



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

Résistance aux antibiotiques et identification des sérotypes circulants des souches de *Streptococcus pneumoniae*

Présenté et soutenu par : CHAABNA Sara

Le : 20/06/2016

NINI Fatima Zohra

Jury d'évaluation :

Président du jury : OULMI Lamia (MCB – UFM Constantine).

Rapporteur : HECINI Abla (MCB – F. Med Constantine 3).

Examineur : BOUZERAIB Latifa (MAA – UFM Constantine).

Année universitaire
2015 - 2016

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des annexes

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumés

Page

Introduction.....1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités.....4

1.1 Historique et dénomination4

1.2 Classification4

1.3 Habitat4

1.4 Epidémiologie5

1.4.1 Réservoir5

1.4.2 Transmission5

1.4.3 Facteurs favorisants.....5

1.4.4 Epidémiologie descriptive5

1.5 Caractères bactériologiques6

1.5.1 Caractères morphologiques.....6

1.5.2 Caractères cultureux7

1.5.3 Caractères biochimiques8

1.5.4 Aspect génétique.....	9
1.6 Identification.....	9
1.6.1 Identification par méthodes conventionnelles	10
1.6.2 Identification par méthodes moléculaires.....	11
2. Facteurs de pathogénicité, pouvoir pathogène et physiopathologie.....	11
2.1 Principaux facteurs de pathogénicité.....	11
2.1.1 Polysaccharides capsulaires.....	12
2.1.2 Paroi bactérienne	13
2.1.3 Protéines pneumococciques	13
2.1.4 Pili.....	13
2.2 Pouvoir pathogène.....	14
2.3 Physiopathologie.....	15
3. Résistance de <i>S. pneumoniae</i> aux antibiotiques	16
3.1 Historique et épidémiologie de la résistance	16
3.2 Mécanismes de résistance.....	17
3.2.1 Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines	17
3.2.2 Mécanismes de résistance aux macrolides	17
3.2.3 Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones.....	18
3.2.4 Mécanismes de résistance aux autres antibiotiques.....	18
4. Sérotypes.....	20
4.1 Classification des sérotypes.....	20
4.2 Distribution des sérotypes.....	21
5. Vaccins antipneumococciques.....	21
5.1 Le vaccin polysidique 23- valent.....	21
5.2 Le vaccin heptavalent conjugué PCV7.....	22
6. Traitement.....	22

MATERIEL ET METHODES

1. Lieu et durée du travail	23
2. Origine des souches.....	23
3. Conservation	24
4. Isolement et culture.....	24
5. Identification des souches par les méthodes conventionnelle	25
5.1 Examen macroscopique.....	26
5.2 Examen microscopique après Coloration de Gram.....	26
5.3 Test de la catalase	26
5.4 Test de lyse par les sels biliaires.....	26
5.5 Test de sensibilité à l'optochine.....	27
6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	27
6.1 Antibiogramme standard	27
6.2 Détection de la résistance aux bêta-lactamines.....	29
6.3 Détection des souches de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones	29
6.4 Test de caractérisation des phénotypes de résistance aux macrolides.....	30
7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des bêta -lactamines (CMI).....	30
7.1 Détermination de la CMI par E-test.....	30
7.2 Technique de dilution en gélose.....	32
8. Sérotypage.....	35

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Identification.....	36
1.1 Examen macroscopique des colonies	36
1.2 Examen Microscopique après coloration de Gram.....	36
1.3 Résultats de l'identification par méthodes phénotypiques.....	37

2. Profil épidémiologique.....	38
2.1 Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon la saison.....	38
2.2 Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon la nature du prélèvement.....	39
2.3 Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon le sexe.....	40
2.4 Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon le service clinique.....	41
2.5 Fréquence des infections à <i>S.pneumoniae</i> en fonction de la nature de l'infection et de l'âge.....	42
3. Résistance aux antibiotiques.....	44
3.1 Résistance à la pénicilline.....	44
3.2 Résistance aux autres bêta-lactamines.....	46
3.3 Résistance aux macrolides et apparentés.....	48
3.4 Résistances aux autres antibiotiques.....	49
3.4.1 Résistance aux fluoroquinolones.....	50
3.4.2 Résistance à la vancomycine et à la rifampicine.....	51
3.4.3 Résistance à la tétracycline et au cotrimoxazole.....	51
3.4.4 Résistance au chloramphénicol.....	51
3.5 Résistance associée et multirésistance.....	52
4. <i>S.pneumoniae</i> et sérotypes.....	54
4.1 Résultats du sérotypage par le test d'agglutination au latex.....	54
4.2 Distribution globale des sérotypes.....	54
4.3 Distribution des sérotypes en fonction de l'âge.....	56
4.4 Distribution des sérotypes en fonction de l'infection.....	57
4.5 Relation sérotype – résistance et fréquence des sérotypes des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline.....	59
4.6 Sérotypes et multirésistance.....	60
5. Sérotypes et couverture vaccinale.....	61

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65
ANNEXES	

Remerciements

Au Nom de Dieu, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux

Nous remercions Dieu Le Généreux, Le Tout Puissant qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et qui nous a honoré d'être parmi ceux qui savent lire et écrire, Dieu merci de nous avoir donné le courage et la patience pour achever ce travail.

C'est avec sincérité que nous remercions notre encadreur Mme HECINI-HANNACHI. A, qui nous a honorées en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans l'encadrement de ce mémoire. Merci Madame d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, veuillez trouver ici toutes les expressions de notre profonde gratitude et nos sentiments de respect.

Nous remercions vivement ceux qui nous ont fait l'honneur de leur présence et qui ont sacrifié leur temps pour juger ce travail.

Nous tenons à remercier Mme OULMI. L, pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

A Mme BOUZERAIB. L, qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury et d'examiner notre travail, merci pour le temps que vous y avez consacré

Nous voudrions présenter nos remerciements et notre gratitude au chef de service de Microbiologie du CHU de Constantine Mr Benlabed. K pour nous avoir accueilli dans son laboratoire.

A Mme Bentchouala .C professeur au service de Microbiologie du CHU de Constantine pour son soutien dans la réalisation de la partie pratique.

Nous tenons à adresser un immense merci au Doctorant Dib. M qui nous a beaucoup aidées et soutenues.

A tous nos enseignants du département de Microbiologie, qui nous ont transmis le goût de l'étude.

A toute l'équipe du service de Microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire Benbadis de Constantine : Karima, Salwa, Hanifa...aussi Yasmine, Hadjer, Leila ...Merci chaleureusement pour l'ambiance et surtout pour vos conseils.

~ Dédicaces ~

Je dédie ce mémoire à :

Ma très chère Maman « Fatiha » ma source de vie, de force, de joie...Toi Maman qui a fait de moi la Femme que je suis aujourd'hui, vraiment je ne trouve pas comment exprimer mes sentiments envers Toi.

Mon très cher Papa « Hacéne », merci pour ton soutien permanent dans mes études et dans ma vie, ta confiance en moi, tes encouragements et ton amour, que Dieu vous garde et vous accorde une longue vie insh'ALLAH.

Mon très cher frère « Chouaib » et sa femme « Sara » merci infiniment pour vos encouragements et pour tout ce que vous faites pour moi.

Ma très chère sœur « Halima » et son mari « Hamza », ma sœur tu es vraiment un cadeau pour moi dans ce bas monde, ta valeur est inestimable, je te dis merci pour ton amour inconditionnel.

Mes chers « Seif-Eddine » et « Abd-Rahime » je vous aime beaucoup, vous êtes adorables.

Mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidée ; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Mes amies, je ne vous oublierai jamais : Meriem, Hayet, Manel, Manar, Khadidja, Assia « la physicienne », Bassoum, Khoukha, Yousra, Assita ... nous avons vécu des moments superbes, merci pour vos blagues, anecdotes et les jolies « lammet » qui m'ont fait rire, elles vont beaucoup me manquer.

Toutes les personnes qui m'ont soutenue et assistée, durant toute ma vie et dont je n'ai pas pu citer les noms.

Sara.

Dédicaces

Tout d'abord, louange à Allah qui m'a guidée sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspirée les bons pas et les justes reflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Je dédie ce mémoire

A **ma très chère mère** qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, qui m'a soutenue durant toute ma vie, qui m'a aidée durant mes années d'étude, pour son amour infini et sa bienveillance jour et nuit. Je souhaite prouver mon grand remerciement qui ne sera jamais suffisant à elle que j'espère rendre fière par ce travail.

A **mon père**, ce travail est le fruit de ses sacrifices pour mon éducation et ma formation.

A ma précieuse sœur Soumia et mes chers frères **Badr-Eldin, Zakaria, El-Hadi, Kamel** ainsi que son épouse **Chamss-Elhouda** et sa fille **Roudayna**.

A ma tante **Nadia** et ma cousine **Karima**.

A mes chères amis **Aziza** et **Hillel**, votre amitié est un honneur et une fierté pour moi. Vos encouragements m'ont toujours été d'un grand secours.

A mon binôme **Sara**.

A toute personne m'ayant aidé de près et de loin.

Que dieu leur accorde santé, bonheur et succès.

❁ *Fatima Zohra* ❁

Liste des abréviations

• ADH	Arginine di-hydrolase
• ADN	Acide Désoxyribonucléique
• AMI	Amidon
• ARA	Arabinose
• ARN	Acide ribonucléique
• ATB	Antibiotique
• ATCC	American Type Collection Culture
• BHS	Bouillon hypersalé
• C	Cytosine
• CASFM	Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
• CbpA	Choline-binding proteins A
• CHU	Centre hospitalier universitaire
• CIE	Contre-immuno-électrophorèse
• CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
• CMI	Concentrations minimales inhibitrices
• CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
• COA	Coagglutination
• DA	Clindamycine
• ENS	Enquête Nationale de Santé
• ERY	Erythromycine
• ESC	Esculine
• G	Guanine
• GLY	Glycérol
• H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
• I	Intermédiaire
• IIN	Infection invasive
• INI	Infection non invasive
• INSP	Institut national de santé publique
• INU	Inuline
• Kb	Kilo base
• KDa	Kilo Daltons
• LAC	Lactose
• LCR	Liquide céphalo-rachidien
• MAN	Mannitol
• Mb	Mégabase
• MH	Mueller-Hinton
• MLS_B	Macrolides, lincosamides et streptogramines B
• MLST	Multi-Locus Sequence Typing
• OMS	Organisation Mondiale de la Santé
• ORL	Oto-rhino-laryngologie

• OXA	Oxacilline
• PCV	Pneumococcal Vaccine
• PEN	Pénicilline
• PG	Peptidoglycane
• pH	Potentiel hydrogène
• PLP	Protéines liant la pénicilline
• PSDP	Pneumocoques de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline G
• PspA	Pneumococcal surface protein A
• R	Résistant
• RAF	Raffinose
• RIB	Ribose
• RNM	Reanimation
• S	Sensible
• SM	Solution mère
• SOR	Sorbitol
• SOS	Sorbose
• SXT	Cotrimoxazole
• TA	Teichoïc acid
• TET	Tétracyclines
• Tn	Transposon
• UFC	Unités Formant Colonie
• USA	United States of America
• VA	vancomycine
• VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
• VP	Réaction de Voges-Proskauer
• WHO	World Health Organization

Liste des annexes

Annexe 1. Milieux de culture

Annexe 2. Réactifs utilisés

Annexe 3. Tableau 4. Fiche de Renseignements du malade

Annexe 4. Coloration de Gram

Annexe 5. Tableau 5. Antibiotiques testés et critères d'interprétations des diamètres d'inhibition pour *S.pneumoniae* selon les normes du CLSI 2007

Annexe 6. Tableau 9. Distribution en échiquier de 90 sérotypes de *S.pneumoniae* selon les pools (A-I) et les pools (P-T)

Annexe 7. Figure 12. Sensibilité à l'optochine

Annexe 8. Figure 13. Résultat de test de la solubilité dans les sels biliaries

Annexe 9. Figure 20 & 21. Résultats des concentrations minimales inhibitrices par la technique du E-test

Annexe 10. Tableau 19. Résultats qualitatifs de l'antibiogramme

Annexe 11. Figure 25. Sérotypage par le test d'agglutination

Liste des figures

	Pages
Figure 1. Aspect microscopique de <i>S. pneumoniae</i> sous microscope après coloration de Gram.....	7
Figure 2. Aspect macroscopique de <i>S.pneumoniae</i> avec une hémolyse de type α sur gélose au sang.....	8
Figure 3. Représentation schématique des principaux facteurs de virulence du pneumocoque.....	12
Figure 4. Structure de la capsule polysacharridique de la souche TIGR4 de <i>S.pneumoniae</i>	12
Figure 5. Expérience de Griffith.....	14
Figure 6. Pouvoir pathogène.....	15
Figure 7. Produits pathologiques utilisés.....	24
Figure 8. Conservation des souches de <i>S.pneumoniae</i> sur gélose inclinée au sang	24
Figure 9. Schéma récapitulatif de l'identification de <i>S.pneumoniae</i>	25
Figure 10. Suspensions bactériennes des souches à tester.....	28
Figure 11. Photographie de l'aspect macroscopique de <i>S.pneumoniae</i> sur gélose au sang après incubation à 37°C pendant 24h.....	36
Figure 14. Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon la nature du prélèvement.....	39
Figure 15. Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon le sexe.....	40
Figure 16. Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon le service clinique.....	41
Figure 17. Fréquence des infections à <i>S. pneumoniae</i> en fonction de la nature de l'infection et de l'âge.....	43

Figure 18. Résultat du test de screening par l'oxacilline après incubation à 37°C pendant 24h.....	44
Figure 19. Distribution des souches de <i>S.pneumoniae</i> en fonction de leurs CMI de Pénicilline, Céfotaxime et Amoxicilline.....	46
Figure 22. Phénotypes de résistance aux macrolides MLS _B	49
Figure 23. Répartition de la résistance de 11 souches de <i>S.pneumoniae</i> à 11 antibiotiques.....	50
Figure 24. Résistance associée et multirésistance de <i>S.pneumoniae</i>	52
Figure 26. Distribution des sérotypes des 11 souches de <i>S.pneumoniae</i>	55
Figure 27. Sérotypes et multirésistance.....	60

Liste des tableaux

	Pages
Tableau 1. Caractères biochimiques de <i>S. pneumoniae</i>	8
Tableau 2. Classification danoise des 90 sérotypes de <i>S. pneumoniae</i>	20
Tableau 3. Sérotypes contenus dans les vaccins antipneumococciques.....	22
Tableau 6. Bandes E-Test et gradients de concentration.....	31
Tableau 7. Critères d'interprétation des CMI de <i>Streptococcus pneumoniae</i> selon les normes du CLSI 2007 (CLSI, 2007).....	32
Tableau 8. Schéma des dilutions d'antibiotique pour la CMI à la pénicilline.....	33
Tableau 10. Résultat de l'identification par les méthodes conventionnelles.....	37
Tableau 11. Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> en fonction des mois.....	38
Tableau 12. Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon la nature du prélèvement.....	39
Tableau 13. Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon le sexe.....	40
Tableau 14. Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> selon le service clinique.....	41
Tableau 15. Fréquence des infections à <i>S.pneumoniae</i> en fonction de la nature de l'infection et de l'âge.....	42
Tableau 16. Valeurs des diamètres d'OXA obtenus avec les valeurs de CMI pour la pénicilline.....	44
Tableau 17. Distribution des souches de <i>S.pneumoniae</i> en fonction de leurs CMI de Pénicilline, Céfotaxime et Amoxicilline.....	46
Tableau 18. Description des souches PSDP.....	47
Tableau 20. Résistance de <i>S.pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	49
Tableau 21. Résistance associée et multi-résistance de <i>S.pneumoniae</i>	52

Tableau 22. Distribution globale des sérotypes.....	54
Tableau 23. Distribution des sérotypes en fonction de l'âge.....	56
Tableau 24. Distribution des sérotypes en fonction de l'infection.....	57
Tableau 25. Fréquence des sérotypes des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline....	59
Tableau 26. Sérotypes et multirésistance.....	60
Tableau 27. Couverture vaccinale (n°, %) théorique des vaccins conjugués 7-valent (PCV7) et 13-valent (PCV13) chez l'enfant et du vaccin polysaccharidique 23-valent (Pn-23v) chez l'adulte.....	61

Résumé

Streptococcus pneumoniae constitue, à ce jour, la deuxième cause de mortalité d'origine bactérienne dans le monde surtout chez l'enfant et les personnes âgées. En 2005, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que 1,6 millions de personnes meurent chaque année d'infections pneumococciques.

Streptococcus pneumoniae est naturellement sensible à la plupart des antibiotiques notamment aux bêta-lactamines, mais la résistance aux antibiotiques est en nette augmentation dans notre pays. L'émergence et la propagation des souches multi résistantes a engendré des échecs thérapeutiques. La gravité des infections à pneumocoque est liée à sa virulence, essentiellement à la présence d'une capsule polysaccharidique qui détermine actuellement plus de 93 sérotypes. Les infections à *Streptococcus pneumoniae* sont peu documentées en Algérie.

Notre travail a donc pour objectifs :

- L'identification des souches de *S.pneumoniae* par différentes méthodes phénotypiques
- L'étude des caractéristiques épidémiologiques des souches de *S.pneumoniae*
- L'étude de la résistance des pneumocoques aux principaux antibiotiques actifs : les bêta-lactamines, et d'autres antibiotiques tels que les macrolides et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des bêta-lactamines.
- Le sérotypage des pneumocoques

Notre étude est menée au niveau du service de microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine sur une période de trois mois (du 19/01/2016 au 19/04/2016).

Onze souches sont isolées et identifiées, le test à l'optochine reste le teste fiable comme méthode conventionnelle pour l'identification de *S.pneumoniae* (100% de sensibilité).

Parmi les 11 souches étudiées, toutes (100%) présentent une sensibilité diminuée à la pénicilline dont 45,45% sont résistantes (CMI entre 2-4µg/ml). Les taux de résistance aux autres antibiotiques sont de 63,63%, 54,54%, 45,45%, 27,27% et 9,09% pour la tétracycline, l'érythromycine, le cotrimoxazole, le chloramphénicol et la ciprofloxacine respectivement. Concernant la résistance aux macrolides, le mécanisme rencontré dans notre étude est de phénotype MLS_B d'où le haut niveau de résistance de ces molécules qui constituent une alternative aux bêta-lactamines.

Les sérotypes prédominants sont les 19F, 1, 2, en particulier chez l'enfant. La couverture vaccinale théorique par le PCV13 semble très efficace dans notre population infantile (100%).

Mots clés : *Streptococcus pneumoniae*, infections invasives, infections non invasives, identification, résistance aux antibiotiques, sérotypes, couverture vaccinale.

Abstract

At the present time, *Streptococcus pneumoniae* is the second leading cause of death by bacteria worldwide, especially for children and old persons. In 2005, the World Health Organization estimated that 1,6 million people die each year from pneumococcal infections.

Streptococcus pneumoniae is naturally sensitive to most antibiotics especially beta-lactam, but, antibiotic resistance is clearly increasing in our country. The emergence and spread of multi-resistant strains caused a therapeutic failures. The severity of pneumococcal infections is related to its virulence, mainly to the presence of a polysaccharide capsule that currently determines over 93 serotypes. *Streptococcus pneumoniae* infections are poorly documented in Algeria.

The objectives of our work are:

- Identifying different *S. pneumoniae* strains by different phenotypic methods.
- The study of the epidemiological characteristics of *S. pneumoniae* .
- The study of pneumococcal resistance to the main active antibiotics: beta-lactam and other antibiotics such as macrolides and determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of beta-lactams.
- Serotyping of pneumococci.

Our study was conducted at the Department of Microbiology of the University Hospital Benbadis, Constantine, during three-months period (from 19/01/2016 to 04/19/2016).

Eleven strains were isolated and identified, the optochin test remains very reliable as conventional method for the identification of *S.pneumoniae* (100% sensitivity). Among the 11 strains tested, all (100%) have a reduced susceptibility to penicillin of which 45,45% are resistant (MIC between 2-4 μ g / ml). Resistance rates to other antibiotics are 63,63%, 54,54%, 45,45%, 27,27% and 9,09% for tetracycline, erythromycin, cotrimoxazole, chloramphenicol and ciprofloxacin, respectively. Concerning macrolide resistance, the mechanism encountered in our study is of MLS_B phenotype, hence, the high level of resistance of these molecules that are an alternative to beta-lactams.

The predominant serotypes are 19F, 1, 2, especially in children. The theoretical vaccinal coverage by PCV13 seems very efficient in our child population (100%).

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, invasive infections, non-invasive infections, identification, antibiotic resistance, serotypes, vaccination coverage.

ملخص

تشكل *S. pneumoniae* حتى يومنا هذا، السبب الثاني للوفيات ذات المنشأ الجرثومي في جميع انحاء العالم وخاصة لدى الأطفال وكبار السن. في عام 2005، قدرت منظمة الصحة العالمية أن 1.6 مليون شخص يموتون سنويا من جراء الالتهابات الرئوية.

S. pneumoniae هي حساسة طبيعيا لأغلبية المضادات الحيوية بما في ذلك مجموعة البيتا لكتمين، لكن مقاومة المضادات الحيوية تعرف زيادة كبيرة في بلادنا. إن ظهور وانتشار سلالات ذات مقاومة متعددة أدت الى الفشل العلاجي. خطورة الالتهابات الرئوية مرتبطة بضرورتها، أساسا بوجود كبسولة بوليساكاريد التي تحدد حاليا أكثر من 93 نمط مصلي. إلتهابات *S.pneumoniae* قليلة التوثيق في الجزائر.

تهدف دراستنا الى:

- تحديد سلالات *S.pneumoniae* بطرق مظهرية مختلفة.

- دراسة الخصائص الوبائية لسلالات *S.pneumoniae*.

- دراسة مقاومة *S.pneumoniae* للمضادات الحيوية الرئيسية الفعالة: مجموعة البيتا لكتمين والمضادات الحيوية الأخرى مثل الماكروليدات و تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للبيتا لكتام.

- تحديد الأنماط المصلية.

وقد أجريت دراستنا على مستوى قسم علم الأحياء الدقيقة في المستشفى الجامعي المركزي ابن باديس بقسنطينة على مدى فترة ثلاثة أشهر (2016/01/19 إلى 2016/04/19).

أحد عشر سلالة عزلت وحددت، اختبار ال optochine يظل الاختبار الموثوق به كطريقة تقليدية لتحديد *S.pneumoniae* (حساسية بنسبة 100%).

من بين 11 سلالة درست، 100% تقدم حساسية ناقصة للبنسيلين من بينها 45,45% مقاومة (MIC بين 2 و 4 µg/ml). معدلات المقاومة للمضادات الحيوية الأخرى هي 63,63%، 54,54%، 45,45%، 27,27%، 09,9% للنتيراسكلين، الاريثروميسين، الكوتريموكسازول، الكلورامفينيكول، السبروفلوكساسين على التوالي. فيما يتعلق بمقاومة الماكروليدات، آلية المقاومة التي ظهرت في دراستنا هي النمط MLSB حيث المستوى المرتفع للمقاومة لهذه الجزيئات التي تشكل بديل للبيتا لكتام.

كانت الأنماط المصلية السائدة هي 19F، 1، 2 خاصة لدى الأطفال. التغطية النظرية للقاح PCV13 مما يجعله يبدو فعالا جدا لدى الأطفال (100%).

الكلمات الرئيسية: *S.pneumoniae*، الأوبئة المعدية المداهمة، الأوبئة المعدية الغير مداهمة، تحديد، مقاومة المضادات الحيوية، الأنماط المصلية، تغطية اللقاح ضد *S.pneumoniae*.

INTRODUCTION

Les infections bactériennes occupent actuellement la première place dans les pathologies médicales microbiennes, un des exemples les plus frappants est : *Streptococcus pneumoniae*.

S.pneumoniae ou pneumocoque appartient au genre *Streptococcus*. Il s'agit d'un cocci à Gram positif, anaérobie aérotoleérant facultatif, possédant de nombreux facteurs de virulence notamment la capsule. *S.pneumoniae* est le plus souvent groupé en diplocoques d'aspect lancéolé en « flamme de bougie » ou en courtes chaînettes (Biance *et al.*, 2015).

S.pneumoniae est une bactérie commensale de la flore oropharyngée colonisant les voies aériennes supérieures (nasopharynx) de façon asymptomatique de l'homme dès les premiers mois de vie, la colonisation atteint son maximum en âge préscolaire en particulier en hiver et chez les enfants vivant en collectivité où près de 50 % d'enfants peuvent être colonisés, puis le taux de portage décroît chez l'enfant plus grand pour atteindre 5 à 10 % chez l'adulte (Kempf *et al.*, 2010 ; Bingen, 2003). Toutefois, sous certaines conditions *S.pneumoniae* devient pathogène responsable d'infections respiratoires hautes (sinusites, otites...) et infections invasives (pneumonies, méningites, bactériémies...) (Biance *et al.*, 2015).

Les infections invasives à pneumocoque constituent un problème important de santé publique, elles surviennent principalement sur des terrains fragilisés et concernent aussi bien l'enfant que l'adulte, avec toutefois une incidence plus élevée chez les nourrissons et les personnes âgées (Ortqvist *et al.*, 2005 ; Denis *et al.*, 2011).

S.pneumoniae est une bactérie d'un grand intérêt clinique, elle est naturellement sensible aux antibiotiques notamment aux bêta-lactamines, mais aujourd'hui, le phénomène de résistance aux antibiotiques « multirésistances », lié à l'évolution naturelle des bactéries a atteint une ampleur alarmante et reste actuellement inquiétant puisque il représente un risque en termes de santé publique (Virtudes, 2014 ; Brieu *et al.*, 2015). Les pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) sont aussi moins sensibles aux céphalosporines, aux macrolides et à d'autres familles d'antibiotiques.

Devant l'augmentation importante ces dernières années du taux de PSDP, les macrolides constituent le traitement de première intention dans les infections pulmonaires et ORL (Ip *et al.*, 2001), mais la résistance du pneumocoque à ces molécules prend actuellement de l'ampleur.

La meilleure stratégie pour diminuer l'incidence des infections à pneumocoques et pour diminuer la diffusion de l'antibio-résistance serait l'administration d'un vaccin anti-

pneumococcique. Le vaccin heptavalent conjugué à une protéine porteuse le PCV7, immunogène dès l'âge de deux mois est introduit aux Etats-Unis en 2000 et est inclus dans le calendrier vaccinal de plus de 40 pays dont la Tunisie.

De ce fait, depuis l'introduction du PCV7, l'incidence des infections dues aux sérotypes vaccinaux a significativement diminué, mais celle des infections dues aux sérotypes non vaccinaux a augmenté (Varon, 2012). Ce phénomène de remplacement est important et a suscité la commercialisation de deux autres vaccins, le PCV 10 et le PCV13.

En Algérie, les infections à pneumocoques sont peu documentées, 14% des décès des enfants de moins de 5 ans sont causés par la pneumonie et la moitié des pneumonies est causée par les pneumocoques (Enquête Nationale de Santé Publique TAHINA ENS, 2005).

Le taux de résistance à la pénicilline qui est le reflet des résistances à toutes les bêta-lactamines est en nette augmentation dans notre pays. Le taux de PSDP a atteint 23,5% dans les méningites en 2010 (Tali-Maamar *et al.*, 2012).

Selon l'OMS, les pathologies pneumococciques sont la première cause de mortalité évitable par un vaccin (WHO, 2007).

En Algérie, le vaccin anti-pneumococcique à 13 valences entre en vigueur dans le programme de vaccination le 24 avril 2016.

Notre travail est une étude menée au laboratoire de Microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine, portant sur 11 souches de *S.pneumoniae* responsables d'infections invasives et non invasives chez l'enfant et l'adulte, isolées de différents prélèvements, de patients hospitalisés ou en ambulatoire durant une période de 3 mois (19 janvier 2016- 19 avril 2016).

Notre travail porte pour objectifs :

- L'isolement et l'identification des souches de *S.pneumoniae* à partir de différents prélèvements.
- L'étude des caractéristiques épidémiologiques des souches de *S.pneumoniae* isolées chez l'enfant et l'adulte (âge, sexe, nature de l'infection).

- L'étude de la résistance des pneumocoques aux principaux antibiotiques actifs : les bêta-lactamines (pénicilline, amoxicilline, céfotaxime et imipénème), et d'autres antibiotiques tels que les macrolides.
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des bêta-lactamines : l'antibiogramme ne peut pas apprécier le niveau de résistance à la pénicilline G ou aux autres bêta-lactamines et l'utilisation d'autres disques de bêta-lactamines ne permet pas de déterminer le niveau de résistance à ces molécules.
- Le sérotypage des pneumocoques : la surveillance des sérotypes de pneumocoques nous permettra d'évaluer surtout la relation sérotype circulants et vaccins.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités

1.1 Historique et dénomination

Le nom de *Streptococcus* (streptus: flexible; coccus: grain) a été pour la première fois attribuée par Billoch et Erlich (1877) à des cocci formant des chaînettes.

En 1881, Sternberg, aux Etats-Unis, et Pasteur, en France, ont décrit indépendamment la présence « d'un microbe septique de la salive » qui est une bactérie en forme de lancette, organisée en paire, trouvée dans le sang de lapins auxquels ils avaient injecté de la salive d'un enfant mort de la rage (Brisou *et al.*, 2004).

L'évolution des connaissances concernant ses caractères bactériologiques et taxinomiques a fait varier au fil du temps ses dénominations: « *Micrococcus pneumoniae* » (1884) en raison de sa capacité à causer des infections du système respiratoire, puis « *Diplococcus pneumoniae* » puis « *Streptococcus pneumoniae* » (1901), le nom que nous lui connaissons aujourd'hui. En 1910, c'était la mise au point de la sérotypie 'Neufeld et Haendel' (Eyquem *et al.*, 2000).

S.pneumoniae est à l'origine de la découverte du principe transformant par Frederick Griffith en 1929, dont la nature biochimique (ADN) fut seulement mise en évidence en 1944 par les travaux d'Avery (Storaï, 2008 ; Brisou, 2004).

1.2 Classification

S.pneumoniae appartient au Règne: *Bacteria*, Phylum: *Firmicutes*, Classe: *Bacilli*, Ordre: *Lactobacillales*, Famille: *Streptococcaceae*, Genre: *Streptococcus*. Ce genre comprend actuellement 44 espèces et sous-espèces, regroupées en trois ensembles : pyogènes, oraux et du groupe D (Brisou *et al.*, 2004).

S.pneumoniae est inclus dans l'ensemble des streptocoques oraux, mais reste dans le *Bergey's manual*, édition 1986 parmi le groupe des « *streptocoques pyogènes* » ce qui peut se justifier compte tenu de la gravité des infections dont il est responsable (Bere, 2010).

1.3 Habitat

S.pneumoniae est une bactérie commensale qui colonise les muqueuses de l'homme. Son habitat principal est constitué par le rhino-pharynx et pratiquement, tout individu a été en contact avec des pneumocoques avant l'âge de 2 ans (Raymond *et al.*, 2002).

1.4 Epidémiologie

1.4.1 Réservoir

S.pneumoniae est une bactérie strictement humaine commensale des voies aériennes supérieures de l'homme, jusqu'à 60% des jeunes enfants et environ 10% des personnes âgées sains en sont porteurs au niveau du nasopharynx et ne développeront pas de symptômes liés à cette colonisation (Henriques-Normark *et al.*, 2013).

1.4.2 Transmission

La transmission d'un individu à l'autre se fait par le biais de gouttelettes de Pflügge, de salive ou de sécrétions respiratoires provenant des voies aériennes supérieures (Bere, 2010 ; Brisou *et al.*, 2004).

1.4.3 Facteurs favorisants

Les âges extrêmes de la vie, le groupe vulnérable (jeunes enfants, dont l'âge est inférieur à 2 ans, et sujets âgés), la vie en collectivité et en crèche, la fratrie, les conditions socio-économiques et particulièrement les sujets immunodéprimés atteints de drépanocytose, d'asplénies, de VIH, de certains syndromes d'immunodéficience et de tumeurs malignes ainsi que les variations saisonnières surtout hivernale, sont des facteurs favorisant la survenue d'infections à pneumocoques (Atale, 2007 ; Rubach *et al.*, 2011).

1.4.4 Epidémiologie descriptive

S.pneumoniae constitue à ce jour la deuxième cause de mortalité d'origine bactérienne dans le monde après la tuberculose, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (who, 2015). On estime plus précisément qu'environ 1,6 million de décès en extrémités de vie qui meurent chaque année d'une conséquence des infections à pneumocoques, en particulier dans les pays en voie de développement (Storaï, 2008 ; Méndez-Lagea, 2015), là où le risque de développer un syndrome invasif est extrêmement élevé chez l'enfant. *S.pneumoniae* constitue la première cause de méningite en Afrique. Concernant les pays développés, la plupart des enfants peuvent contracter une ou plusieurs otites moyennes durant leur enfance, et seulement pour un nombre moins important, des syndromes plus invasifs. A titre

d'exemple, 7 millions de cas d'otites moyennes recensés chaque année aux USA sont attribués à *S.pneumoniae* (Grijalva *et al.*, 2007).

Cette bactérie est majoritairement responsable de syndromes invasifs de type méningites ou pneumonies, ou moins sévères comme les sinusites et les otites moyennes aiguës, surtout chez l'enfant entre 2 mois et 2 ans. Ces infections restent la première cause de mortalité par maladies infectieuses en France mais la grande pathologie mortelle reste la méningite (Brisou *et al.*, 2004 ; Hausdorff *et al.*, 2005).

En Algérie, les infections à pneumocoques sont peu documentées, 14% des décès des enfants de moins de 5 ans sont causés par la pneumonie et la moitié des pneumonies est causée par les pneumocoques. L'Enquête Nationale de Santé Publique TAHINA (ENS, 2005) initiée par l'institut national de santé publique (INSP) montre que les maladies respiratoires en Algérie constituent la deuxième cause d'hospitalisation.

S.pneumoniae est une cause sous-estimée d'infections nosocomiales notamment dans les services de soins intensifs, ou les services de soins palliatifs (Grijalva *et al.*, 2007).

1.5 Caractères bactériologiques

1.5.1 Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, *S.pneumoniae* se présente comme un cocci à Gram positif d'environ 0,5 à 1,25 micromètre de diamètre, généralement capsulé (halo clair autour de la bactérie), d'allure lancéolée (en flamme de bougie), typiquement groupé par deux (diplocoque) ou sous forme de courtes chaînettes (figure 1). La bactérie peut également se présenter sous forme plus ou moins pseudo-bacillaire quand elle est en voie de lyse. Le germe ne forme pas de spores et n'est pas mobile, bien que la présence de pili ait été rapportée (Gianfaldoni *et al.*, 2007 ; Pancotto *et al.*, 2013).



Figure 1. Aspect microscopique de *S.pneumoniae* sous microscope après coloration de Gram.

Source: Université du Texas-Houston / Ecole de Médecine

1.5.2 Caractères cultureux

S.pneumoniae est une bactérie aéro-anaérobie, cultivée sur des milieux riches, généralement sur gélose supplémentée de 5% de sang de cheval ou de mouton. Il pousse en 24 à 36 heures sous atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

Il se présente sous forme de petites colonies rondes de 0,5 à 1,5 mm de diamètre, lisses, bombées, brillantes, entourées d'une zone d'hémolyse partielle (alpha) donnant à la gélose une couleur verdâtre (figure 2). Cependant la culture prolongée en condition d'anaérobiose peut induire une hémolyse complète du sang (hémolyse β). Les colonies s'aplatissent et s'ombiliquent rapidement sous l'action d'autolysines. Ce phénomène d'autolyse impose en pratique des repiquages fréquents pour conserver la vitalité des souches. Certaines souches de pneumocoques sécrètent une plus grande quantité de capsule, ce qui augmente la taille des colonies et leur donne un aspect muqueux.

Les conditions optimales de croissance de ce germe fragile sont un ensemencement sur milieu enrichi, un pH à 7,8, une température à 37 °C et une atmosphère enrichie de 5 à 10 % de CO₂ (Brisou *et al.*, 2004 ; Atale, 2007).

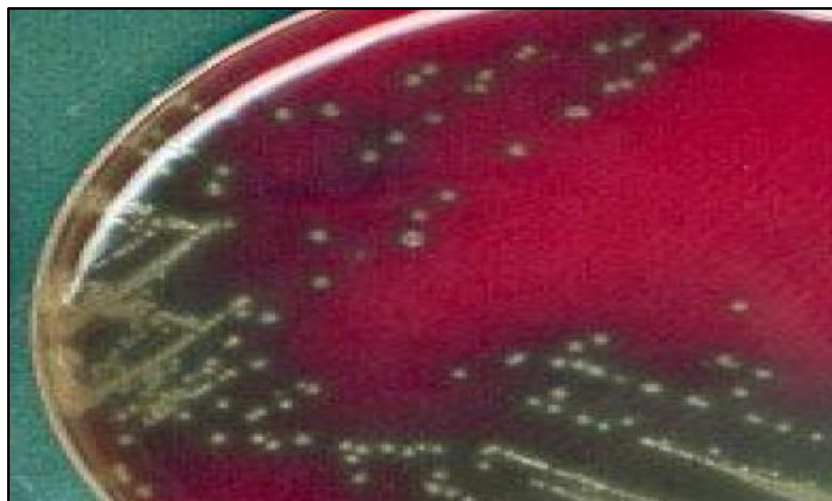


Figure 2. Aspect macroscopique de *S.pneumoniae* avec une hémolyse de type α sur gélose au sang. Source : www.microbes-edu.org/etudiant/streptocoques.html
(Centre National de Référence des Streptocoques, Hôtel Dieu, Université Paris VI).

1.5.3 Caractères biochimiques

Tableau 1. Caractères biochimiques de *S.pneumoniae* (Lemozy & suc, 1997)

Test	V P	ES C	A D H	B H S	A R A	M A N	S O R	T R E	R A F	S O S	I N U	L A C	R I B	A M I	G L Y
Résultat	-	-	d	-	-	-	-	+	+	d	d	+	-	-	d

VP : Réaction de Voges-Proskauer / ESC : Esculine /ADH : Arginine di-hydrolase /BHS : bouillon hypersalé / ARA : L-Arabinose / MAN: Mannitol / SOR: Sorbitol / TRE: Tréhalose / RAF: Raffinose / SOS : Sorbose / INU : Inuline / LAC : Lactose / RIB : Ribose / AMI : Amidon /GLY : Glycérol.

(+)=Caractère positif / (-)=Caractère négatif / (d)=Caractère variable.

- **Enzymes respiratoires :** Catalase négative, Cytochrome oxydase négative, Peroxydase négative, ce qui conduit à l'accumulation de peroxyde responsable en partie de son autolyse.

- **Métabolisme glucidique** : fermente les sucres en suivant la voie homofermentaire, sans production de gaz.
- **Métabolisme protidique** : provoque une acidification et une coagulation du lait.
- **Propriétés particulières** : deux caractères bactériologiques permettent l'identification et la différenciation de *S. pneumoniae* des autres streptocoques :
 - le phénomène de Neufield.
 - la sensibilité à l'optochine.

1.5.4 Aspect génétique

S.pneumoniae est naturellement compétent, son génome a été totalement séquencé, il est constitué d'un chromosome circulaire d'environ 2,16 Mb. Possédant un % GC moyen de 39,7 % et 83 % de régions codantes. Sur les 2303 gènes identifiés, 2105 codent pour des protéines dont 64 % ont une fonction biologique validée ou attribuée par homologie (1440 gènes), 16 % une fonction inconnue et 20 % sans aucune homologie avec les banques de données (Tettelin *et al*, 2001).

L'une de ses particularités est qu'il contient 5% de séquences d'insertion qui témoignent de phénomènes de réarrangements avec du matériel génétique d'autres bactéries (Atale, 2007).

L'analyse de la séquence des gènes codant pour l'ARNr 16S, montre une parenté (98,5% d'homologie) avec *Streptococcus oralis* et *Streptococcus mitis* ; Ces trois espèces sont capables d'échanger entre elles des fragments d'ADN (Bere, 2010).

1.6 Identification

L'identification de *S.pneumoniae* est essentielle afin de le différencier des autres espèces pathogènes et commensales vivant dans sa niche écologique principale, le nasopharynx. En effet, la présence de certaines espèces bactériennes, telles les bactéries commensales du groupe des *Streptococcus viridans*, peuvent compliquer l'identification du pneumocoque (Barbet, 2011).

En premier lieu, les techniques de microbiologie classiques, telle la coloration de Gram, la présence d'hémolyse sur gélose au sang, l'aspect des colonies, la recherche de l'absence de la catalase, la sensibilité à l'optochine et la solubilisation par les sels biliaires sont

généralement utilisées pour l'identification de *S.pneumoniae* (Facklam, 2002 ; Navne *et al.*, 2014).

1.6.1 Identification par méthodes conventionnelles

➤ Test de lyse par les sels biliaires

Neufeld a observé pour la première fois en 1900 que la bile à la propriété d'être capable de dissoudre les pneumocoques (Tarja, 2006), ces derniers possèdent un système inhibiteur d'enzymes autolytiques qui est détruit par les agents tensioactifs comme la bile ce qui engendre une activation de l'autolysine, impliquée dans la division cellulaire, qui clive la liaison entre l'acide N-acétylmuramique et l'alanine. Le peptidoglycane est ainsi altéré et la bactérie apparaît soluble dans la bile (Bere, 2010).

➤ Test de sensibilité à l'optochine

L'optochine (éthylhydrocupréine) inhibe la croissance du pneumocoque à des concentrations qui seraient sans effet sur la plupart des autres bactéries du genre *Streptococcus* (Bere, 2010). Des disques de 6mm de diamètre sont chargés de 5µg d'optochine, dose calculée pour provoquer sur une culture de pneumocoque sur gélose au sang, une zone d'inhibition dont le diamètre est compris entre 14 et 35mm. Les autres streptocoques sont résistants à l'optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque.

➤ Mise en évidence de l'antigène capsulaire

Elle s'effectue à l'aide d'un sérum anti-pneumococcique polyvalent, dirigé contre tous les types capsulaires (Lalitha *et al.*, 1996; Brisou *et al.*, 2004). Il existe plusieurs méthodes :

- ✓ Réaction du "gonflement capsulaire" ou réaction de NEUFELD.
- ✓ Réactions d'agglutination :
 - Agglutination de particules de latex sensibilisés.
 - Coagglutination (COA) avec des staphylocoques tués.
- ✓ contre-immuno-électrophorèse (CIE).

➤ Inoculation à l'animal sensible

Les souris et les lapins sont hautement sensibles à l'infection par les pneumocoques. La méthode de choix utilise l'inoculation intra péritonéale à une souris jeune (12 à 14g). Celle-ci meurt en 24-48 heures à la suite d'une péritonite aiguë et bactériémie.

1.6.2 Identification par méthodes moléculaires

Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées et parmi celles-ci :

- l'hybridation moléculaire par sonde AccuprobeR (Richter *et al.*, 2008).

- la PCR avec amorces spécifiques :

➤ **amplification de gènes codant pour des facteurs de virulence :**

gènes très documentés : PlyN, LytA, PsaA ... (Arbique *et al.*, 2004).

➤ **Gène sodA:** comparaison après PCR et séquençage du gène sodA à une banque de donnée (Arbique *et al.*, 2004).

➤ **Gène ARN 16S :** qui présente 99% d'homogénéité avec *S.mitis* et *S.oralis* (El Aila *et al.*, 2010).

➤ **Multi-Locus Sequence Typing (MLST):** amplification et séquençage de 7 panels de gènes essentiels au métabolisme de la bactérie et présentant un faible taux de mutation (El Aila *et al.*, 2010).

La méthode d'avenir est la spectrométrie de masse (Bizzini & Greub, 2010).

2. Facteurs de pathogénicité, pouvoir pathogène et physiopathologie

2.1 Principaux facteurs de pathogénicité

Le pouvoir pathogène des pneumocoques a été attribué à de nombreux facteurs de pathogénicité et plus de 125 gènes pourraient être impliqués dans la virulence (Bere, 2010), parmi les principaux facteurs de virulence :

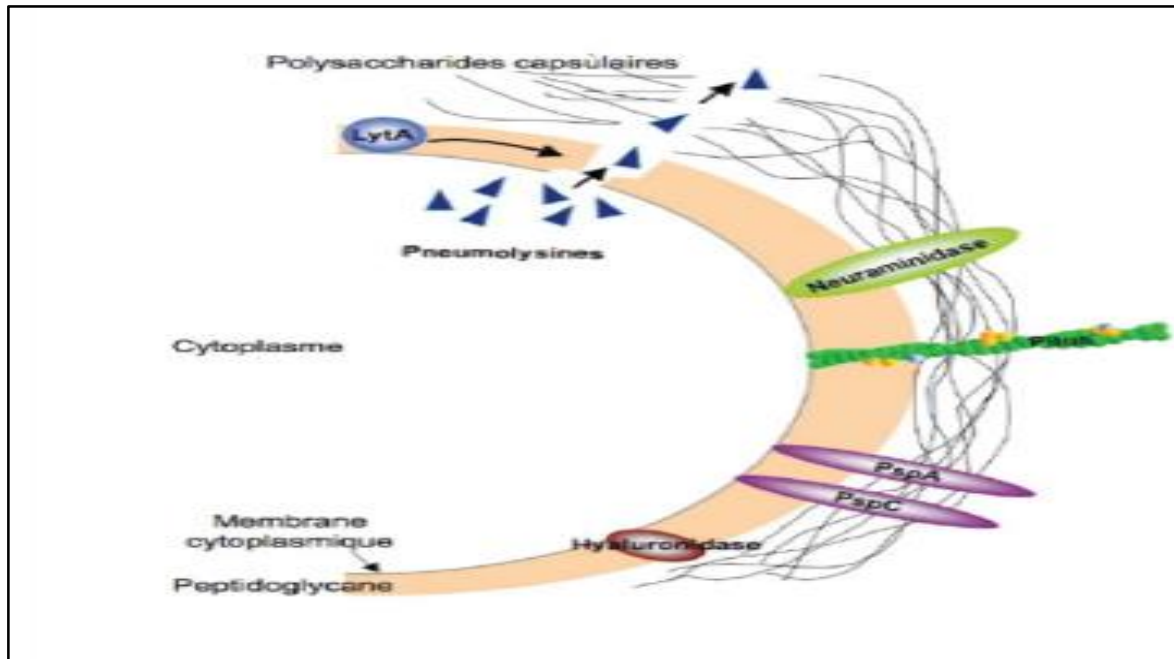


Figure 3. Représentation schématique des principaux facteurs de virulence du pneumocoque. (Manzano, 2010)

2.1.1 Polysaccharides capsulaires

La capsule, de nature polysaccharidique, est un déterminant essentiel de la virulence du pneumocoque; elle protège la bactérie de la phagocytose des macrophages et des neutrophiles, permettant ainsi la colonisation *in vivo*. De plus, elle protège certaines protéines de surface (telles PspA ou CbpA) des anticorps circulants de l'hôte, leur évitant ainsi une inhibition fonctionnelle. La nature chimique de la capsule détermine le sérotype de la souche de pneumocoque (Fritzell, 2005).

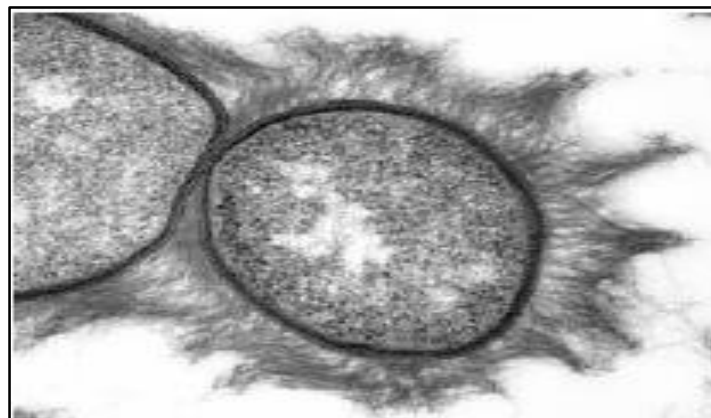


Figure 4. Structure de la capsule polysaccharidique de la souche TIGR4 de *S.pneumoniae* (<http://www.rockefeller.edu>).

2.1.2 Paroi bactérienne

Elle est composée du peptidoglycane, d'acides teichoïques et d'acides lipoteichoïques. Ces deux derniers sont de puissants inducteurs de la réaction inflammatoire capable de provoquer des dommages tissulaires irréversibles. La paroi est également impliquée dans l'attachement de pneumocoques non capsulés sur les cellules endothéliales humaines (Fritzell, 2005).

2.1.3 Protéines pneumococciques

S.pneumoniae possède de nombreuses protéines jouant un rôle dans la pathogénie, en permettant l'adhésion, en agissant directement sur les tissus de l'hôte ou encore en médiant l'inflammation.

➤ **Toxines**

Les plus connues sont la pneumolysine, capable de lyser les hématies humaines et responsable de l'hémolyse de type alpha (Lawrence, 2015).

➤ **Enzymes**

- **Neuraminidase** : l'enzyme qui clive l'acide sialique contenu dans les glycolipides, les glycoprotéines et les oligosaccharides présents à la surface des cellules hôtes. Il en résulte alors des dommages cellulaires, une diminution de la colonisation du nasopharynx est observée avec des souches de pneumocoque déficientes en neuraminidase.
- **Hyaluronidase** : l'enzyme qui contribue à la virulence de celui-ci en dégradant l'acide hyaluronique, composant important de la matrice extracellulaire. La migration de la bactérie du site de colonisation vers le système sanguin est, de ce fait, facilitée (Manzano, 2010).
- **Autolysine** : l'enzyme qui dégrade les différentes liaisons de peptidoglycane (Sourav, 2010).

2.1.4 Pili

Fibres protéiques, présentes dans 30% des souches pneumococciques et constituent un facteur de virulence qui n'a été découvert que récemment (Barocchi, 2006).

2.2 Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène d'une souche bactérienne s'exprime par la création de lésions tissulaires caractéristiques suite à la réaction inflammatoire engendrée par la libération et à l'activation de différents composants bactériens (Manzano, 2010).

Le pouvoir pathogène de *S.pneumoniae* est lié à sa résistance à la phagocytose du fait d'une capsule protectrice, et à la remarquable aptitude de cette bactérie à induire une réaction inflammatoire intense qui explique la gravité des symptômes et la fréquence de sa dissémination tissulaire.

Expérimentalement, la souris est un animal de choix. Elle est sensible à toutes les voies d'inoculation. En effet, l'inoculation intrapéritonéale d'une souche capsulée « smooth » de *S.pneumoniae* entraîne la mort de la souris par septicémie en 24h.

L'expérience réalisée par Griffith (figure 5) montre le pouvoir pathogène et génétique du pneumocoque. En effet, l'inoculation d'une souche capsulée S de *S.pneumoniae* à une souris provoque sa mort (Bere, 2010).

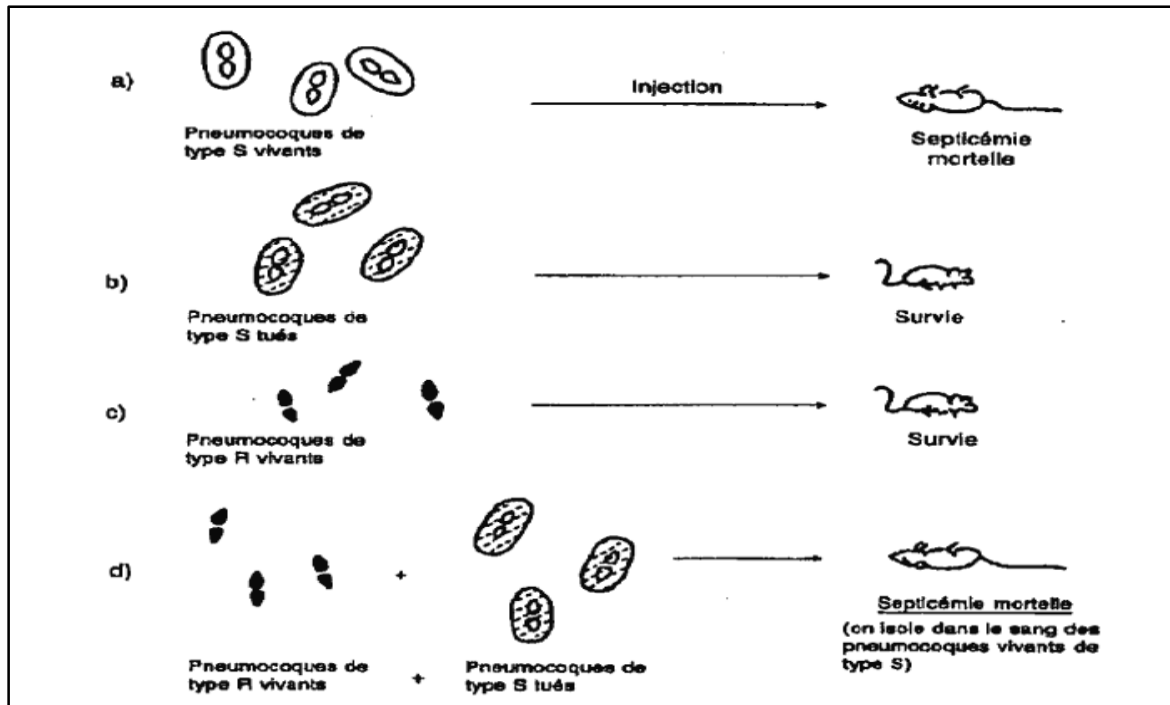


Figure 5. Expérience réalisée par Griffith

Source : http://stl_bjb.ac-dijon.fr/Annales/98remM.htm

2.3 Physiopathologie

Dans tous les processus infectieux et après contamination interhumaine par aérosols, *S.pneumoniae* colonise la muqueuse du nasopharynx et avec la diminution des défenses de l'hôte, elle va agir en deux étapes : l'adhésion par les différentes adhésines qui sont situées dans la paroi et l'invasion.

Le mécanisme principal d'échappement à la phagocytose est la production d'une capsule et la lyse bactérienne libère ou active des composants bactériens comme la pneumolysine qui vont entraîner sinusite et otites, puis la bactérie colonise d'une manière massive les voies aériennes basses et gagne les alvéoles pulmonaires en provoquant une pneumopathie, une bactériémie qui va aller jusqu'à la méningite. *S.pneumoniae* peut être aussi l'agent responsable d'arthrite septique, d'ostéomyélite, de péritonite et d'endocardite.

(Brisou *et al.*, 2004 ; Tortora *et al.*, 2007 ; Iovino *et al.*, 2016 ; Cundell *et al.*, 1995).

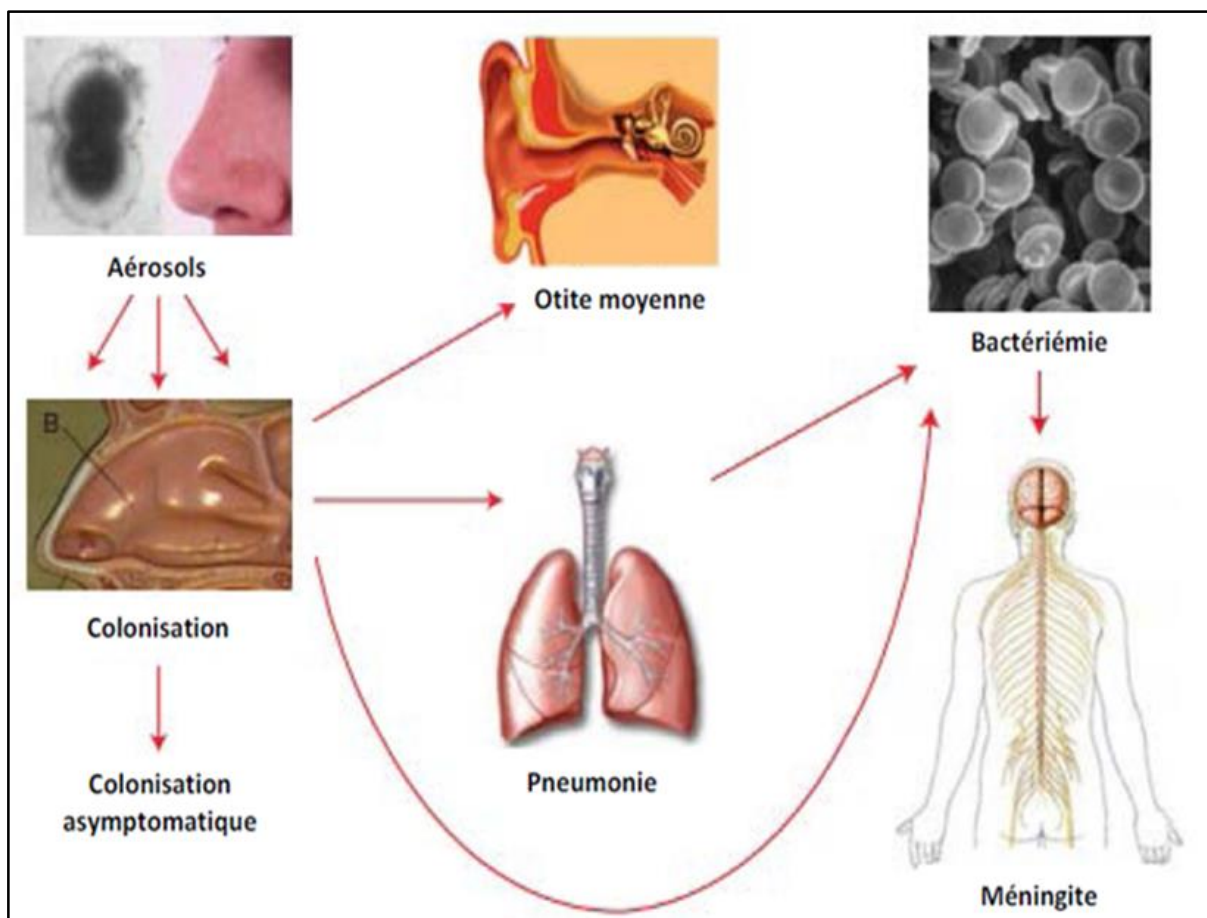


Figure 6. Pouvoir pathogène. (Henriques-Normark *et al.*, 2013).

3. Résistance de *S.pneumoniae* aux antibiotiques

3.1 Historique et épidémiologie de la résistance

S.pneumoniae est une espèce naturellement sensible à la plupart des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif : bêta-lactamines, macrolides, tétracyclines, chloramphénicol, rifampicine, cotrimoxazole, glycopeptides. Les antibiotiques de référence restent les bêta-lactamines (Geslin, 1998).

Le pneumocoque présente une résistance naturelle aux aminosides (résistance de bas niveau) et aux quinolones de première génération et une faible sensibilité à la péfloxacin, l'ofloxacin et la ciprofloxacine. Les fluoroquinolones les plus actives sur le pneumocoque sont la levofloxacine, la moxifloxacine et la gatifloxacine (Chardon, 2008).

Des souches résistantes aux antibiotiques sont apparues progressivement dans le monde: sulfamides (1943), tétracyclines (1963), érythromycine (1967), pénicilline (1967) en Australie et enfin une souche multirésistante fut découverte en 1977 en Afrique du Sud. La résistance à la pénicilline se propage alors rapidement à travers le monde entier dans les années 1980, particulièrement en Afrique du Sud, en Espagne, en Hongrie et en France, pour laquelle la diminution de la sensibilité à la pénicilline G est apparue en 1979, également au chloramphénicol (1970) (Chardon, 2008 ; Manzano, 2010).

La prévalence de *S.pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline G (PSDP) est restée stable de nombreuses années dans de nombreux pays comme en France, puis elle a rapidement augmenté à partir des années 1990 et cela de façon hétérogène selon les régions (Maugein, 2003 ; CA-SFM, 2003).

Cette résistance complique le traitement des infections à pneumocoques et de nombreux échecs de traitement d'antibiotique ont été rapportés.

En Algérie, plusieurs rapports ont montré une augmentation de la résistance à l'antibiotique depuis 1996 à 2010, en particulier chez les enfants (Ramdani-Bouguessa *et al.*, 2015).

3.2 Mécanismes de résistance

3.2.1 Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines

Les pneumocoques sont naturellement très sensibles aux bêta-lactamines avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très basses : 0,004 à 0,06 mg/L pour pénicilline G, ampicilline, amoxicilline et céfotaxime (Chardon, 2008).

L'acquisition de la résistance aux bêta-lactamines repose sur une modification qualitative et quantitative d'origine chromosomique des PLP (Penicillin Binding Protein) qui sont des transpeptidases responsables de l'étape finale de la synthèse du peptidoglycane (van, 2001). *S.pneumoniae* possède six PLP dont cinq de haut poids moléculaire, les PLP 1a, 1b, 2x, 2a et 2b, et une de bas poids moléculaire, la PLP 3, entraînant ainsi une augmentation des CMI de toutes les bêta-lactamines.

Les souches de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) possèdent des gènes « mosaïques ». Ces gènes sont obtenus par recombinaison de séquences « résistantes » qui proviennent de gènes homologues d'espèces voisines (*S.mitis*, *S.sanguis*, *S.oralis*), ou de transferts entre pneumocoques sensibles et résistants, mais aussi par mutations sous la pression de sélection (Brisou *et al.*, 2004).

3.2.2 Mécanismes de résistance aux macrolides

On distingue ainsi les macrolides à noyau lactone à 14 atomes (comme l'érythromycine), à 15 atomes (comme l'azithromycine), et à 16 atomes (comme la spiramycine). Récemment, les kétolides sont venus s'ajouter à cette liste.

La résistance du pneumocoque aux macrolides est principalement causée par l'altération de la cible et par efflux. L'expression du gène *ermB* habituellement localisée sur un transposon conjugatif de type Tn1545 codant pour une méthylase ribosomale confère une haute résistance aux macrolides (CMI) ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, aux lincosamides et à la streptogramine B (phénotype de résistance MLS_B) par méthylation de la position 2058 de l'ARNr 23S.

Ce gène est transférable de chromosome à chromosome chez les pneumocoques, le plus souvent avec d'autres gènes de résistance (*tetM* pour les tétracyclines et *aphA-3* pour la

kanamycine). Ainsi, la diffusion de ces gènes de résistance peut se faire par transferts horizontaux, expliquant le maintien de la multirésistance.

Également, l'efflux qui consiste à rejeter l'antibiotique en dehors de la bactérie sous la dépendance d'une pompe. La spécificité de cette pompe fait que la résistance n'affecte que les macrolides à noyau à 14 et 15 atomes et s'exprime le plus souvent à bas niveau (Doern, 2006 ; Canu *et al.*, 2002) , conférant un profil de résistance particulier (phénotype M) exprimé par le gène *mefA* qui est transférable de pneumocoque à pneumocoque et serait porté par un grand transposon qui est le Tn1207 (7,244 kb) (Gay *et al.*, 2001). Ces souches sont résistantes à l'érythromycine, mais restent sensibles à la clindamycine (bas niveau de résistance) prouvé par le test de synergie des macrolides (Brisou *et al.*, 2004).

3.2.3 Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont de puissants agents à activité bactéricide qui inhibent la réplication et la transcription bactérienne en inhibant par mutation le fonctionnement des topo-isomérases bactériennes de type II, l'ADN gyrase (codée par les gènes *gyrA* et *gyrB*) et la topo-isomérase IV (codée par les gènes *parC* et *parE*) (Fabrega *et al.*, 2009 ; Lastours *et al.*, 2014).

Plusieurs types de mécanismes de résistance ont été décrits :

- diminution de l'accumulation intra-cytoplasmique par diminution de la perméabilité de la paroi ou augmentation de l'efflux ; qui empêche certaines fluoroquinolones comme la ciprofloxacine et la norfloxacine d'accéder à leurs cibles.
- diminution de l'affinité des cibles par mutation ou par protection des cibles.
- inactivation enzymatique (Daporta *et al.*, 2004 ; Lupien, 2015).

3.2.4 Mécanismes de résistance aux autres antibiotiques

➤ Linézolide (Les oxazolidinones)

D'exceptionnelles souches non sensibles au linézolide sont décrites dans la littérature, suite à une mutation dans le gène codant pour une protéine ribosomale (Charpentier *et al.*, 2000).

➤ **Glycopeptides**

La vancomycine et la teicoplanine sont actives contre le pneumocoque. Aucune résistance à la vancomycine n'a été décrite mais des souches tolérantes ont été signalées (Cullers, 2000).

➤ **Sulfamides, triméthoprimine et cotrimoxazole**

La résistance aux sulfamides est liée à une modification du gène codant pour la dihydroptéroate synthétase et la résistance au triméthoprimine à une mutation dans le gène de la dihydrofolate réductase (Chardon, 2008).

➤ **Rifampicine**

Elle agit sur les bactéries par fixation sur l'une des sous-unités de l'ARN polymérase ADN-dépendant entraînant un blocage de transcription de l'ADN en ARN. Les souches de *S.pneumoniae* deviennent résistantes par des mutations portant sur le gène *rpoB* codant la ARN polymérase ADN dépendante. Les souches résistantes à cet antibiotique sont rares (Chardon, 2008).

➤ **Tétracyclines**

Les tétracyclines qui ont une activité bactériostatique se lient de façon irréversible à la sous-unité 30S du ribosome, empêchant l'incorporation de nouveaux acides-aminés et inhibant la synthèse bactérienne. Cette résistance est généralement plasmidique, codée par le gène *tetM* (Atale, 2007).

➤ **Chloramphénicol**

C'est un antibiotique à large spectre qui bloque la synthèse bactérienne en se fixant sur la sous-unité 50S au niveau de l'ARN ribosomale 23S. Les souches résistantes ont acquis une chloramphénicol-acétylase responsable de l'inactivation de cet antibiotique. La résistance au chloramphénicol est codée par le gène *cat* porté par le transposon conjugatif Tn5253 (Dang-Van, 1978).

➤ Aminosides

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides. Ils agissent en inhibant la synthèse protéique des bactéries. Leur site principal d'action est l'ARN ribosomal 16 S. Il s'agit d'une résistance de bas niveau par défaut de pénétration intrabactérienne de l'antibiotique (Atale, 2007).

S.pneumoniae est exceptionnellement résistant à la gentamicine et fréquemment résistant à la kanamycine. Le gène qui code pour la résistance à la kanamycine est le plus souvent situé sur un transposon qui contient un gène de résistance tetM et ermB.

Ces antibiotiques ne seront pas utilisés seuls, mais en association avec des bêta-lactamines pour le traitement des infections sévères à *S.pneumoniae* (endocardites...) (Mc Dougal *et al.*, 1998).

4. Sérotypes

4.1 Classification des sérotypes

Les polysaccharides antigéniques sont à la base de la classification sérotypique des pneumocoques (Brisou *et al.*, 2004). La réaction consiste à provoquer une agglutination avec les antigènes pneumococciques homologues représentés sur le corps bactérien. Une réaction positive se traduit par l'obtention de gros agglutinats. On procède à un screening à l'aide d'une réaction polyvalente sous forme de pools de sérums (Edoh *et al.*, 1988), la connaissance de ces sérotypes est indispensable au choix d'un vaccin antipneumococcique donné (Dia *et al.*, 2013), plus de 93 sérotypes pneumococciques sont connus (Song *et al.*, 2013), bien que la plupart des maladies invasives et non invasives soit associées à un nombre beaucoup plus restreint des sérotypes (Smaoui *et al.*, 2008).

Tableau 2. Classification danoise des 90 sérotypes de *S.pneumoniae* (Brisou *et al.*, 2004)

<p>1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 7A, 7B, 7C, 8, 9A, 9L, 9N, 9V, 10F, 10A, 10B, 10C, 11F, 11A, 11B, 11C, 11D, 12F, 12A, 12B, 13, 14, 15F, 15A, 15B, 15C, 16F, 16A, 17F, 17A, 18F, 18A, 18B, 18C, 19F, 19A, 19B, 19C, 20, 21, 22F, 22A, 23F, 23A, 23B, 24F, 24A, 24B, 25F, 25A, 27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33F, 33A, 33B, 33C, 33D, 34, 35F, 35A, 35B, 35C, 36, 37, 38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A, 48</p>
--

4.2 Distribution des sérotypes

Depuis l'avènement des antibiotiques, l'utilisation de ces molécules a entraîné une modification des sérotypes responsables des infections. Ainsi, depuis des années, on a pu constater une nette diminution de l'incidence des sérotypes « épidémiques » (sérotypes 1,3 et 5) associée à une augmentation de l'incidence des sérotypes de « portage ». La distribution des sérotypes de pneumocoque a été étudiée dans beaucoup de pays et les sérotypes les plus fréquents sont les 23, 14, 19 et 6 et sont les plus résistants à la pénicilline (Reinert *et al.*, 2010; Mehr & wood, 2012). Ensuite, l'évolution de la résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque a été fortement influencée par les changements dans la distribution des sérotypes sous la pression vaccinale du PCV7 (Hicks *et al.*, 2007 ; Hanquet *et al.*, 2010).

5. Vaccins antipneumococques

Près de 50 ans ont été nécessaires pour comprendre l'action protectrice des anticorps dirigés contre la capsule, ainsi que leur intérêt pour la mise au point d'un vaccin, qui est un moyen efficace de prophylaxie contre un grand nombre de sérotypes infectieux du pneumocoque qui sont potentiellement porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques (Fritzell, 2005 ; Lupien, 2015).

5.1 Le vaccin polysaccharidique 23- valent

Le Pneumo 23 de Sanofi Pasteur appartient à la seconde génération de vaccin commercialisée aux Etats-Unis en 1983, puis en France en 1987, ce vaccin polysaccharidique contient 23 valences (sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F et 33F) qui représentent entre 85% et 90% des sérotypes isolés dans les formes invasives de la pathologie pneumococcique humaine. Plusieurs études ont confirmé que les réponses en anticorps des sujets âgés en bonne santé sont comparables à celles des adultes jeunes. Chez les enfants, la réponse au vaccin anti-pneumococcique 23 est médiocre avant l'âge de 2 ans. Le vaccin induit une réponse thymo-indépendante, l'effet immunogène est donc nul avant cet âge (Gaillat *et al.*, 1985 ; Lee *et al.*, 1995).

5.2 Le vaccin heptavalent conjugué PCV7

En février 2000, un vaccin antipneumococcique conjugué heptavalent dénommé Prevenar® a été conçu pour être actif contre sept sérotypes de pneumocoques. Il est enregistré aux Etats-Unis et dans plusieurs autres pays dont la France pour la prévention des infections invasives dues au pneumocoque, de l'otite moyenne et de la pneumonie chez les enfants et nourrissons. Le couplage des antigènes polysaccharidiques du pneumocoque, thymo-indépendants, à une protéine porteuse permet de les transformer en antigènes thymo-dépendants. Le Prévenar® contient 7 valences (sérotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F). Suite au phénomène de remplacement, des vaccins conjugués à 10 et 13 valences sont développés. En cours d'année 2010, un nouveau vaccin conjugué, le vaccin 13-valent, comportant 6 valences supplémentaires (1, 3, 5, 6A, 7F et 19A) a remplacé le PCV7, offrant à la population cible une couverture sérotypique plus large.

Tableau 3. Sérotypes contenus dans les vaccins antipneumococciques

	Le vaccin polysaccharidique 23- valent	Le vaccin heptavalent conjugué PCV7	le vaccin 13- valent
Les sérotypes retrouvés	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F et 33F.	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F.	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F.

6. Traitement

Le traitement des infections à pneumocoques repose principalement sur l'administration d'antibiotiques. Les principaux antibiotiques utilisés sont les bêta-lactamines, les macrolides et les fluoroquinolones. Également, la vancomycine, les tétracyclines et le linézolide sont des molécules qui peuvent être utilisées pour traiter les infections aux souches ne répondant pas aux antibiotiques de première ligne (Lupien, 2015).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Lieu et durée du travail

Ce travail, qui a duré trois mois, du 19/01/2016-19/04/2016, a été réalisé au niveau du service de microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine.

2. Origine des souches

La taille de l'échantillon est représentée par 11 souches non redondantes de *S.pneumoniae* isolées à partir de prélèvements effectués chez des patients (enfants et adultes) qui ne sont pas tous originaires de Constantine (Constantine, Sétif et Batna). La plupart sont hospitalisés ou évacués à l'hôpital Benbadis et à l'origine d'infections invasives et non invasives.

Durant notre étude, qui a eu lieu au niveau du service de microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine et comme les souches de *S.pneumoniae* sont rares ; nous avons pris en compte 6 souches de *S.pneumoniae* qui ont été isolées à partir du 19/10/2015 et conservées. Du 19/01/2016 au 19/04/2016, qui a été la période de notre étude, nous avons pu isoler 5 souches de *S.pneumoniae*.

Les prélèvements proviennent de différents services (service de réanimation, urgences médicales, urgences pédiatriques, service d'orthopédie, centre des brûlés.), ou de patients en ambulatoire.

Nos souches sont isolées de ponctions lombaires (LCR), d'hémocultures (sang), de ponctions pleurales (liquides pleuraux), de liquide trachéal, de liquide articulaire et de pus oculaire et auriculaire. Toutes les souches suspectées d'être des pneumocoques par une identification préliminaire (aspect des colonies, hémolyse alpha) sont prises en considération puis soumises à d'autres tests pour l'identification formelle.

Après réception des prélèvements, ceux-ci sont enregistrés par le corps technique sous la forme d'un numéro afin d'assurer le numéro du dossier.

Après ensemencement sur gélose à 5% de sang de mouton ou humain (annexe 1), c'est la mise en culture à 37°C en anaérobiose pendant 24 à 48 h. Les renseignements de chaque patient sont répertoriés sur le tableau 4 (annexe 3 ; tableau 4).

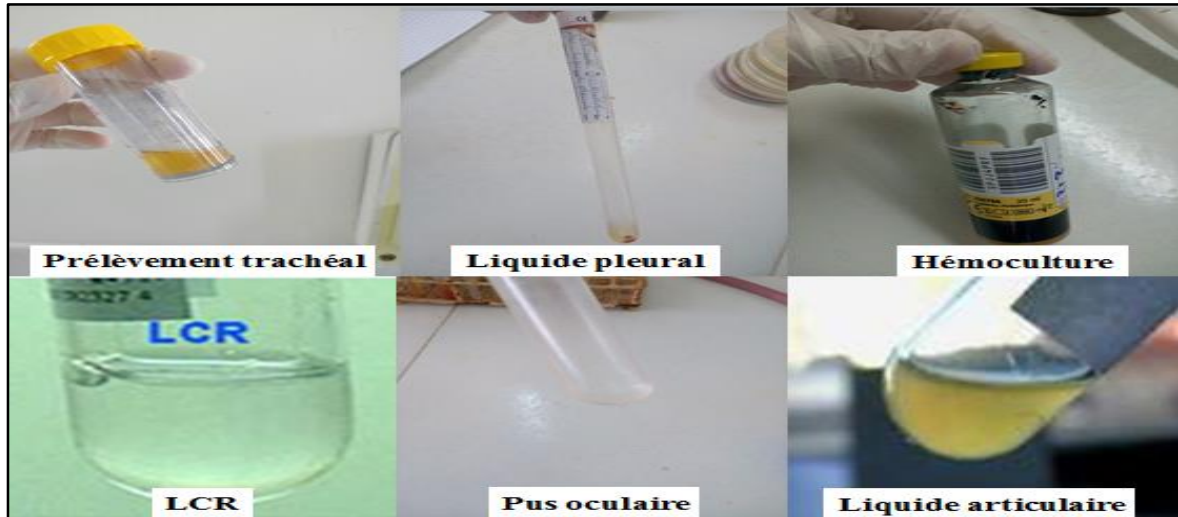


Figure 7. Produits pathologiques utilisés

3. Conservation

La conservation des souches est réalisée sur milieux solides, selon les moyens, par repiquage hebdomadaire sur gélose inclinée au sang de mouton frais ou cuit.



Figure 8. Conservation des souches de *S. pneumoniae* sur gélose inclinée au sang

4. Isolement et culture

Le milieu de culture utilisé est la gélose au sang constituée du milieu de base : Gélose nutritive, gélose Columbia et/ou gélose Mueller- Hinton additionné de 5% de sang de mouton frais ou cuit (annexe 1). Le milieu de culture changeait en fonction de la disponibilité du milieu de base.

L'incubation est effectuée dans une étuve à CO₂ (5 %), à 37°C et à pH optimum de 7,2 pendant 24 à 48 heures.

5.5 Identification des souches par les méthodes conventionnelle

Pour identifier *S.pneumoniae*, nous avons suivi le schéma représenté par la figure 9.

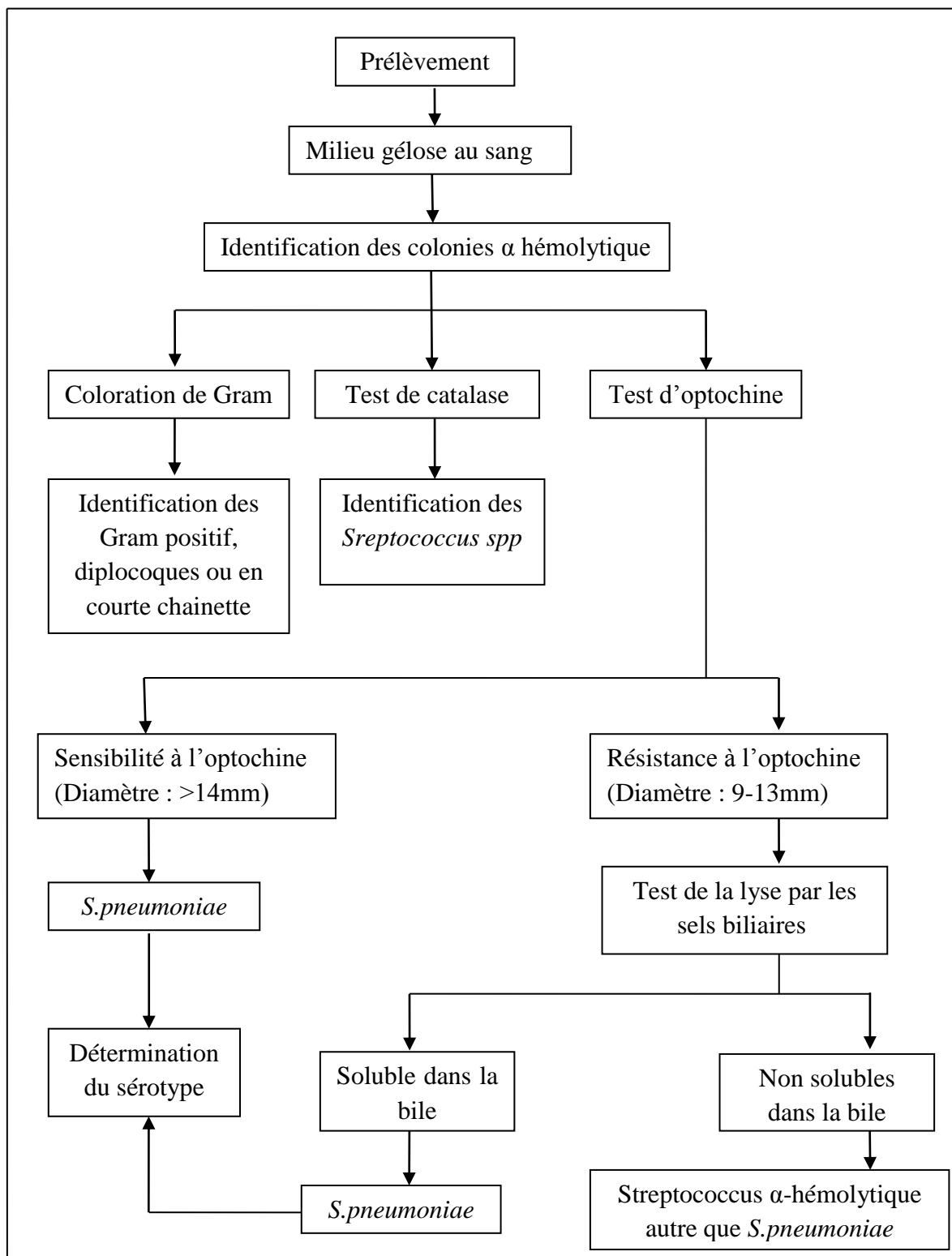


Figure 9. Schéma récapitulatif de l'identification de *S.pneumoniae*

5.1 Examen macroscopique

Cet examen nous permet d'avoir des renseignements sur l'aspect des colonies, leur taille, leur forme ainsi que du type d'hémolyse sur gélose au sang.

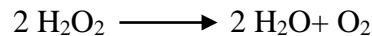
5.2 Examen microscopique après Coloration de Gram

L'examen microscopique peut être très indicateur pour les pneumocoques qui ont une morphologie bien spécifique (diplocoques à forme lancéolée, en flamme de bougie, encapsulés, mais il n'est pas suffisant. Aussi, la coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés de la structure pariétale, elle se fait selon deux étapes (Annexe 4).

5.3 Test de la catalase

Principe

La catalase est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries. La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d' O_2 sous forme gazeuse selon la réaction suivante :



Réalisation du test

Prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame.

Lecture des résultats

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate de bulles d' O_2 .

5.4 Test de lyse par les sels biliaires

Réalisation du test

Le test est réalisé selon la méthode de Lund (1959). Une riche suspension correspondant à 2 Mc Farland est préparée à partir d'une culture jeune de pneumocoque dans de l'eau physiologique stérile puis séparée dans deux tubes à hémolyse. Dans un des tubes, on a ajouté 0,5 ml de solution de sels biliaires à 10% (Institut Pasteur). L'autre tube sert de témoin. Les tubes sont ensuite mis en incubation à 37°C pendant 30min.

Lecture des résultats

L'éclaircissement du tube contenant des sels biliaires est révélateur de la présence de pneumocoque et le test est considéré positif. L'éclaircissement partiel du tube est considéré négatif.

5.5 Test de sensibilité à l'optochine

Réalisation du test

Réalisé selon la méthode de Lund (1959). Après avoir prélevé une colonie suspecte alpha-hémolytique avec une anse stérile, celle-ci est ensemencée en stries serrées sur gélose au sang. Un disque à l'optochine à 5µg contenant 5µg d'éthylhydrocupréine (BioRad Disks, Code : 53852, LOT : 2H3255) de 6 mm de diamètre est déposé à l'extrémité de la strie, là où a commencé l'ensemencement et la boîte est incubée 18 à 24 heures à 35-37 °C dans un incubateur à CO₂.

Lecture des résultats

La zone d'inhibition autour du disque est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse. Les souches alpha-hémolytiques présentant une zone d'inhibition supérieure à 14 mm sont des pneumocoques. Les souches alpha-hémolytiques sans zone d'inhibition ou avec des zones d'inhibition comprises entre 9 et 13 mm doivent subir des tests complémentaires.

6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques est fondée sur la recherche des diamètres d'inhibition et sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Ces deux techniques sont réalisées selon les techniques de standardisation de l'antibiogramme (2005).

6.1 Antibiogramme standard

Principe

L'antibiogramme standard utilise la technique de la diffusion en milieu gélosé selon les normes préconisées par le Clinical Laboratory Standard institute (CLSI, 2007). Il permet d'apprécier la modification de la croissance d'une souche bactérienne en présence de l'antibiotique testé.

Réalisation du test

- **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture de 18-24 H sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton, préparer une suspension en bouillon Mueller-Hinton équivalente au standard Mc Farland 0,5.

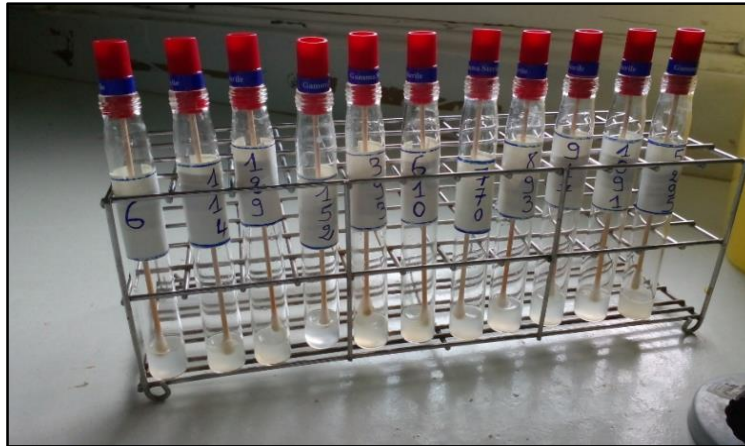


Figure 10. Suspensions bactériennes des souches à tester

- **Ensemencement**

L'ensemencement des souches est effectué à l'aide des écouvillons alors que les disques d'antibiotiques (Bio-discs bioMérieux^R SA, BioRad Marne-la coquette, France) sont appliqués sur la surface de la gélose à l'aide d'un distributeur automatique. Les antibiotiques testés et les critères d'interprétation sont représentés dans le tableau 5 (annexe 5).

- **Lecture**

Réalisée après 18-24 h d'incubation à 35-37 °C sous CO₂. La lecture de l'antibiogramme est effectuée à partir des mesures à l'aide d'un pied à coulisse. Ces valeurs sont comparées aux valeurs critiques de l'antibiotique correspondant.

Le germe est qualifié de sensible (S), d'intermédiaire (I) ou de résistant (R) selon le degré de sensibilité des souches, évalué par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition.

6.2 Détection de la résistance aux bêta-lactamines

La détection de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline G (PSDP) est réalisée avec un disque d'oxacilline à 5 µg (OXA-5) selon la méthode du CA-SFM (comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Chardon, 2008), aux critères suivants :

- diamètre OXA-5 \geq 26 mm : souche sensible à la pénicilline G et aux autres bêta-lactamines.
- diamètre OXA-5 $<$ 26 mm : souche de sensibilité diminuée à la pénicilline G et aux autres bêta-lactamines.

Ce test ne peut pas apprécier le niveau de résistance à la pénicilline G ou aux autres bêta-lactamines. L'utilisation d'autres disques de bêta-lactamines ne permet pas de déterminer le niveau de résistance à ces bêta-lactamines. En conséquence, devant toute souche de sensibilité diminuée (OXA-5 $<$ 26 mm), il y a lieu de déterminer la CMI de la pénicilline G et celle d'au moins une des bêta-lactamines dont les propriétés pharmacodynamiques sont compatibles avec une efficacité thérapeutique. En diffusion en gélose, le disque de pénicilline G ne convient pas pour détecter les PSDP, ce disque trop fortement chargé donne des diamètres d'inhibition de 25 à 28 mm pour les PSDP, sans aucune corrélation avec les CMI. Le dépistage des PSDP se pratique grâce au disque d'oxacilline, méthode sensible. Le disque chargé à 5 µg est recommandé : si le diamètre d'inhibition est inférieur à 26 mm, la souche doit être considérée comme PSDP probable et subir des investigations complémentaires. Il n'existe donc pas de diamètre critique pour toutes les autres bêta-lactamines.

6.3 Détection des souches de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones

Le dépistage des pneumocoques de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones est réalisé par la mesure de la sensibilité à la norfloxacin. Si le diamètre autour du disque de norfloxacin (charge à 5 µg) est inférieur à 10 mm, il existe un risque de sélection in vivo de mutants résistants aux fluoroquinolones [CA-SFM (Chardon, 2008)]. Dans notre cas nous avons remplacé la norfloxacin par l'ofloxacin.

6.4 Test de caractérisation des phénotypes de résistance aux macrolides

La caractérisation du phénotype de résistance aux macrolides est effectuée selon la méthode de Diawara *et al.* (2016). A partir d'une suspension de *S.pneumoniae* à un standard de Mc Farland 0,5, on effectue un ensemencement par écouvillonnage sur gélose MH additionnée de 5% de sang de mouton. À l'aide d'une pince ou un distributeur de disques d'antibiotiques, on applique 2 disques : clindamycine (DA, 2 µg) et érythromycine (E, 15 µg) en laissant une distance de 12mm entre les deux disques. Après 18 h à 24h d'incubation à 37° C :

- l'absence d'une zone d'inhibition autour des deux disques indique le phénotype MLS_B.
- La présence d'une résistance modérée de l'érythromycine et la présence d'une zone d'inhibition autour du disque de clindamycine avec action de synergie indique le phénotype MLS_B.
- l'absence d'une zone d'inhibition autour du disque d'érythromycine uniquement, avec une zone d'inhibition autour du disque de clindamycine indique le phénotype M.

7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des bêta-lactamines (CMI)

7.1 Détermination de la CMI par E-test

Principe

Le système E-test® utilise une bande en plastique non poreuse calibrée par un gradient pré- établi de concentrations d'antibiotiques couvrant plusieurs dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé (Joly-Guillou, 2006). Les antibiotiques testés sont l'amoxicilline, le céfotaxime et l'imipénème [Bandes E-test® BioMérieux, AB Bio-discs, selon les recommandations du fournisseur].

Le gradient couvre une gamme de concentrations allant de 0,015 ou 0,016 à 256 µg/ml ou 0,002 à 32 µg/ml selon l'antibiotique (tableau 6).

Tableau 6. Bandes E-Test et gradients de concentration

Antibiotique	Gradient de concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Amoxicilline	0,016-256 et/ou 0,015-256
Céfotaxime	0,002-32 et/ou 0,016-256
Imipenème	0,002-32

Réalisation du test

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum est préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 20 à 24 heures dans de l'eau physiologique stérile. La suspension est calibrée à l'échelle 0,5 Mc Farland.

- **Ensemencement**

La gélose au sang utilisée est soit déjà préparée, soit coulée avec une épaisseur de 4,5 à 5mm (une fois la gélose solidifiée, la boîte est mise à l'étuve pour avoir une surface bien sèche). L'ensemencement est effectué par écouvillonnage qui consiste à imbiber un écouvillon stérile de la suspension bactérienne, essorer sur le rebord du tube et effectuer un passage de l'écouvillon sur toute la surface de la gélose par simple rotation de 120° tout en s'assurant que toute la boîte est bien ensemencée, ensuite appliquer les bandes E-test® et incuber immédiatement les boîtes à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO₂ pendant 20 à 24 heures.

- **Lecture de la valeur de la CMI**

L'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse. La valeur de la CMI correspond au point d'intersection entre la limite de la zone d'inhibition et la bande d'E-test®. Les valeurs obtenues sont comparées aux normes du CLSI 2007.

Tableau 7. Critères d'interprétation des CMI de *S.pneumoniae* selon les normes du CLSI 2007 (CLSI, 2007)

Interprétation Antibiotique	Sensible	Intermédiaire	Résistant	ATCC 49619 Contrôle de qualité
Pénicilline	$\leq 0,06$	0,12 - 1	≥ 2	0,25-1
Amoxicilline				0,03 – 0,12
Méningite	$\leq 0,5$	1	≥ 2	
Autre	≤ 2	4	≥ 8	
Céfotaxime				0,03 – 0,12
Méningite	$\leq 0,5$	1	≥ 2	
Autre	≤ 1	2	≥ 4	
Imipenème	$\leq 0,12$	0,25 – 0,5	≥ 1	0,03 – 0,12

7.2 Technique de dilution en gélose

Principe

Cette technique consiste à déposer des suspensions bactériennes calibrées sur des milieux contenant des concentrations croissantes d'antibiotique. L'antibiotique testé est la pénicilline (groupe industriel SAIDAL, Algérie).

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne (selon la technique de Standardisation de l'Antibiogramme à l'Echelle Nationale 2011).

Réalisation du test

- **Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique**
 - ✓ Peser 51,20 mg de poudre titrée d'antibiotique.
 - ✓ Diluer dans le volume de solvant approprié pour obtenir une concentration stock de 5120 µg/ml (solution-mère).

- ✓ Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2, dans de l'eau physiologique stérile, jusqu'à la concentration finale de 1,25 µg/ml (tableau 8).
- ✓ Répartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée sans changer de pipette.
- ✓ Compléter chaque boîte avec 18 ml de gélose au sang (milieu Mueller-Hinton + 5% de sang de mouton) liquéfiée et homogénéiser délicatement le contenu des boîtes par des mouvements circulaires.
- ✓ La dilution obtenue (1/10ème) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées.
- ✓ Préparer, en parallèle, une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.
- ✓ Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

Tableau 8. Schéma des dilutions d'antibiotique pour la CMI à la pénicilline

Etape	Concentration (µg/ml)	ATB (ml)	Diluant (ml)	Concentration intermédiaire	Concentration finale dans la gélose (µg/ml)
SM	5120			5120	512
1	5120	2	2	2560	256
2	5120	1	3	1280	128
3	5120	1	7	640	64
4	640	2	2	320	32
5	640	1	3	160	16
6	640	1	7	80	8
7	80	2	2	40	4
8	80	1	3	20	2
9	80	1	7	10	1
10	10	2	2	5	0,5
11	10	1	3	2,5	0,25
12	10	1	7	1,25	0.125

- **Préparation de l'inoculum bactérien**

Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 Mc F, utiliser l'eau physiologique pour la préparation de la suspension directement à partir d'une culture jeune de la souche à tester.

- **Dépôt des spots bactériens**

- ✓ Déposer les spots dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum.
- ✓ Marquer la boîte de dilution d'antibiotique pour localiser et identifier chaque spot.

Commencer par la boîte témoin, puis déposer les spots sur les différentes boîtes en allant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée.

- **Incubation**

- ✓ Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn).
- ✓ Renverser les boîtes et incuber à 37°C pendant 16-20 heures.

- **Lecture des CMI**

- ✓ Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive.
- ✓ Noter la CMI (la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible).
- ✓ Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film.
- ✓ Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- ✓ Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

8. Sérotypage

Principe

Le sérotypage est réalisé par la méthode d'agglutination au latex. Le principe du sérotypage est basé sur les réactions antigènes-anticorps. Nous avons à notre disposition un ensemble de sérum poolés « A » à « I » du Statens Serum institut de Copenhague (Danemark). Chacun des 14 pools d'antisérum se composait d'un mélange de 7 à 11 anticorps. L'ensemble des 14 pools couvrait les 93 sérogroupes connus. Nous donnons le nom de sérotypes à l'ensemble des sérotypes et sérogroupes.

Réalisation de la technique

La technique utilisée est celle de Slotved *et al.* (2004), visualisée par une agglutination qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène-anticorps. Une suspension bactérienne riche (2 Mc Farland dans de l'eau physiologique) est préparée. Sur une plaque d'agglutination, 10µl de la suspension bactérienne à tester sont mélangés avec 10µl de l'antisérum (commencer par les pools de A à I) (Annexe 6 ; tableau 9). La lame est secouée dans un mouvement rotatoire manuellement pendant 5 à 8 secondes.

Lecture des résultats

La lecture se fait à l'œil nu par l'apparition de particules agglutinées alors que le reste de la suspension devient clair. Si l'agglutination est obtenue après 30 secondes, la réaction est considérée comme faussement positive.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification

S.pneumoniae est l'une des causes les plus fréquentes d'infections invasives graves, telles que la méningite, la pneumonie et la bactériémie et la cause de morbidité importante dans le monde. L'apparition et la propagation rapide de souches résistantes à la pénicilline et de souches multirésistantes rend l'identification exacte des isolats de pneumocoques encore plus importante qu'auparavant.

1.1 Examen macroscopique des colonies

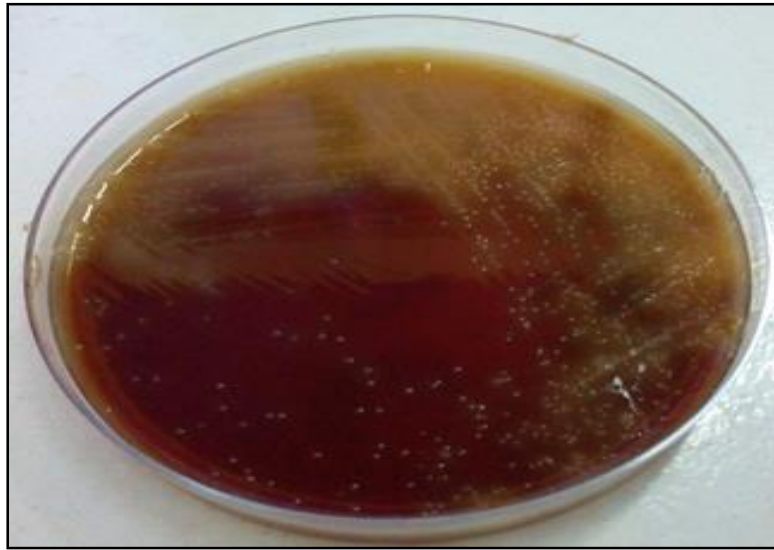


Figure 11. Photographie de l'aspect macroscopique de *S.pneumoniae* sur gélose au sang après incubation à 37°C pendant 24h

S.pneumoniae donne sur gélose au sang de petites colonies rondes de 0,5 à 1,5 mm de diamètre, à dépression centrale, lisses, brillantes, entourées d'une zone d'hémolyse partielle (alpha) donnant à la gélose une couleur verdâtre comme le montre la figure 11.

1.2 Examen Microscopique après coloration de Gram

L'observation microscopique à l'objectif à immersion montre des diplocoques à Gram positifs lancéolés en flamme de bougie. Il s'agit là d'une morphologie généralement caractéristique du pneumocoque.

1.3 Résultats de l'identification par méthodes phénotypiques

Tableau 10. Résultat de l'identification par les méthodes conventionnelles (11 souches)

n° Souche	Résistance à l'optochine	à Solubilité dans les sels biliaires	Test à la catalase
1	Sensible	Positive	Négatif
2	Sensible	Négative	Négatif
3	Sensible	Positive	Négatif
4	Sensible	Positive	Négatif
5	Sensible	Positive	Négatif
6	Sensible	Positive	Négatif
7	Sensible	Positive	Négatif
8	Sensible	Négative	Négatif
9	Sensible	Positive	Négatif
10	Sensible	Positive	Négatif
11	Sensible	Positive	Négatif

Selon le tableau 10, le test à la catalase n'a été utilisé que pour pouvoir faire la discrimination entre streptocoques et autres Gram positifs. Concernant le test de sensibilité à l'optochine, 11 souches sur 11 (100%) testées présentent un diamètre supérieur à 14mm (annexe 7 ; figure 12). Ce test nous a permis de faire le diagnostic différentiel surtout avec les autres streptocoques qui sont résistants à l'optochine.

Pour le test de solubilité dans les sels biliaires, les souches ne sont pas toutes solubles, 2 souches sur 11 (18,18%) présentent un résultat négatif (annexe 8 ; figure 13).

Notre étude donne un aperçu sur la performance des différentes méthodes phénotypiques pour l'identification de *S.pneumoniae*. Les 11 souches de pneumocoques sont

identifiées comme *S. pneumoniae* sur la base de tests de routine (alpha- hémolyse, caractéristiques des colonies et coloration de Gram).

Dans de nombreux laboratoires cliniques, le test de sensibilité à l’optochine est le test le plus couramment utilisé pour la discrimination entre les pneumocoques et les autres streptocoques du groupe *viridans*. En général, ces derniers sont généralement résistants à cet agent, ainsi, quand il n’y a pas de zone d’inhibition autour du disque d’optochine, la souche est régulièrement identifiée comme un streptocoque. Un streptocoque α -hémolytiques optochine-sensible est un pneumocoque.

Le test de solubilité dans la bile a été jugé comme une méthode simple et fiable pour l’identification de *S. pneumoniae* (Arbique *et al.*, 2004) . Ce test peut être utilisé comme un test supplémentaire si le résultat n’est pas concluant mais des souches de pneumocoque sensibles à l’optochine et non solubles dans la bile ont déjà été décrites (Kellogg *et al.*, 2001) et l’identification de *Streptococcus sp* fondée sur ce test peut souvent conduire à des résultats erronés. Donc le test de sensibilité à l’optochine reste le teste fiable comme méthode conventionnelle pour l’identification de *S.pneumoniae*.

2. Profil épidémiologique

2.1 Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon la saison

Tableau 11. Répartition des souches de *S.pneumoniae* en fonction des mois

Mois	n°(%)
Octobre	02 (18,18)
Novembre	01 (09,09)
Décembre	02 (18,18)
Janvier	01 (09,09)
Février	03 (27,27)
Mars	02 (18,18)

Selon les données de la littérature, les infections pneumococciques sont en règle sporadique, *S.pneumoniae* est remarqué en particulier dans la période hivernale avec des taux élevés mais dans notre cas et vu les changements climatiques de cette année nous avons obtenu un nombre faible de *S.pneumoniae*.

2.2 Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon la nature du prélèvement

Tableau 12. Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon la nature du prélèvement

Produit pathologique	n°(%)
Liquide céphalo-rachidien	5 (45,45)
Prélèvement trachéal	1 (9,09)
Liquide pleural	1 (9,09)
Pus auriculaire	1 (9,09)
Pus oculaire	1 (9,09)
Hémoculture	1 (9,09)
Liquide articulaire	1 (9,09)
Total	11 (100)

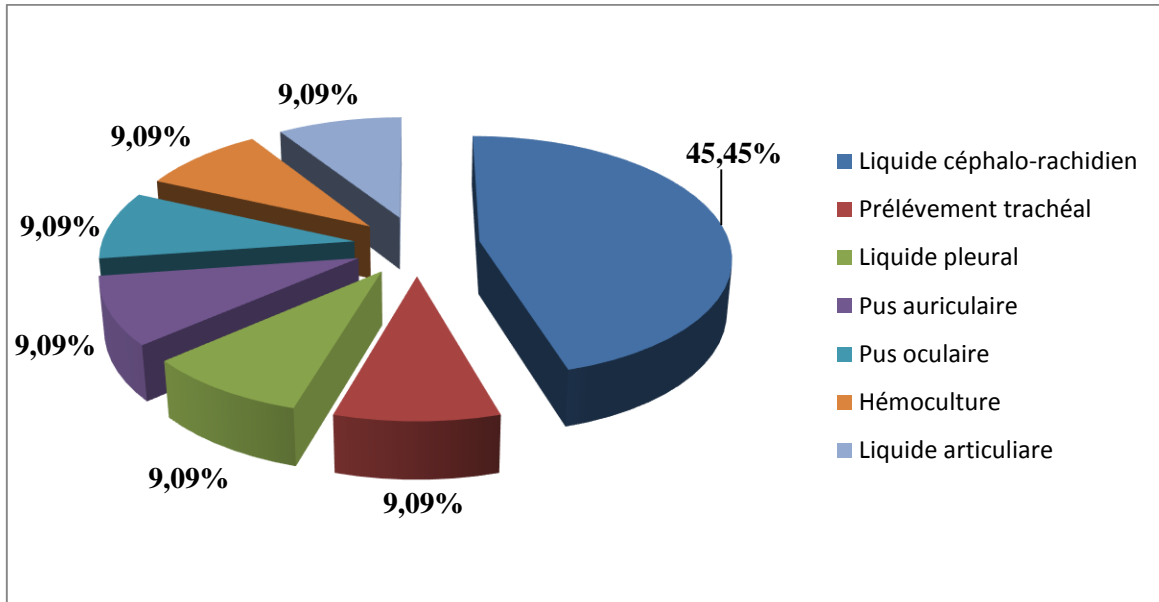


Figure 14. Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon la nature du prélèvement

Nos souches de *S.pneumoniae* ont été isolées à partir d’une variété des produits pathologiques responsables de diverses infections invasives et non invasives. En majorité, nos souches sont d’origine invasive, provenant essentiellement de LCR avec une fréquence élevée de 45,45 % (5/11). Par ailleurs, les autres souches sont isolées de liquide pleural, de liquide articulaire, de pus oculaire, de pus auriculaire, d’hémoculture et prélèvement trachéal dans de faibles proportions (9,09%, 1/11 chacun) (figure 14).

S.pneumoniae est le plus souvent responsable d'infection non invasive selon l'étude de Tali maamar *et al.* (2012), surtout dans les pus d'otites. Notre faible échantillon ne nous a pas permis de faire cette constatation.

Quant aux infections invasives, le taux des souches isolées à partir d'LCR élevé est retrouvé dans l'étude de Hecini-Hannachi (2014) en Algérie (75%) et dans l'étude de Dia *et al.* (2013) au Sénégal (59,49 %). C'est l'inverse de ce qui a été constaté en Gambie par Adegbola *et al.* (2006) où les souches invasives de *S.pneumoniae* ont été isolées, surtout des hémocultures (79 %) puis du LCR (16%).

2.3 Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon le sexe

Tableau 13. Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon le sexe

Sexe	n°(%)
Sexe féminin	1 (9,09)
Sexe masculin	10 (90,90)

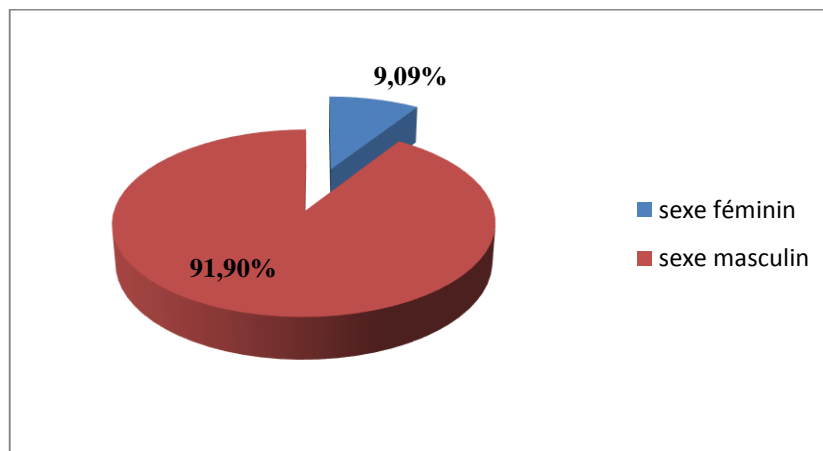


Figure 15. Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon le sexe

Nos résultats montrent une nette prédominance des souches de *S.pneumoniae* isolées chez des patients de sexe masculin avec 90,90% (10/11) des cas contre 9,09% (1/11) des souches qui ont été isolées chez des patients de sexe féminin (sex-ratio 10) (figure 15). D'après Avril *et al.* (1992) la fréquence des souches isolées chez l'homme est beaucoup plus élevée.

Verhaegen *et al.* (1990), trouvent que 60 % des infections à pneumocoques sont retrouvés chez des patients de sexe masculin. Les infections à *S.pneumoniae* prédominent en général chez l’homme à cause du terrain (sédentarité, tabagisme...).

2.4 Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon le service clinique

Tableau 14. Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon le service clinique

Service clinique	n°(%)
Unité de réanimation médicale	5 (45,45)
Urgences médicales	2 (18,18)
Urgences pédiatriques	2 (18,18)
Service des brulés	1 (9,09)
Service d'orthopédie	1 (9,09)
Total	11 (100)

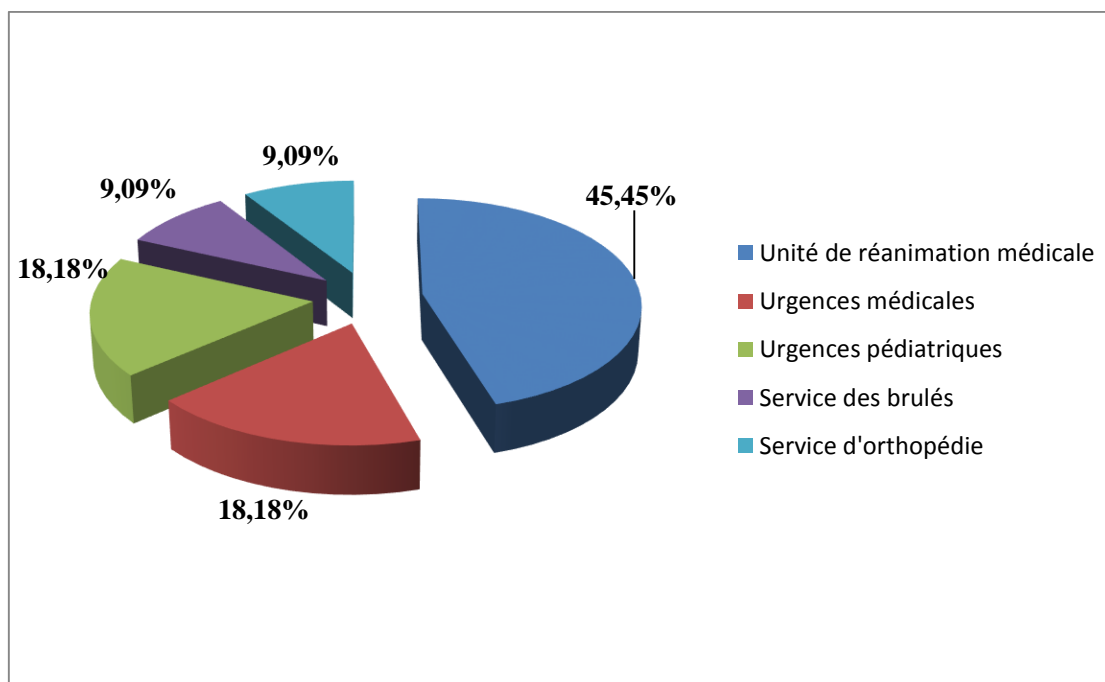


Figure 16. Répartition des souches de *S.pneumoniae* selon le service clinique

Le laboratoire de bactériologie a reçu dans la période de notre étude des prélèvements issus de plusieurs services tels que : l’unité de réanimation médicale, les urgences médicales, les urgences pédiatriques, le service d'orthopédie et le service des brulés.

Le tableau 14 montre que plus de 40% des isolements de *S.pneumoniae* provenaient de patients hospitalisés à l'unité de réanimation médicale d'où la sévérité de l'infection.

Les autres prélèvements proviennent des urgences médicales et des urgences pédiatriques avec une fréquence de 18,18% des cas pour chaque service (2/11), du service des brûlés et du service d'orthopédie avec une fréquence de 9,09% chacun (1/11). Les infections à *S.pneumoniae* sont souvent graves et constituent un problème de santé publique (OMS).

2.5 Fréquence des infections à *S.pneumoniae* en fonction de la nature de l'infection et de l'âge

Tableau 15. Fréquence des infections à *S.pneumoniae* en fonction de la nature de l'infection et de l'âge

Nature de l'infection	Tranche d'âge n(%)					Total (%)
	≤5ans	6- 17ans	18-40ans	41-59ans	≥60ans	
INI						
2 Otite	1(9,09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(9,09)
2 Conjonctivite	1(9,09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(9,09)
IIN						
9 Méningite	2(18,18)	0 (0)	2(18,18)	0 (0)	1(9,09)	5(45,45)
9 Pneumopathie	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2(18,18)	2(18,18)
Bactériémie	1(9,09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(9,09)
Arthrite	0 (0)	1(9,09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(9,09)
Total (%)	5(45,45)	1(9,09)	2(18,18)	0 (0)	3(27,27)	11(100)

INI : Infection non invasive , IIN : Infection invasive

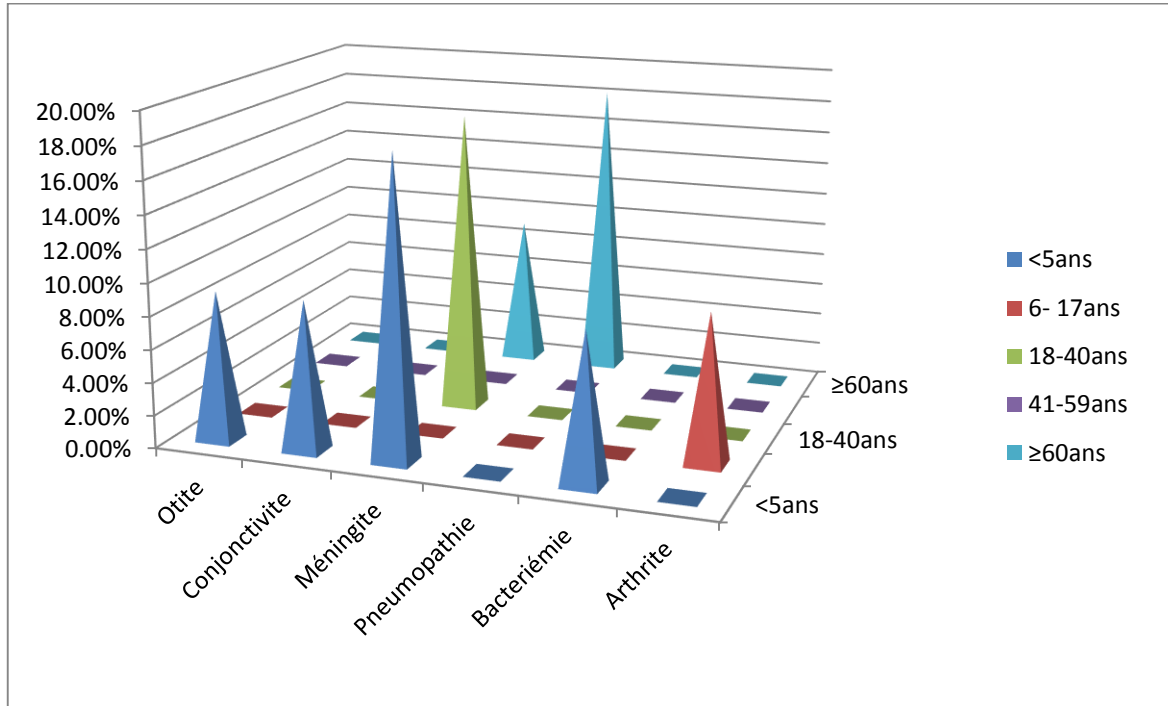


Figure 17. Fréquence des infections à *S. pneumoniae* en fonction de la nature de l'infection et de l'âge

Les infections à *S.pneumoniae* sont observées dans toutes les tranches d'âge avec des extrémités variant entre 8mois et 86ans.

La tranche d'âge qui semble la plus touchée par ces infections dans notre étude est celle de l'enfant dont l'âge est inférieur ou égale à 5 ans (5/11, 45,45%), Suivie par la population des personnes âgées de plus de 60ans (3/11, 27,27%), les infections pneumococciques sont beaucoup plus fréquentes aux âges extrêmes de la vie [(Ortqvist *et al.* (2005) ; Kempf *et al.* (2010), Collet *et al.* (2009)].

Nos onze souches de *S.pneumoniae* sont responsables d'infections dont la plupart sont invasives (9/11, 81,81%).

Pour les infections non invasives, elles se répartissent en 1 cas d'otite (9,09%) et 1 cas de conjunctivite (9,09%), remarquées surtout chez l'enfant de moins de 5ans. Concernant les infections invasives, elles se répartissent en 5 cas de méningites (45,45%), observés presque dans toutes les tranches d'âge, 2 cas de pneumopathies (18,18%) observés chez les adultes de plus de 60ans puis 1 cas de bactériémie et 1 cas d'arthrite (9,09% chacun) chez l'enfant et chez l'adolescent (tableau 15).

Nous pouvons constater dans notre étude que le taux de méningites est plus élevé chez l'enfant et le taux des pneumopathies plus élevé chez les adultes de plus de 60ans, conformément aux données de la littérature Smati *et al.* (1994).

3. Résistance aux antibiotiques

3.1 Résistance à la pénicilline

Tableau 16. Valeurs des diamètres d'OXA obtenus avec les valeurs de CMI pour la pénicilline

souche	CMI de pénicilline ($\mu\text{g/ml}$)	Diamètres oxacilline (mm)
1	2	13
2	4	14
3	0,5	09
4	0,5	19
5	0,5	25
6	0,125	25
7	0,5	00
8	2	23
9	2	10
10	0,25	13
11	2	07

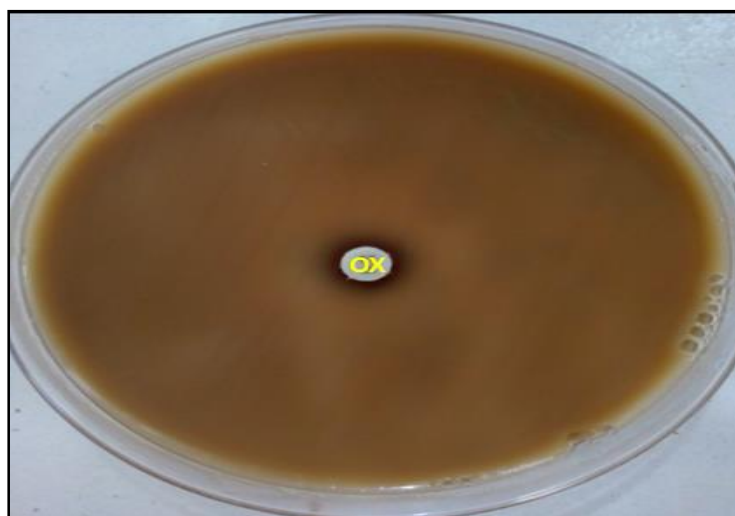


Figure 18. Résultat du test de screening par l'oxacilline après incubation à 37°C pendant 24h

La détection de la résistance à la pénicilline G a été effectuée par un disque d'oxacilline chargé à 5µg. Ce test a donné des diamètres d'OXA-5 < 26 mm pour les 11 souches testées, ce qui signifie des souches 100% PSDP (CMI entre 0,125 et 4 µg/ml).

D'après ces résultats et d'après la figure 18, nous constatons un taux très élevé de souches de sensibilité diminuée à la pénicilline (100%). Parmi ces souches, 5 sont résistantes (5/11, 45,45%) et 6 sont de résistance intermédiaire (6/11, 54,54%). Les CMI des souches résistantes s'échelonnent entre 2 et 4 µg/ml. Quant aux souches intermédiaires, leurs CMI sont comprises entre 0,125 et 0,5 µg/ml (se référant aux normes du CLSI 2007 (CMI < 0,06 µg/ml sensible, CMI entre 0,1 et 1µg/ml : intermédiaire et CMI ≥ 2 µg/ml : résistant).

S.pneumoniae est naturellement sensible à de nombreux antibiotiques en particulier aux bêta-lactamines qui sont le traitement de référence des infections à pneumocoque mais la situation actuelle en termes de résistance reste préoccupante.

Depuis la description de la première souche de sensibilité diminuée à la pénicilline G en 1967 en Australie, le taux de PSDP ne cesse d'augmenter dans de nombreux pays et selon Bingen *et al.* (2005) et O'Brien *et al.* (2009) en Europe, c'est la France après l'Espagne qui présente le taux de PSDP le plus élevé avec près de 40 % des souches isolées chez l'adulte, ce taux s'élevant chez l'enfant à 54 % pour les cas de méningites.

D'après Lupien, (2015) aux États-Unis, plus de 25% sont des souches PSDP, mais ce pourcentage pourrait atteindre jusqu'à 60 et même 80% en Amérique latine et dans quelques pays d'Asie.

Les taux rapportés pour le Kenya, l'Ouganda, la Tanzanie et l'Ethiopie ont été aussi bas en 2003-2007 (Mudhune *et al.*, 2009), un taux de 0,5% a été déclaré en Afrique du Sud (Silberbauer *et al.*, 2011).

Concernant les pays avoisinants, les taux de PSDP étaient respectivement de 52,8 % et 43,3 % en Tunisie et au Maroc (Smaoui *et al.*, 2009 ; Benbachir *et al.*, 2012).

En Algérie, plusieurs études ont été faites et le taux de PSDP ne cesse d'augmenter. A Constantine précisément et selon Smati *et al.* (1994), le taux de PSDP était de 12,5%, en majorité de résistance intermédiaire à la pénicilline. D'après Benouda *et al.* (2009), dans une

étude menée à Alger (1995-2000), le taux de PSDP était de 34,6%, pour atteindre 48,1% selon l'étude de Tali-Maamar *et al.* (2012) menée entre 2005 et 2012. Le taux de PSDP a grimpé pour atteindre les 57% dans l'étude de Hecini-Hannachi (2014).

Ces résultats montrent une nette augmentation de taux des PSDP dans notre pays notamment dans les infections invasives et la diffusion des souches PSDP a transformé le problème thérapeutique en problème de santé publique.

3.2 Résistance aux autres bêta-lactamines

Tableau 17. Distribution des souches de *S.pneumoniae* en fonction de leurs CMI de Pénicilline, Céfotaxime et Amoxicilline

Antibiotique	Valeurs des CMI (µg/ml)	% S	% I	% R
Pénicilline	0,125 - 04	0% (0/11)	54,54% (6/11)	45,45% (5/11)
Amoxicilline	0,032 - 04	81,81% (9/11)	18,18% (2/11)	0% (0/11)
Céfotaxime	0,016 - 02	72,72% (8/11)	27,27% (3/11)	0% (0/11)
Imipènème	0,004 - 0,125	100% (11/11)	0% (0/11)	0% (0/11)

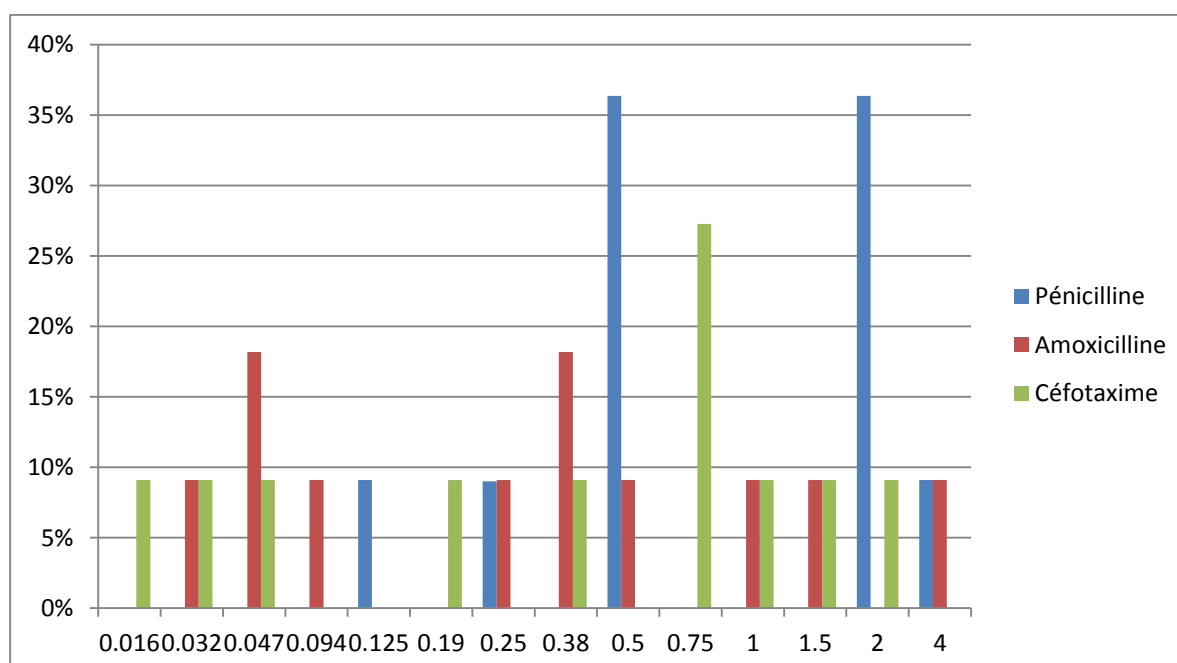


Figure 19. Distribution des souches de *S.pneumoniae* en fonction de leurs CMI de Pénicilline, Céfotaxime et Amoxicilline

La détermination des CMI pour les autres bêta-lactamines a été effectuée par des bandelettes plastifiées « E-test » (annexe 9 ; figure 20, 21) et d'après le tableau (17) nous remarquons :

- Parmi les souches de sensibilité diminuée à l'amoxicilline, 2 souches sont intermédiaires avec des CMI de 1 à 4 µg/ml et pour le céfotaxime, 3 souches sont intermédiaires avec des CMI de 1 à 2 µg/ml.
- Malgré le taux élevé de PSDP, aucune souche résistante à l'amoxicilline ou au céfotaxime n'a été isolée.
- Une souche (souche n°7) a une CMI à l'amoxicilline (4 µg/ml) plus élevée qu'à la pénicilline (0,5 µg/ml) isolée d'un pus oculaire chez un enfant âgé de 8 mois.
- Une souche (souche n°5) a une CMI au céfotaxime (2 µg/ml) plus élevée qu'à la pénicilline (0,5 µg/ml) isolée d'un pus d'otite chez un enfant âgé de 11 mois.
- L'imipénème reste une molécule très active, aucune souche résistante n'a été mise en évidence dans notre étude.

Tableau 18. Description des souches PSDP

n	Age	Site d'isolement	CMI (µg/ml)					
			Pénicilline		Amoxicilline		Céfotaxime	
1	9 mois	LCR	2	R	0,38	S	0,38	S
2	35 ans	LCR	4	R	0,094	S	0,19	S
3	80 ans	Liquide pleural	0,5	I	0,50	S	0,75	S
4	15ans	Liquide articulaire	0,5	I	0,047	S	0,032	S
5	11 mois	Pus auriculaire	0,5	I	1,5	S	2	I
6	11 mois	Hémoculture	0,125	I	0,047	S	0,016	S
7	8 mois	Pus oculaire	0,5	I	4	I	0,75	S
8	70 ans	LCR	2	R	0,032	S	0,047	S
9	23 ans	LCR	2	R	1	I	1	I
10	86 ans	prélèvement trachéal	0,25	I	0,25	S	1,5	S
11	10 mois	LCR	2	R	0,38	S	1	I

3.3 Résistance aux macrolides et apparentés

Le taux de résistance à l'érythromycine est de 54,54% (6/11) et 5 souches sur 6 sont résistantes à la clindamycine.

La résistance aux macrolides reste préoccupante. *S.pneumoniae* a longtemps montré une sensibilité vis-à-vis des macrolides. A noter que les macrolides font partie, jusqu'à présent, des molécules prescrites en première intention.

Les souches PSDP sont le plus souvent résistantes aux macrolides et sachant que nos souches sont 100% des souches PSDP, nous constatons que plus de la moitié des souches de *S.pneumoniae* isolées dans notre étude présentent une résistance à l'érythromycine, un taux très élevé comparé à ceux retrouvés dans d'autres études algériennes [Smati *et al.*, 1994 (16%), Tali-Maamar *et al.*, 2012 (31%), Hecini-Hannachi, 2014 (22%)].

Pour les streptogramines 'pristinamycine' aucune souche résistante n'est isolée.

Le mécanisme de résistance aux macrolides dans notre étude est de type « MLS_B » (figure 22) dont le support génétique est le gène *ermB* qui induit une résistance plus souvent constitutive, ce gène code pour une 23S ARNr méthylase qui modifie la cible ribosomale de ces antibiotiques.

Nous remarquons l'absence de la résistance de type M, qui correspond à un système d'efflux codé par le gène *mef* qui confère un bas niveau de résistance aux macrolides en C14 et C15.

Le phénotype de résistance de type MLS_B associé au gène *erm* est le plus commun en Europe, notamment en Belgique, France, Pologne (Méndez-Lagea *et al.*, 2015), également en Italie et en Espagne, alors qu'aux Etats-Unis, le mécanisme de résistance de type *mef* prédomine (Bingen, 2005).

Le taux élevé de résistance à l'érythromycine est dû à l'introduction de nouveaux macrolides (azithromycine, clarithromycine) et de leur usage excessif à la fois chez l'adulte comme chez le jeune enfant dans les infections respiratoires hautes (Hyde *et al.*, 2001).

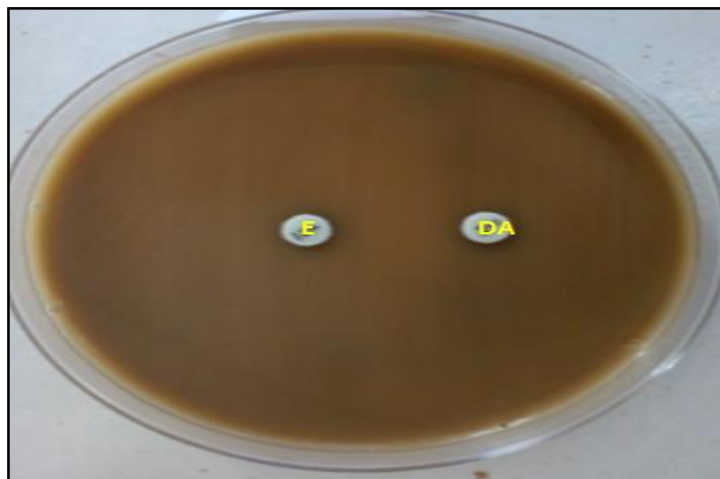


Figure 22. Phénotype de résistance aux macrolides MLS_B

3.4 Résistances aux autres antibiotiques

Dans cette présente étude toutes les souches de *S.pneumoniae* ont été testées vis-à-vis des 11 molécules d'antibiotiques appartenant à des familles différentes dont les bêta-lactamines, Macrolides, Tétracyclines, Sulfamides, Phénicolés, Fluoroquinolones, Glycopeptides, Rifamycine. Leurs activités ont été évaluées par la méthode de diffusion en gélose.

Les résultats de la mesure du diamètre des zones d'inhibition basée sur la standardisation CLSI 2007 sont présentés dans le tableau 19 (annexe 10).

Tableau 20. Résistance de *S.pneumoniae* aux antibiotiques

Famille d'ATB	Antibiotique	n°(%)
bêta-lactamines	Pénicilline G (PSDP)	11 (100)
Cyclines	Tétracycline	7 (63,63)
Macrolides	Erythromycine	6 (54,54)
	Clindamycine	5 (45,45)
	Pristinamycine	0 (0)
Sulfamides	Cotrimoxazole	5 (45,45)
Phénicolés	Chloramphénicol	3 (27,27)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	1 (9,09)
	Levofloxacine	0 (0)
Glycopeptides	Vancomycine	0 (0)
Rifamycine	Rifampicine	0 (0)

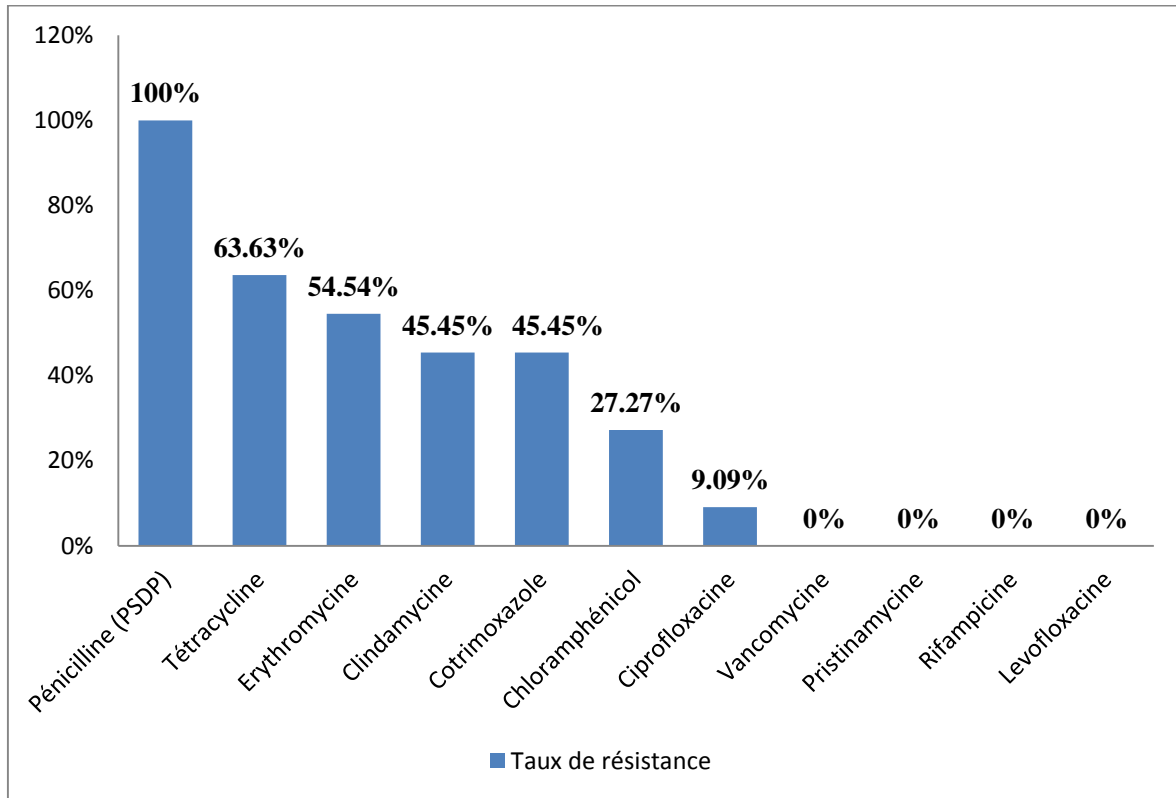


Figure 23. Répartition de la résistance de 11 souches de *S.pneumoniae* à 11 antibiotiques

3.4.1 Résistance aux fluoroquinolones

D’après le test de screening qui a été effectué par un disque d’ofloxacine (F2G) aucune résistance n’est détectée (diamètre inférieure à 10mm).

Pour la levoflaxacine (F3G), le taux de résistance est nul. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bamidele *et al.* (2012) en Nigéria ; Hecini-Hannachi. (2014) en Algérie.

Nous signalons dans notre étude un très faible taux de résistance (1/11, 9,09%) à la ciprofloxacine (fluoroquinolone de 2^{ème} génération). Les fluoroquinolones sont des molécules très actives sur les pneumocoques, mais plutôt celles de troisième génération comme la lévofloxacine.

La prévalence mondiale de la résistance aux fluoroquinolone est inférieure à 1 %, toutefois celle-ci est beaucoup plus élevée dans certaines régions d’Asie telles que Hong Kong où elle a dépassé les 17 % (Ho *et al.*, 2004), le Sri Lanka (9,5%), les Philippines (9,1%) et la Corée (6,5%) (Morrissey *et al.*, 2003 ; Song *et al.*, 2004).

Au Canada, l'utilisation de la ciprofloxacine a causé une augmentation de la prévalence des souches résistantes de 1% en 1997 à 4,2% en 2005 (Adam *et al.*, 2007).

Alors que, 2,3 % des souches étudiées au Centre de référence des Pneumocoques en France avaient acquis au moins un mécanisme de résistance aux fluoroquinolones en 2007 (Kempf *et al.*, 2011).

3.4.2 Résistance à la vancomycine et à la rifampicine

Dans notre étude, comme dans la littérature, toutes les souches ont été sensibles à la vancomycine et à la rifampicine. Elles ne présentent que des phénotypes sauvages « sensibles », ces résultats sont identiques avec ceux retrouvés dans d'autres études Algériennes (Smati *et al.*, 1994 ; Hecini –Hannachi., 2014).

Ces molécules restent une alternative dans le traitement des infections sévères à pneumocoques lors d'un échec thérapeutique.

3.4.3 Résistance à la tétracycline et au cotrimoxazole

Les taux de résistance à la tétracycline et au cotrimoxazole sont respectivement de 63,63% et 45,45 % dans notre étude.

Des taux de 30 % et 43 % sont observés dans une récente étude algérienne (Tali-Maamar *et al.*, 2012) et aussi 20 % et 51% (Hecini –Hannachi , 2014) alors que des taux de résistance à ces deux antibiotiques, très bas , sont rapportés en 1994 (14 % et 8 %) (Smati *et al.*, 1994).

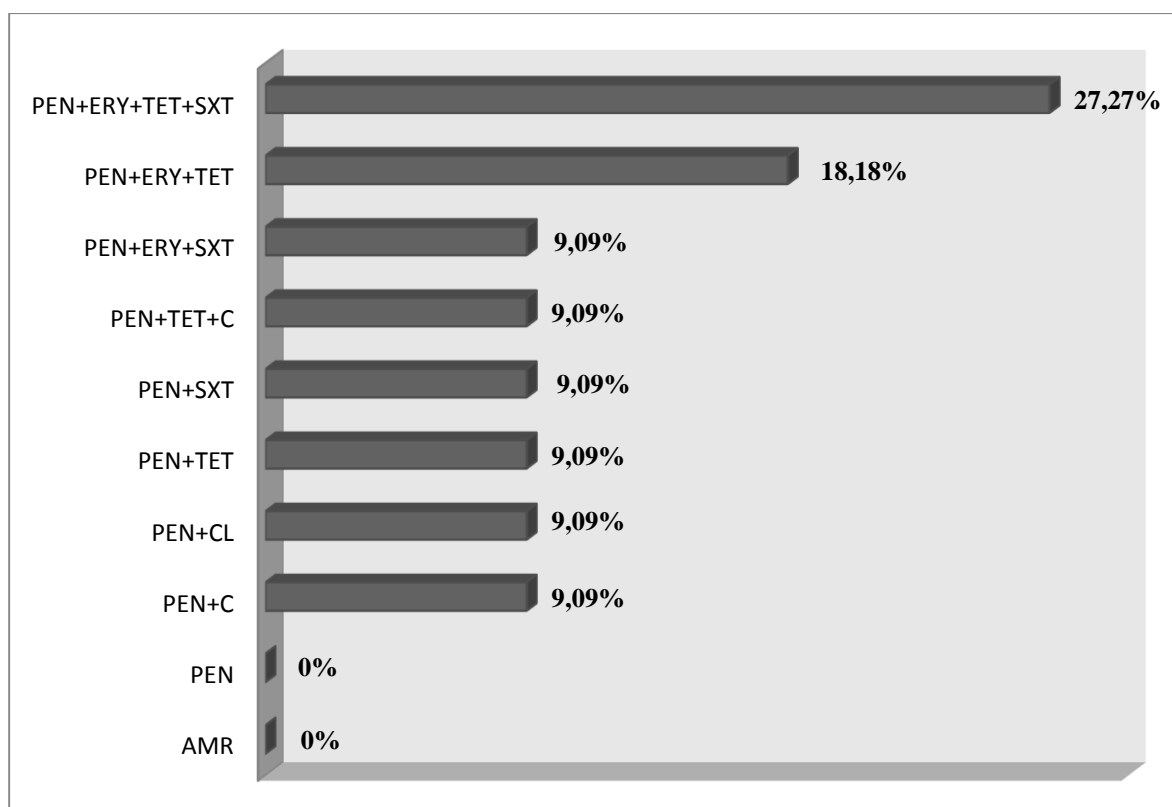
3.4.4 Résistance au chloramphénicol

Le taux de résistance pour le chloramphénicol est de 27,27%. Dans l'étude de Smati *et al.*, 1994 et celle de Hecini-Hannachi *et al.*, 2014, le taux de résistance est nul et atteint 5,8% d'après les résultats de Tali-maamar *et al.* , 2012. Le chloramphénicol est une molécule rarement utilisée dans le traitement des infections à pneumocoques en Algérie.

3.5 Résistance associée et multirésistance

Tableau 21. Résistance associée et multi-résistance de *S.pneumoniae*

Résistance	N°(%)
AMR	0 (0)
PEN	0 (0)
PEN+C	1 (9,09)
PEN+CL	1 (9,09)
PEN+TET	1 (9,09)
PEN+SXT	1 (9,09)
PEN+TET+C	1 (9,09)
PEN+ERY+SXT	1 (9,09)
PEN+ERY+TET	2 (18,18)
PEN+ERY+TET+SXT	3 (27,27)



PEN: pénicilline, ERY: érythromycine, C : Chloramphénicol, TET: tétracycline, SXT: Cotrimoxazole, CL : Ciprofloxacine, AMR : aucun marqueur de résistance.

Figure 24. Résistance associée et multi-résistance de *S.pneumoniae*

La multi résistance est définie chez le pneumocoque par la résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques.

La fréquence des souches cumulant la résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques est indiquée sur la figure 24.

Nous remarquons différents phénotypes de résistance qui sont tous associés à une diminution de sensibilité à la pénicilline.

Le nombre des souches qui ne présentent aucun marqueur de résistance ou un seul marqueur de résistance (résistance isolée) est nul.

La résistance est associée à 2 marqueurs de résistance pour 4 souches :

- Pénicilline + Chloramphénicol : 1 fois
- Pénicilline + Ciprofloxacine : 1 fois
- Pénicilline + Tétracycline : 1 fois
- Pénicilline + Cotrimoxazole : 1 fois

Le taux des souches de *S.pneumoniae* multi résistantes est de 63,63% (7 /11), taux élevé, comparé à celui de 20% retrouvé dans l'étude de Hecini-Hannachi, (2014).

La fréquence des souches multirésistantes a atteint des proportions inquiétantes à l'échelle mondiale (Felmingham *et al.*, 2002), due à des mutations spontanées ou des transferts horizontaux de gènes ou l'acquisition de gènes situés sur des éléments génétiques mobiles (Claverys, 2002 ; Cattoir, 2004)

De plus, il a été récemment démontré que les antibiotiques constituaient des inducteurs directs du mécanisme de compétence, confirmant que la pression de sélection qu'ils exercent contribue aux transferts horizontaux de gènes, et donc à l'émergence de multirésistance (Prudhomme *et al.*, 2006).

4. *S.pneumoniae* et sérotypes

La capsule polysaccharidique demeure le facteur de virulence essentiel chez *S.pneumoniae*, elle détermine plus de 93 sérotypes, dont une vingtaine est responsable d'infections invasives (Song *et al.*, 2013). Après avoir effectué une étude sur les profils de résistance des souches isolées, il était nécessaire d'effectuer le sérotypage pour connaître les sérotypes qui circulent et qui entrent dans la composition du vaccin (couverture vaccinale théorique).

4.1 Résultats du sérotypage par le test d'agglutination au latex

Les sérotypes des 11 souches de *S.pneumoniae* ont été déterminés à l'aide des antisérums fournis par le Statens Serum Institut (Copenhague, Danemark). Le principe de la méthode s'appuie sur l'agglutination des particules des anticorps anti-pneumococciques lorsque celles-ci sont en contact avec des antigènes capsulaires (annexe 11 ; figure 25).

4.2 Distribution globale des sérotypes

Tableau 22. Distribution globale des sérotypes

Sérotypes	n°(%)
19F	2 (18,18)
1	2 (18,18)
2	2 (18,18)
14	1 (9,09)
6B	1 (9,09)
3	1 (9,09)
18C	1 (9,09)
4	1 (9,09)
Total (%)	11 (100)

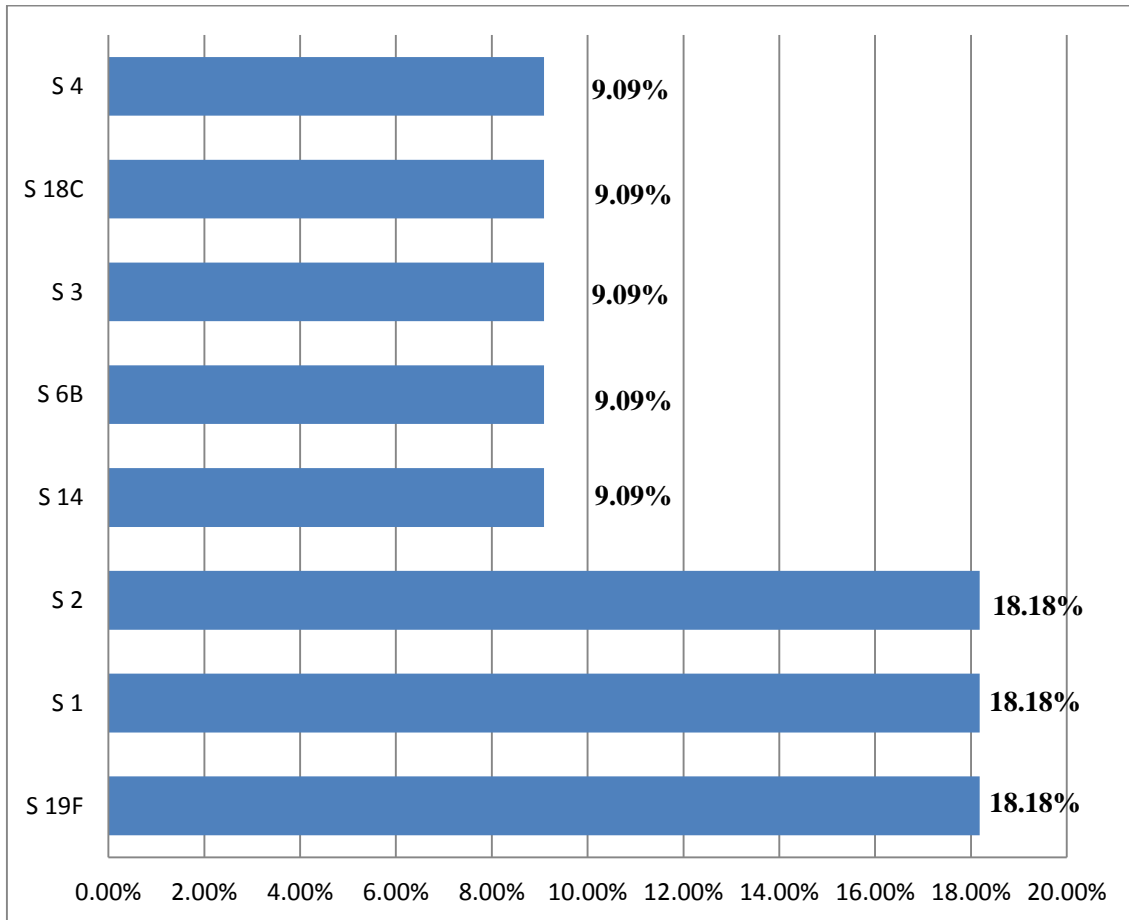


Figure 26. Distribution des sérotypes des 11 souches de *S.pneumoniae*

Dans notre étude, les 11 souches sont sérotypées. Les sérotypes 19F, 1 et 2 sont plus fréquents dont chacun présente un taux de 18,181% (2/11), suivis des sérotypes 14, 6B, 3, 18C et 4 retrouvés dans 9,09% (1/11) des cas chacun (figure 26).

Ce que nous pouvons constater, d’après les études qui ont été faites concernant les sérotypes circulants, c’est que leur répartition varie d’un pays à un autre, ou d’une région à une autre.

En Algérie, dans l’étude de Tali-Maamar *et al.* (2012), les sérotypes retrouvés étaient les 14, 6B, 19F et 1. En Tunisie, les sérotypes les plus fréquents dans l’infection invasive dans l’étude de Rachdi *et al.* (2011) sont les 19F, 6B, 23F et 14. Quant au Maroc, les sérotypes 19F, 14, 6, 23F, 5 et 1 sont les plus fréquents (Elmdaghri *et al.*, 2012). Bien sûr, il faut tenir compte du fait que notre série de sérotypes est faible par rapport aux études publiées.

Au Nigéria, la répartition 19F, 5, 6B, 9V et 23F est retrouvée par Bamidele *et al.* (2012).

En Espagne, les sérotypes les plus fréquents sont les 3, 7F, 11A, 14, 19A et 22F (Méndez-Lagea *et al.*, 2015), alors qu'en Australie, les sérotypes 23F, 19F, 6B, 5 et le 1 sont les plus rencontrés dans les infections invasives (Mehr & wood, 2012).

En Chine les sérotypes le plus souvent retrouvés sont les 19F, 19A, 6A, 23F, 14 et 6B (Pan *et al.*, 2015).

4.3 Distribution des sérotypes en fonction de l'âge

Tableau 23. Distribution des sérotypes en fonction de l'âge

Sérotypes	Enfant (%)	Adulte (%)	Total (%)
19F	2 (18,18)	0 (0)	2 (18,18)
1	2 (18,18)	0 (0)	2 (18,18)
2	0 (0)	2 (18,18)	2 (18,18)
14	0 (0)	1 (9,09)	1 (9,09)
6B	1 (9,09)	0 (0)	1 (9,09)
3	1 (9,09)	0 (0)	1 (9,09)
18C	0 (0)	1 (9,09)	1 (9,09)
4	0 (0)	1 (9,09)	1 (9,09)
Total	6 (54,54)	5 (45,45)	11 (100)

Le tableau 23 indique que chez l'enfant, les sérotypes rencontrés sont les 19F (2/11) et 1 (2/11), suivi des sérotypes 6B, et 3 chacun retrouvé une fois (1/11), alors que les sérotypes 2, 14, 18C et 4, ils ne sont pas identifiés chez l'enfant (0/11).

Chez l'adulte, le sérotype 2 est le plus fréquent, retrouvé 2 fois (2/11) ainsi que les sérotypes 14, 18C et 4, retrouvés une fois chacun (1/11). Quant aux sérotypes 19F, 1, 6B, et 3, ils ne sont pas identifiés chez l'adulte (0/11).

D'après l'étude de Tali-Maamar *et al.* (2012) parmi les sérotypes retrouvés chez l'enfant, on rencontre les sérotypes 19F, et le 6B. Hecini-Hannachi. (2014) a trouvé que les sérotypes 1 et 3 sont plus fréquents chez l'adulte.

Le sérotype 2, retrouvé 2 fois chez l'adulte, est rarement trouvé dans les études algériennes précédentes comme celles de Smati *et al.* (1994) et Tali-Maamar *et al.* (2012).

Le sérotype 14, rare dans notre étude, est le plus fréquemment rencontré dans l'étude de Tali-Maamar *et al.* (2012).

4.4 Distribution des sérotypes en fonction de l'infection

Tableau 24. Distribution des sérotypes en fonction de l'infection

Sérotypes	Infection non invasive		Infection invasive				Total (%)
	Otite	Conjonctivite	Méningite	Pneumopathie	Bactériémie	Arthrite	
19F	0 (0)	0 (0)	2 (18,18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (18,18)
1	1 (9,09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)	2 (18,18)
2	0 (0)	0 (0)	2 (18,18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (18,18)
14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)
6B	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)	0 (0)	1 (9,09)
3	0 (0)	1 (9,09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)
18C	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)	0 (0)	0 (0)	1 (9,09)
Total (%)	1 (9,09)	1 (9,09)	5 (45,45)	2 (18,18)	1 (9,09)	1 (9,09)	11 (100)

D'après le tableau 24, nous observons que les sérotypes 19F et 2 sont responsables de 2 cas d'infection invasive chacun, alors que le sérotype 1 est responsable d'un cas d'infection invasive et un cas d'infection non invasive.

Les sérotypes 2, 14, 6B, 18C, et 4, retrouvés une seule fois sont responsables d'infection invasive. Le sérotype 3 est responsable d'un cas d'infection non invasive.

Dans les infections invasives, les sérotypes 19F et 2 sont responsables de méningites, le 19F chez l'enfant de moins de 5ans (18,18%) et le 2 pour l'adulte (18,18%). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux rapportés par Ramdani-Bouguessa *et al.* (2015) où le sérotype 14 était le plus fréquent dans les méningites (34%) chez l'enfant. Hecini-Hannachi. (2014) rapporte que le sérotype 19F est responsable d'une manière particulière de pneumopathies (22,22%).

Le sérotype 6B est incriminé dans un cas d'infection invasive (bactériémie) chez l'enfant de 11mois (9,09%), ces résultats rejoignent ceux de Tali-Maamar *et al.* (2012) où ce sérotype a fait partie des sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans l'infection invasive de l'enfant âgé de moins de 5 ans.

Dans notre étude, le sérotype 1 est responsable d'un cas d'arthrite et d'un cas d'otite chez l'enfant avec une fréquence de 18,18%. Selon Smati *et al.* (1994), le Sérotype 1 est le plus fréquent car c'est l'agent de 38 % des infections et selon une étude indienne, le sérotype fréquent dans les infections invasives est le sérotype 1 qui représentait 22,9 % de tous les isolats (Thomas *et al.*, 2013).

Le sérotype 1 est considéré parmi les sérotypes responsables d'infections invasives dans les pays en voie de développement (Mehr & Wood, 2012).

4.5 Relation sérotype – résistance et fréquence des sérotypes des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline

Tableau 25. Fréquence des sérotypes des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline

Sérotypes	Souche PSDP		Total (%)
	R (%)	I (%)	
19F	2 (18,18)	0 (0)	2 (18,18)
1	0 (0)	2 (18,18)	2 (18,18)
2	2 (18,18)	0 (0)	2 (18,18)
14	0 (0)	1 (9,09)	1 (9,09)
6B	0 (0)	1 (9,09)	1 (9,09)
3	0 (0)	1 (9,09)	1 (9,09)
18C	1 (9,09)	0 (0)	1 (9,09)
4	0 (0)	1 (9,09)	1 (9,09)
Total (%)	5 (45,45)	6 (54,54)	11(100)

Comme les 11 souches qui ont fait l’objet de notre étude sont de sensibilité diminuée à la pénicilline, nous remarquons que les deux souches portant le sérotype 19F, les deux souches portant le sérotype 2 et la souche portant le sérotype 18C, sont résistantes. Ces sérotypes sont responsables de méningite. Le reste des sérotypes (1, 3, 4, 6B et 14) sont de résistance intermédiaire à la pénicilline (tableau 25).

Dans deux études algériennes, le sérotype 19F est le plus observé parmi les PSDP car il est fréquemment rencontré d’où la sélection de la résistance (Tali-Maamar *et al.*, 2012 ; Hecini-Hannachi, 2014).

4.6 Sérotype et multirésistance

Tableau 26. Sérotypes et multirésistance

Sérotype	Multirésistance (%)
19F	2 (28,57)
18C	1 (14,29)
1	1 (14,29)
3	1 (14,29)
2	1 (14,29)
14	1 (14,29)

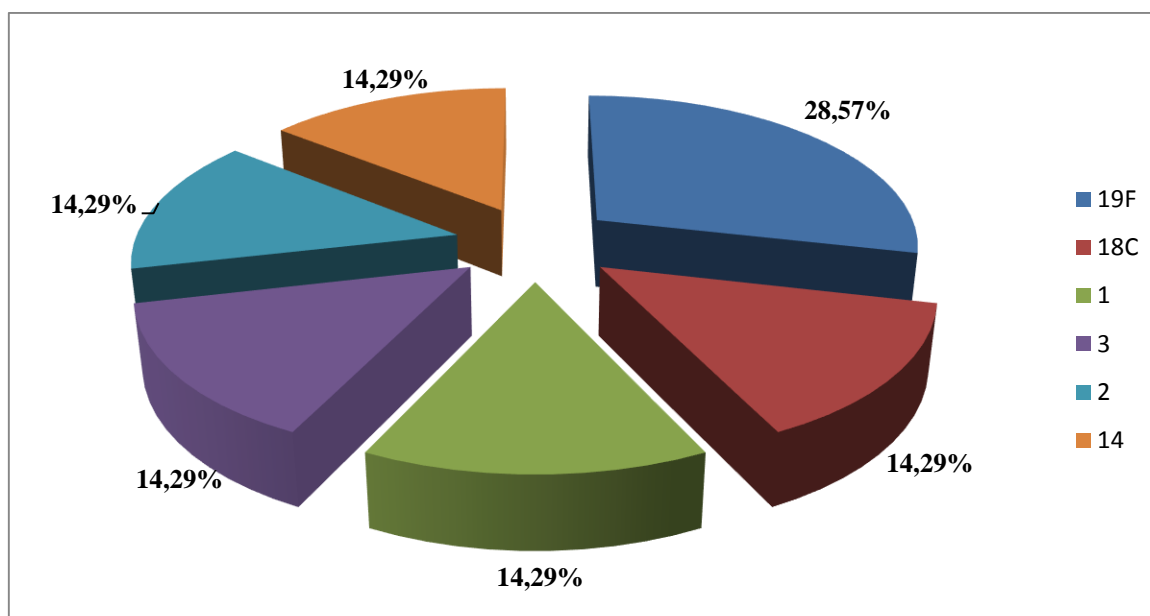


Figure 27. Sérotypes et multirésistance

D’après la figure 27, les 7 souches multirésistantes sont sérotypées, nous avons observés les sérotypes suivants, liés à la multirésistance : 19F, 18C, 1, 3, 2,14. Le sérotype 19F est multirésistant dans les deux cas (2/7, 28,57%). Dans l’étude de Hecini-Hannachi. (2014), les sérotypes 14 et 19F sont ceux qui présentent le plus de multirésistance (30%).

5. Sérotypes et couverture vaccinale

Tableau 27. Couverture vaccinale (n°, %) théorique des vaccins conjugués 7-valent (PCV7) et 13-valent (PCV13) chez l'enfant et du vaccin polysaccharidique 23-valent (Pn-23v) chez l'adulte

Vaccin*	Enfant ≤ 17 ans	Adulte ≥ 18 ans
	N=6	N=5
PCV7	3 (50%)	
PCV13	6 (100%)	
Pn-23v		5 (100%)

➤ Sérotypes contenus dans chacun des vaccins conjugués :

PCV7: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F.

PCV13: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F + 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A.

➤ Sérotypes contenus dans le vaccin polysaccharidique :

Pn-23v : 1, 2, 3, **4, 5, 6B**, 7F, 8, 9N, **9V**, 10A, 11A, 12F, **14**, 15B, 17F, **18C**, 19A, **19F**, 20, 22F, **23F** et 33F.

Nous remarquons d'après le tableau que, globalement, la couverture vaccinale théorique par le vaccin 23-valent est très élevée chez l'adulte (100%). Chez l'enfant, la couverture vaccinale théorique par le PCV7 est de 50% (3/6), le PCV13 semble plus efficace dans notre population infantile, la couverture vaccinale théorique par ce vaccin est de 100% (6/6).

L'épidémiologie de *S.pneumoniae* a été influencée dans certains pays par la réduction des prescriptions d'antibiotiques, mais plus encore par l'introduction du vaccin, ce qui a causé la diminution de la résistance aux antibiotiques tant en ce qui concerne les infections invasives que la colonisation rhinopharyngée, surtout la pénicilline.

La couverture vaccinale théorique des infections invasives chez l'enfant âgé de moins de 5 ans est de 76,66% pour le vaccin conjugué à 13 valences dans une précédente étude algérienne (Hecini-Hannachi, 2014).

La mise en place de la vaccination doit s'accompagner de la surveillance de l'évolution du portage du pneumocoque chez les enfants vaccinés et les non-vaccinés.

Cela signifie qu'une surveillance épidémiologique s'impose parallèlement à une politique d'utilisation plus prudente des antibiotiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les infections à *Streptococcus pneumoniae* représentent aujourd'hui un problème de santé publique, malheureusement peu d'études sont effectuées en Algérie sur la résistance aux antibiotiques, surtout les bêta-lactamines et les macrolides, et sur la répartition des différents sérotypes.

Dans notre étude, *S.pneumoniae* est responsable d'infections à majorité invasives, retrouvées le plus souvent dans les méningites surtout chez l'enfant.

Nous rapportons également un taux très important de souches de sensibilité diminuée à la pénicilline qui atteint 100%. Ce taux est en nette augmentation dans notre pays comparé à ceux retrouvés dans de précédentes études algériennes. Mais les niveaux de résistance ne sont pas très élevés (2 à 4 µg/ml) pour la pénicilline et aucune souche n'est résistante à l'amoxicilline et au céfotaxime, ce qui permet à ces molécules d'être utilisées dans le traitement des infections à pneumocoques. Les bêta-lactamines restent les antibiotiques de choix tant que le niveau de résistance reste compatible avec une efficacité thérapeutique, alors que dans les méningites à pneumocoques, le traitement par amoxicilline ou céphalosporines de troisième génération comme le céfotaxime n'est pas remis en cause. Les CM1 doivent être mesurées en cas d'infection sévère, d'échec clinique et de souches suspectées d'être de sensibilité diminuée à la pénicilline.

Le taux de résistance aux macrolides est élevé et atteint des niveaux de résistance élevés ce qui est alarmant, car ces molécules sont utilisées dans le traitement des infections respiratoires.

La résistance s'élargit à d'autres antibiotiques comme la tétracycline, le cotrimoxazole, et le chloramphénicol. Le taux des souches multi résistantes dans notre étude est de 63,63%, la diffusion et la propagation de la multirésistance est devenue un grand problème pouvant aboutir à des échecs thérapeutiques.

En termes de sérotypage, les sérotypes prédominants sont les 19F, 1, et 2, remarqués le plus chez l'enfant. La couverture vaccinale théorique par le PCV13 semble très efficace dans notre population infantile (100%).

La connaissance des sérotypes est importante pour le choix de la composition d'un vaccin utilisable chez les sujets à risque surtout le jeune enfant. Heureusement, Le vaccin antipneumococcique conjugué a été introduit dans le Programme de Vaccination National en Algérie le 24 avril 2016.

Les infections à *S.pneumoniae* sont peu documentées en Algérie. Devant la fréquence élevée de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline, la surveillance de la résistance aux antibiotiques et la distribution des sérotypes est indispensable pour adapter au mieux l'antibiothérapie, suivre l'épidémiologie des résistances et en prévenir l'extension.

Au terme de ce travail, nous proposons comme perspectives:

- La surveillance et le suivi des infections à *S.pneumoniae* pendant une période longue avec un grand nombre de prélèvements.
- La surveillance de l'antibiorésistance et de la multirésistance pour suivre l'évolution de la résistance et éviter les échecs thérapeutiques.
- La surveillance des sérotypes circulants pour connaître l'impact du PCV13.
- La caractérisation moléculaire des souches (méthode MLST) afin de pouvoir surveiller les clones résistants en circulation.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Adam HJ, Hoban DJ, Gin AS, Zhanel GG. Association between fluoroquinolone usage and a dramatic rise in ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 1997-2006. *Int J Antimicrob Agents* **2009**; 34: 82-5.

Adegbola RA, Hill PC, Secka O, *et al.* Serotype and antimicrobial susceptibility patterns of isolates of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in The Gambia 1996–2003. *Trop Med Int Health* **2006**; 7(11): 1128-35.

Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, *et al.* Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 4686- 96.

Atale A. La baisse des résistances aux antibiotiques dans les crèches dijonnaises : l'effet conjugué de ces médicaments et le respect du calendrier vaccinal. Thèse de doctorat **2007**; 12-36.

Bamidele IA, Fowora M, Olubukola A, *et al.* A retrospective study of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates from four health facilities in South-West Nigeria. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* **2012**; 4(8):160-170.

Barbet ML. Virulence et résistance des infections à pneumocoques. *Option Bio* **2011**; 22(453) : 11-13.

Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, *et al.* A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**; 103 : 2857–2862.

Benbachir M, Elmdaghri N, Belabbes, *et al.* Eleven-year surveillance of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Casablanca (Morocco). *Microb Drug Resist* **2012**; 18:157-60.

Benouda A, Ben Redjeb S, Hammami A, *et al.* Antimicrobial resistance of respiratory pathogens in North African countries. *J Chemother* **2009** ; 21: 627-32.

Bere CL. Résistance des souches de *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques à Bobo-Dioulasso : aspects phénotypiques et génotypiques. *Revue Bio-Africa* **2010** ; 2(1) : 9-21.

Biance VÉ, Soulliéa B, Koecka JL. Les tests de diagnostic rapide et pathologies à pneumocoque et Legionella. *Revue Francophone des Laboratoires. Elsevier Masson* **2015**; 474 : 77-82.

Bingen E. État actuel de la résistance du pneumocoque en pédiatrie. *Revue Française des Laboratoires* **2003** ; 354: 48 :43.

Bingen E, Levy C, De La Rocque F, *et al.* Pneumococcal meningitis in France: age and medical risk factors in children. *Arch Pediatr* **2005**; 12: 1187- 9.

- Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* **2010**; 16: 1614- 9.
- Brieu AN, Varon E, Baraduc R, *et al.* Observatoires régionaux du pneumocoque : évolution de la résistance aux antibiotiques et des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* isolés en France entre 2009 et 2013. *Journal des Anti-infectieux, Science Direct* **2015**; 150 :146.
- Brisou P, Chamouilli JM, Gaillard T, Muzellec Y. Infections à pneumocoque. *EMC-Pédiatrie* **2004**; 4-260-B-10: 410–431.
- Canu A, Malbruny B, Coquemont M, *et al.* Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 125- 31.
- Cattoir V. Pompes d’efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Elsevier Pathologie Biologie* **2004**; 52 : 607–616.
- Chardon H. L’antibiogramme du pneumocoque. *Revue francophone des laboratoires Elsevier Masson* **2008** ; 407: 45.
- Charpentier E, Tuomanen E. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes Infect* **2000**; 2: 1855- 64.
- Claverys JP, Havarstein LS. Extracellular-Peptide Control of Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* 7. **2002** : 1798-1814.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing In: Sixteen informational supplement CLSI* **2007**; M100- S16.
- Collet JP, Burtin P, Kramer MS, *et al.* Type of day care setting and risk of repeated infections. *Pediatrics* **2009**; 84 : 997-9.
- Comité de l’Antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM) Communiqué du 21 juillet **2003**. <http://www.sfm.asso.fr/>
- Cullers JA, English BK, Novak R. Isolation and characterization of vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the cerebrospinal fluid of a patient who developed recrudescence meningitis. *J Infect Dis* **2002**; 181: 369-373.
- Cundell DR, Weiser JN, Shen J, *et al.* Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **1995**; 63757: 761.
- Daporta MT, Munoz Bellido JL, Guirao GY, *et al.* In vitro activity of older and newer fluoroquinolones against efflux-mediated high-level ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* **2004**; 24: 185- 7.

- Denis F, Bingen E, Martin C, *et al.* Bactériologie médicale 2nd ed. *Elsevier Masson* **2011**; 640 : 27.
- Dia ML, Sonko MA, Kâ R, *et al.* Serotype and antimicrobial susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Senegal between 1996 and 2010. *Médecine et maladies infectieuses* **2013**; 43: 304–307.
- Diawara I, Zerouali K, Katfy K, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolide in Casablanca, Morocco. *Elsevier* **2016**; 40:200-4.
- Doern GV. Macrolide and ketolide resistance with *Streptococcus pneumoniae*. *The Medical clinics of North America* **2006**; 90:1109-1124.
- Edoh.V, Dosso.M, Bissagnene.E, *et al.* Etude des sérotypes des pneumocoques rencontrés dans les méningites purulentes Au C.H.U. D'Abidjan et application de la vaccination pneumococcique. *Médecine et Maladies Infectieuses* **1988** ; 6(7) : 309- 1312.
- El Aila NA, Emler S, Kaijalainen T, *et al.* The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. *BMC Infect Dis* **2010**; 10: 104.
- Elmdaghri N, Benbachir M, Belabbes H, *et al.* Changing epidemiology of pediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates before vaccine introduction in Casablanca (Morocco). *Vaccine* **2012**; 30: 46- 50.
- Enquête Nationale Santé (ENS). *Projet TAHINA INSP-AL Contrat N° ICA3-CT-2002- 10011* **2005**.
- Eyquem A, Alouf J, Montagnier L. *Traité de Microbiologie Clinique Deuxièmes Mises à Jour et Compliments, Piccin Nuova Libreria S.p.A Italie* **2000** ; 66 : 50.
- Fabrega A, Madurga S, Giralt E,Vila J. Mechanism of action and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology* **2009**; 2: 40-61.
- Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews* **2002**; 15: 613-630.
- Felmingham D, Reinert R R, Hirakata Y, Rodloff A. Increasing Prevalence of Antimicrobial Resistance Among Isolates of *Streptococcus pneumoniae* From the Protekt Surveillance Study, and Compatative in Vitro Activity of the Ketolide, Telithromycin. *J Antimicrob Chemother* **2002**; 50(1): 25-37.
- Fritzell B. Rôle de la vaccination sur les infections invasives à pneumocoque. *Journal de pédiatrie et de puériculture* **2005**; 18 (1): 20-27.

- Gaillat J, Zmirou D, Mallaret M. Essai Clinique du vaccin antipneumococcique chez des personnes âgées vivant en institution. *Rev Epidemiol et Santé Publ* **1985**; 33: 437- 444.
- Gay K, Stephens DS. Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **2001**; 184: 56- 65.
- Geslin P, Fremaux A, Sissia G, Spicq C. *Streptococcus pneumoniae* : sérotypes, souches invasives et résistance aux antibiotiques. *Presse Méd* **1998**; 27(11): 21-7.
- Gianfaldoni C, Censini S, Hilleringmann M, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infection and immunity* **2007**; 75: 1059-62.
- Grijalva CG, Nuorti J P, Arbogast P G, *et al.* Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet* **2007**; 369: 1179-86.
- Hanquet G, Kissling E, Fenoll A. Pneumococcal serotypes in children in 4 European countries. *Emerg Infect Dis* **2010**; 16 (9): 1428-39.
- Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological Differences Among Pneumococcal Serotypes. *Lancet Infect Dis* **2005**; 5: 83-93.
- Hecini-Hannachi A. *Streptococcus pneumoniae* dans les infections invasives : identification, résistance aux antibiotiques et sérotypage. Université de Constantine, Algérie, thèse de doctorat **2014**; 260: 30-127.
- Henriques-Normark B, El Tuomanen, The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2013**; 15: 2-9.
- Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, *et al.* Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. *J Infect Dis* **2007**; 196 :1346- 54.
- Ho PL, Que TL, Chiu SS, *et al.* Fluoroquinolone and other antimicrobial resistance in invasive pneumococci, Hong Kong, 1995-2001. *Emerg Infect Dis* **2004**; 10(7): 1250-7.
- Hyde TB, Gay K, Stephens DS, *et al.* Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Jama* **2001**; 286(15): 1857-62.
- Iovino F, Seinen JB, Henriques-Normark B, van Dijk JM. How Does *Streptococcus pneumoniae* invade the Brain? *Trends in Microbiology Article in press-Elsevier* **2016**; 1283: 9.
- Ip M, Lyon DJ, Yung RW, *et al.* Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 1578- 80.
- Joly-Guillou ML. Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation* **2006**;15: 234- 40.

Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, *et al.* Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3373-5.

Kempf M, Kowalczyk F, Gaultier du Perray C, *et al.* Observatoire régional du pneumocoque en région Pays de la Loire : résistance de *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques en 2007. *Pathologie Biologie* **2010** ; 58: 89–94.

Kempf M, Baraduc R, Bonnabau H, *et al.* Epidemiology and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in France in 2007: data from the pneumococcus surveillance network. *Microb Drug Resist* **2011**; 17: 31-6.

Lalitha MK, Pai R, John TJ, *et al.* Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by agglutination assays: a cost-effective technique for developing countries. *Bull World Health Organ* **1996**; 74: 387- 90.

Lastours V, Fantin B. Mouvement thérapeutique Résistance aux fluoroquinolones en 2013 : quel impact pour l'interniste ? *Revue de médecine interne* **2014**; 35(9): 601-608.

Lawrence SL, Susanne C, Feil M, *et al.* Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation, *Scientific Reports 5-Nature* **2015**: 12.

Lee HJ, Kang JH, Henrichsen W. Immunogenicity and safety of a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in healthy children and in children at increased risk of pneumococcal infection. *Vaccine* **1995**; 13: 1533- 38.

Lemozy J, Suc C. Actualités sur les streptocoques et entérocoques (Données taxonomiques et identification). *Feuille de Biologie* **1997**; 37 (215):15- 22.

Lund E. Diagnosis of pneumococci by the optochin and bile tests. *Acta Pathol Microbiol Scand* **1959**; 47: 308-15.

Lupien A. Caractérisation génomique et phénotypique de la résistance aux antibiotiques chez *Streptococcus pneumoniae*. Université Laval-Québec-Canada (Thèse de Doctorat).**2015** ; 221: 8-40.

Manzano C. Caractérisation structurale et fonctionnelle des composants du pilus de *Streptococcus pneumoniae* : vers une meilleure compréhension de la biogenèse des pili. Biomolécules University Joseph-Fourier - Grenoble I French, these de Doctorat **2010**; 34: 4-13.

Maugein A, Fourche J. Epidemiology and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Aquitaine in 2001. *Médecine et maladies infectieuses* **2003** ; 33: 247–253.

McDougal LK, Tenover FC, Lee LN, *et al.* Detection of Tn917-like sequences within a Tn916-like conjugative transposon (Tn3872) in erythromycin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 2312-8.

- Mehr S, Wood N. *Streptococcus pneumoniae* – a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatric Respiratory Reviews* **2012**; 13: 258- 264.
- Méndez-Lagea S, Losada-Castillo I, Agulla-Budiño A. *Streptococcus pneumoniae*: distribution des sérotypes, sensibilité aux antibiotiques, facteurs de risque et de la mortalité en Galice dans une période de 2 ans, les maladies infectieuses et microbiologie clinique. *EIMC* **2015**; 1277: 6.
- Morrissey I, Farrell DJ, Bakker S, *et al.* Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of fluoroquinolone-resistant or -susceptible *Streptococcus pneumoniae* from Hong Kong. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2003**; 47: 1433- 35.
- Mudhune S, Wamae M. Report on invasive disease and meningitis due to *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* from the Network for Surveillance of Pneumococcal Disease in the East African Region. *Clin Infect Dis* **2009**; 48 (2):147-52.
- Navne JE. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* in Greenland Colonization, Invasive Disease and Vaccine Impact, Copenhagen, Denmark. Phd thesis **2014**; 75: 19.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, *et al.* Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **2009**; 374: 893-902.
- Ortqvist A, Hedlund J, Kalin M. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Semin Respir Crit Care Med* **2005**; 26: 563-74.
- Pancotto L, G De Angelis, E Bizzarri. Expression of the *Streptococcus pneumoniae* pilus-1 undergoes on and off switching during colonization in mice. *Scientific reports* **2005**; 3: 2040.
- Parasakthi, PH Van, C Carlos, *et al.* High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2004**; 48: 2101-2107.
- Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, *et al.* Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **2006**; 313: 89-92.
- Rachdi M, Boutiba-Ben B I, Mahjoubi-Rhimi F, *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Tunisia. *J Med Microbiol* **2011**; 60: 391-3.
- Ramdani-Bouguessa N, Ziane H, Bekhoucha S, *et al.* Evolution of antimicrobial resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with invasive and non-invasive pneumococcal diseases in Algeria from 2005 to 2012. *New Microbes and New Infections* **2015**; 6: 42-48.

Raymond J, Cohen R, Moulin F, *et al.* Facteurs influençant le portage de *Streptococcus pneumoniae*. *Med Mal Infect* **2002**; 32(1): 13-20.

Recommandations du Comité de L'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) **2008** (www.sfm.asso.fr)

Reinert RR, Paradiso P, Fritzell B. Advances in pneumococcal vaccines: the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. *Vaccines* **2010**; 9: 229-36.

Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* **2009**; 15(3): 7- 11.

Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, *et al.* Accuracy of phenotypic methods for identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates included in surveillance programs. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 2184- 88.

Rubach MP, Bender JM, Mottice S, *et al.* Increasing incidence of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults, Utah, USA. *Emerg Infect Dis* **2011**; 17: 1645–50.

Silberbauer EJ, Ismail N, Gottberg AV, *et al.* Serotype and antimicrobial profile distribution of invasive pneumococcal isolates in the pre-vaccine introduction era in Pretoria, South Africa, 2005 through 2009. *Diag Microbiol Infect Dis* **2011**; 71: 309-11.

Slotved HC, Kaltoft M, Skovsted IC, *et al.* Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 2518-22.

Smaoui H, Amri J, Hajji N, Kechrid A. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *streptococcus pneumoniae* isolates in children in Tunis. *Arch Pediatr* **2009**; 16: 220-6.

Smati F, Laouar H, Khelifa E, *et al.* Résistance à la pénicilline G de *Streptococcus pneumoniae* responsable d'infections graves communautaires en Algérie. *Med Mal Infect* **1994**; 24: 1190-2.

Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore 1986; 1st ed; 2: 965-1599.

Song JH, SI Jung, KS Ko, *et al.* High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2004**; 48: 2101-2107.

Song JY, Nahm MH, Allen MM, *et al.* Clinical Implications of Pneumococcal Serotypes: Invasive Disease Potential, Clinical Presentations, and Antibiotic Resistance. *J Korean Med Sciv* **2013**; 28(1).

- Sourav S, Patricia A, Sharma S, *et al.* Detection of pneumolysin and autolysin genes among antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* in invasive infections, *Indian Journal of Medical*.**2010**; 28.
- Storaï J. Analyse métabolique et transcriptomique de *Streptococcus pneumoniae* en lien avec la production de polysaccharide capsulaire. Université de Toulouse-France, thèse de doctorat **2008**; 196:17.
- Tali-Maamar H, Laliem R, Bentchouala C, *et al.* Reprint of: Serotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Algeria from 2001 to 2010. *Vaccine* **2012**; 30(6): 25- 31.
- Tarja Kaijalainen. The Identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Publications of the National Public Health Institute* **2006**; 75: 417.
- Tettelin H, Nelson K E, Paulsen IT, *et al.* Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **2001**; 293: 498-506.
- Thomas K, Mukkai KL, Veeraraghavan B, *et al.* Invasive pneumococcal disease associated with high case fatality in India. *J Clin Epidemiol* **2013**; 66: 36- 43.
- Tortora GJ, Berdell RF, Christine LC. Microbiology an introduction .8th ed., *San Francisco, CA Benjamin Cummings* **2007**; 898:724.
- Van Heijenoort J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **2001**; 11: 25-36.
- Varon E. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Med Mal Infect* **2012**; 42: 361- 5.
- Verhaegen J, Glupczynski Y, Verbist L, *et al.* Capsular types and antibiotic sensitivity of pneumococci isolated from patients with serious infections in Belgium 1980 to 1988. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1990**; 9: 390- 5.
- Virtudes SCM. Caractérisation moléculaire de régulateur transcriptionnel MgaSpn de *Streptococcus pneumoniae*, Université complutense de Madrid. (Thèse de Doctorat) **2014**:6.
- World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization- *WHO position paper*. *Wkly Epidemiol Rec* **2007**; 82(12): 93-104. (www.who.int/en/).

ANNEXES

Annexe 1. Milieux de culture**Milieu Columbia** (formule en g/l d'eau distillée)

- Extrait de levure.....3,0
- Peptone de viande.....5,0
- Peptone de soja.....3,0
- Tryptone.....5,0
- Cœur-cerveau.....8,0
- Amidon.....1,0
- Chlorure de Sodium.....18,0

pH : 7,3

Milieu Mueller Hinton (Formule en g/l d'eau distillée)

- Extrait de viande.....3,0
- Hydrolysate acide de caséine.....17,5
- Amidon.....1,5
- Agar.....16,0

pH : 7,3

Milieu Gélose nutritive (Formule en g/l d'eau distillée)

- Extrait de viande.....1,0
- Extrait de levure.....2,5
- Peptone.....5,0
- Chlorure de sodium.....5,0
- Agar.....15,0

pH 7,0

Milieu Gélose au sang (Formule en g/l d'eau distillée)

- Peptone.....23,0
- Amidon.....1,0
- NaCL.....5,5
- Agar.....10,0
- Sang de mouton.....50ml

pH final = 7,3

Annexe 2. Réactifs utilisés**Solution de l'eau oxygénée à 10 %**

- Eau oxygénée à 110 V0,5ml
- Eau distillée14,5 ml

Solution de sels biliaires à 10%

- Poudre de sels biliaires.....1,0g
- Eau distillée.....10ml

Pénicilline G

- Pénicilline G.....1.000.000 UI

Antiserums (du statens institut de Copenhague)

Pool	Composition (1.5ml)	REF	LOT
A	1, 2, 4, 5, 18	52390	HA11L6
B	3, 6, 8, 19	52391	FB111L4
C	7, 20, 24, 31, 40	52392	GC12L2
D	9, 11, 16, 36, 37	52393	CD11L8
E	10, 12, 21, 33, 39	52394	KE11L2
F	17, 22, 29, 32, 41	52395	CF13L4
G	29, 34, 35, 42, 47	52396	DG13L5
H	13, 14, 15, 23, 28	52397	GH11L6
I	25, 28, 43, 44, 45, 46, 48	52398	CI11L8
P	1, 7, 14, 19	52399	MP31L2
Q	6, 18, 23	52400	BQ12L8
R	3, 4, 9, 12	52401	ER12L8
S	5, 8, 10, 15, 17	52402	ES13L2
T	2, 11, 20, 22, 33	52403	HT11L6

Disques d'Antibiotiques

Antibiotique	Charge (µg)
Oxacilline (screening)	5
Erythromycine	15
Clindamycine	15
Pristinamycine	15
Cotrimoxazole	1,25/23,75
Tétracycline	30
Chloramphénicol	30
Vancomycine	30
Rifampicine	5
Lévofloxacine	5
Ciprofloxacine	5
Ofloxacine (screening)	5

Annexe 3. Tableau 4. Fiche de Renseignements du malade

N° souche	Date de prélèvement	Age	sexe	Nature du prélèvement	Service	Provenance
1	01/01/2016	9mois	H	LCR	Urgence médicale	CHU Constantine
2	17/11/2015	35ans	H	LCR	Reanimation	CHU Sétif
3	09/02/2016	80ans	H	Liquide pleural	Reanimation	CHU Constantine
4	15/02/2016	15ans	H	Liquide articulaire	Service d'orthopédie	CHU Batna
5	05/03/2016	11mois	H	Pus auriculaire	Reanimation	CHU Constantine
6	03/03/2016	11mois	H	Hémoculture	service des brulés	CHU Constantine
7	22/02/2016	8mois	H	Pus oculaire	Urgence pédiatrique	CHU Constantine
8	19/10/2015	70ans	F	LCR	Reanimation	CHU Constantine
9	24/10/2015	23ans	H	LCR	Reanimation	CHU Constantine
10	09/12/2015	86ans	H	Prélèvement trachéal	Urgence medical	CHU Constantine
11	16/12/2015	10mois	H	LCR	Urgence pédiatrique	CHU Constantine

Annexe 4. Coloration de Gram

La coloration permet de distinguer les bactéries Gram positif des Gram négatif, basée sur la différence de composition de la paroi.

-Préparation de frottis

- Etalement
- Séchage
- Fixation

-Coloration

Etapes	Mode opératoire	Temps	Principe
Coloration primaire	-Recouvrir la lame de cristal violet ou violet de gentiane - Rincer à l'eau distillée et récupérer le cristal violet dans un bêcher (ne pas le jeter dans le bac à coloration)	1minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
Mordantage	- Recouvrir de Lugol - Rincer à l'eau distillée et l'égoutter	1minute	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
Décoloration	Tenir la lame inclinée et faire couler pendant quelques secondes de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore. - Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter	5 secondes environ	L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans la bactérie et décolore son cytoplasme : la bactérie devient incolore. Si la bactérie a une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elle reste colorée en violet et elle est dite Gram +.
Coloration secondaire	Recouvrir la lame de fuschine - Rincer à l'eau distillée	1 minute	La fuchsine recolore en rose la bactérie précédemment décolorée : bactérie Gram -.
Séchage	Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher		

Annexe 5. Tableau 5. Antibiotiques testés et critères d'interprétations des diamètres d'inhibition pour *S.pneumoniae* selon les normes du CLSI 2007

Antibiotique	Charge du disque (µg)	Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (mm)		
		Sensible	Intermédiaire	Résistant
Pénicilline G	10	-	-	-
Oxacilline (screening)	5	≥26	-	≤26
Amoxicilline	25	-	-	-
Céfotaxime	30	-	-	-
Imipenème	10	-	-	-
Erythromycine	15	≥21	16-20	≤15
Clindamycine	15	≥19	16-18	≤15
Pristinamycine	15	≥19	16-18	≤15
Cotrimoxazole	1.25/23.75	≥19	16-18	≤15
Tétracycline	30	≥23	19-22	≤18
Chloramphénicol	30	≥21	-	≤20
Vancomycine	30	≥17	-	-
Rifampicine	5	≥19	17-18	≤16
Lévofloxacine	5	≥17	14-16	≤13
Ciprofloxacine	5	≥19	16-18	≤15
Ofloxacine (screening)	5			<10

Annexe 6. Tableau 9. Distribution en échiquier de 90 sérotypes de *S.pneumoniae* selon les pools (A-I) et les pools (P-T)

Sérotype(s) ou sérotype(s) avec pool:						
Pool	P	Q	R	S	T	Autres sérogroupes ou sérotypes non-contenus dans les vaccins
A	1	18F, 18A, 18B, 18C	4	5	2	
B	19F, 19A, 19B, 19C	6A, 6B	3	8		
C	7F, 7A, 7B, 7C				20	24F, 24A, 24B, 31, 40
D			9A, 9L, 9N, 9V		11F, 11A, 11B, 11C, 11D	16F, 16A, 36, 37
E			12F, 12A, 12B	10F, 10A, 10B, 10C	33F, 33A, 33B, 33C, 33D	21, 39
F				17F, 17A	22F, 22A	27, 32F, 32A, 41F, 41A
G	29	34	35F, 35A, 35B, 35C	42	47F, 47A	
H	14	23F, 23A, 23B		15F, 15A, 15B, 15C		13, 28F, 28A
I	25F, 25A	38	43	44	45	46, 48

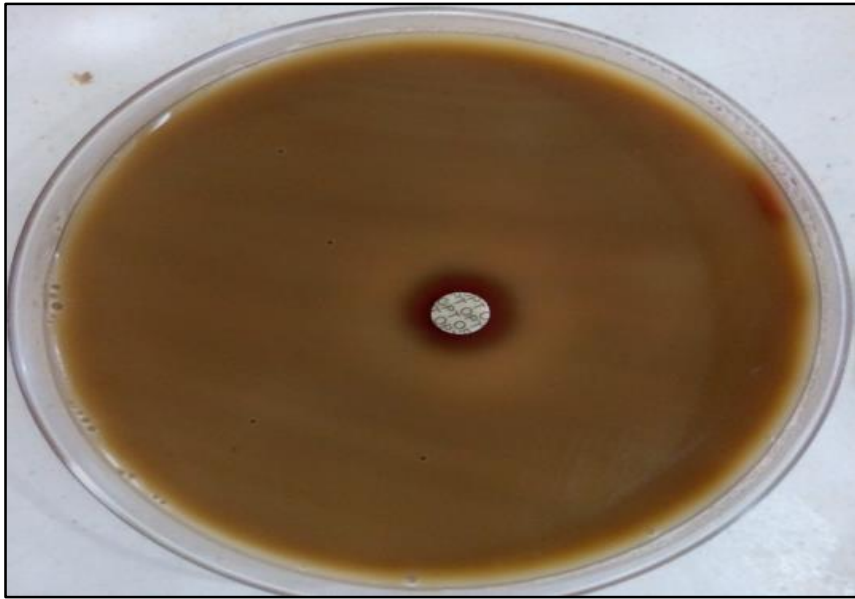
Annexe 7. Figure 12. Sensibilité à l'optochine

Figure 12. Souche de *S.pneumoniae* sensible à l'optochine (diamètre > 14 mm)

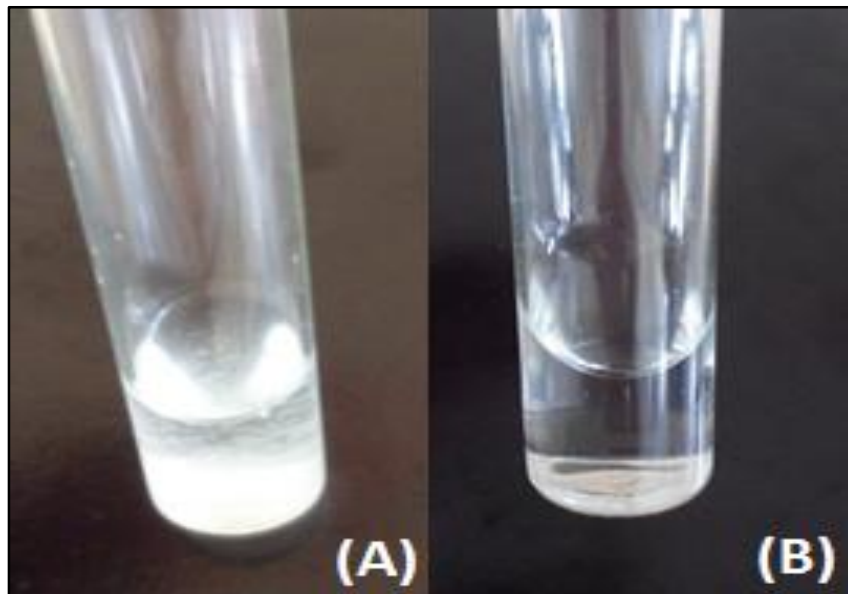
Annexe 8. Figure 13. Résultat de test de la solubilité dans les sels biliaries

Figure 13. Résultat de test de la solubilité dans les sels biliaries

(A). Tube témoin ne contenant pas des sels biliaries (trouble).

(B). Tube contenant des sels biliaries (éclaircissement).

Annexe 9. Figure 20 et 21. Résultats des concentrations minimales inhibitrices par la technique du E-test

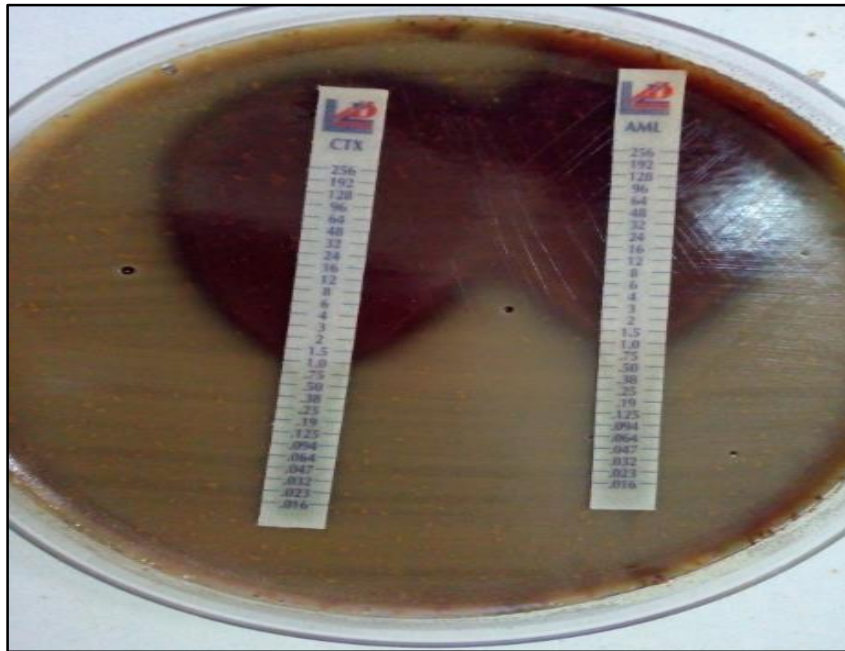


Figure 20. Souche de *S.pneumoniae* de sensibilité diminuée au céfotaxime (CTX) et l'amoxicilline (AML) isolée d'un LCR (CMI à 1µg/ml)

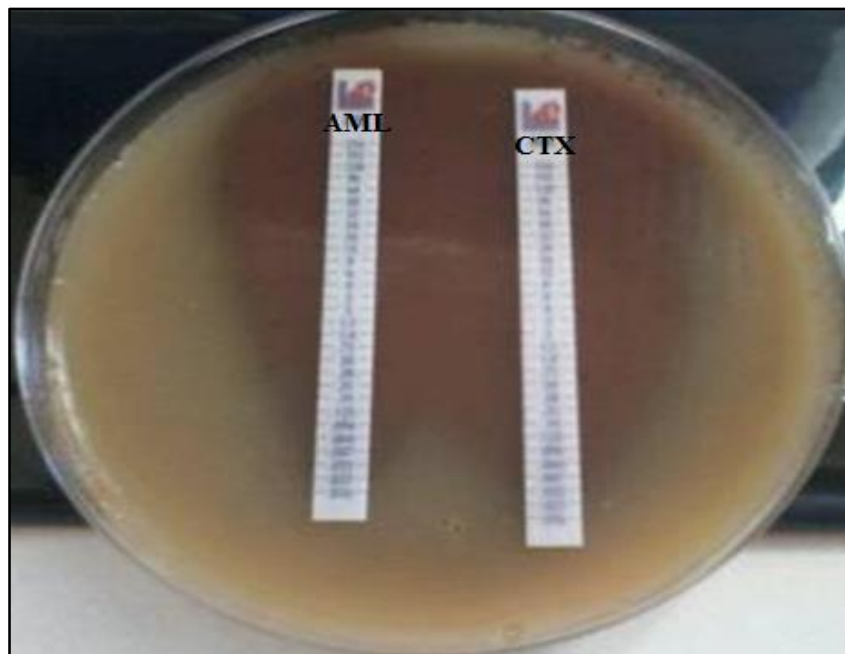
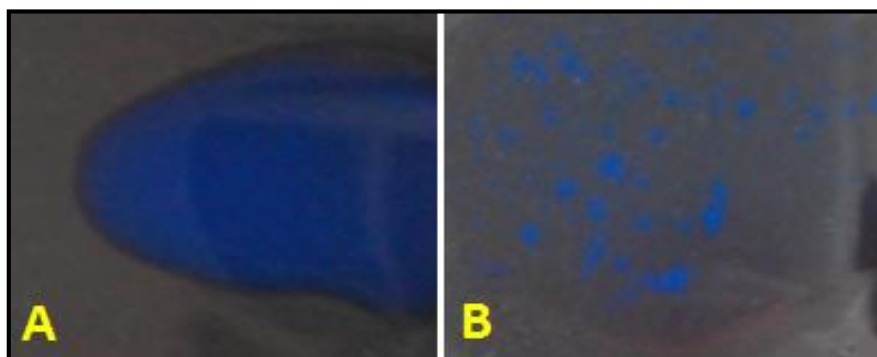


Figure 21. Souche de *S.pneumoniae* sensible à l'amoxicilline (CMI à 0,047µg/ml) et au céfotaxime (CMI à 0,032µg/ml) isolée d'un Liquide articulaire

Annexe 10. Tableau 19. Résultats qualitatifs de l'antibiogramme

Famille d'ATB	Antibiotique	C (µg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
bêta-lactamines	Pénicilline G	10											
	Oxacilline	5											
	Amoxicilline	25											
	Céfotaxime	30											
	Imipenème	10											
Macrolides	Erythromycine	15	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R
	Clindamycine	15	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R
	Pristinamycine	15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
cyclines	Tétracycline	30	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R
Phénicolés	Chloramphénicol	30	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S
Glycopeptides	Vancomycine	30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifamycine	Rifampicine	5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fluoroquinolones	Lévofoxacine	5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Ciprofloxacine	5	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Sulfamides	Cotrimoxazole		R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S

1 ,25/23,75

Annexe 11. Figure 25. Sérotypage par test d'agglutination**Figure 25.** (A) absence des particules agglutinées ; (B) présence des particules agglutinées

Résistance aux antibiotiques et identification des sérotypes circulants des souches de *Streptococcus pneumoniae*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes.

Résumé

Streptococcus pneumoniae constitue, à ce jour, la deuxième cause de mortalité d'origine bactérienne dans le monde surtout chez l'enfant et les personnes âgées. En 2005, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que 1,6 millions de personnes meurent chaque année d'infections pneumococciques. *Streptococcus pneumoniae* est naturellement sensible à la plupart des antibiotiques notamment aux bêta-lactamines, mais la résistance aux antibiotiques est en nette augmentation dans notre pays. L'émergence et la propagation des souches multi résistantes a engendré des échecs thérapeutiques. La gravité des infections à pneumocoque est liée à sa virulence, essentiellement à la présence d'une capsule polysaccharidique qui détermine actuellement plus de 93 sérotypes. Les infections à *Streptococcus pneumoniae* sont peu documentées en Algérie. Notre travail a donc pour objectifs :

- L'identification des souches de *S.pneumoniae* par différentes méthodes phénotypiques
- L'étude des caractéristiques épidémiologiques des souches de *S. pneumoniae*
- L'étude de la résistance des pneumocoques aux principaux antibiotiques actifs : les bêta-lactamines, et d'autres antibiotiques tels que les macrolides et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des bêta-lactamines.
- Le sérotypage des pneumocoques

Onze souches sont isolées et identifiées, le test à l'optochine reste le teste fiable comme méthode conventionnelle pour l'identification de *S.pneumoniae* (100% de sensibilité). Parmi les 11 souches étudiées, toutes (100%) présentent une sensibilité diminuée à la pénicilline dont 45,45% sont résistantes (CMI entre 2-4µg/ml). Les taux de résistance aux autres antibiotiques sont de 63,63%, 54,54%, 45,45%, 27,27% et 9,09% pour la tétracycline, l'érythromycine, le cotrimoxazole, le chloramphénicol et la ciprofloxacine respectivement. Concernant la résistance aux macrolides, le mécanisme rencontré dans notre étude est de phénotype MLS_B d'où le haut niveau de résistance de ces molécules qui constituent une alternative aux bêta-lactamines. Les sérotypes prédominants sont les 19F, 1, 2, en particulier chez l'enfant. La couverture vaccinale théorique par le PCV13 semble très efficace dans notre population infantile (100%).

Mots clés : *Streptococcus pneumoniae*, infections invasives, infections non invasives, identification, résistance aux antibiotiques, sérotypes, couverture vaccinale.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine sur une période de trois mois (du 19/01/2016 au 19/04/2016).

Jury d'évaluation :

Président du jury :	OULMI Lamia	(MCB - UFM Constantine),
Rapporteur :	HECINI Abla	(MCB - F. Med Constantine 3),
Examineur :	BOUZERAIB Latifa	(MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 20/06/2016

