

Caractérisation moléculaire et distribution des gènes codant la résistance aux Macrolides, Lincosamides et Streptogramines B chez *Staphylococcus* communautaires et cliniques à Brazzaville, Congo

Tarcisse BALOKI NGOULOU, Gabriel AHOMBO*, Etienne NGUIMBI, Raoul AMPA et Rachel MOYEN

Université Marien NGOUABI, Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire(BCM), BP 69 Brazzaville, Congo

* Correspondance, courriel : gabriel.ahombo@umng.cg

Résumé

Cette étude a porté sur la détection moléculaire des gènes de résistance aux Macrolides, Lincosamides et Streptogramines B (MLS_B) chez 30 souches de *Staphylococcus* dont 8 (26,66 %) souches de *Staphylococcus* communautaires et 22 (73,34 %) souches de *Staphylococcus* cliniques. Ces souches ont été isolées et identifiées selon les méthodes classiques de microbiologie. Le profil de résistance des souches a été déterminé par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur milieu Mueller Hinton. Des PCR ont été réalisées sur les ADN de 24 souches dont 4 (16,66 %) souches communautaires et 20 (83,34 %) souches cliniques pour la détection des gènes ErmA, ErmB et ErmC. Les résultats montrent que la vancomycine, la ciprofloxacine, la norfloxacine et la pristinaamycine ont été plus actives chez les *Staphylococcus* communautaires. Seule la tobramycine a été plus active sur les *Staphylococcus* cliniques. Le gène ErmC a été le seul déterminant des trois recherchés à être détecté par PCR. Un fragment de 570pb a été obtenu chez 6 (75 %) souches cliniques et 2 (25 %) souches communautaires. L'analyse des séquences protéiques montre quelques mutations. Les macrolides en particulier l'érythromycine, ne sont pas appropriés pour traiter les infections causées par les *Staphylococcus*. La détection du gène ErmC chez *Staphylococcus* communautaires et cliniques souligne la dissémination des souches cliniques et des gènes de résistance dans la communauté.

Mots-clés : gènes ErmA, ErmB, ErmC ; MLS_B, *Staphylococcus aureus*, SCN.

Abstract

Molecular characterization and distribution of genes encoding resistance to Macrolides, Lincosamides and Streptogramines B in community and clinical *Staphylococcus* in Brazzaville, Congo

This study focused on the molecular detection of Macrolide, Lincosamide and Streptogramine B (MLS_B) resistance genes in 30 *Staphylococcus* strains, including 8 (26.66 %) community *Staphylococcus* strains and 22 (73.34 %) clinical *Staphylococcus* strains. These strains have been isolated and identified using conventional microbiological methods. The resistance profile of the strains was determined by the standard antibiotic susceptibility test method by diffusion on Mueller Hinton medium. PCRs were performed on the DNA of 24 strains, including 4 (16.66 %) community strains and 20 (83.34 %) clinical strains for the detection of the ErmA,

ErmB and ErmC genes. The results show that vancomycin, ciprofloxacin, norfloxacin and pristinamycin were more active in community *Staphylococcus*. Only tobramycin was more active on clinical *Staphylococcus*. The ErmC gene was the only determinant of the three sought to be detected by PCR. A fragment of 570 bp was obtained in 6 (75 %) clinical strains and 2 (25 %) community strains. Analysis of the protein sequences shows some mutations. Macrolides, especially erythromycin, are not suitable for treating infections caused by *Staphylococcus*. The detection of the ErmC gene in community and clinical *Staphylococcus* highlights the spread of clinical strains and resistance genes in the community.

Keywords : *ErmA, ErmB, ErmC genes; MLSB, Staphylococcus aureus, SCN.*

1. Introduction

Au cours de la dernière décennie, les souches de *Staphylococcus*, en particulier les souches résistantes à la méthicilline, ont été reconnues comme étant les pathogènes les plus importants. Elles ont été fréquemment isolées et ont causé des infections cliniques graves et potentiellement mortelles comme les infections nosocomiales et acquises par la communauté [1]. L'espèce *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) est l'un des agents pathogènes les plus fréquents impliquée dans les multiples infections graves dans le monde entier et cause un problème de santé publique. Divers antibiotiques sont utilisés dans le traitement de ces infections. Toutefois, le développement de la résistance aux médicaments chez *S. aureus* rend le traitement difficile ; ce qui a conduit à l'utilisation d'antibiotiques plus anciens tels que les Macrolides, Lincosamides et Streptogramines B (MLSB) [2]. Les macrolides sont largement utilisés pour traiter les infections aiguës des voies respiratoires supérieures et inférieures, les maladies sexuellement transmissibles et les infections pulmonaires chroniques. En outre, ils s'appliquent également aux infections de la peau et des tissus mous [3]. Premier antibiotique macrolide découvert, l'érythromycine a joué un rôle important dans le traitement des maladies infectieuses. Depuis lors, des dérivés semi-synthétiques plus actifs, tels que l'azithromycine et la clarithromycine ont été développés. L'utilisation intensive des MLSB pour le traitement des infections à *S. aureus* a développé la résistance de cette dernière à ces antibiotiques [4]. La résistance aux MLSB est inducible (iMLSB), elle concerne les macrolides ayant un cycle de 14 et 15 chaînons et sensible au cycle MLSB à 16 chaînons. Elle est aussi constitutive (cMLSB), et concerne le cycle MLSB à 16 chaînons. Jusqu'à présent, trois types de mécanismes responsables de la résistance aux macrolides chez *S. aureus* sont connus, notamment une pompe à efflux actif codée par le gène *msrA*, l'inactivation enzymatique d'antibiotiques et la modification de la cible ribosomale par les gènes ErmA, ErmB, ErmC et Erm33. Parmi ces trois mécanismes, le dernier est le principal mécanisme impliqué [1]. En République du Congo, les cas de résistance aboutissant aux échecs thérapeutiques ont été observés durant le traitement des infections à *Staphylococcus* par les MLSB en milieu hospitalier et dans la communauté. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur la détection moléculaire des gènes de résistance chez les souches de *Staphylococcus* cliniques et communautaires résistantes aux MLSB. C'est ainsi que ce travail s'inscrit dans le but d'analyser la distribution des phénotypes et des gènes de résistance (ErmA, ErmB et ErmC) aux MLSB dans les souches de *Staphylococcus* isolées dans la communauté et à l'hôpital.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel

Le matériel biologique a été constitué des souches communautaires isolées à partir des produits biologiques des malades externes et des souches cliniques isolées à partir des produits biologiques des malades hospitalisés au Centre Hospitalier et Universitaire de Brazzaville (CHUB).

2-2. Méthodes

2-2-1. Isolement et identification des souches

L'isolement des souches a été effectué sur le milieu Chapman agar. Les souches communautaires ont été isolées entre janvier et mars 2018 à la clinique COGEMO de Brazzaville. Les souches cliniques ont été isolées entre janvier et juillet 2017 dans les différents services du CHUB. L'identification des souches communautaires a été faite sur la base des caractères culturels sur milieu Chapman agar et biochimiques (test de coagulase). Les souches cliniques ont été identifiées par la galerie API Staph.

2-2-2. Résistance aux antibiotiques

Le profil de résistance des souches bactériennes a été évalué par l'antibiogramme standard en utilisant la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton [5]. Les antibiotiques testés ont été les suivants : pénicilline G (P.,10UI), oxacilline (OXA.,1µg), céfoxitine (CX.,30µg), vancomycine (VA.,30µg), Kanamycine (K.,5UI), gentamicine (CN.,10UI), tobramycine (TOB.,10µg), fosfomycine (FF.,200µg), ciprofloxacine (CIP.,5µg), norfloxacine (NOR.,10µg), érythromycine (E.,15µg), clindamycine (DA.,2µg), pristinamycine (PT.,15µg), acide fusidique (FA.,10 µg), rifampicine (RA., 5 µg). Les disques d'antibiotiques ont été appliqués sur milieu Mueller Hinton ensemencé par étalement d'un inoculum préparé à partir d'une colonie pure et jeune de *Staphylococcus*. La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard sur milieu Mueller Hinton. Après 18 à 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°C, les diamètres de diffusion des différents antibiotiques ont été mesurés et comparés aux diamètres de référence du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie [6].

2-2-3. Détection moléculaire des gènes *ErmA*, *ErmB* et *ErmC*

2-2-3-1. Extraction d'ADN

Au total 24 ADN de souches de *Staphylococcus* présentant une résistance aux macrolides et apparentés ont été extraits par le Kit nucleSpin DNA conformément au protocole de Macherey Nagel.

2-2-3-2. Réalisation de la PCR

Une réaction de PCR a été réalisée pour l'amplification des fragments des gènes *ErmA*, *ErmB* et *ErmC* dont les amorces sont mentionnées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour les PCR et le séquençage

Gènes cibles	Amorces	Séquences (5 → 3')	Taille de l'amplicon	Références
Erm A	Erm A-F	5'-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG-3'	421pb	[7, 8]
	Erm A-R	5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTAC-3'		
Erm B	Erm B- F	5'CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC-3'	359 pb	[7, 8]
	Erm B-R	5'-GAATCGAGACTTGAGTGTGC-3'		
Erm C	Erm C-F	5'-GCTAATATTGTTAAATCGTCAATTCC-3'	572 pb	[7, 8]
	Erm C-R	5'-GGATCAGGAAAAGGACATTTAC-3'		

pb : paire de base ; *F* : forward ; *R* : reverse

Le mélange réactionnel d'amplification par PCR (50µL) contenait 2 µL de matrice d'ADN et 48 µL du mix. Le mix a été constitué de 31,75 µL d'eau distillée stérile, 2 µL d'amorce F, 2 µL d'amorce R, 2 µL de dNTPs, 10 µL de tampon PCR (x5) et 0,25 µL de one taq. Les conditions PCR ont été les suivantes (**Tableau 2**):

Tableau 2 : Conditions PCR des gènes *ErmA*, *ErmB* et *ErmC*

Paramètres	Conditions / durées		
	ErmA	ErmB	ErmC
Dénaturation initiale	94°C / 10 min	94°C / 10 min	94°C / 10 min
Dénaturation	94°C / 30 sec	94°C / 30 sec	94°C / 30 sec
Hybridation	50°C / 30 sec	53°C / 30 sec	51°C / 30 sec
Elongation	72°C / 1 min	72°C / 1 min	72°C / 1 min
Elongation finale	72°C / 10 min	72°C / 10 min	72°C / 10 min
Nombre de cycles	35	35	35

2-2-3-3. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR du gène *ErmC*

Cinq microlitres (5µL) de produit PCR ont été résolus sur un gel d'agarose à 1,5 % contenant 0,5 µg / mL de bromure d'éthidium dans un tampon Tris-Borate-EDTA à 100 V pendant 40 minutes.

2-2-4. Séquençage d'ADN

Les produits de la PCR classique positifs pour les gènes *ErmC* ont été purifiés en utilisant la plaque PCR NucleoFast 96 (Macherey-Nagel EURL, France) et séquencés en utilisant la chimie du terminateur BigDye sur un séquenceur ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, Californie, États-Unis). Les séquences obtenues ont été assemblées avec le logiciel DNA Baser Assembler. L'analyse des séquences a été effectuée à l'aide de l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST). L'alignement multiple des séquences protéiques traduites sur SMS ORF Finder de 3 gènes *ErmC* a été fait sur ClustalW. Des analyses phylogénétiques et évolutives moléculaires ont été réalisées à l'aide de MEGA version 7 [9].

3. Résultats

3-1. Isolement

Au total trente souches de *Staphylococcus* ont été isolées dont 8 (26,66 %) souches communautaires et 22 (73,34 %) souches cliniques (**Figure 1**).

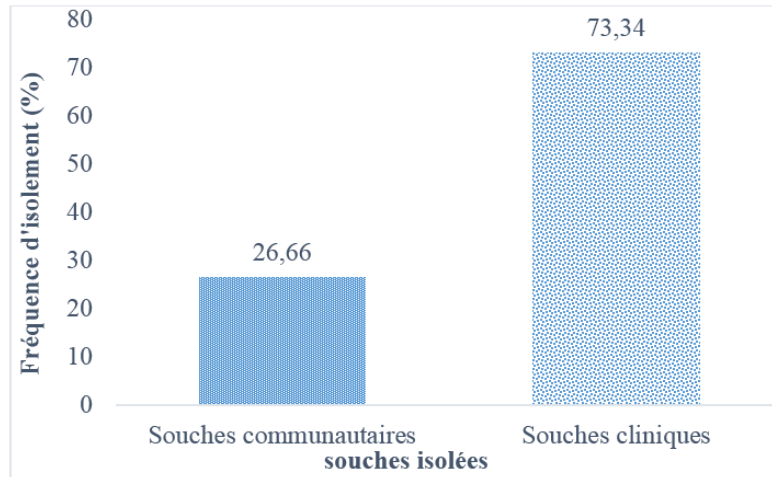


Figure 1 : Distribution des souches isolées

3-2. Identification

L'identification des souches communautaires nous a permis de compter 6 (75 %) *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) et 2 (25 %) *Staphylococcus à coagulase négative* (SCN) (Figure 2).

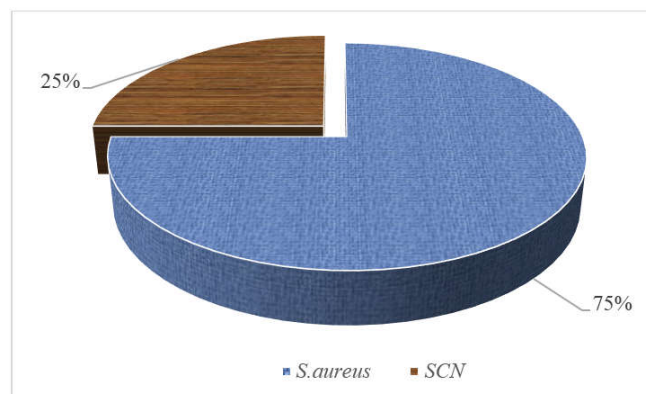


Figure 2 : Distribution des souches communautaires identifiées

Les souches cliniques ont été constituées de 11 (50 %) *Staphylococcus aureus* et 11 (50 %) *Staphylococcus à coagulase négative* (Figure 3).

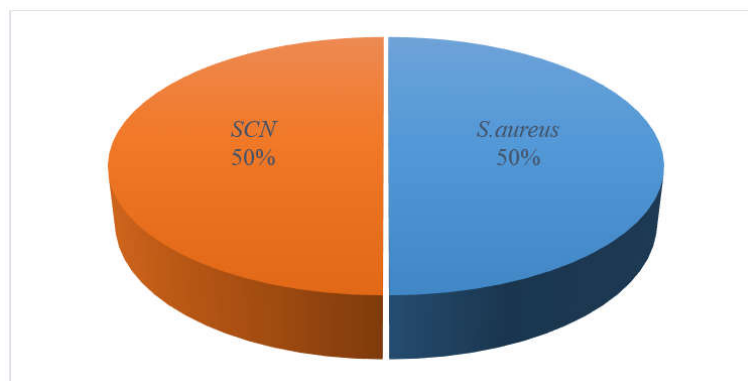


Figure 3 : Distribution des souches cliniques identifiées

3-3. Résultats phénotypiques

Le **Tableau 3** représente les taux de résistance des *Staphylococcus* communautaires et cliniques. Il ressort de l'analyse des résultats de ce tableau que les *S. aureus* communautaires ont été plus résistants à la fosfomycine et à l'oxacilline, en revanche, la kanamycine, la tobramycine, la norfloxacine et la ciprofloxacine ont été plus actives. Chez les *SCN*, la vancomycine et la pristinamycine ont conservé leur activité. Chez les *S. aureus* et *SCN* cliniques, la tobramycine a été la molécule la plus active de toutes les moléculaires testées avec un taux de résistance de 27,27 %. Par ailleurs, des taux de résistance élevés ont été observés pour les autres antibiotiques. Le phénotype de résistance inductible aux MLSB (iMLSB) a été rencontré chez tous les *S. aureus* communautaires, cliniques et chez les *SCN* cliniques. Une seule souche de *Staphylococcus à coagulase négative* communautaire a présenté une résistance constitutive (cMLSB) indépendante de l'érythromycine (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Taux de résistance chez *Staphylococcus* communautaires et cliniques

ATB testés	<i>Staphylococcus</i> communautaires		<i>Staphylococcus</i> cliniques	
	<i>S.aureus</i> communautaires (n=6) R (%)	<i>SCN</i> communautaires (n=2) R (%)	<i>S.aureus</i> Cliniques (n=11) R (%)	<i>SCN</i> cliniques (n=11) R (%)
P	2(33,34)	2(100)	10(90,90)	10(90,90)
OXA	6(100)	2(100)	11(100)	11(100)
CX	3(50)	2(100)	10(90,90)	9(81,81)
FF	6(100)	2(100)	8(72,23)	11(100)
VA	2(33,34)	0	7(63,63)	7(63,63)
K	1(16,67)	1(50)	8(77,72)	9(81,81)
TOB	1(16,67)	1(50)	3(27,27)	3(27,27)
CN	1(16,67)	2(100)	7(63,63)	8(72,23)
CIP	0	1(50)	5(45,46)	4(36,37)
NOR	1(16,67)	1(50)	5(45,46)	5(45,46)
E	3(100)	1(50)	10(90,90)	10(90,90)
DA	2(33,34)	2(100)	8(77,72)	6(54,54)
PT	2(33,34)	0	8(77,72)	5(45,46)
FA	3(50)	2(100)	5(45,46)	5(45,46)
RA	2(33,44)	1(50)	4(36,37)	4(36,37)

ATB = Antibiotiques ; n = nombre de souches ; R = Nombre des souches résistantes ; (%) = Pourcentage de résistance ; *S.aureus* = *Staphylococcus aureus* ; *SCN* = *Staphylococcus à coagulase négative* ; P = Pénicilline G ; OXA = oxacilline ; CX = céfoxitine ; VA = vancomycine ; FF = Fosfomycine ; K = Kanamycine ; TOB = tobramycine ; CN = Gentamycine ; CIP = ciprofloxacine ; NOR = Norfloxacine ; E = Érythromycine ; DA = Clindamycine ; PT = pristinamycine ; FA = acide fusidique ; RA = Rifampicine

3-4. Résultats génotypiques

Au total 24 ADN des souches résistantes aux macrolides seuls et/ou apparentés ont été extraits et analysés dont 4 (16,66 %) souches communautaires et 20 (83,34 %) souches cliniques. Les ADN des souches communautaires ont été constitués de 3 (75 %) ADN de *S. aureus* et 1 (25 %) ADN de souche de *SCN*. Les 20 ADN des souches cliniques ont été extraits chez 11 (55 %) *S.aureus* et 9 (45 %) *SCN*. Le gène ErmC a été identifié chez 8 (33,33 %) souches de *Staphylococcus* dont 5 (62,50 %) *S. aureus* et 3 (37,50 %) *SCN*. Une souche de *S. aureus* (souche 11) et 1 *SCN* communautaire ont été porteuses du gène ErmC (souche 12) (**Figure 4**). Les gènes ErmA et ErmB n'ont pas été identifiés chez les *Staphylococcus* communautaires et cliniques.

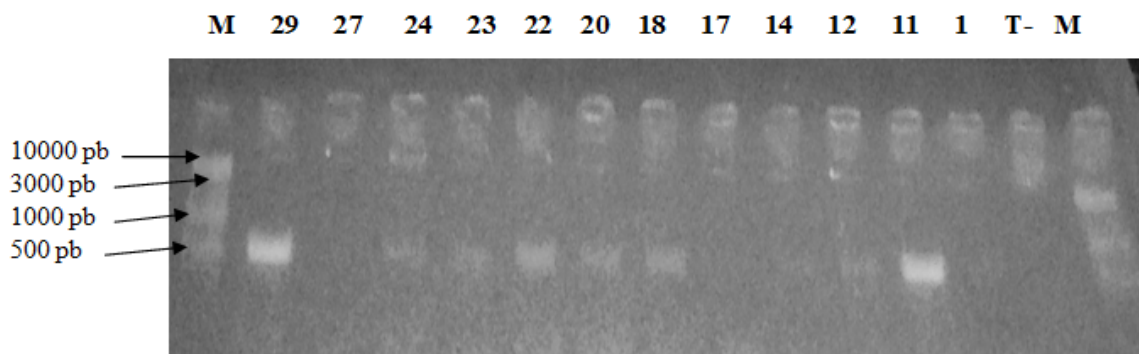


Figure 4 : Électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % d'amplicon PCR du gène *ErmC* obtenu avec l'ADN de souches de *Staphylococcus aureus* et de *SCN* communautaires et cliniques. M = marqueur labder DNA ; T = témoin négatif ; 11 = fragments de souche de *S.aureus* communautaire ; 12 = fragments de souche de *SCN* communautaires ; 22, 23 = fragments de souche de *SCN* cliniques ; 18, 20, 24, 29 = fragments de souche de *S. aureus* cliniques

3-5. Analyses bioinformatiques

La **Figure 5** représente l'alignement multiple de 3 séquences protéiques des gènes *ErmC* et de la séquence protéique du gène *ErmC* de référence téléchargée dans Genbank sur le numéro KT803897.1.

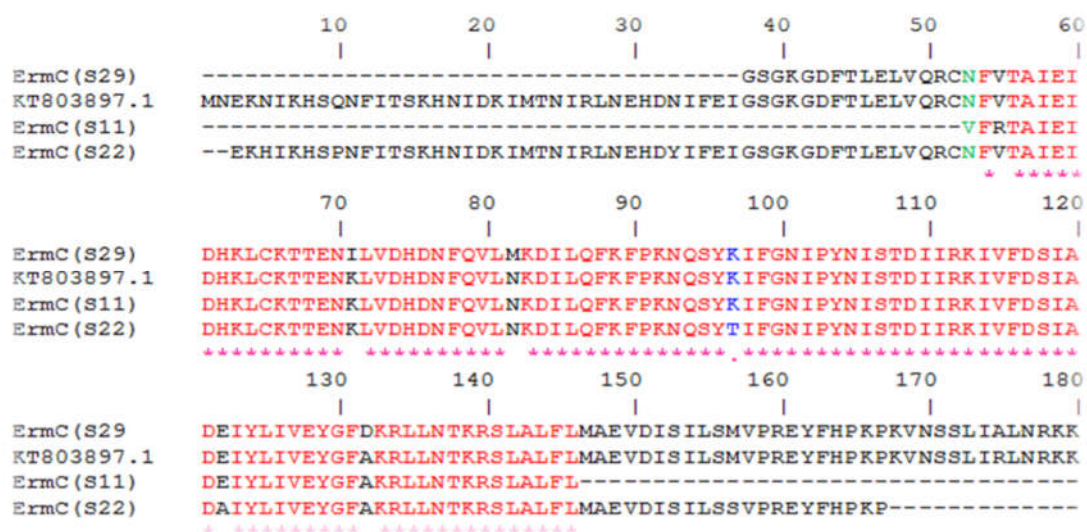


Figure 5 : Alignement multiple des séquences protéiques du gène *ErmC* sur clustalW

La **Figure 6** représente un dendrogramme évolutif des gènes *ErmC* entre 2 *Staphylococcus aureus* (S22 et S29) cliniques et 1 *SCN* communautaire (S11). Cette figure montre que la souche communautaire (S11) et les souches cliniques (S22 et S29) ont un ancêtre commun. Les autres types de gènes *Erm* sont considérés comme étant ceux du groupe extérieur.

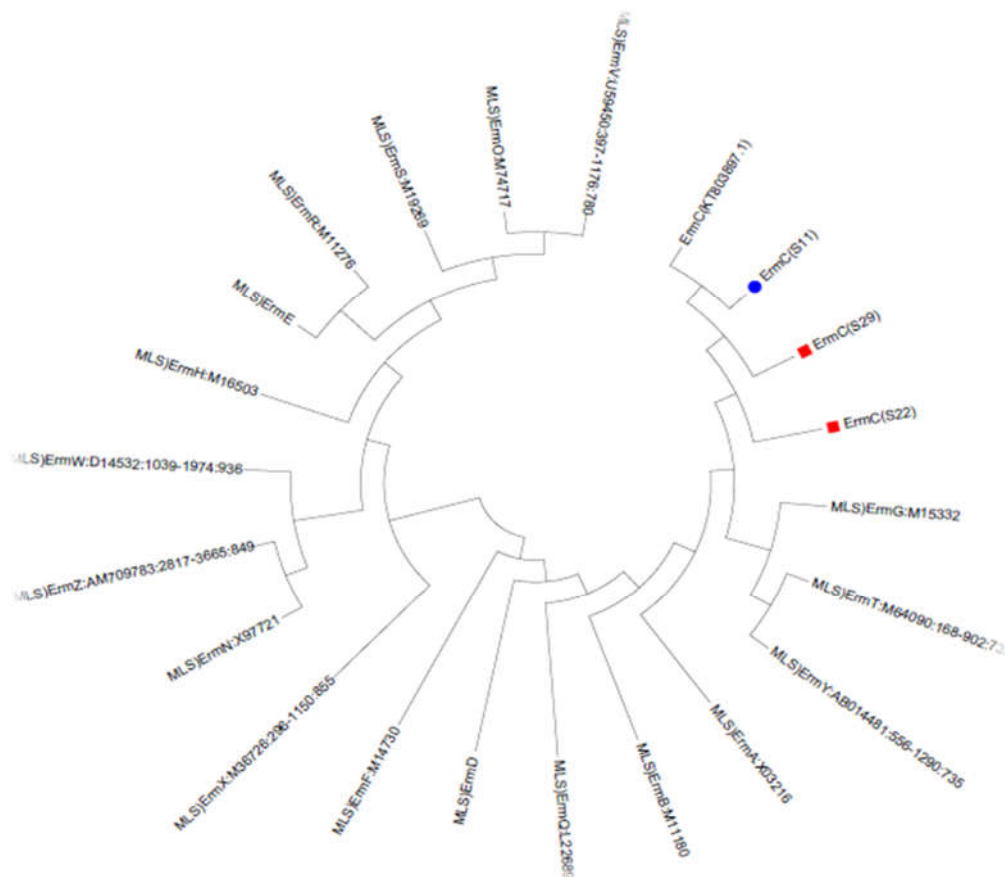


Figure 6 : Arbre phylogénétique évolutif des différents gènes *ErmC* et des groupes extérieurs

L'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode des jonctions voisines [10]. L'arbre optimal avec la somme de la longueur de la branche = 0,30445496 est présenté. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode de correction de Poisson [11] et sont exprimées en unités du nombre de substitutions d'acides aminés par site. Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 1060 positions dans le jeu de données final. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA7 [9].

4. Discussion

De notre étude, nous avons étudié la distribution des phénotypes de résistance et de trois déterminants de résistance aux MLSB. Nous avons détecté par PCR les gènes *ErmA*, *ErmB* et *ErmC* avec les amorces spécifiques dans les isolats de *Staphylococcus* communautaires et cliniques résistants à au moins l'un des antibiotiques MLSB. Les souches ont été testées à 15 antibiotiques appartenant à huit familles différentes. Toutes les 30 souches de *Staphylococcus* ont résisté à l'oxacilline (100 %). La céfoxitine a présenté des taux de résistance allant de 50 % à 100 %. Durant ces travaux, l'érythromycine et l'oxacilline ont présenté des fréquences de résistance 90,90 % et 100 % respectivement chez les souches *S. aureus* cliniques. Ces fréquences sont supérieures à celles rapportées par [12] 40 % et 25,7 % respectivement à l'érythromycine et à l'oxacilline et par [13] qui ont rapporté des taux de 71 % et 84 % à l'érythromycine et à l'oxacilline respectivement. Nous avons rapporté durant cette étude chez *S. aureus* cliniques des taux de résistance de 90,90 % à 77,72 % respectivement à l'érythromycine et à la clindamycine. Les taux inférieurs ont été rapportés par [8] 62,5 %

pour l'érythromycine et la clindamycine chez *S. aureus* cliniques. Les taux de résistance élevés à l'érythromycine et à l'oxacilline dans nos isolats peuvent s'expliquer par la fréquence élevée des prescriptions de l'érythromycine et de l'oxacilline dans le traitement de première intention des infections à *Staphylococcus* en médecine humaine et ambulatoire. Dans la présente étude la résistance aux MLSB a été inducible (iMLSB) chez tous les *S. aureus* communautaires et cliniques, de même que chez *SCN* cliniques (100 %). Une seule souche de *SCN* communautaire a présenté une résistance constitutive (cMLSB) (50 %) indépendante de l'érythromycine. Aucun phénotype MSB n'a été détecté. Chez *S. aureus* résistant à la méthicilline (*SARM*), seul le phénotype de résistance inducible iMLSB (100 %) a été rencontré. [18] ont rapporté une prédominance du phénotype de résistance constitutive aux MLSB (83 %) dans des isolats de *S. aureus* résistants à la méthicilline. Dans une étude similaire en Turquie, la prévalence des phénotypes iMLSB, cMLSB et MSB parmi les souches de *SARM* a été de 18 %, 23 % et 48 % respectivement. Une prévalence plus faible a été signalée pour les souches de *S. aureus* sensibles à la méthicilline (*MSSA*) 2 %, 3 % et 16 % [14]. En Iran, 20,45 % des isolats de *SARM* présentaient un phénotype de résistance iMLSB et la prévalence des phénotypes de résistance cMLSB et MSB était respectivement de 52,27 % et 15,91 % [15]. Une prévalence totale de 10,52 % a été signalée en Inde en 2011 pour le phénotype de résistance iMLSB dans les isolats de *SARM* [16].

Au Canada, la prévalence de la résistance inducible et constitutive à la clindamycine chez les isolats de *SARM* était de 64,7 % et 35,3 % respectivement, et de 90,4 % et 8,5 % respectivement dans les *MSSA* [17]. Pendant cette étude, aucune souche de *S. aureus* sensible à la méthicilline n'a présenté le phénotype iMLSB. En Iran, un taux de iMLSB de 4 % a été indiqué [15] chez *S. aureus* cliniques. La fréquence élevée du phénotype inducible dans nos isolats peut s'expliquer par l'utilisation abusive de l'érythromycine dans le traitement des infections à *Staphylococcus*. Dans cette étude, les isolats des *SARM* ont résisté à une vaste gamme d'antibiotiques. Des résultats similaires ont été obtenus par [19] qui travaillant sur les *SARM*, ont démontré que les *SARM* résistaient à une vaste gamme d'agents antimicrobiens, notamment les macrolides, les lincosamides, les fluoroquinolones, les tétracyclines, les aminosides et le chloramphénicol. Nous avons réalisées les études moléculaires par PCR pour la recherche des gènes ErmA, ErmB et ErmC codant la résistance aux MLSB sur 24 ADN extraits des souches de *Staphylococcus*. Les résultats de la PCR dans notre étude ont montré que le gène ErmC a été le seul déterminant génétique des trois recherchés parmi les isolats étudiés. Il a été identifié chez 8 (33,33 %) souches de *Staphylococcus* dont 5 (62,50 %) *S. aureus* et 3 (37,50 %) *SCN*. Parmi les souches ErmC positives on trouve une souche de *S. aureus* et une souche *SCN* communautaires. Toutes les souches ErmC positives ont présenté le phénotype iMLSB.

Les travaux menés par [20] ont rapporté une fréquence du phénotype iMLSB supérieure à celle du phénotype cMLSB. De même, [8] ont rapporté une fréquence du phénotype iMLSB (26,5 %) supérieure à la fréquence du phénotype cMLSB (4,18 %). Des résultats similaires ont été rapportés par [29,30]. En revanche, nos résultats concernant la prédominance du phénotype iMLSB diffèrent de ceux trouvés par [31] qui ont rapportés une fréquence du phénotype cMLSB supérieure à la fréquence du phénotype iMLSB. Le gène ErmC a été détecté chez *S. aureus* et *SCN*. Ce gène a été détecté dans plusieurs pays [1, 12, 13, 21, 32]. Les travaux menés par [1, 12, 13, 21, 32] ont révélé l'implication du gène ErmC dans la résistance aux MLSB chez *S. aureus* et de *SCN* cliniques. D'autres types de gènes Erm (ErmA et ErmB) et une pompe d'efflux *msr A* ont été également détectés dans leurs isolats. [22] ont montré la présence du gène ErmC ou ErmA dans 98 % des cas chez *S. aureus* résistant à l'érythromycine isolés en clinique. Nous avons réalisées les PCR en utilisant les amorces décrites dans la littérature par [7, 8]. Nos résultats sont similaires pour le gène ErmC (570pb) à ceux rapportés par [7, 8] bien que d'autres types de gènes Erm (ErmA et ErmB) n'ont pas été détectés. Durant notre étude, 4 (36,36 %) souches de *S. aureus* cliniques et 1 (100 %) souche de *S. aureus* communautaire ont porté le gène ErmC. [26] en Turquie ont rapporté des fréquences de 62 % et 17 % respectivement pour les gènes ErmA et ErmC dans les isolats de *S. aureus*. [24] à Téhéran ont signalé que 60,3 % et 54,8 % des gènes appartenaient à ErmA et

à ErmC respectivement dans les souches de *S. aureus*. [25] ont signalé que dans 45 isolats de *S. aureus*, seulement 1 isolat contenait le gène ErmB. Les études menées par [1, 21] ont montré l'implication des gènes ErmA et ErmC chez *S. aureus*. Par contre [13] ont démontré que ErmA et ErmB ont été impliqués dans la résistance des *S. aureus* cliniques aux MLSB. L'analyse des souches danoises isolées de 1959 à 1988 a montré que les gènes ErmA et ErmC ont été responsables de la résistance à l'érythromycine chez 98% des 428 isolats de *S. aureus* [19]. [22] ont montré que le gène ErmA fait parti du transposon Tn554 dans le chromosome, le gène ErmB se trouve sur le transposon Tn551 d'un plasmide portant le gène de la pénicillinase, alors que le gène ErmC se trouve sur les petits plasmides [19]. Le gène ErmC est responsable de la résistance constitutive ou inducible à l'érythromycine et est généralement situé sur de petits plasmides [22]. La fréquence de détection élevée de ErmC dans nos isolats pourrait être justifiée par la facilité que possèdent les plasmides à se mouvoir d'une cellule à une autre. Les résultats de nos analyses bioinformatiques montrent que le gène ErmC de la souche communautaire S11 possède plusieurs acides aminés identiques et des régions conservées en comparaison avec la séquence de référence contrairement aux gènes ErmC des souches cliniques. Les taux de mutation élevés observés dans les gènes issus des souches cliniques peuvent s'expliquer par la pression de sélection de l'antibiothérapie due à l'utilisation abusive des antibiotiques en milieu hospitalier.

Le gène ErmC code pour une méthyltransférase (MTase) transfère les groupes méthyle de S-adénosyl-L-méthionine à l'atome N6 d'une adénine base dans la peptidyltransférase boucle de l'ARNr 23S conférant ainsi une résistance aux antibiotiques contre un certain nombre d'antibiotiques macrolides [27]. Les MTases sont des enzymes qui méthylent une grande variété de substrats utilisant la S-adénosyl-L-méthionine (SAM ou AdoMet) comme donneur de méthyle universel et libérant de la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH ou AdoHcys) en tant que produit de réaction [27, 28]. L'alignement des séquences protéiques sur ClustalW montre plusieurs régions conservées (**Figure 5**). Cependant, quelques mutations non conservatives ont été observées sur nos séquences. Dans la séquence protéique de la souche S11 l'asparagine(Asn53) a été remplacée par la valine (Val53) ; en position 55, la valine a été remplacée par l'arginine (Arg). Au niveau de la séquence de la souche S22, en position 96 la lysine (acide aminé basique) a été remplacée par la thréonine (acide aminé hydroxylé). L'acide glutamique (Glu122) a été remplacé par l'alanine (Ala122). Et enfin, dans la séquence protéique de la souche S29 l'asparagine (Asn82) a été remplacée par la méthionine(Met), l'alanine a été remplacée par l'acide aspartique (Asp132). Toutes les mutations n'ont pas affecté le site catalytique N101IPY104. La séquence FHPKPKVNS forme une boucle sur ErmC, elle se bloque sur le site actif et sera appelée «boucle de liaison à l'adénine» [28]. Celle-ci forme une caractéristique arquée de premier plan sur le domaine catalytique comprenant des résidus immédiatement après Val158 (Pro159-Val169) [28].

5. Conclusion

La présente étude a permis d'analyser la distribution des phénotypes et des gènes de résistance (ErmA, ErmB et ErmC) aux MLSB dans des souches de *Staphylococcus* isolées dans la communauté et à l'hôpital ; ceci afin de tenter d'expliquer les causes des échecs thérapeutiques. Les résultats montrent que la vancomycine, la ciprofloxacine, la norfloxacine et la pristinaamycine ont été plus actives chez *Staphylococcus* communautaires. La tobramycine a été la molécule la plus active sur les *Staphylococcus* cliniques. Le phénotype inducible (iMLSb) a été prédominant. Le gène ErmC est le seul déterminant génétique de trois recherchés qui a été obtenu ; il code pour la résistance aux MLSB. L'érythromycine, encore moins la clindamycine ne sont pas appropriés pour traiter les infections à *Staphylococcus*. La détection du gène ErmC chez les souches communautaires et cliniques souligne une dissémination des souches cliniques ou des gènes de résistance vers la communauté et est en partie responsable des échecs thérapeutiques.

Références

- [1] - M. MOOSAVIAN, S. SHOJA, S. ROSTAMI, M.TORABIPOUR and Z. FARSHADZADEH, "Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to *erm* genes, Iran", *Iran J. Microbiol*, 6 (6) (2014) 421 - 427
- [2] - J. S. VIVEK, G. N. RAJESH, S. MUKESH, K. MANPREET, K. MANPREET and R. N. MISRA, " Prevalence of inducible clindamycin resistance among community- and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary care hospital in India ", *Biomed. Res.*, 22 (2011) 465 - 9
- [3] - X. LIU, S. DENG, J. HUANG, Y. HUANG, Y. ZHANG, Q. YAN, Y. WANG, Y. LI, C. SUN 1 and X. JIA, "Dissémination des macrolides, de l'acide fusidique et de la résistance à la mupirocine parmi les isolats cliniques de *Staphylococcus aureus*", *Oncotarget*, 8 (2017) 58086 - 58097
- [4] - M. J. ELLINGTON, S. REUTER, S. R. HARRIS, M. T. HOLDEN, E. J. CARTWRIGHT, D. GREAVES, S. M. GERVER, R. HOPE, N. M. MARRON, M. E. TOROK, J. J. PARKHILL, C. U. KOSER et S. J. PEACOCK, "Cassettes de résistance aux antimicrobiens émergentes et évolutives dans l'acide fusidique associé à la communauté et le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline", *Int. J. Agents antimicrobiens*, (2015) 45 - 4
- [5] - G. PRATS, B. MIRELIS, T. LLOVET, C. MUNOZ, E. MIRO and F. NAVARRO, " Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona ", *Antimicrob Agents Chemother*, 44 (2000) 1140 - 1145
- [6] - G. CARRET, J. D. CAVALLO, H. CHARDON, C. CHIDIAC, P. CHOUTET, P. COURVALLIN, H. DABERNAT, H. DRUGEON, L. DUBREUIL, F. GOLSTEIN, V. JARLIER, R. LECLERCQ, M. H. N. CHANOINE, A. PHILIPPON, C. QUENTIN, B. ROUVEIX, J. SIROT et C. J. SOUSSY, " Communiqué du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie ", (2001) 47 p.
- [7] - H. S. LIM, H. LEE, K. H. ROH, J. H. YUM, D. YONG, K. LEE and C. YUNSOP, " Prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococcal isolates at a Korean tertiary care hospital ", *J.Med. Yonsei.*, 47 (2006) 480 - 4
- [8] - G. FAHIMEH, G. HASAN, H. ROHOLLA, J. M. SAEID, K. FARZAD, H. LEILA, S. MOJTABA and H. S. ASGHAR, " Distribution of *erm* genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran ", *Adv. Biomed. Res.*, 5 (2016) 62
- [9] - S. KUMAR, G. STECHER et K. TAMURA, " MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 pour des bases de données plus grandes ", *Biologie moléculaire et évolution*, 33 (2016) 1870 - 1874
- [10] - N. SAITOU and M NEI, " La méthode de jonction entre voisins : une nouvelle méthode pour reconstruire les arbres génétiques ", *Biologie moléculaire et évolution*, 4 (1987) 406 - 425
- [11] - E. ZUCKERKANDL and L. PAULING, "Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H. J. Vogel, 97-166", *Academic Press*, New York, (1965)
- [12] - T. ZMANTAR, K. CHAIED, B. B. ABDALLAH, A. N. B KAHLA, A. B. HASSENC, K. MAHDOUANI et A. BAKHROUF, " Détection par PCR multiplex des gènes de résistance aux antibiotiques chez des souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'infections auriculaires ", *Folia microbial*, 53 (4) (2008) 357 - 362
- [13] - T. ZMANTAR, B. KOUIDHI, H. MILADI et A. BAKHROUF, " Détection des gènes de résistance aux macrolides et aux désinfectants dans les *staphylocoques aureus* cliniques et les *staphylocoques à coagulase négative*", *BMC. Res. Notes*, 4 (2011) 453
- [14] - D. DEBDAS and S. JOSHI, "Incidence of clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*", *J. Infect. Dev. Ctries*, 5 (2011) 316 - 317
- [15] - N. SEIFI, N. KAHANI, E. ASKARI, S. MAHDIPOUR and N. M. NADERI, "Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran", *Iran J. Microbiol.*, 4 (2) (2012) 82 - 86
- [16] - K. PRABHU, S. RAO and V. RAO, "Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples", *J. Lab. Physicians*, 3 (2011) 25 - 7

- [17] - S. A. KHAN and R. P. NOVICK, "Terminal nucleotide sequences of Tn551, a transposon specifying erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: homology with Tn3", *Plasmid*, 4 (1980) 148 - 154
- [18] - G. LINA, A. QUAGLIA, M. E. REVERDY, R. LECLERCQ, F. VANDENESCH and J. ETIENNE, "Distribution des gènes codant la résistance aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines chez les staphylocoques", *Antimicrob Agents Chemother*, 43 (5) (1999) 1062 - 1066
- [19] - N. ARDIC, M. OZYURT, B. S. YUPOGLU and T. H. DAROGLU, "Investigation of erythromycin and tetracycline resistance gene in methicillin-resistant staphylococci", *J. Int. Agents Antimicrob*, 26 (2005) 213 - 218
- [20] - S. P. REDDY and R. SURESH, "Phenotypic detection of inducible clindamycin resistance among the clinical isolates of *Staphylococcus aureus* by using the lower limit of inter disk space". *J. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 2 (2005) 258 - 64
- [21] - N. DURAN, B. OZER, G. G. DURAN, Y. ONLEN and C. DEMIR, "Gènes de résistance aux antibiotiques et profils de sensibilité chez les staphylocoques", *Indian J. Med. Res.*, 135 (3) (2012) 389 - 396
- [22] - H. WESTH, D. M. HOUGAARD, J. VUUST and V. T. ROSDAHL, "Erm genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci", *APMIS*, 103 (1995) 225 - 232
- [23] - C. Y. GUSHIKEN, L. B. MEDEIROS, B. P. CORREIA, J. M. SOUZA, D. V. MORIS, V. C. PEREIRA, R. GIUFFRIDA et M.V. RODRIGUES, "Transport nasal de *Staphylococcus aureus* résistant dans une communauté d'étudiants en médecine", *Un. Acad. Bras. Cienc.*, 88 (2016) 1501 - 1509
- [24] - H. SADERI, B. EMADI and P. OWLIA, "Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS_B) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran", *Med. Sci. Monit.*, 17 (2011) 48 - 53
- [25] - L. V. COUTINHO, R. M. PAIVA, K. C. REITER, F. D. PARIS, A. L. BARTH and A. B. MACHADO, "Distribution of erm genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates", *Braz.J. Infect. Dis.*, 14 (2010) 564 - 568
- [26] - E. S. CETIN, H. GUNES, S. KAYA, B. C. ARIDOGAN and M. DEMIRCI, "Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital", *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 43 (2010) 524 - 529
- [27] - R. SKINNER, E. CUNLIFFE and F. J. SCHMIDT, *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 12702 - 12706
- [28] - E. D. BUSSIERE, S. W. MUCHMORE, C. G. DEALWIS, G. SCHLUCKEBIER, V. NIENABER, R. P. EDALJI, K. A. WALTER, U. S. LADROR, T. F. HOLZMAN and C. A. ZAPATERO, "Crystal Structure of ErmC, an rRNA Methyltransferase Which mediates antibiotic resistance in bacteria", *Biochemistry*, 37 (1998) 7103 - 7112
- [29] - M. MEMARIANI, M. R. POURMAND, M. H. SHIRAZI, M. M. S. DALLAL, Z. ABDOLSAMADI and N. MARDANI, "The importance of inducible clindamycin resistance in enterotoxin positive *S. aureus* isolated from clinical samples", *Tehran. Univ. Med. J.*, 67 (2009) 250 - 6
- [30] - C. B. MAHESH, B. K. RAMAKANT and V. S. JAGADEESH, "The prevalence of inducible and constitutive clindamycin resistance among the nasal isolates of staphylococci", *J. Clin. Diagn. Res.*, 7 (2013) 1620 - 2
- [31] - M. ASLANIMEHR, R. YAGHOBFAR and A. PEYMANI, "Detection of MLSB phenotypes and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in-patients of Qazvin and Tehran teaching hospitals", *J. Qazvin. Univ. Med. Sci.*, 18 (2014) 30 - 6