitaire. PATBIO. 2003 Mai;51:454-459.

N

Nour M, Mastouri M, Ben Nejma M. Le staphylocoque doré résistant à la méticilline :émergence et bases moléculaires de la résistance. PATBIO. 2004 Sep;53:334-340.

P

Panaro M.A, Acquafredda A, Lisi S, et al. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. CIMID. 2001;24:187-195.

Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: from structure to function. Prog Biophys Mol Biol. 2005;88:91-142.

Pariente R. Oxyde nitrique. EMC –Pneumologie. 2004;1:37-39.

Pasteur L. A propos de deux malades soignés à l'hôpital saint-Luis pour pustule maligne.1877.

Pincemail J, Nève J, Defraigne J.O. Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 4^{ème} partie : le Sélénium. Medi Sphere. 1999 Mars;93.

Popham J.R, Shelby K.S, Popham T.W. Effect of dietary selenium supplementation on resistance to baculovirus infection. Biological Control. 2005;32:419-426.

Poulsen HD, Danielsen V, Nielsen TK, Wolstrup C. Excessive dietary selenium to primiparous sows and their offspring. I. Influence on reproduction and growth. Acta Vet Scand. 1989;30:371-8.

Prescott A, Harley J, Klein D. Microbiologie. 2^{nde}. Paris: de boeck; 2003.

R

Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, et al. La détection de souches de *Staphylococcus*

aureus résistants à la méthicilline et à plusieurs antibiotiques et l'exercice de Panton-Valentine Leucocidine de gènes dans un hôpital d'Alger. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1083-5.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunologie*. 3^{ème}. Bruxelles : de boeck;2002.

Rouzik N, Tande D, Payan C, et al. Epidémiologie des infections nosocomiales à SARM au CHU de Brest du 1^{er} janvier 2004 au 31 Décembre 2007. Impact des consommations de produits hydroalcooliques et d'antibiotiques. *PATBIO.* 2011;59:1-5.

S

Sabry S, Dinh-Xuan AT. Le monoxyde d'azote : un médiateur ubiquitaire. *arch pediatr.* 1996;3:275-277.

Spohr M, Rau J, Friedrich A, Klittich G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. *Zoonoses.* 2011 Juin;58,4:252-261.

Strulens M, Denis O. Methicillin resistant *S.aureus* : toward a coordinate response to a continuing challenge. *Eurosurveillance.* 2005;5:25-6.

Styblo M, Walton F.S, Harmon A.W et al. Activation of superoxide dismutase in selenium-deficient mice infected with influenza virus. *Patbiochem.* 2007;21:52-62.

T

Tadié J.M, Guerot E, Delclaux C. Supplémentation en l-arginine en réanimation. *Reanim.* 2009 Juin;18:511-517.

Tattevin P. Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) d'acquisition communautaire. *Méd et mal infect.* 2011 Jan;41:167–175.

Tiemersma EW, Bonzwaer SL, Lyytikainen O, et al. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. *Emerg Infect Dis.* 2004 Sep;10:1627-34.

Trémoières F. Stratégies antibiotiques en cas d'infections à SARM. *prat en anest réanim.* 2007;460-467.

U

Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect.* 1993 Oct;25:97-108.

V

Vanhoutte P.M. L'endothélium : un quart de siècle de surprises. *Ann Cardio Angéio.* 2008 Juin;57:133-135.

Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *FRANCLAB.* 2008 Dec;407:62.

Vincent S, Gratas-Delamarche A, Saïag B, et al. L'exercice de sprint induit une augmentation des concentrations plasmatiques en dérivés de l'oxyde nitrique. *Science & Sports.* 2006;21:110-112.

W

Wargenwoort J.H.T. Kepers-Rietrae M. Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) dans la population en général. *Eurosurveillance.* 1997;2,12:96-97.

Weems JJ. The many faces of *Staphylococcus aureus* infection. Recognizing and managing its life-threatening manifestations. *Postgrad Med.* 2001;24-26.

Wood S.M, Beckham C, Yosioka A, et al. b-carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Integ Med.* 1999;2:85-92.

INFECTION A SARM ET NOx

Warda MEZIANE, Master microbiologie, UAB-Tlemcen, 2011

RESUME

Introduction	L'infection à <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline constitue à l'heure actuelle un sérieux problème thérapeutique, associé aux maladies nosocomiales ainsi qu'à la mortalité chez le nouveau-né.
Objectifs	Étudier la relation qui peut exister entre l'infection à SARM et les niveaux du NOx circulants d'une part et la supplémentation en sélénium d'autre part.
But	Montrer que le sélénium pourrait avoir un rôle à jouer dans la diminution des taux circulants du NOx induits par l'infection à SARM.
Matériels et méthodes	Quarante (40) hamsters ont été suivis dans cette étude. Quinze (15) hamsters répartis en trois groupes : Groupe 1; infecté par SARM (SARM+), supplémenté en sélénium (Se+), n=5, sexe; mâles, âge; 38 jours, Groupe 2; (SARM+), (Se-), 4 mâles, 1 femelle, 38 jours, Groupe 3; (SARM-), (Se-), 5 mâles, 28 jours; Ont été soumis à une étude rétrospective cas/témoins.
Résultats	Les niveaux circulants du monoxyde d'azote sont significativement diminués chez les hamsters infectés par SARM, supplémentés ou non en sélénium, comparés aux contrôles sains, non infectés ($p = 0,000$). De même, les taux sériques du monoxyde d'azote sont nettement en baisse chez les hamsters infectés par SARM, supplémentés en sélénium, comparés à ceux infectés par SARM, non supplémentés en sélénium ($p = 0,000$). Parallèlement, les concentrations sériques du monoxyde d'azote sont aussi significativement diminués chez les Hamsters infectés par SARM ($n = 10$) comparés aux contrôles, non infectés par SARM ($n = 5$, $p = 0,000$). Enfin, Le fractionnement électrophorétique par SDS-PAGE montre une présence d'un mélange de protéines du SARM, différent par rapport à la souche SASM de référence ATCC 33862.
Conclusion	Le SARM diminue la concentration sérique en oxyde nitrique (NOx) chez les hamsters infectés; le sélénium diminue encore davantage ce taux. La prise de sélénium est de ce fait déconseillée lors d'une infection à SARM.
Mots clés	SARM, NOx, Sélénium, nosocomiale, Oxyde nitrique.

ABSTRACT

Introduction	Nowadays, many medical issues like nosocomial infections and newborn mortality are facing therapeutic solutions. In this context, methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> infections constitute also a serious problem which needs to be treated.
Objectives	Investigate the relationship that may exist between the MRSA and different levels of circulating NOx on the one hand, as well as selenium supplementation on the other.
Aim	Demonstrate that selenium may have a role to play in reducing levels of circulating NOx induced by MRSA
Materials and methods	Forty hamsters were followed in this study. Fifteen (15) hamsters divided into three groups : Group 1, infected with MRSA (MRSA +), supplemented with selenium (Se +), $n = 5$, sex male, age 38 days; Group 2; (MRSA +), (Se-), 4 males, 1 female, 38 days; Group 3, (-MRSA), (Se-), 5 males. 28 days were subjected to a retrospective study case / control.
Results	Levels of nitric oxide serum were significantly reduced in hamsters infected with MRSA, supplemented or non supplemented with selenium, compared with healthy controls uninfected ($p = 0,000$). Similarly, serum levels of NOx were significantly lower in hamsters infected with MRSA, supplemented with selenium, compared to those infected with MRSA, non supplemented with selenium ($p = 0,000$). Also, serum concentrations of nitric oxide are significantly reduced in hamsters infected with MRSA ($n = 10$) compared to controls, not infected with MRSA ($n = 5$, $p = 0,000$). Finally, electrophoretic fractionation by SDS-PAGE shows that protein mixture of MRSA is different from that of the strain MSSA ATCC 33862.
Conclusion	For infected hamsters, MRSA decreases the serum concentration of nitric oxide (NOx). Moreover, it has been found that selenium reduces this rate further. Therefore, taking selenium is not recommended during an MRSA infection.
Keywords	MRSA, NOx, Selenium, Nosocomial, Nitric oxid

ملخص	عشرة حيوانات من نوع همستر أصيبت ببكتيريا من نوع <i>S.aureus</i> مقاومة للميثيلين و خمسة منهم استكملت بعنصر السيلينيوم في تغذيتها. تمت مقارنة كل واحد منهم بمجموعة خمسة شهود بهدف إظهار إمكانية السيلينيوم في تخفيض NOx في المصل
-------------	---