

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire



N° d'ordre : 70/D3C/2019
N° de série : 01/Bio/2019

THÈSE :

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)

OPTION : Biochimie Appliquée

PAR : AYECHÉ Amina

THÈME :

Approches génétique et bioinformatique pour la prédiction de la structure

3D de la PLP2a du gène *mecA* de *Staphylococcus aureus*

Soutenue le : 11 / 07 / 2019

Devant le jury:

Président :	Pr. KACEM CHAOUICHE Noredine	Univ. des Frères Mentouri Constantine 1.
Directeur de thèse :	Pr. HAMIDECHI M. Abdelhafid	Univ. des Frères Mentouri Constantine 1.
Examineur :	Pr. GUECHI Abdelhadi	Univ. Farhat ABBAS de Sétif 1.
Examineur :	Pr. KITOUNI Mahmoud	Univ. des Frères Mentouri Constantine 1.

Année universitaire : 2018-2019

Dédicaces

Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie cette thèse :

À ma très chère maman « Fatiha » et à mon très cher papa « Kamel » qui ont fait de moi ce que je suis.

À ma chère sœur « Sabrina » et mes chers frères « Mohammed », « Fares », « Amer » et « Omar », qui n'ont pas cessé de me combler par leur amour et leur tendresse.

À mon conseiller, cher époux « Ilyes » pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour.

À mes petits anges, mes enfants « Koussaï » et « Louay » qui m'ont donné un coup de pouce pour compléter ma thèse.

À mes chères amies « Zeineb », « Hanène », « Assia » et « Wahiba » pour leur gentillesse et leur encouragement.

À tous les membres de ma famille.

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.

Remerciements

Avec tout le sens de mon éducation et de mon modeste savoir, je ne commencerai pas ce travail sans exprimer à tous et à chacun ; les chers membres du jury, l'expression de mes respects et de mes remerciements.

Je tiens à remercier mon Directeur de thèse, le Professeur HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid. Je suis reconnaissante pour ses orientations, sa patience, sa confiance et ses conseils, tout au long de ce parcours scientifique. Ainsi, la pertinence de ses remarques a contribué à l'amélioration de la qualité de ce manuscrit. Veuillez trouver ici, Monsieur, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour vous.

Mes remerciements sont adressés au président du jury : Monsieur KACEM CHAOUCHE Noredine, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Ses conseils, comme à son habitude, apporteront un plus à cette thèse.

J'adresse un grand merci à Monsieur GUECHI Abdelhadi, professeur à l'Université Farhat ABBAS Sétif 1, qui me fait le plaisir et l'honneur de juger ce travail et pour son déplacement jusqu'à Constantine. Sa contribution me sera sans aucun doute très bénéfique, connaissant toutes ses qualités humaines et scientifiques.

Monsieur KITOUNI Mahmoud, Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, est à remercier vivement pour l'honneur d'accepter d'évaluer ma thèse et de lui apporter, par ses compétences reconnues, un regard scientifique. Certainement, son expérience établie apportera des conseils et des critiques précieux pour encore améliorer ma thèse.

Je suis profondément reconnaissante vis-à-vis du Professeur Jean-Marc Rolain, Directeur du laboratoire de Microbiologie et résistance aux antibiotiques à l'URMITE (Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales

Emergentes), pour m'avoir accordée l'opportunité de réaliser une partie expérimentale de ma thèse et d'évoluer au sein de son équipe de recherche.

Je tiens également à remercier :

- Madame Névine LEBSIR, responsable du laboratoire de microbiologie (Pédiatrie Constantine) au niveau duquel j'ai effectué l'isolement et la purification des bactéries, pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité.
- Madame Souad KHEMILL, enseignante à l'Université de Boumerdes pour son aide à réaliser la partie modélisation de la structure 3D des protéines, sa gentillesse, ses conseils et sa disponibilité.
- Valérie Filoza, Linda Hadjadj, Mounira Yagoubat et Winnie pour leurs accompagnements, leurs aides et leurs conseils durant mon stage.
- Mrs BENNOUAR Farid, LARABA Djamel et BOUFRIOUA Amar pour m'avoir aidé à réaliser la partie microbiologique au sein de notre faculté.

Merci à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières	
Liste des figures.....	<i>i</i>
Liste des tableaux.....	<i>iii</i>
Liste des abréviations.....	<i>iv</i>
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Chapitre I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Généralités sur <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.1. Taxinomie.....	3
1.2. Identification de <i>S. aureus</i>	4
1.2.1. Identification moléculaire.....	4
1.2.2. Identification protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	5
1.2.2.1. Historique.....	5
1.2.2.2. Principe.....	6
1.3. Systèmes de régulation génétique chez <i>S. aureus</i>	7
1.3.1. <i>Accessory gene regulator (Agr)</i>	7
1.3.2. Les ARN régulateurs.....	8
1.3.2. Les facteurs de transcription : la famille de protéine Sar.....	8
2. Résistance de <i>S. aureus</i> à la méticilline.....	11
2.1. Mécanisme de résistance.....	11
2.1.1. Résistance intrinsèque liée à la PLP2a.....	11
2.1.2. Support génétique de la résistance à la méticilline.....	16
2.1.3. Modes de résistance autres que la PLP2a.....	20

2.2. Régulation génétique de la résistance de <i>S. aureus</i> à la méticilline.....	20
3. Structure des protéines.....	21
3.1. La structure primaire.....	22
3.2. Les structures secondaires.....	22
3.2.1. Hélices α	24
3.2.2. Les feuillets β	25
3.2.3. Les boucles ou coudes.....	26
3.3. La structure tertiaire.....	27
4. Approche bioinformatique pour la prédiction des structures 2D et 3D des protéines	29
4.1. Méthode pour la prédiction de structures secondaires.....	30
4.2. Méthode pour la prédiction des structures tertiaires.....	31
4.2.1. La modélisation comparative.....	31
4.2.1.1. Modélisation par homologie	32
4.2.1.2. Les méthodes de reconnaissance de repliement (Threading).....	32
4.2.2. Les méthodes <i>ab initio</i>	33
Chapitre II: MATERIEL ET METHODES	
1. Matériel bactérien.....	35
1.1. Isolement et purification.....	35
1.2. Identification et conservation des souches.....	35
2. Antibiogramme.....	37
3. Identification protéomique des souches par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	39

3.1. Préparation de la matrice.....	39
3.2. Préparation et dépôt des échantillons sur la plaque.....	39
3.3. Lancement de l'acquisition MALDI-TOF MS et interrogation de la base de données.....	40
4. Détection moléculaire du gène <i>mecA</i>	43
1.1. Extraction de l'ADN.....	43
1.2. RT-PCR.....	43
5. Identification moléculaire des isolats.....	44
5.1. Lyse des colonies bactériennes.....	45
5.2. Purification de l'ADN total.....	45
5.3. Amplification et séquençage du gène ADNr 16S.....	45
5.3.1. Contrôle Qualité des amplifications PCR.....	46
5.3.2. Purification des produits PCR.....	46
5.3.3. Les réactions de séquence	46
5.3.4. Le séquençage.....	47
5.4. Alignement multiple des séquences et analyse phylogénétique.....	48
6. Détection moléculaire et séquençage du gène <i>mecA</i>	48
7. Analyses bioinformatiques.....	49
7.1. Prédiction de la structure secondaire du gène l'ADNr16S.....	50
7.2. Prédiction des structures 2D de la PLP2a.....	51
7.3. Modélisation des structures tridimensionnelles des PLP2a.....	52
7.3.1. Modélisation comparative des structures 3D de la PLP2a.....	52
7.3.2. Création des modèles.....	54

7.3.3. Visualisation des structures.....	54
Chapitre III : RESULTATS	
1. Identification des isolats bactériens.....	55
1.1. Méthodes bactériologiques et biochimiques classique.....	55
1.1.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats bactériens.....	55
1.1.2. Identification biochimique.....	55
1.1.2.1. Les tests catalase, coagulase et DNase.....	55
1.1.2.2. Biotypage des souches de <i>S. aureus</i> selon les profils numériques en API Staph.....	55
1.2. Identification par MALDI-TOF MS.....	56
1.3. Identification génotypique (amplification et séquençage de l'ADNr16).....	56
2. Résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques.....	60
3. RT-PCR.....	62
4. Identification moléculaire du gène <i>mecA</i>	64
5. Analyses bioinformatiques.....	65
5.1. Alignement multiple des séquences protéiques de la PLP2a.....	82
5.2. Prédiction des structures 2D et 3D de la PLP2a.....	82
Chapitre IV : DISCUSSION	
1. Identification de <i>S. aureus</i>	90
2. Résistance de <i>S. aureus</i> à la méticilline.....	91
3. Corrélation entre les méthodes phénotypiques et génotypiques pour la détection de la méticillino-résistance.....	93
4. Analyses bioinformatiques.....	94

Conclusion et perspectives.....	97
Références bibliographiques.....	99
Annexes	
Résumés	

Liste des figures

Figure 1 :	Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS.....	7
Figure 2 :	Organisation du système <i>agr</i> de <i>S. aureus</i> et modèle de fonctionnemnt...	10
Figure 3 :	Mécanisme de résistance de <i>S. aureus</i> à la méticilline par PLP2a.....	13
Figure 4 :	Structure de la PLP2a du <i>S. aureus</i>	15
Figure 5 :	Complexe méticilline-acyl-PLP2a chez <i>S. aureus</i>	16
Figure 6 :	Les quatre classes du complexe de gène <i>mec</i> chez <i>Staphylococcus</i>	18
Figure 7 :	Structures de base des éléments SCC <i>mec</i> représentatifs.....	19
Figure 8 :	Formation de la liaison peptidique.....	22
Figure 9 :	Plans peptidiques de deux résidus.....	23
Figure 10 :	Diagramme de Ramachandran.....	24
Figure 11 :	Schéma d'une hélice α droite.....	25
Figure 12 :	Schéma d'un Brin β	25
Figure 13 :	Shéma représentatif des différentes structures d'un feuillet β	26
Figure 14 :	Différents types de repliement illustrant la variabilité de la structure tertiaire.....	29
Figure 15 :	Méthodes de prédiction des structures 3D des protéines.....	34
Figure 16 :	Organigramme de l'identification de <i>S. aureus</i> par les méthodes bactériologiques standards.....	36
Figure 17 :	Séquence d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.....	40
Figure 18 :	Interface du logiciel MALDI BioTyper TM 2.0 (Bruker Daltonics).....	41
Figure 19 :	Interface du logiciel d'acquisition FlexControl.....	41

Figure 20 :	Code couleur des analyses et identifications BioTyper TM 2.0 (Bruker Daltonics).....	42
Figure 21 :	Résultats de l'identification de quelques isolats par MALDI-TOF MS....	56
Figure 22 :	Produits d'amplification PCR du gène d'ARNr 16S de quelques isolats bactériens sur QIAXCEL.....	57
Figure 23 :	Arbre phylogénétique construit selon la méthode Neighbor-joining du gène 16S.....	60
Figure 24 :	Résultats représentatifs obtenus par RT-PCR pour la détection du gène <i>mecA</i>	62
Figure 25 :	Produits d'amplification PCR du gène <i>mecA</i> de quelques isolats bactériens, sur QIAXCEL.....	64
Figure 26 :	Arbre phylogénétique construit selon la méthode Neighbor-joining du gène <i>mecA</i>	65
Figure 27 :	Structure 3D de la PLP2a de l'isolat LISC8 générée par MODELLER...	86
Figure 28 :	Structure 3D de la PLP2a de l'isolat PMC1 générée par MODELLER....	87
Figure 29 :	Alignement multiple des cibles (LISC8 et PMC1) avec leur patron (code PDB : 1VQQ).....	87
Figure 30 :	Superposition des structures 3D des cibles avec le patron (code PDB: 1VQQ).....	88
Figure 31 :	Superposition des trois structures en position 124.....	88
Figure 32 :	Superposition des trois structures en position 182.....	89

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Les différents types du SCC mec identifiés chez <i>S. aureus</i>	18
Tableau 2 :	Angles dièdres moyens des résidus centraux suivant les trois types de coude β	27
Tableau 3 :	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>S. aureus</i> .	38
Tableau 4 :	Score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification.....	42
Tableau 5 :	Séquences des amorces utilisées pour amplifier le gène <i>mecA</i>	44
Tableau 6 :	Séquences des amorces utilisées pour amplifier et séquencer le gène ADNr 16S.....	48
Tableau 7 :	Séquences des amorces utilisées pour amplifier et séquencer le gène <i>mecA</i>	49
Tableau 8 :	Pourcentage d'identité entre nos séquences protéiques cibles de la PLP2a et les templates. Le pourcentage des résidus alignés est donné entre parenthèses.....	53
Tableau 9 :	Codes Genbank des séquences d'ADNr 16S pour les 21 isolats de <i>S. aureus</i>	59
Tableau 10 :	Résultats de la résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques (n=65).....	62
Tableau 11 :	Comparaison des résultats de la méticillino-résistance de <i>S. aureus</i> (MRSA) obtenus par la méthode de la RT-PCR et la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=65).....	63
Tableau 12 :	Structures 2D des ADNr 16S séquencés des 21 isolats de <i>S. aureus</i> et leurs énergies libres ΔG°	66
Tableau 13 :	Résultats des séquences protéiques de la PLP2a contre BlastP.....	74
Tableau 14 :	Structures secondaires de la PLP2a prédites avec le programme	

	bioinformatique GOR IV.....	83
Tableau 15 :	Fonction de scores objective des cinq modèles générés par MODELLER.....	86

Liste des abréviations et acronymes

aa : acide aminé

agr : accessory gene regulator.

ARNrég : Acide ribonucléique régulateur

bla Z : gène de résistance aux β -lactamines.

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool.

BLASTN : BLAST Nucleotide.

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

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire.

DNase : Désoxyribonucléase.

IWG-SCC : International Working Group on Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome.

LISC : Laboratoire Ibn Sina Constantine.

LPKC : Laboratoire Particulier Khroub Constantine.

MALDI-TOF MS : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry.

Mec A : gène de résistance à la méticilline.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

PAI : Peptide Auto-Inducteur.

PFGE : Pulsed Field Electrophoresis Gel.

PLP : Protéine de Liaison aux Pénicillines.

PMC : Pédiatrie Mensorah Constantine.

PVL : leucocidine de Panton Valentine.

RT-PCR : Real Time-Polymerase Chain Reaction.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline.

SCCmec : La cassette chromosomique staphylococcique *mec*.

SCN : Staphylocoques à coagulase négative.

T_m : Température de demi-dénaturation.

TSST : Toxic shock syndrome toxin.

Introduction générale

Staphylococcus aureus est l'un des pathogènes humains les plus importants responsables de diverses maladies infectieuses dans le monde (Martineau *et al.*, 2000 ; Deurenberg *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2011 ; Momtaz et Hafezi, 2014). Jusqu'au début des années 2000, au sein des laboratoires de microbiologie, l'identification bactérienne, en particulier *S. aureus*, reposait essentiellement sur l'analyse de caractères phénotypiques dont l'interprétation nécessitait une expertise. Pour la plupart des cas, le résultat n'était obtenu qu'au bout de 24 heures. En cas d'échec, l'identification était acquise par des analyses de biologie moléculaire comme celles des séquences du gène de l'ARNr 16S. Des automates utilisant la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) (Mellmann et Müthing, 2013) ont révolutionné l'identification bactérienne. À partir de colonies, des résultats d'identification fiables sont acquis en moins de cinq minutes avec une facilité d'utilisation technique. Mais malheureusement, cette technique est très peu exploitée dans le domaine de la microbiologie (Uhlik *et al.*, 2011 ; Koubek *et al.*, 2012) d'où la nécessité d'autres travaux de recherche.

La résistance à la pénicilline chez *S. aureus* est principalement due à la production de protéine liant la pénicilline additionnelle (PLP2a) avec une faible affinité pour les bêta-lactamines, codée par le gène *mecA* (Martineau *et al.*, 2000; Xiaoguang *et al.*, 2016). Les méthodes de routine utilisées dans les laboratoires de microbiologie pour l'identification de la résistance à la pénicilline chez *S. aureus* sont basées sur l'antibiogramme (Shahraz *et al.*, 2012). Ces méthodes ne détectent que l'expression phénotypique de la résistance à la pénicilline sans la présence du gène *mecA* (Al-Zu'Bi *et al.*, 2004). Les méthodes phénotypiques n'étant pas suffisamment discriminantes et fortement dépendantes des conditions de croissance, l'utilisation de l'approche génétique, comme l'hybridation de l'ADN et la PCR, est essentielle pour stopper la propagation de *S. aureus* résistante à la pénicilline et augmenter la rapidité et la précision de leur identification et leurs profils de résistance aux antibiotiques (Pe'Rez-Roth *et al.*, 2001). La détection de SARM est devenue un outil important dans le diagnostic clinique pour la gestion et le traitement des patients (Pe'Rez-Roth *et al.*, 2001).

La prédiction de la structure 3D est capitale puisqu'elle détermine les propriétés biochimiques et la fonction biologique des protéines. Jusqu'à 1985, les seules méthodes permettant de déterminer la structure protéique étaient la diffraction des rayons X (ou cristallographie) et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Guillaume,

2004), alors très coûteuses et plus lentes. Le recours à des méthodes de bioinformatique semblait être une bonne solution (Bouziane *et al.*, 2008).

La structure 3D de la PLP2a de *S. aureus* a déjà été déterminée expérimentalement par RMN ou par cristallographie aux rayons X (Lim *et al.*, 2002). Cette structure 3D est étroitement dépendante de sa séquence en acides aminés et des modifications même minimales de cette séquence ont des répercussions profondes sur la structure 3D de la PLP2a et même sur sa fonction biologique (résistance à la méticilline). Pour cela, nous avons tracé dans cette étude les objectifs consistant à :

- Mettre en évidence l'importance d'identifier le *S. aureus* par une méthode protéomique : le MALDI-TOF MS et montrer l'importance des outils bioinformatiques dans l'identification bactérienne,
- Mettre en évidence le pourcentage des SARM récoltés au niveau de la Ville de Constantine,
- Comparer entre la détection phénotypique et la détection génotypique de SARM,
- Prédire les structures secondaires et tertiaires de la PLP2a de différents isolats à partir de ses séquences primaires par les méthodes de bioinformatique,
- Aligner les structures 3D des PLP2a des différents isolats pour mettre en évidence (si c'est le cas) les mutations qui seraient dues à l'environnement car nos isolats bactériens ont été récoltés de divers horizons cliniques.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur *Staphylococcus aureus*

S. aureus est un pathogène humain majeur qui a été mis en évidence pour la première fois en 1878 par Robert Koch en Allemagne et en 1880 par Louis Pasteur en France à partir de pus d'abcès (Spicer, 2003).

Le *S. aureus* est un cocci à Gram positif de 0,5 à 1µm de diamètre. Il est regroupé le plus souvent par deux (diplocoques) ou par quatre (tétraèdres) ou en amas irréguliers ayant la forme de grappe de raisin d'où le nom "*Staphylococcus*" (Ogston, 1884). C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, c'est-à-dire qu'elle est capable de se développer à la surface de la peau, en aérobiose et aussi dans les tissus mal oxygénés (Trouillet, 2011).

Ces bactéries sont immobiles, non sporulés. La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture (Couture, 1990 ; Fauchère et Avril, 2002).

1.1. Taxinomie

La classification des staphylocoques a connu plusieurs bouleversements; lors de la première édition du « Bergey's Manual ® of Determinative Bactériology » en 1923, les staphylocoques étaient classés dans la famille des *Streptococcaceae* puis lors de la deuxième édition en 1926 étaient classés dans la famille des *Micrococcaceae*, cette famille comprenait alors le genre *Micrococcus* et *Staphylococcus*. En 1957, les staphylocoques et les microcoques furent séparés en raison de leur capacité à utiliser le glucose en anaérobiose. Cependant ce test mena beaucoup de confusion en attribuant certaines espèces du genre *Staphylococcus* au genre *Micrococcus* (Fauchère et Avril, 2002). En 1974, Baird-Parker sépare définitivement le genre *Staphylococcus* du genre *Micrococcus* grâce à la pauvreté de l'ADN des staphylocoques en guanine et en cytosine (30-39%) en comparaison avec l'ADN des microcoques (66-75%). En 2001, sur la base d'analyses des séquences des gènes codants pour l'ARN ribosomal (ARNr 16S), le genre *Staphylococcus* est classé dans la famille des *Staphylococcaceæ* qui comprend 45 espèces et sous espèces dont dix-sept ont été retrouvées chez l'homme (Garrity *et al.*, 2002).

Selon la 9^{ème} édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les staphylocoques sont classés comme suivant (Prescott *et al.*, 2010) :

Règne : Bacteria
Division : Firmicutes
Classe : Bacilli
Ordre : Bacillales
Famille : Staphylococcaceae
Genre : Staphylococcus
Espèce : *Staphylococcus aureus*

1.2. Identification de *S. aureus*

Jusqu'il y a une dizaine d'année, l'identification des microorganismes, en particulier *S. aureus* dans les laboratoires de microbiologie médicale reposait principalement sur les caractères phénotypiques : aspect des colonies, coloration de Gram, caractéristiques de croissance et caractères biochimiques (Seng *et al.*, 2009). Toutefois, les techniques conventionnelles nécessitent beaucoup de personnel et de réactifs et conduisent donc à un coût d'analyse important (Sauget, 2016). Le développement des techniques de biologie moléculaire et de protéomique a permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyse biologique. Elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures voire moins (Guendouze, 2018).

1.2.1. Identification moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire ont bouleversé l'identification des bactéries, et ont mis en lumière les insuffisances et les erreurs d'identifications phénotypiques qui étaient jusque là seules disponibles (Ronsin, 2005 ; Denis *et al.*, 2007).

L'identification moléculaire des bactéries repose essentiellement sur l'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S spécifique des bactéries. Celui-ci est le constituant de la petite sous unité ribosomale du 30S des procaryotes. Le gène codant pour cet ARNr est l'ADNr 16S (Clarridge et Alerts, 2004), présent dans l'ensemble des espèces bactériennes en un nombre variable de copies (Woese, 1987; Reller *et al.*, 2007). Il est composé d'environ 1500 nucléotides et est constitué de sept régions conservées et de neuf régions hypervariables (Chakravorty *et al.*, 2007).

La séquence du gène ADNr 16S obtenue au laboratoire est comparée via le réseau internet, à l'aide de logiciel spécialisé avec les banques électroniques de séquences comme "Nucleotide" du portail NCBI, ou EMBL en Europe. L'identification bactérienne va reposer

sur le pourcentage de similarité des séquences. Nous admettons généralement, qu'une similarité de 99% est identifiante au niveau de l'espèce. Une similarité de 97% identifiante au niveau du genre et qu'en dessous de 97%, il y a une possibilité de nouvelle espèce non décrite dans les banques de données. Par ailleurs, certains logiciels permettent de positionner la séquence obtenue au laboratoire parmi l'ensemble des séquences ADNr 16S disponibles sous forme d'arbres phylogénétiques (Sanger *et al.*, 1977 ; Thomas, 1980 ; Smith *et al.*, 1986 ; Swerdlow *et al.*, 1991 ; Zhang *et al.*, 2003). Cette possibilité est particulièrement intéressante lorsque nous déterminons au laboratoire une séquence ADNr 16S de similarité inférieure à 97%; cela permet alors d'avoir une idée du groupe bactérien dans lequel se situe la bactérie nouvellement identifiée (Staden, 1979).

1.2.2. Identification protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF

1.2.2.1. Historique : les premiers spectromètres de masse datent du début du 20ème siècle et ont servi en physique à rechercher les différents isotopes d'un élément chimique. Elle est issue de la découverte par Euge Goldstein (1886), les rayons canaux dus aux ions positifs et de leur analyse par un champ magnétique, par Wilhelm Wien en 1898 (Guendouze, 2018).

Au cours des années 1980, le développement de l'ionisation douce par MALDI-TOF a permis l'analyse de diverses molécules (Anhalt et Fenselau, 1975; Karas *et al.*, 1988). Par la suite, la technologie de type MALDI-TOF a été appliquée à l'identification rapide de bactéries (Claydon *et al.*, 1996 ; Hettick *et al.*, 2006). Cain *et al.* (1994) sont les premiers à avoir utilisé le MALDI-TOF. L'analyse MALDI portait sur des extraits protéiques obtenus par sonication des bactéries. Par la suite, Holland *et al.* (1996) ont réalisé les premières analyses par MALDI-TOF MS à partir de bactéries intactes. Après une croissance de 18 h sur un milieu solide, les bactéries sans aucun traitement préalable, étaient directement mélangées à la matrice avant d'être ionisées et analysées. La présence de quelques ions caractéristiques du spectre a suffi pour obtenir l'identification d'une espèce.

Une première base de données, permettant l'identification de bactéries par analyses des protéines de surfaces, a été référencée en 2004 (Keys *et al.*, 2004). La fiabilité de l'identification au niveau de l'espèce a été ensuite améliorée par l'ionisation des protéines ribosomales, molécules plus stables que les protéines de surface (Suh et Limbach, 2004). Diverses études ont comparé les performances de l'identification bactérienne par MALDI-TOF MS avec celles des méthodes conventionnelles, et résolu les discordances par

séquençage de l'ADN codant l'ARN 16S ou du gène rpoB (Seng *et al.*, 2009 ; Ferroni *et al.*, 2010). Depuis la fin des années 1990, de nombreuses études ont confirmé l'intérêt de cette technique (Fenselau et Demirev, 2001; Lay, 2001). Pour cette raison, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS a été intégrée dans les laboratoires de routine de microbiologie clinique, depuis le début des années 2010, pour l'identification des microorganismes. (Bizzini et Greub, 2010 ; Emonet *et al.*, 2010). Cet outil innovant, facile à utiliser, rapide, précis, peu coûteux et rentable a révolutionné l'identification bactérienne (Descy *et al.*, 2010).

1.2.2.2. Principe : la spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant d'identifier différents types de molécules ionisées par mesure de leur rapport masse/charge (m/z). La technologie de type MALDI-TOF requiert au préalable une étape de cristallisation, sur support inerte (la cible), de l'échantillon (la bactérie) dans une matrice. Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. Les ions générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF: Time-Of-Flight). La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les plus grandes molécules mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les plus petites molécules arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, il a alors transformé en un signal électrique qui sera amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme d'une série de spectres de masse (pics) (Descy *et al.*, 2010; Sauget, 2016). Un spectre de masse est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé, qui peut être comparé à une banque de données de spectres (Descy *et al.*, 2010) (Figure 1).

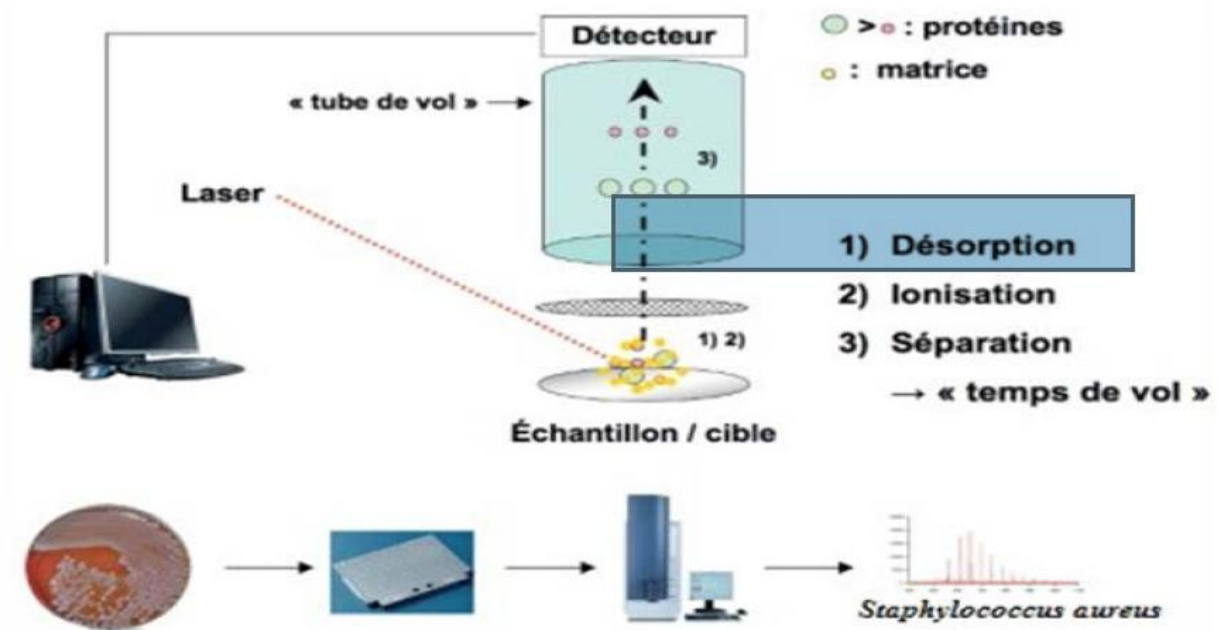


Figure 1 : Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (Sauget, 2016).

1.3. Systèmes de régulation génétique chez *S. aureus*

Le système régulateur est essentiel pour la survie de la bactérie, il contrôle l'expression des facteurs de virulence en fonction des signaux extracellulaires. Ce sont des systèmes de régulation à deux composants qui sont des systèmes enzymatiques capables de traduire les signaux extracellulaires et d'agir en conséquence directement sur la transcription des gènes. Chez *S. aureus* le système *Agr* est le mieux décrit (Le Loir et Gantier, 2010).

1.3.1. *Accessory gene regulator (Agr)* : le système *Agr* peut être considéré pour *S. aureus* comme un stimulateur des exotoxines, et un inhibiteur des facteurs de colonisation et de la formation des biofilms. Il induit l'expression de nombreuses exoprotéines (toxine α , hémolysine β , TSST et leucotoxines) en même temps qu'il réprime l'expression de protéines de surface (protéine A, coagulase et protéine liant la fibronectine) durant la phase post-exponentielle de croissance. L'analyse du transcriptome réalisée par Dunman *et al.* (Dunman *et al.*, 2001) a identifiée 104 gènes activés et 34 gènes réprimés par le système *Agr*. L'effecteur du système *Agr* est une molécule d'ARN, l'ARN III qui module l'expression des facteurs de virulence à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau post-transcriptionnel (Morfeldt *et al.*, 1995 ; Novick *et al.*, 1993).

Le locus *agr* se compose de deux promoteurs P2 et P3 (Ji *et al.*, 1995 ; Lina *et al.*, 1998). L'opéron P2 transcrit un ARN messager : l'ARN II, constitué de quatre gènes : *agrA*,

agrB, *agrC* et *agrD*. *AgrA* et *agrC* correspondent à un système de régulation à deux composants, *agrB* et *agrD* composent un système de « quorum sensing ». L'opéron P3 transcrit un ARN messager : l'ARN III (Le Loir et Gantier, 2010).

Le gène *agrD* code un peptide auto-inducteur (PAI): *agrD*. Durant la phase exponentielle de croissance il s'accumule dans le milieu extra-cellulaire et, à partir de certaine concentration, il active le système à deux composants *agrA/agrC*. Ce phénomène de régulation définit le *quorum sensing* (Fuqua *et al.*, 1994). La fixation de *agrD* sur le récepteur transmembranaire *agrC*, induit l'autophosphorylation de ce dernier (Lina *et al.*, 1998). Le groupement phosphate est ensuite transféré sur la protéine cytoplasmique *agrA* qui active l'expression de l'ARN II et de l'ARN III, effecteur du système (Figure 1).

1.3.2. Les ARN régulateurs : chez *S. aureus*, les ARN régulateurs sont des médiateurs clés de la virulence, de la viabilité et de l'adaptabilité à diverses conditions environnementales. L'ARN rég le mieux caractérisé chez *S. aureus* est l'ARN III. Ce transcrit de 514 nucléotides est un régulateur du système *Agr*. L'ARN III régule de nombreux processus biologiques importants comme la formation de biofilm, le métabolisme du peptidoglycane, le métabolisme d'acides aminés, et les voies de transport (Novick et Geisinger, 2008). De récentes études ont permis l'identification de nouveaux ARN régulateurs dont les ARN agissant en cis, des ARN antisens, des petits ARN non codants et ou des ARNm codant des peptides (Romilly *et al.*, 2012).

1.3.3. Les facteurs de transcription : la famille de protéine Sar : Il s'agit d'une protéine de liaison à l'ADN, dont le locus génétique est sous la dépendance de trois promoteurs P1, P2 et P3 (Bayer *et al.*, 1996). La synthèse de SarA est maximale en phase post-exponentielle de croissance, qui correspond également à la phase d'activation du système *agr* (Chien et Cheung, 1998). SarA agit de deux façons différentes. Soit de manière directe par liaison aux régions promotrices des gènes cibles, soit de manière indirecte par liaison à la région promotrice du locus *agr* (Cheung *et al.*, 1997; Chien et Cheung, 1998; Chien *et al.*, 1999). Dans le deuxième cas, il va permettre d'activer la synthèse de l'ARN II et l'ARN III pour promouvoir l'activation des exotoxines (hémolysines α , δ et γ) (Bronner *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 1999; Dunman *et al.*, 2001) et la répression des protéines d'adhésion, telles que la protéine A et les protéines de liaison au fibrinogène ou à la fibronectine. SarA permet l'activation de plusieurs protéines d'adhésion et de certaines exotoxines (Parmentier, 2014).

Quatre autres protéines homologues à SarA, SarR, SarS, SarT et SarU ont été caractérisées, et d'autres séquences homologues à sarA, sarV, sarY, sarX et sarZ ont été identifiées dans le génome (Le Loir et Gantier, 2010).

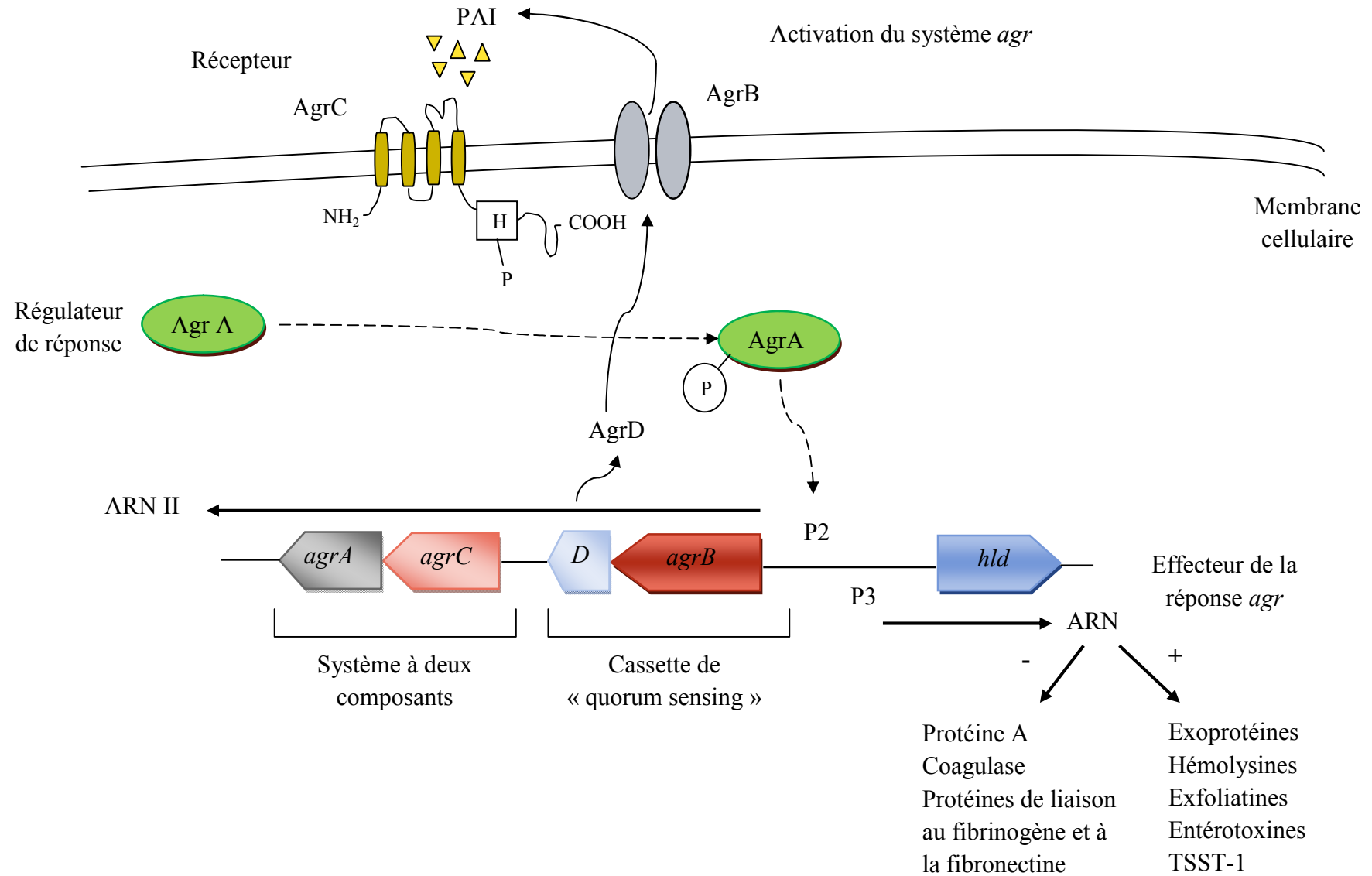


Figure 2 : Organisation du système *agr* de *S. aureus* et modèle de fonctionnement (Le Loir et Gantier, 2010)

2. Résistance de *S. aureus* à la méticilline

Dès sa découverte en 1878, *S. aureus* a été émergée dans les pathologies et c'était la première cause de plusieurs maladies infectieuses dans le monde. Avant l'introduction de la pénicilline, le taux de mortalité des malades infectés par *S. aureus* était 80% (Deurenberg *et al.*, 2007). En 1928, Alexander Fleming a remarqué l'effet inhibiteur du champignon *Penicillium* sur la croissance des Staphylocoques. Cette découverte a conduit à l'amélioration de la santé mondiale par la purification et la production du premier antibiotique utilisé en thérapeutique pour traiter les maladies infectieuses: la pénicilline G (Robert, 2013).

Dès 1940, la pénicilline était l'antibiotique de choix pour traiter les infections causées par *S. aureus*. Cependant la sensibilité à la pénicilline a été de courte durée suite à l'apparition de la première souche résistante en 1942, cette résistance est due à cause de la production de l'enzyme β -lactamase (Deurenberg *et al.*, 2007). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le cycle bêta-lactame des pénicillines G, V et A. Le traitement des infections causées par ces souches résistantes est reposé sur l'utilisation de pénicillines semi-synthétiques capables de résister à l'action des pénicillinases (Vieu, 2014).

En 1959, la méticilline est découverte pour résoudre les problèmes causés par les *S. aureus* résistantes à la pénicilline. C'est aussi une bêta-lactamine mais dont le noyau bêta-lactame est résistant à l'action des pénicillinases. Deux ans après l'introduction de ce nouvel antibiotique, apparaissent des souches de *S. aureus* résistantes que l'on appellera *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) (Pe'Rez, 2001 ; Zhang *et al.*, 2005). Cette résistance à la méticilline est due par l'acquisition d'une cassette chromosomique SCCmec portant le gène *mecA*, qui code une protéine liant les pénicillines additionnelle (PLP2a) de faible affinité pour les bêta-lactamines (Ouchenane *et al.*, 2010), entraînant une résistance croisée à tous les antibiotiques de cette classe ainsi que très fréquemment à des antibiotiques appartenant à d'autres classes (Touaitia, 2016).

2.1. Mécanisme de résistance

2.1.1. Résistance intrinsèque liée à la PLP2a : la méticilline, comme l'oxacilline et la cloxacilline, est une pénicilline M non hydrolysée par les bêta-lactamases. La résistance à la méticilline est le plus souvent due à une modification de la cible de la méticilline par acquisition d'une nouvelle protéine de liaison à la pénicilline de faible affinité pour les bêta-lactamines: la PLP2a (El-Anzi, 2014) (Figure 3). Cette PLP2a est une protéine unique,

inductible, acquise qui a un poids moléculaire d'environ 76 kDa, et elle est produite uniquement par les staphylocoques résistants à la méticilline (Palaveceno, 2007). La PLP2a, d'autre part, est une transpeptidase liée à la membrane qui a évolué à partir de protéases à sérine, leur activité biochimique est mécaniquement similaire à celle de la protéase à sérine (Chambers, 1997). Elle possède la capacité de catalyser seule l'assemblage du peptidoglycane lorsque les autres PLP sont inactivées par les β -lactamines (Al-Zu'Bi *et al.*, 2004). Les isolats contenant le mécanisme de résistance à médiation par PLP2a sont cliniquement résistants à toutes les β -lactamines disponibles, y compris les pénicillines, les céphalosporines, le complexe : inhibiteur de β -lactamase / β -lactamine, monobactamines et les carbapénèmes (Palaveceno, 2007).

La résistance peut être homogène : exprimée par toutes les souches, ou hétérogènes : exprimée par une proportion de colonies filles issues d'une colonie mère exprimant la résistance (Tomasz *et al.*, 1991).

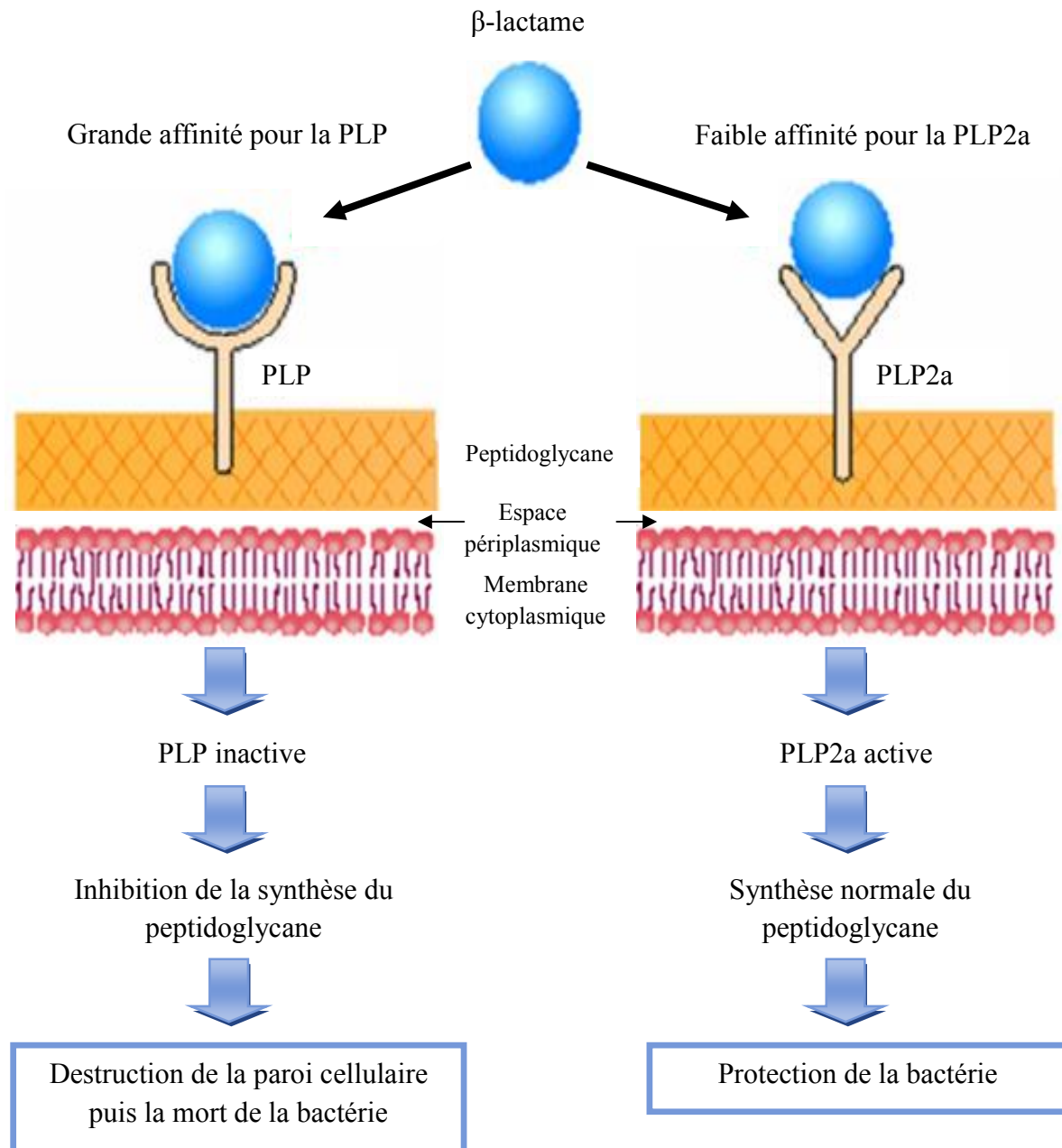


Figure 3: Mécanisme de résistance de *S. aureus* à la méticilline par PLP2a (Rebiahi, 2012).

La PLP2a de *S. aureus* contient une ancre transmembranaire N-terminale, qui peut être éliminée sans affecter la cinétique de liaison au β -lactame. La PLP2a a des dimensions globales de : $130 \times 60 \times 58 \text{ \AA}$ et est constitué d'un domaine de liaison à la nonpénicilline (nPL) bilobé et d'un domaine transpeptidase C-terminal (Figure 4). Le lobe N-terminal correspond à une extension N-terminale unique aux PLP de masse moléculaire élevée. La longueur du domaine nPL (qui positionne le site actif transpeptidase $> 100 \text{ \AA}$ de l'extrémité C-terminale attendue de l'ancre transmembranaire) suggère un rôle structural potentiel et donne potentiellement au domaine transpeptidase une portée substantielle de la membrane cellulaire (Lim *et al.*, 2002).

Les bêta-lactames antibiotiques inactivent les DD-transpeptidases nécessaires à la synthèse du peptidoglycane en réagissant avec le groupement $-O$ d'un résidu de sérine indispensable à l'activité enzymatique dans une réaction d'acylation qui implique l'ouverture du noyau bêta-lactame (Lu *et al.*, 1999).

L'interaction d'une PLP avec un inhibiteur de β -lactame commence avec la formation réversible rapide d'un complexe de Michaelis non covalent. Ceci est suivi par l'attaque nucléophile par le résidu sérine (Ser) du site actif sur le cycle β -lactame pour donner un intermédiaire acyle-PLP covalent relativement stable. Une comparaison des paramètres cinétiques de la PLP2a avec la PLP sensible au β -lactame a montré que la résistance au β -lactame de la PLP2a est principalement due à la formation inefficace de l'intermédiaire acyl-PLP, et ne résulte pas d'un mauvais ajustement du β -lactame dans le site actif ni d'une rupture rapide de l'intermédiaire acyl-PLP. L'efficacité des inhibiteurs de β -lactame résulte de leur capacité à former des complexes covalents stables avec leurs cibles (Lu *et al.*, 1999).

La structure du domaine soluble de la PLP2a a révélé que, bien que le domaine C-terminal présente un schéma de repliement typique des transpeptidases de PLP, il présente des déviations structurelles uniques qui peuvent expliquer sa faible affinité pour les β -lactames. La principale différence est que le motif du site actif contenant la sérine nucléophile est situé sur une hélice- α dans une gorge étroite étendue. Le faible taux d'acylation de PLP2a est dû à ce site actif discordé qui doit subir un changement conformationnel pour que l'acylation se produise (Lim *et al.*, 2002).

La structure du complexe méticilline-acyle-PLP2a (figure 5) montre que ce faible taux d'acylation est une conséquence de la translation de la méticilline liée le long de la rainure du site actif. L'acylation intrinsèquement lente de PLP2a fonctionne en conjonction avec la liaison restreinte de la méticilline dans le site actif étroit (figure 5d) pour fournir une résistance accrue contre les β -lactames volumineux, tels que la méticilline (Lim *et al.*, 2002).

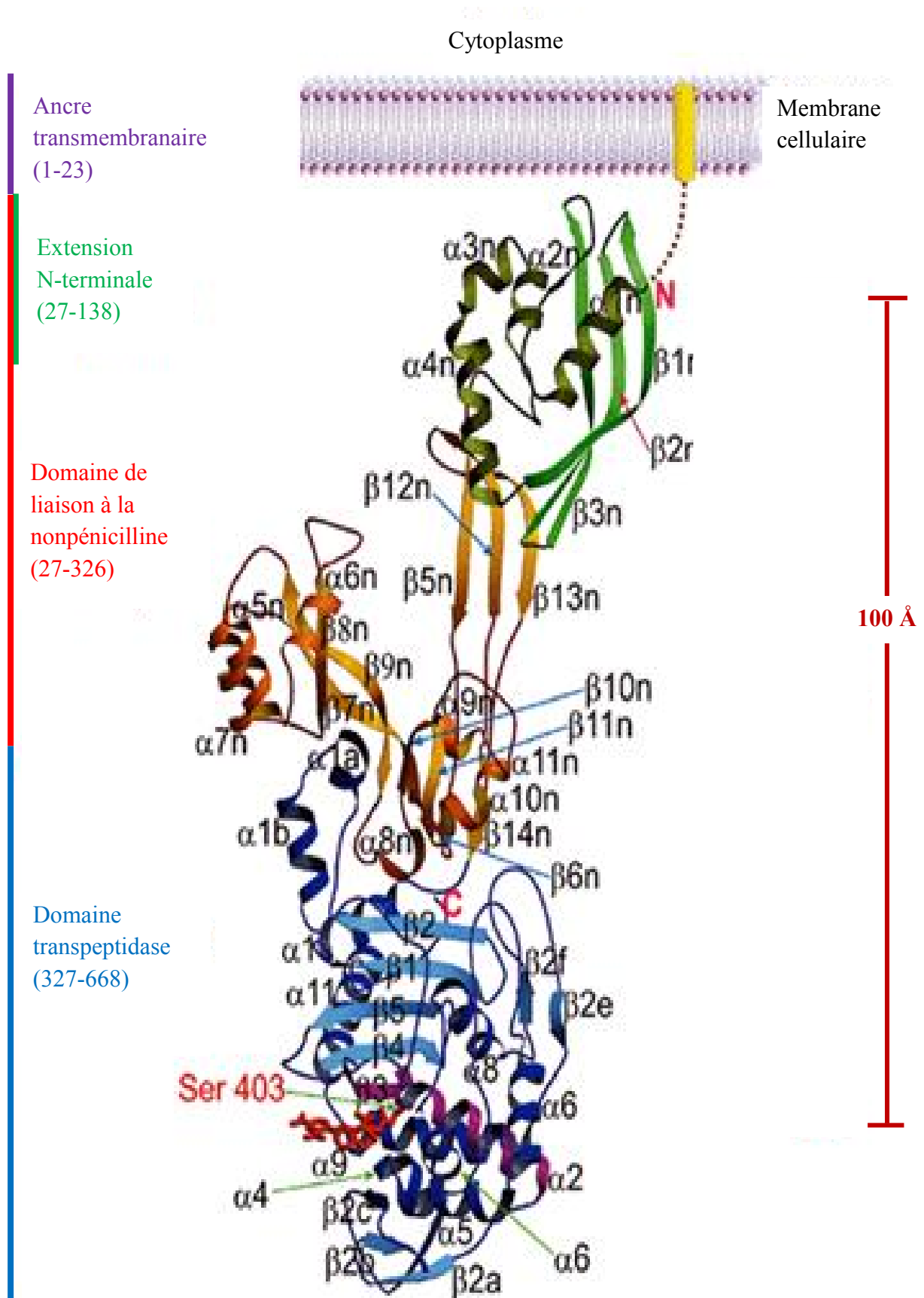
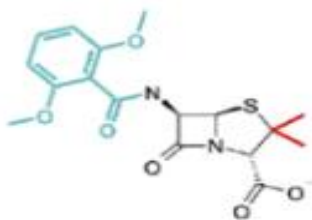


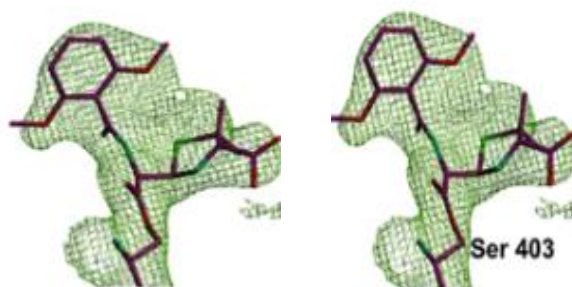
Figure 4 : Structure de la PLP2a du *S. aureus* (Lim et al., 2002).

a)



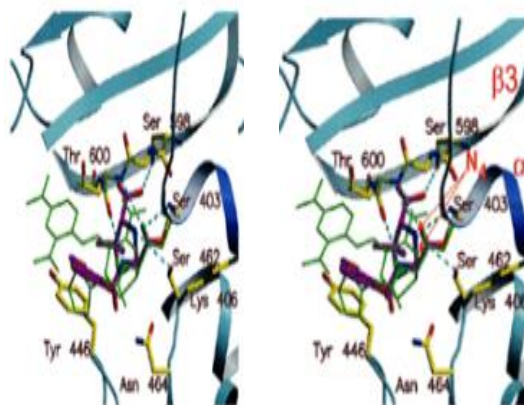
La structure de la méticilline

b)



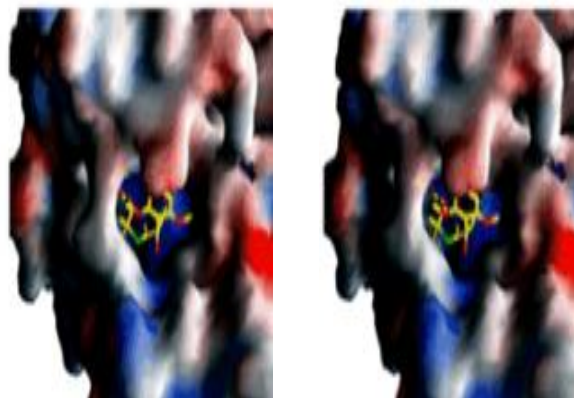
Densité électronique 2Fo - Fc pondérée par SIGMAA54 (profilée à une résolution de 1 σ à 2,6 Å) pour la Ser 403 méticilline-acylée, comme observée dans le complexe acyl-PLP2a correspondant.

c)



Le site actif dans le complexe méticilline-acyl-PLP2a. La méticilline est montrée dans le rendu de bâton avec des carbones magenta. La Ser 403 acylée par la nitrocefine, est montrée dans un léger rendu de bâtonnet vert. Les azotes du groupe partant des β -lactames sont indiqués par l'orange 'N4'.

d)



Représentation en surface GRASP55 du sillon du site actif dans le complexe méticilline-acyl-PLP2a. Les zones positives et négatives sont respectivement bleues et rouges. La méticilline est montrée dans le rendu de bâton avec des carbones jaunes.

Figure 5 : Complexe méticilline-acyl-PLP2a chez *S. aureus* (Lim *et al.*, 2002).

2.1.2. Support génétique de la résistance à la méticilline : la résistance à la méticilline chez les staphylocoques est due principalement à la production de la PLP2a qui est codée par le gène *mecA* (Al-Zu'Bi *et al.*, 2004). Ce gène est situé dans un grand fragment d'ADN chromosomique appelé *mecDNA*, retrouvé uniquement chez les souches résistantes à la méticilline et intégré au niveau d'un site spécifique de *S. aureus* (Chambers, 1997). Les travaux de Katayama *et al.* ont permis de montrer que le *mecDNA* appartient à une nouvelle

classe d'éléments génomiques mobiles appelés *SCCmec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) (Katayama *et al.*, 2000).

La *SCCmec* est un fragment d'ADN de 21 à 67 kb qui s'intègre dans le chromosome des SARM au niveau d'un site unique : attBsc, situé près de l'origine de réplication de *S. aureus* et qui se trouve dans un cadre de lecture ouvert de fonction inconnue, appelé orfX (open reading frame), qui est hautement conservé parmi les souches cliniques de *S. aureus* (Hiramatsu *et al.*, 2001).

Pour ses mouvements, la *SCCmec* porte deux gènes spécifiques appelés : cassette chromosome recombinase A and B (*ccrA* et *ccrB*), codant pour les recombinases qui appartiennent à la famille des invertases-resolvases. Ces deux gènes sont responsables de l'intégration et de l'excision du *SCCmec* au chromosome. En plus des gènes *mecA*, *ccrA* et *ccrB*, *SCCmec* porte une séquence d'insertion IS431*mec* (Palaveceno, 2007).

Quatre classes du complexe du gène *mec* ont été identifiées : classe A, B, C et classe D (figure 5), et quatre allotypes du complexe du gène *ccr* ont été identifiés dans chaque gène *ccrA* et *ccrB* : *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* et *ccrA4* pour le gène *ccrA* et *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3* et *ccrB4* pour le gène *ccrB* (Ito *et al.*, 2004). Différentes combinaisons entre les classes du complexe du gène *mec* et les types du complexe du gène *ccr* ont jusqu'à présent défini huit types de *SCCmec* en utilisant les critères ci-dessous (tableau 1 et figure 7). Les trois premiers éléments *SCCmec* ont été désignés comme types I, II et III. Ceux-ci ont été suivis par des rapports de *SCCmec* types IV à VIII. Cette nomenclature devrait être conservée, mais un système supplémentaire (plus informatif) pour nommer les nouveaux éléments *SCCmec*, basé sur le type de *ccr* et la classe du *mec* présente, est proposé (IWG-SCC, 2009).

SCCmec ressemble à un îlot de pathogénicité; cependant, il ne contient aucun gène de virulence. En ce sens, *SCCmec* peut être considéré comme un îlot de résistance aux antibiotiques. Il porte le complexe du gène *mec*, codant pour la résistance aux β -lactamines et sa régulation inductible, et contient également des transposons et des copies intégrées de plasmides qui portent divers gènes de résistance aux antibiotiques autres que les β -lactamines (Hiramatsu *et al.*, 2001).

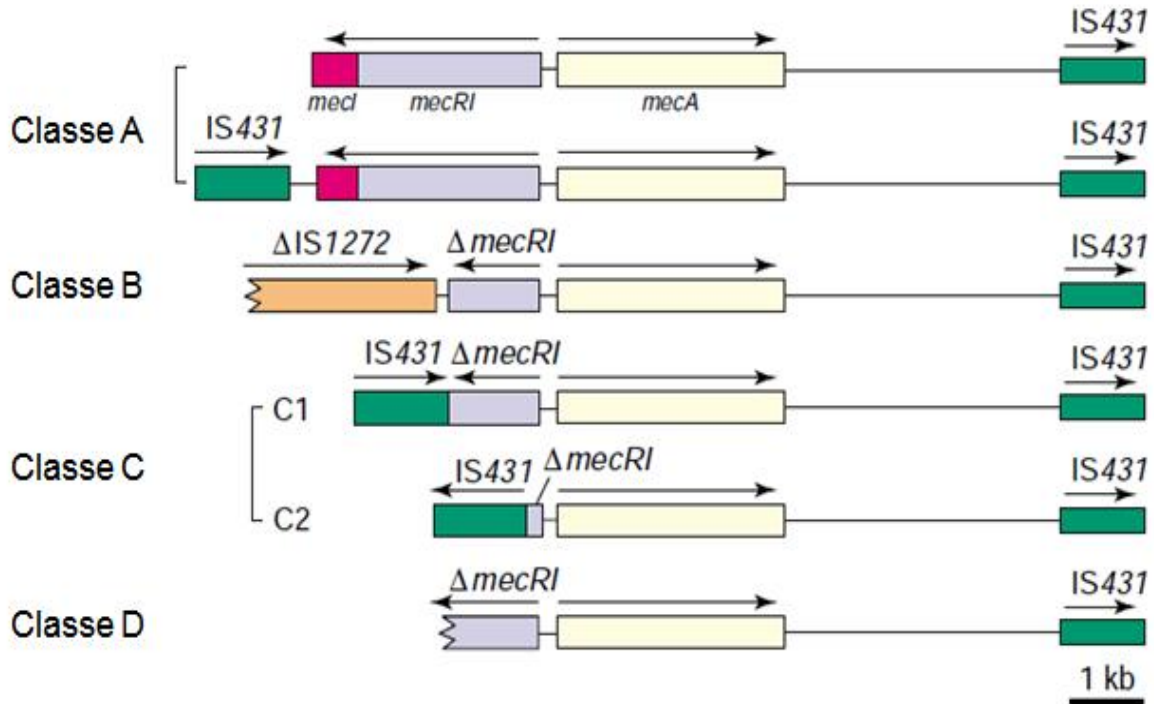


Figure 6 : Les quatre classes du complexe de gène *mec* chez *Staphylococcus* (Hiramatsu *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Les différents types du SCC*mec* identifiés chez *S. aureus* (IWG-SCC, 2009).

Type du SCC <i>mec</i>	Complexe du gène <i>ccr</i> ^a	Complexe du gène <i>mec</i>
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4) ^b	A

^a Les gènes *ccr* dans le complexe du gène sont indiqués entre parenthèses.

^b Les gènes *ccrA4B4* trouvés dans la SCC*mec* de type VIII étaient presque identiques à ceux de l'élément SCC-CI de *S. epidermidis* et présentaient des identités nucléotidiques de 89,6% et 94,5% à celles trouvées dans la SCC*mec* de type VI.

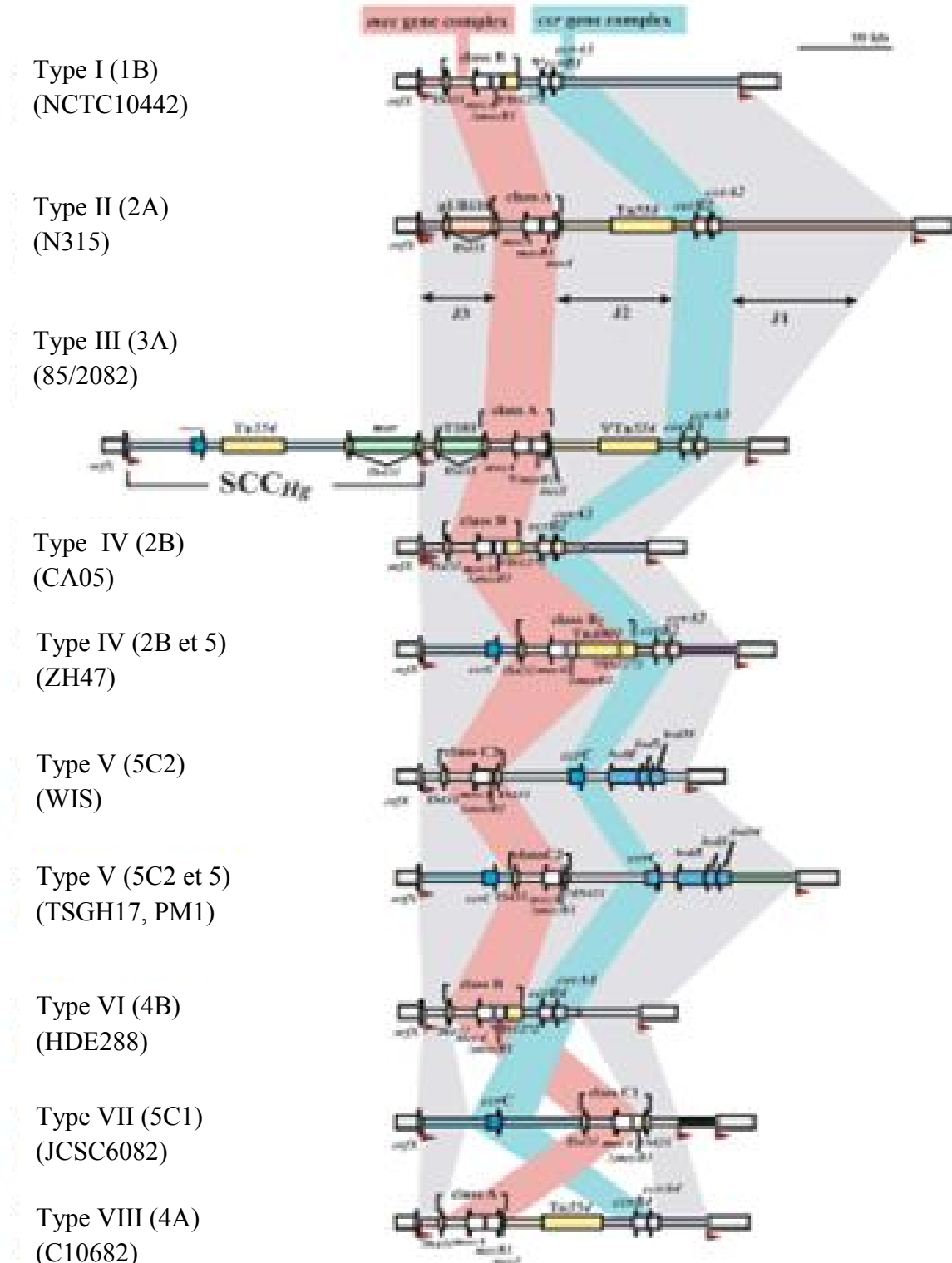


Figure 7 : Structures de base des éléments *SCCmec* représentatifs (IWG-SCC, 2009).

Les structures des éléments *SCCmec* de souches représentatives sont illustrées à partir des séquences nucléotidiques suivantes, déposées dans des bases de données: NCTC10442 (AB033763), N315 (D86934), 85/2082 (AB037671), CA05 (AB063172), ZH47 (AM292304), WIS (AB121219), TSGH17 (AB512767), PM1 (AB462393), HDE288 (AF411935), JCSC6082 (AB373032) et C10684 (FJ390057).

En 1987, le gène *mecA* a été découvert et cloné à partir d'une souche Japonaise de SARM, et sa séquence a été déterminée (Katayama *et al.*, 2000). Cette séquence d'ADN n'est pas retrouvée chez les souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la pénicilline. En effet, l'origine du gène *mecA* est incertaine jusqu'à présent. Un homologue du gène *mecA* présentant une similarité de 88% au niveau de la séquence d'acides aminés a été identifié chez *Staphylococcus sciuri* (Deurenberg *et al.*, 2007). Cet homologue aurait subi des mutations, car *S. sciuri* n'est pas résistante à la méticilline. Ces données et d'autres, supportent l'hypothèse que *mecA* est originaire d'une espèce de Staphylococcus à coagulase négative, probablement un proche parent évolutif de *S. sciuri*. Toutes les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline sont des descendants clonaux de quelques souches ancestrales qui ont acquis le gène *mecA* (Chambers, 1997).

2.1.3. Modes de résistance autres que la PLP2a : pour certaines souches, les CMI de la méticilline (4 à 8 µg/ml) sont légèrement supérieures à la limite permettant de différencier les souches résistantes des souches sensibles. Ces souches ne contiennent pas le gène *mecA*. Trois mécanismes peuvent être à l'origine de cette résistance de bas niveau (Tomatz *et al.*, 1989).

- Des altérations des PLP1, 2 ou 4 chez des souches ne produisant pas de bêta-lactamase (souches MODSA : modified *Staphylococcus aureus*) (Tomatz *et al.*, 1989).
- Une hyperproduction de bêta-lactamase plasmidique pourrait être également à l'origine de l'hydrolyse de la méticilline (souches BORSA : borderline *Staphylococcus aureus*) (Tomatz *et al.*, 1989 ; Chambers *et al.*, 1997).
- Une activité de la méticillinase distincte de la b-lactamase staphylococcique codée par un plasmide a également été rapportée chez des souches BORSA, qui pourrait être importante (Chambers *et al.*, 1997).

2.2. Régulation génétique de la résistance de *S. aureus* à la méticilline

La classe original du complexe du gène *mec*, classe A, contient le gène *mecA* et en amont de ce dernier se situe ses gènes régulateurs intacts : *mecI* et *mecR1*. Le gène *mecI* code une protéine répresseur de la transcription : MecI, et *mecR1* code pour une protéine transducteur du signal, MecR1. Sur la base des données expérimentales de leurs homologues protéiques *BlaI* et *BlaR1*, qui constituent le système d'induction de la pénicillinase chez *S.*

aureus, codée par le gène *blaZ* (Hiramatsu *et al.*, 2001). Il n'est donc pas surprenant que *mecA* puisse être régulé par le système d'induction de la β -lactamase (Berger-Bachi, 1994).

Cependant, en absence de β -lactamine, MecI réprime la transcription à la fois de *mecA* et de *mecRI-mecI*. En présence de β -lactamine, MecRI le détecte avec son domaine extracellulaire, ensuite clive par voie autocatalytique, en activant son domaine métalloprotéase qui se situe dans sa partie cytoplasmique. La métalloprotéase clive MecI liée à la région de l'opérateur du gène *mecA*, ce qui permet sa transcription et la production de la PLP2a. Les deux gènes *mecI* et *mecRI* peuvent être tronqués par les séquences d'insertion IS431 ou IS1272, ce qui entraîne la dérégulation du gène *mecA* (Deurenberg *et al.*, 2007 ; Hiramatsu *et al.*, 2001).

Le système *mecI/mecRI* exerce une inhibition plus forte que *blaI/blaRI*. Si le système *mecI/mecRI* est fonctionnel, la transcription du gène *mecA* est très fortement inhibée et la souche apparaît sensible avec les techniques usuelles d'antibiogramme. Toutefois, grâce au système *blaI/blaRI*, la méticilline sera lentement inductrice de la résistance. En pratique clinique, la majorité des souches actuelles ont un système *mecI/mecRI* non fonctionnel et la transcription du gène *mecA* est sous la dépendance de *blaI/blaRI* : dans ce cas la résistance est rapidement inductible par les β -lactamines. En raison de l'interaction entre le système régulateur de la β -lactamase et le *mecA*, le locus chromosomique R2, un autre gène impliqué dans l'induction des β -lactamases, pourrait également être impliqué dans l'induction de PLP2a. Des gènes auxiliaires appelés *fem* (pour «factors essential for methicillin resistance») sont également impliqués dans l'expression de la résistance à haut niveau chez les souches présentant une résistance hétérogène à la méticilline. Cinq gènes ont été identifiés : *femA*, *femB*, *femC*, *femD* et *femE* (Berger-Bachi, 1994).

3. Structure des protéines

Si l'ADN est le support physique de l'information biologique, la protéine en est le reflet, et à l'échelle moléculaire c'est déjà une véritable machine fonctionnelle, assurant à la fois des fonctions vitales aussi bien structurales que dynamiques. Ainsi une protéine est un polymère linéaire constitué de différentes unités de base, les acides aminés (aa) ou résidus. Un aa est constitué d'un carbone central (carbone alpha ou C α) lié à un groupement carboxyle (COOH), à un groupement amine (NH₂), à un atome d'hydrogène (H) et à un radical R. Les vingt aa se différencient par la nature de ce radical qui leur confère différentes propriétés telles que la charge, la flexibilité, l'encombrement stérique ou bien encore

l'hydrophobicité (Ferron, 2005). La structure d'une protéine peut être décrite à plusieurs niveaux de structures, chacun apportant un type d'informations spécifiques.

3.2. La structure primaire

Les aa sont reliés entre eux par une liaison peptidique entre le groupement carboxyle COOH d'un résidu et le groupement amine NH₂ du résidu suivant. La chaîne ainsi formée est appelée « la chaîne principale ou squelette », alors que les radicaux sont désignés sous le terme de « chaînes latérales ». On parle de peptide lorsque le nombre de résidus est inférieur à 50 et de protéine au-delà (Krid, 2008) (Figure 8). La principale information apportée par la structure primaire est l'ordre ou la succession des aa formant la molécule protéique. Secondairement, la structure primaire permet les calculs de valeurs spécifiques intrinsèques telles que le pI, le PM, l'hydrophobicité, etc.

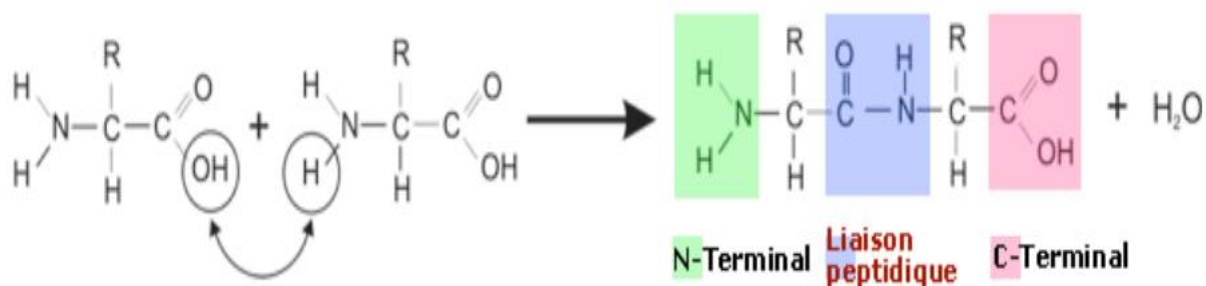


Figure 8: Formation de la liaison peptidique. La liaison de deux aminoacides est accompagnée de la perte d'une molécule d'eau (Berg *et al.*, 2002).

3.2. Les structures secondaires

Elle correspond aux repliements qu'adoptent certaines portions de la séquence protéique, caractérisés par les angles dièdres Phi (Φ : C α -NH) et Psi (Ψ : C α -CO) et par la présence de liaisons hydrogène entre les groupements amides (-NH) et carbonyles (-CO) du squelette peptidique (Ghouzam, 2016).

Les valeurs d'angles Φ et Ψ sont limitées par l'encombrement stérique des chaînes latérales des résidus. En effet, les rotations C α -NH et C α -CO ne s'effectuent pas librement sur 360°, mais sur des valeurs d'angles (Phi et Psi) limitées pour éviter un éventuel encombrement stérique ayant pour conséquence une anomalie structurale affectant négativement l'activité de la protéine. Il existe donc un ensemble de valeurs autorisées pour Phi et pour Psi pour lesquelles la molécule protéique peut adopter une conformation active. Ces valeurs combinées peuvent être représentées graphiquement selon le diagramme de

Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963 ; Ramachandran et Sasisekharan, 1968) (figures 9 et 10).

De manière générale, les angles dièdres Phi et Psi adoptent des valeurs déterminées spécifiques de chacune des deux conformations (alpha et bêta) : pour l'hélice alpha Phi = -57° et Psi = -47° ; pour le feuillet bêta l'angle Phi = -139° et l'angle Psi = $+135^\circ$ (Guendouze, 2018).

Les hélices α et les feuillets β constituent une très grande partie des éléments structuraux réguliers des protéines. Cependant, des éléments de structures secondaires irréguliers (les coudes) sont également observés dans les protéines et sont tout aussi importants pour leurs fonctions et leurs structures (Ghouzam, 2016).

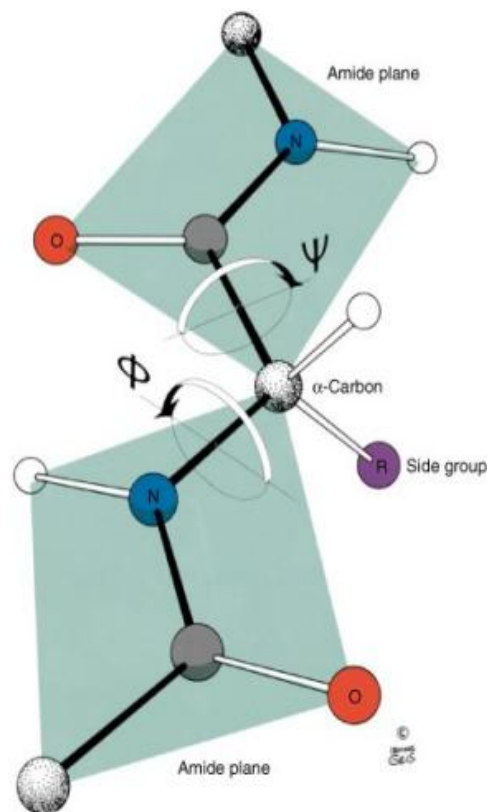


Figure 9 : Plans peptidiques de deux résidus. Les deux plans peptidiques sont colorés en bleu. Les deux angles de torsion Phi (Φ) et Psi (Ψ) y sont représentés (Waldispuhl, 2004).

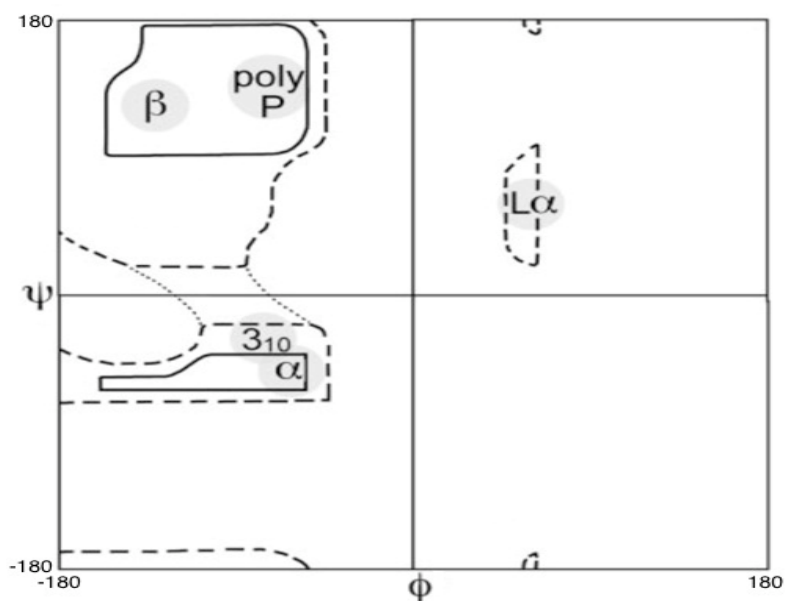


Figure 10 : Diagramme de Ramachandran.

3.2.1. Hélices α : L'hélice α est créée par l'enroulement du squelette peptidique autour d'un axe central de manière à former un tour régulier, chaque tour comporte 3,6 résidus ce qui correspond à un pas de 5,4 Å (soit 1,5 Å par aa). La structure est stabilisée par des liaisons hydrogène entre le groupe C=O du résidu i et le groupe N-H du résidu $i+4$. Les chaînes latérales des résidus d'une hélice α sont orientées vers l'extérieur (Ghouzam, 2016).

La courbure du squelette peptidique peut se faire dans deux directions : droite (dans le sens des aiguilles d'une montre) et gauche. Presque la totalité des hélices observées dans les protéines sont des hélices droites. Les hélices gauches sont plus rares, car énergétiquement moins favorables (Ghouzam, 2016).

D'autres types d'hélices ont également été observés dans les protéines, mais beaucoup moins fréquemment, dûs à leur géométrie moins favorable. L'hélice 3_{10} a une périodicité de trois résidus par tour, avec une liaison hydrogène entre le résidu i et le résidu $i+3$ (Taylor et Kerr, 1941 ; Huggins, 1943). Ce type d'hélice est généralement observé dans de petits segments ou encore aux extrémités d'une hélice α . La très rare hélice π (π) a une périodicité de 4,4 résidus par tour avec une liaison hydrogène entre le résidu i et le résidu $i+5$. Elle est seulement observée aux extrémités des hélices α (Low et Baybutt, 1952).

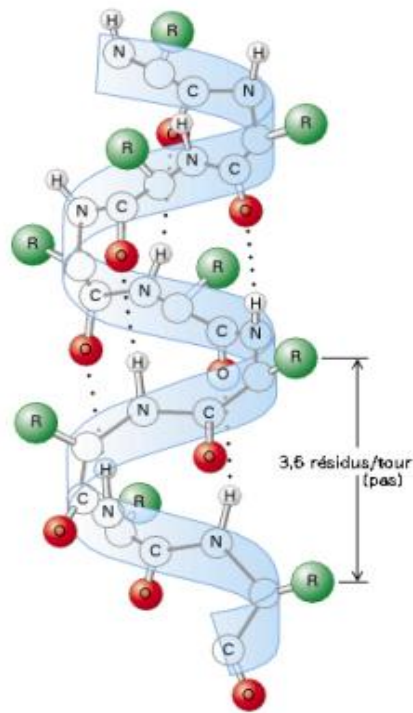


Figure 11: Schéma d'une hélice α droite (Ghouzam, 2016).

Les oxygènes, azotes, hydrogènes, et chaînes latérales des résidus sont représentés par des boules rouges, blanches, grises et vertes, respectivement.

3.2.2. Les feuilletts β : Contrairement aux hélices α , les feuilletts β font intervenir des régions éloignées les unes des autres le long de la structure primaire, appelée brins β (Figure 12). Les feuilletts β sont composés de plusieurs brins, alignés les uns à côtés des autres entre lesquels s'établissent des liaisons hydrogènes. Cet alignement des brins peut s'organiser de trois façons différentes (Figure 13) :

- Si deux brins adjacents sont orientés dans le même sens (de Nter vers Cter) le feuillet β est parallèle β (Ferron, 2005),
- Si les deux brins sont dans des sens opposés, on dit que le feuillet β est antiparallèle (Ferron, 2005),
- Les feuilletts β peuvent aussi former des configurations mixtes avec, à la fois, des brins parallèles et antiparallèles au sein du même feuillet (Ghouzam, 2016).

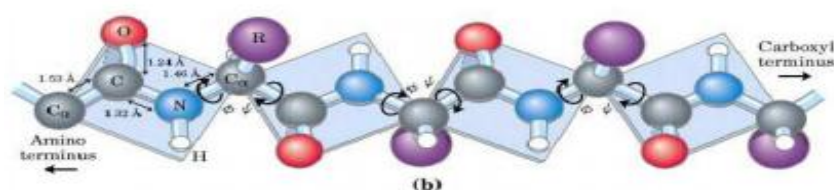


Figure 12: Schéma d'un Brin β (Ferron, 2005).

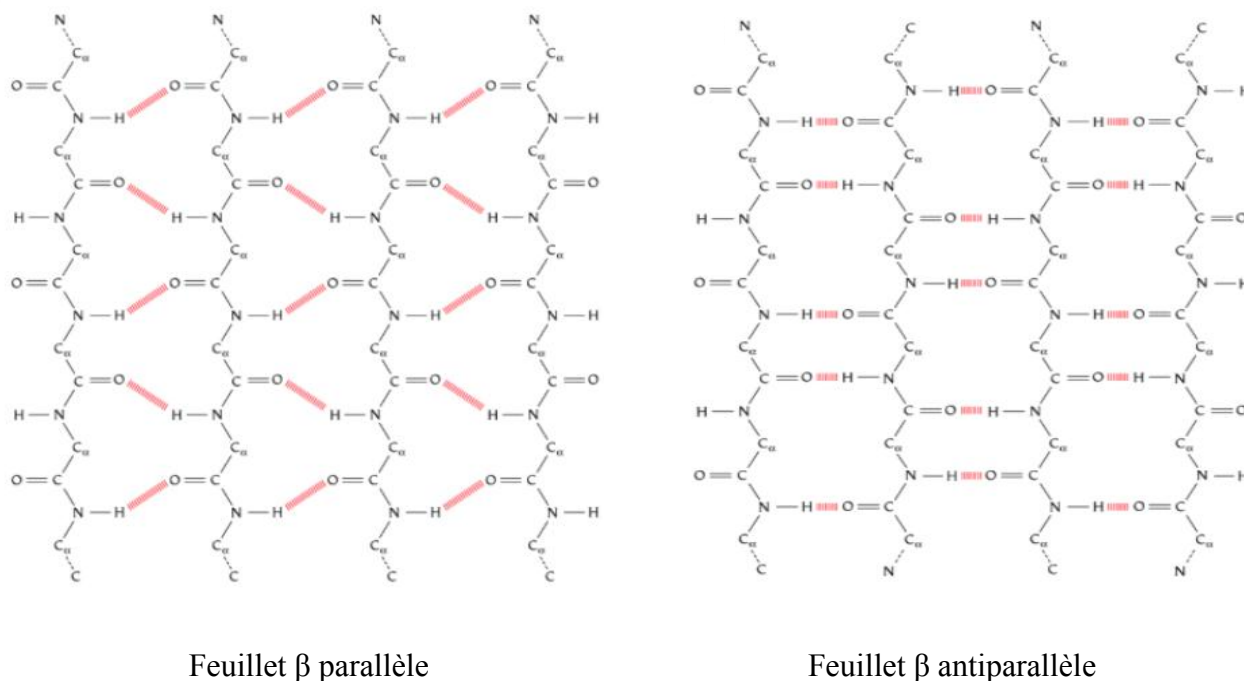


Figure 13 : Schéma représentatif des différentes structures d'un feuillet β (Branden et JohnTooze, 1999).

3.2.3. Les boucles ou coudes : C'est une structure secondaire irrégulière, constituée de trois acides aminés caractérisés par une liaison hydrogène entre le groupe C=O du résidu i et le groupe N-H du résidu $i+3$. Contrairement aux hélices et aux feuillets, les tours sont des structures secondaires très courtes, bien qu'environ 25 à 30% des acides aminés s'y retrouvent (Waldispuhl, 2004). Elles peuvent être importantes pour la stabilité et la fonction de la protéine (Fetrow, 1995).

La classification des coudes s'effectue généralement en fonction du nombre de résidus qu'ils comprennent :

- coude α : comprend trois résidus avec quatre liaisons peptidiques, séparent les deux résidus extrêmes de la structure. La liaison hydrogène se forme entre le groupe -CO d'un résidu i et les groupements -NH d'un résidu $i+4$.
- coude β : comprend deux résidus avec trois liaisons peptidiques, séparent les deux résidus extrêmes de la structure. La liaison hydrogène se forme entre le groupe -CO d'un résidu i et les groupements -NH d'un résidu $i+3$. Ils sont regroupés sous l'appellation de coude β car ils font souvent le lien entre deux brins β . Les différentes valeurs prises par les angles Φ et Ψ permettent de définir trois sous types de coude β notés I, II et III (Tableau 2).

- coude γ : comprend un seul résidu avec deux liaisons peptidiques, séparent les deux résidus extrêmes de la structure. La liaison hydrogène se forme entre le groupe -CO d'un résidu i et les groupements -NH d'un résidu $i+2$.
- coude δ : les deux résidus extrêmes de la structure son contigus, c'est-à-dire qu'ils ne sont séparés que par une seule liaison peptidique (structure peu probable d'un point vue stérique).
- coude π : comprend quatre résidus avec cinq liaisons peptidiques, séparent les deux résidus extrêmes de la structure. La liaison hydrogène se forme entre le groupe -CO d'un résidu i et les groupements -NH d'un résidu $i+5$.

Tableau 2 : Angles dièdres moyens des résidus centraux suivant les trois types de coude β .

	Résidu $i+1$		Résidu $i+2$	
	angle Φ	angle Ψ	angle Φ	angle Ψ
Type I	-60.0°	-30.0°	-90.0°	0.00°
Type II	-60.0°	+120.0°	+80.0°	0.00°
Type III	-60.0°	-30.0°	-60.0°	-30.0°

3.3. La structure tertiaire

Elle correspond au repliement et à l'assemblage des différents éléments de la structure secondaire. Cette structure correspond en fait à la structure tridimensionnelle (structure 3D) de la protéine (Figure 14) (Krid, 2008). Le repliement et la stabilité des protéines sont guidés par plusieurs forces ; les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions hydrophobes:

- Les liaisons hydrogènes apparaissent quand deux atomes électronégatifs entrent en compétition pour le même atome d'hydrogène. L'hydrogène est lié de façon covalente à un des deux atomes (le donneur) mais interagit favorablement avec l'autre (l'accepteur) (Delsaux, 2008). Elles sont présentes par exemple dans la formation des hélices α et des feuillets β .
- Les forces de Van der Waals sont des forces faibles et à courte portée mais efficaces en grand nombre (Abraham, 2008). Elles correspondent aux forces d'attractions à longue portée et de répulsions à très courte portée entre deux atomes ou molécules adjacentes (Krid, 2008).

- Les interactions électrostatiques (ioniques), ou ponts salins, sont formés entre deux atomes de charges opposées (exemple : l'arginine et l'aspartate) (Ghouzam, 2016).
- Les interactions hydrophobes sont des forces indirectes qui favorisent le regroupement des molécules non polaires afin de limiter les contacts avec l'eau, et à créer entre elles des liaisons dites interactions non covalentes (Krid, 2008).
- En effet, lorsque la protéine est déstructurée, les molécules d'eau qui l'entourent vont former des « cages » autour des résidus non polaires, ce qui va ordonner les molécules d'eau et diminuer leur entropie, mais l'entropie de la protéine augmente. Inversement, lorsque la protéine est repliée et que les résidus hydrophobes sont situés à l'intérieur, l'entropie des molécules d'eau augmente, mais l'entropie de la protéine diminue (Abraham, 2008).

Les protéines possèdent plusieurs fonctions, dans ce cas, pour chaque fonction est associée une structure et les séquences peuvent être découpées en unités de base, que l'on appelle domaines protéiques. Ces domaines sont des structures globulaires et compactes qui adoptent des repliements indépendants. Ces domaines structuraux sont les constituants de l'architecture des protéines et de leurs fonctions. Ainsi, les combinaisons peuvent être variées tant par la nature que par l'ordre. Néanmoins, il est possible de distinguer deux grandes catégories : les domaines continus qui sont formés par des régions peptidiques consécutives qui se replient pour former un domaine indépendant et unique, et les domaines discontinus qui sont composés de régions peptidiques non consécutives. Il est possible de caractériser structurellement un domaine et ce, indépendamment du reste de la protéine. Cette approche en domaines est largement utilisée dans la caractérisation structurale (Ferron, 2005).

Des expériences montrent que les protéines repliées aléatoirement sont inactives et qu'après dénaturation modérée, une protéine peut retrouver son repliement natif. Cela indique que la chaîne d'acides aminés contient en général l'information suffisante pour déterminer la conformation de la structure de la protéine (Anfinsen, 1973 ; Alberts *et al.*, 1994).

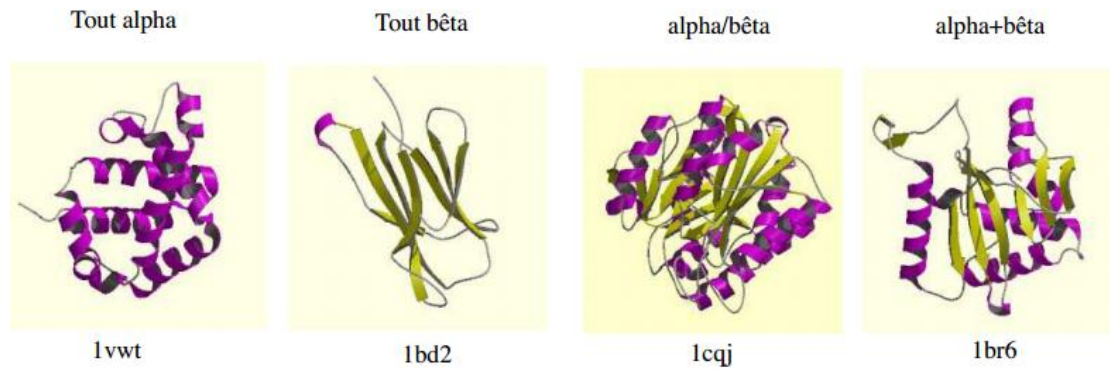


Figure 14: Différents types de repliement illustrant la variabilité de la structure tertiaire (Ferron, 2005).

4. Approches bioinformatiques pour la prédiction des structures 2D et 3D des protéines

La séquence primaire des protéines contient toutes les informations qui vont déterminer les structures secondaires et tertiaires des protéines. La fonction d'une protéine dépend en grande partie de sa structure c'est-à-dire de la manière dont se replie la chaîne d'acides aminés (Bouziane *et al.*, 2008). Plusieurs études se sont intéressées aux relations entre la séquence, la structure et la fonction (Chothia et Lesk, 1986 ; Wilson *et al.*, 2000 et Todd *et al.*, 2001).

L'identification de la fonction d'une protéine commence par la recherche de similarité de séquence en comparant sa séquence primaire à d'autres séquences (alignements). Si la similarité est significative (> 70%), alors deux postulats peuvent être posés :

- Premièrement, les deux séquences sont homologues, autrement dit, elles sont liées phylogénétiquement (Rost, 1999).
- Deuxièmement, l'homologie entre deux séquences peut laisser supposer que les protéines ont la même structure voire la même fonction (Rost, 1999).

La recherche de similarité au sein d'un échantillon de séquences passe par leur alignement multiple. Celui-ci permet de :

- Déterminer si la protéine s'organise en domaines : les domaines adoptent une conformation particulière, peuvent évoluer de façon indépendante du reste de la protéine et acquérir une fonction biologique particulière (fixation d'un ligand, ancrage membranaire,...). La structure 3D des protéines peut ainsi être constituée d'un assemblage de plusieurs

domaines protéiques (protéine multi-domaine). Une protéine composée de plusieurs domaines structuraux peut posséder plusieurs fonctions (Ghouzam, 2016).

- Déterminer des motifs conservés : la recherche de motifs est fondamentale, elle participe à caractériser de nouvelles séquences (identification de fonction ou sites de reconnaissances...) de nouveaux organismes et elle permet la classification des protéines et leur assignement en famille sur le critère d'une « signature » commune (Ferron, 2005).
- Retracer son évolution et ses liens phylogénétiques : les séquences homologues possèdent un ancêtre commun. La structure est généralement mieux conservée que la séquence au cours de l'évolution du fait des pressions de sélection qui s'exercent sur la structure pour le maintien de la fonction (Orengo *et al.*, 1999). La découverte que des protéines homologues ont des séquences en acides aminés variables d'une espèce à l'autre, et que cette variabilité est fonction de l'évolution.
- Identifier sa fonction : deux séquences similaires à plus de 70% peuvent avoir des structures qui se ressemblent et des fonctions proches ou identiques.

Les programmes d'alignement multiple sont nombreux. Les plus utilisés sont Clustal Oméga, Multalign, Clustal W, Dialign, T-coffee, MAFFT et MUSCLE (Thompson *et al.*, 1999; Edgar, 2004).

4.1. Méthodes pour la prédiction de structures secondaires

La fonction d'une protéine dépend en grande partie de sa structure c'est-à-dire de la manière dont elle se replie au tour d'elle-même. La prédiction de la fonction protéique passe d'abord par les prédictions structurelles 2D (et 3D). Prédire la structure 2D revient à prédire les éléments conformationnels locaux : hélices α , feuillets β et coudes (Bouziane *et al.*, 2008).

Les premières méthodes de prédiction de structures secondaires, développées par Nagano (Nagano, 1973), Chou-Fasman (Chou et Fasman, 1974), Lim (Lim, 1974), Garnier, Osguthorpe et Robson (Garnier *et al.*, 1978) reposaient sur une analyse statistique de la propension des acides aminés à se trouver dans l'un des éléments de structures secondaires (α , β ou coude) (Ferron, 2005). Les méthodes de Chou et Fasman et GOR sont les plus utilisées :

- La méthode de Chou et Fasman a été établie à partir d'un ensemble de protéines dont la structure primaire est connue ainsi que la conformation tridimensionnelle (rayons X). L'étude statistique apportée par cette méthode (algorithme) permet de déterminer l'aptitude

de chacun des 20 aa à adopter une conformation donnée (alpha, bêta). On définira donc pour un aa donné les paramètres structuraux P_α et P_β correspondant aux structures α et β (Henriette et Lefebvre, 1980).

Les paramètres $P_\alpha = f_\alpha / \langle f_\alpha \rangle$ et $P_\beta = f_\beta / \langle f_\beta \rangle$ dans lesquels f_α et f_β représentent le nombre de fois que le résidu considéré est présent dans les séquences en hélice α ou en structure β et où $\langle f_\alpha \rangle$ et $\langle f_\beta \rangle$ représentent le nombre moyen d'aa constituant ces séquences protéiques (Henriette et Lefebvre, 1980).

- La méthode GOR (Garnier *et al.*, 1978) est basée sur la prédiction de trois états (hélices, brins et coudes). Il s'agit d'une analyse statistique de la fréquence des résidus observés dans une fenêtre de 17 aa. Les éléments de structure secondaire sont assignés en fonction de la composition et de la fréquence des résidus. La prédiction est affinée par la suite, en tenant compte du fait que le nombre minimum de résidus est respectivement quatre ou deux pour les hélices et les brins (Ferron, 2005). Le taux de bonne prédiction de ces méthodes, noté Q_3 est de l'ordre de 55 à 58%. Le Q_3 correspond au pourcentage des structures correctement prédites (hélices α , feuilletts β et coudes) par rapport à une structure 2D de référence (Maupetit, 2007). Exemple :

Prédiction :	CCCHHHCC	EEEEHHHHH	→	$Q_3 = (7+3+3) / (9+3+4)$
				$Q_3 = 13/16$
Correct :	CHHHHH	CC		$Q_3 = 0.81 (81\%)$
		EE		
		CHHHH		

H: Helix = Hélice α ; E: Extended strand = Feuillet β ; C: Coil = Coude (ou boucle).

4.2. Méthodes pour la prédiction des structures tertiaires

La structure 3D est importante puisqu'elle détermine les propriétés biochimiques et la fonction biologique des protéines. En général, les structures 3D des protéines sont déterminées soit par cristallographie aux rayons-X soit par RMN. Cependant, ces méthodes sont coûteuses et restent un processus long. En complément à ces approches expérimentales, les méthodes de modélisation moléculaire ont été développées (Khemili, 2013).

Deux types de méthodes sont utilisés pour la prédiction de la structure 3D des protéines : la modélisation comparative et les méthodes dites *ab initio* (figure 15).

4.2.1. La modélisation comparative

4.2.1.1. Modélisation par homologie : La modélisation par homologie est fondée sur le fait que deux protéines qui partagent une identité de séquence élevée (plus de 30%) adoptent un même repliement (Rost, 1999; Baker et Sali, 2001). Son principe consiste à aligner la séquence d'une protéine donnée dont la structure est inconnue (cible) avec la séquence d'une ou de plusieurs protéines ayant une structure expérimentale connue (RMN ou Rayons-X) (patrons ou références) (Sali & Blundell, 1993).

Les programmes de prédiction des structures des protéines par modélisation par homologie se basent sur différentes approches :

- Assemblage de corps rigides : un modèle est assemblé à partir d'un nombre restreint de corps rigides obtenus à partir du coeur des régions alignées (Blundell *et al.*, 1987 ; Greer, 1990). L'assemblage consiste donc en un ajustement des corps rigides sur la matrice (le patron), puis de reconstruire les parties non conservées (*i.e.* les boucles et chaînes latérales). Les programmes les plus connus dans cette catégorie sont SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/> ; Schwede *et al.*, 2003), NEST (Petrey *et al.*, 2003), 3D-JIGSAW (Bates *et al.*, 2001) et Builder (Koehl et Delarue, 1995). La principale différence entre ces méthodes réside dans la technique employée pour reconstruire les boucles et les chaînes latérales (Maupetit, 2007).
- Correspondance de segments : utilise un sous-ensemble de fragments protéiques dérivés de l'alignement pour rechercher des fragments compatibles dans une base de données représentative de structures résolues (Jones et Thirup, 1986; Claessens *et al.*, 1989). La base de données de recherche contient de courts fragments protéiques sélectionnés selon des critères énergétiques et/ou géométriques. Le programme le plus connu est SEGMOD (Levitt, 1992) développé par Michael Levitt.
- Satisfaction des contraintes spatiales : cette approche utilise des contraintes spatiales pour générer des modèles, contraintes dérivées de l'alignement de séquences toujours. Le modèle est ainsi obtenu en minimisant les violations de ces contraintes spatiales. Le programme le plus performant dans cette catégorie est MODELLER (<http://salilab.org/modeller/modeller.html> ; Sali et Blundell, 1993).

4.2.1.2. Les méthodes de reconnaissance de repliement (Threading) : Cette méthode est préconisée quand la similarité de séquence entre la cible et les patrons est comprise entre 20 et 30%. Elle consiste à enfiler la séquence de la cible sur une bibliothèque de repliement afin de déterminer les structures qui correspondent le mieux à la séquence sur

la base d'un critère énergétique ou de score (Helms et McCammon, 1998 ; Fiser *et al.*, 2001 ; Kamberaj et Helms, 2001). Les programmes de reconnaissance de repliement les plus populaires sont 3D-PSSM ou Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/>; Kelley *et al.*, 1999 ; Kelley et Sternberg, 2009) et THREADER (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/software_downloads/threader/; Jones, 1998).

4.2.2. Les méthodes *ab initio*

Ces méthodes sont utilisées pour prédire la structure tertiaire de la cible pour des pourcentages d'identité de séquence très faibles à partir de sa séquence primaire en acides aminés, en se basant sur leurs interactions physicochimiques (électrostatiques, van der Waals, liaisons hydrogènes, etc...) entre les atomes des résidus (Cornell *et al.*, 1995). Ces méthodes se basent sur l'hypothèse que la structure native des protéines correspond à l'énergie libre minimale. Au sein de cette méthode, on distingue deux types de méthodes dites : *ab initio* pures, basées uniquement sur des principes physiques, et *de novo* qui utilisent une batterie d'informations issues de bases de données (Maupetit, 2007).

En raison de l'extrême complexité des calculs devant être effectués, la taille des polypeptides pouvant être traitées par cette méthode (*ab initio*) ne dépasse pas la vingtaine d'acides aminés, rendant de fait ces techniques inutilisables en pratique.

Les performances de ces méthodes de prédiction de structure 3D des protéines sont évaluées régulièrement par le concours CASP (Critical Assessment of techniques for protein Structure Prediction, <http://www.predictioncenter.org/casp10/index.cgi>) (Khemili, 2013). Malgré les progrès réalisés dans chacune de ces méthodes de prédiction, la modélisation comparative demeure la plus performante (Oezguen *et al.*, 2009 ; Shen *et al.*, 2011 ; Ghosh et Gupta-Bhattacharya, 2011)

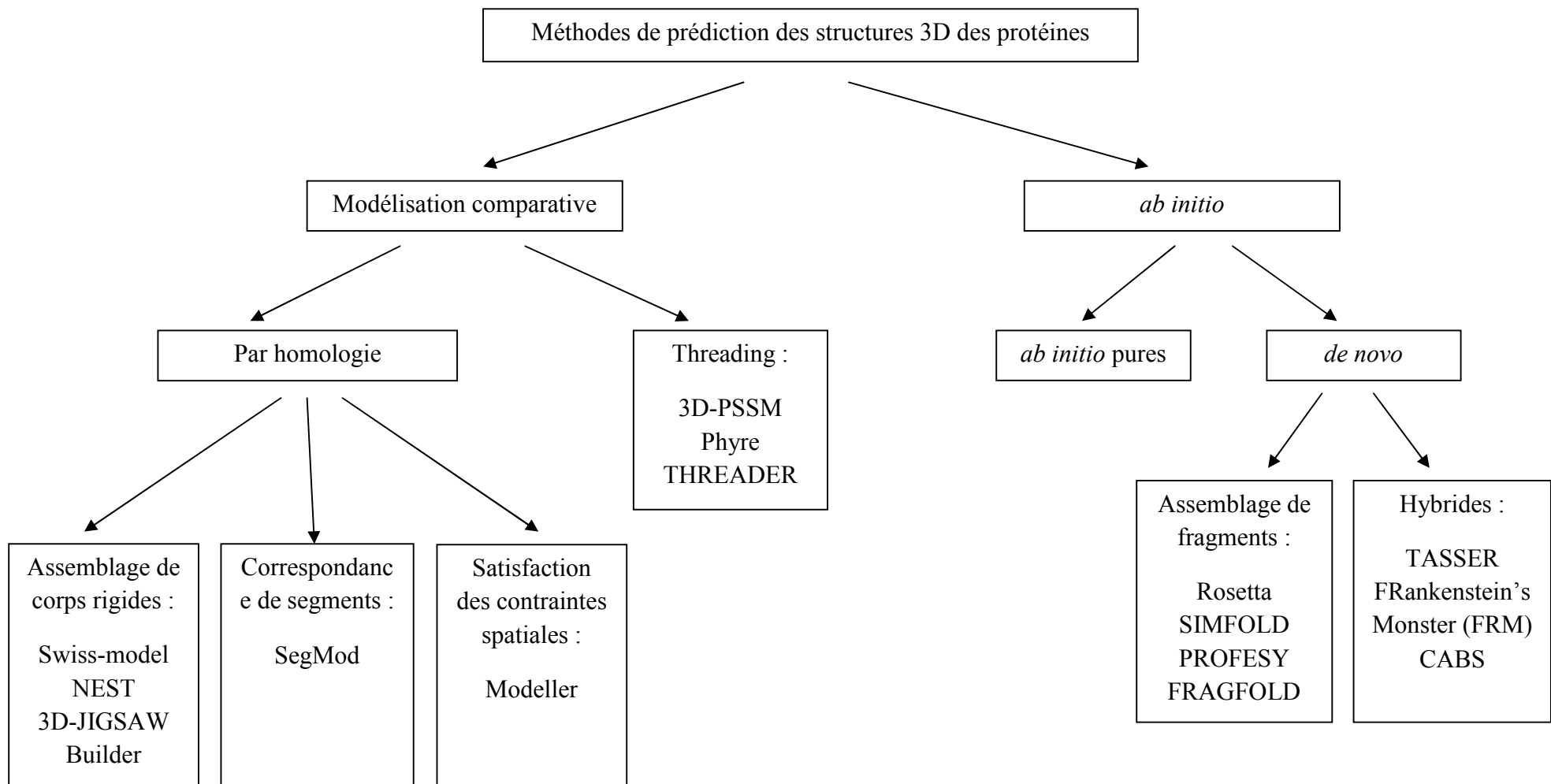


Figure 15 : Méthodes de prédiction des structures 3D des protéines

Chapitre II: Matériel et Méthodes

1. Matériel bactérien

Ce travail a été réalisé sur 65 isolats de *S. aureus* de différents prélèvements cliniques responsables d'infections au niveau de la pédiatrie Mensorah et d'autres laboratoires de la ville de Constantine. Les isolats ont été recueillis durant la période de Décembre 2014 à Septembre 2015. Les prélèvements ont concerné différents types d'échantillons pathologiques à visée diagnostic (pus, urine et sperme).

Les différentes techniques bactériologiques et les tests biochimiques utilisés pour identifier les isolats de *S. aureus* ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie de la pédiatrie Mensorah de Constantine.

1.1. Isolement et purification

L'isolement de *S. aureus* a été réalisé par repiquages successifs sur le milieu Chapman, incubés à 37 °C/ 24 h. *S. aureus* donne des colonies jaunes orangés bombées de 1 à 2 µm de diamètre avec acidification du milieu Chapman.

1.2. Identification présomptive et conservation des souches

En plus des observations macroscopiques, toutes les souches ont été identifiées (figure 16) grâce aux méthodes bactériologiques classiques (coloration de Gram, production de catalase, oxydase, DNase et de coagulase) et par les caractères biochimiques à l'aide des galeries API 20 Staph (Bio Mérieux).

La conservation de courte durée des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée. Après incubation à 37 °C/ 24h, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4 °C. La conservation de longue durée des souches a été réalisée par piqure centrale du milieu gélosé de conservation. Après incubation à 37 °C/24h, les tubes ont été conservés à température ambiante.

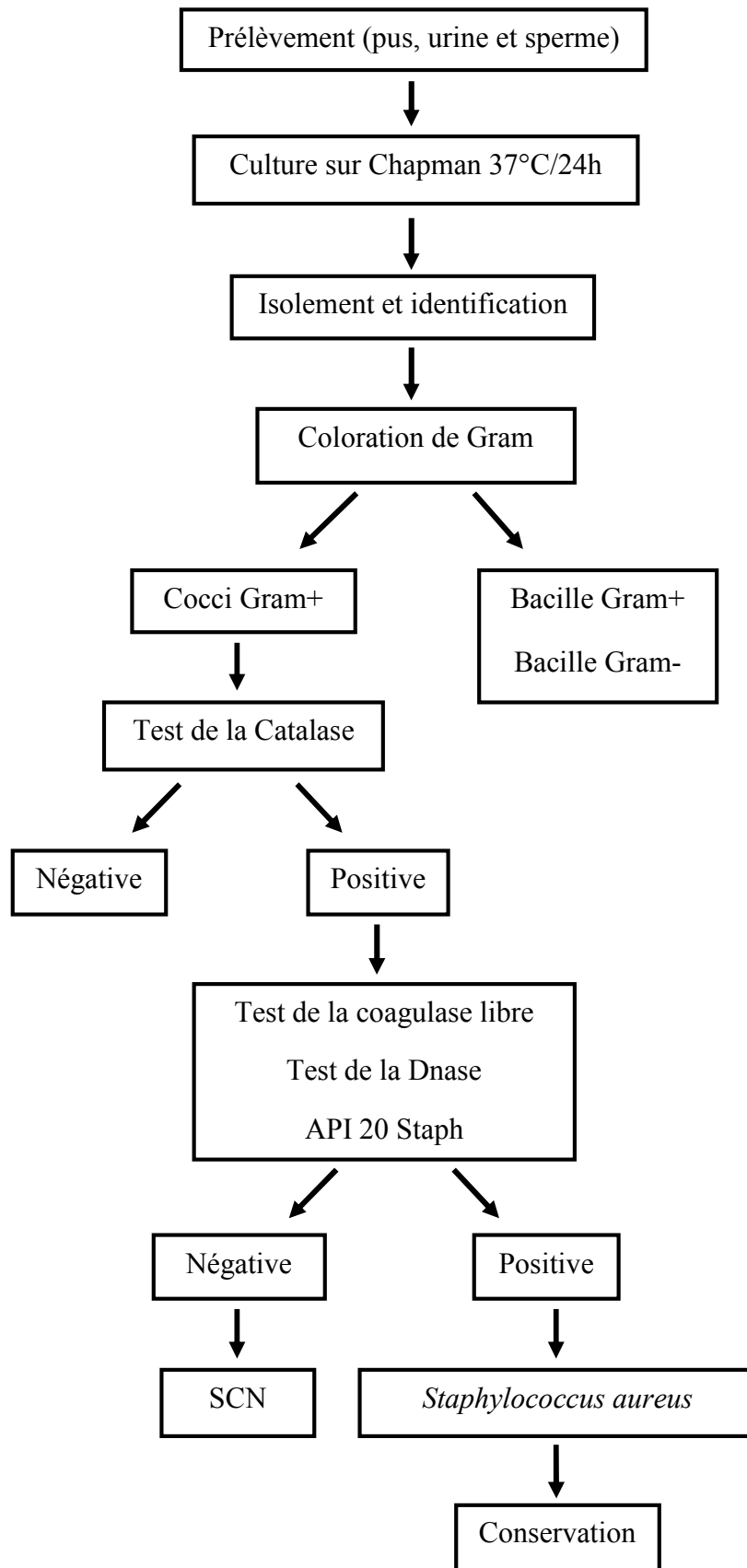


Figure 16: Organigramme de l'identification de *S. aureus* par les méthodes bactériologiques standards. SCN : Staphylocoque Coagulase Négative.

2. Antibiogramme

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion de disques (Bio-Rad, France) en milieu gélosé de Muller-Hinton selon les recommandations décrites par le comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie (CA-SFM). Les isolats ont été testés avec 16 antibiotiques : pénicilline G (10 µg), oxacilline (5 µg), céfoxitine (30 µg), Ciprofloxacine (5 µg), Gentamicine (15 µg), Teicoplanine (30 µg), Vancomycine (30 µg), Erythromycine (15 µg), Clindamycine (15 µg), Pristinamycine (15 µg), Doxycycline (30 µg), Fosfomycine (50 µg), Linézolide (30 µg), Rifampicine (30 µg) et Triméthoprim-sulfaméthoxazole (25 µg). Les boîtes ont été incubées à 37 °C /24h.

Les résultats ont été comparés aux valeurs critiques figurant sur la table de lecture ; l'isolat est classé sensible, de résistance intermédiaire ou résistant (Tableau 3).

Tableau 3 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *S. aureus*.

Antibiotiques	Symbole	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
			S	R
Céfoxitine	FOX	30 µg	≥ 27	< 25
Ceftriaxone	CRO	30 µg	≥ 26	< 23
Ciprofloxacine	CIP	5 µg	≥ 22	< 22
Clindamycine	CM/CC	15 µg	≥ 21	< 14
Doxycycline	D/DO	30 µg	≥ 19	< 17
Erythromycine	E	15 µg	≥ 22	< 19
Fosfomycine	FOS	50 µg	≥ 14	< 14
Gentamicine	GM	15 µg	≥ 20	< 20
Linézolide	LNZ	30 µg	≥ 24	< 24
Oxacilline	OX	5 µg	≥ 20	< 20
Pénicilline G	P	10 µg	≥ 29	< 29
Pristinamycine	PR/PT	15 µg	≥ 22	< 19
Rifampicine	RA	30 µg	≥ 29	< 24
Teicoplanine	TEC	30 µg	≥ 17	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole	SXT	25 µg	≥ 16	< 13
Vancomycine	VA	30 µg	≥ 17	-

3. Identification protéomique des souches par spectrométrie de masse MALDI-TOF

3.1. Préparation de la matrice

La matrice, solution pour cristalliser les échantillons, est préparée sous hotte chimique avant chaque série d'analyses et est conservée à -80 °C à l'abri de la lumière. Le protocole de sa préparation est le suivant :

- Dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, introduire deux spatules d'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (ACHC),
- Ajouter 500 µL d'acétonitrile HPLC,
- Ajouter 250 µL de TFA à 10% (acide trifluoroacétique),
- Ajouter 250 µL d'eau HPLC,
- Vortexer,
- Soniquer 10 min (la solution doit devenir trouble),
- Centrifuger pendant 5 min à 13 000 g,
- Transférer le surnageant dans un tube Eppendorf de 1,5 mL : la matrice est prête.

3.2. Préparation et dépôt des échantillons sur la plaque

L'étape de dépôt des échantillons staphylococciques (figure 17) sur la plaque destinée au MALDI-TOF (ou cible MALDI) est essentielle pour une bonne identification. Ces étapes sont :

- Mise en place d'un plan de dépôt pour préciser la disposition des échantillons à placer sur la plaque, en tenant compte de leurs codes respectifs. Chaque échantillon staphylococcique étant placé dans deux puits (spots) de la plaque.
- Déposer, sur la première ligne de la plaque, deux spots du témoin positif " T⁺ " (1,5 µL de la suspension BTS " *Bacterial Test Standard* " contenant une souche de référence de *Escherichia coli*) et recouvrir chaque dépôt après séchage par 1,5 µL de matrice.

- Sur la ligne suivante dans les deux mêmes colonnes, déposer deux spots du témoin négatif " T " (ne contenant que 1,5 µL de matrice).
- Sur les lignes suivantes de la cible MALDI, déposer les échantillons staphylococciques sous forme d'une fine pellicule en deux exemplaires, en prélevant à l'aide d'un embout (0,1-10 µL) une petite quantité de chaque colonie des isolats cultivés sur gélose TSA.
- Recouvrez les spots avec 1,5 µL de la matrice.
- Laisser sécher les échantillons à température ambiante pendant cinq min sous une hotte.
- Introduisez la cible dans le MALDI-TOF.

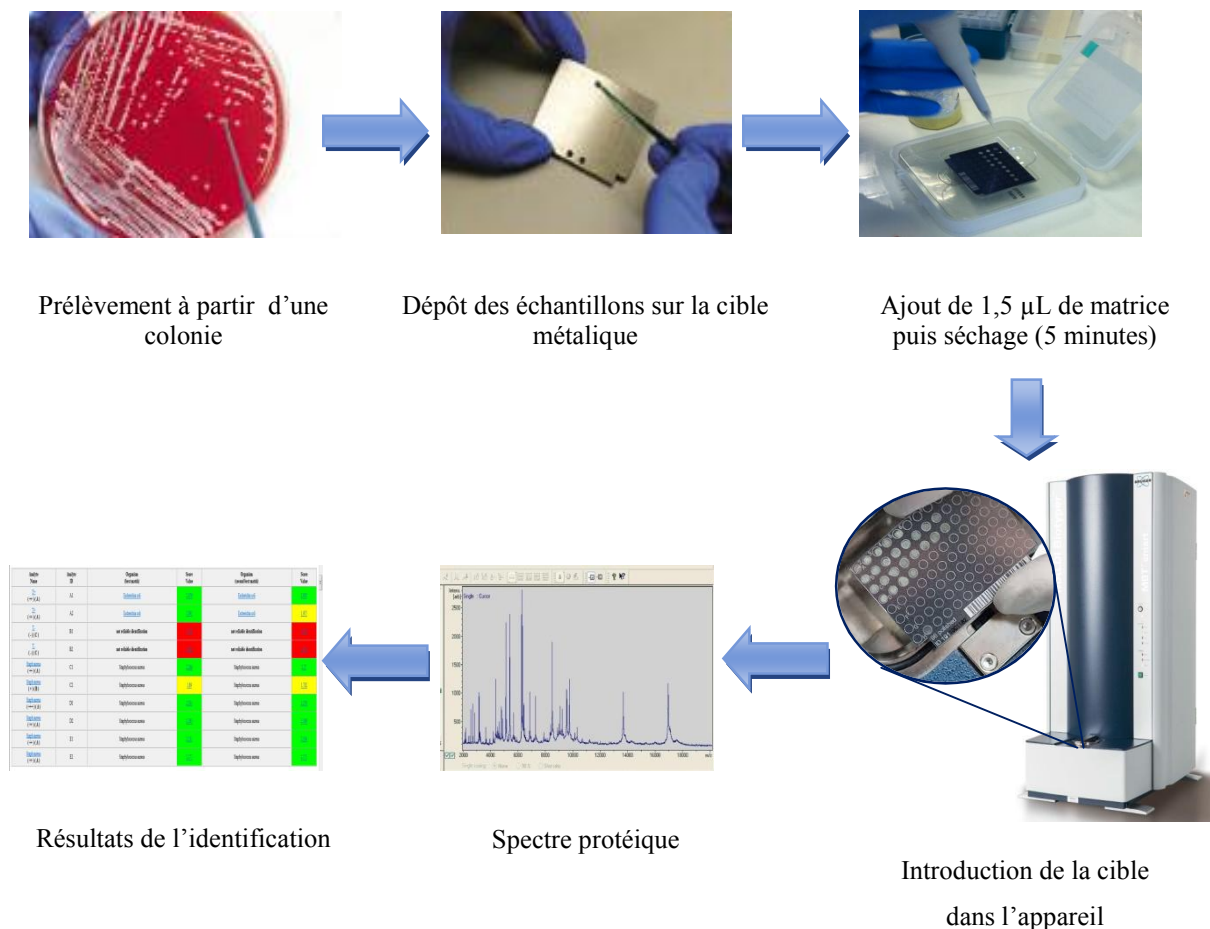


Figure 17 : Séquence d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.

3.3. Lancement de l'acquisition MALDI-TOF MS et interrogation de la base de données

- Lancer le logiciel d'acquisition FlexControl pour créer le projet d'identification des bactéries. Ce logiciel est piloté par le programme MALDI BioTyper™ 2.0 (Bruker Daltonics) (figure 18).

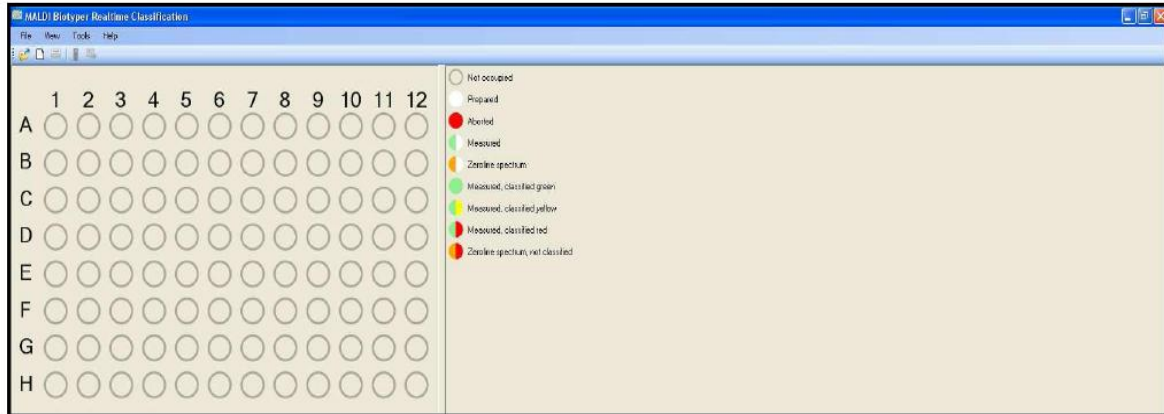


Figure 18 : Interface du logiciel MALDI BioTyper™ 2.0 (Bruker Daltonics).

- Visualiser l'acquisition des spectres (figure 19).
- Les résultats s'affichent avec un code couleur (Figure 20).

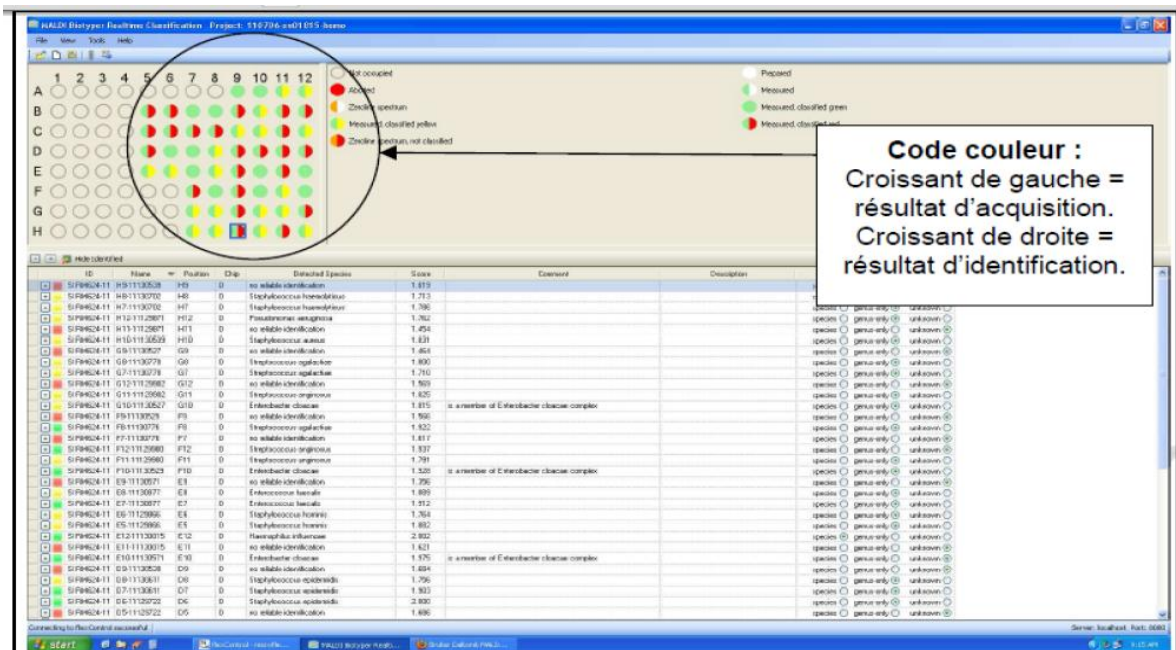


Figure 19 : Interface du logiciel d'acquisition FlexControl.

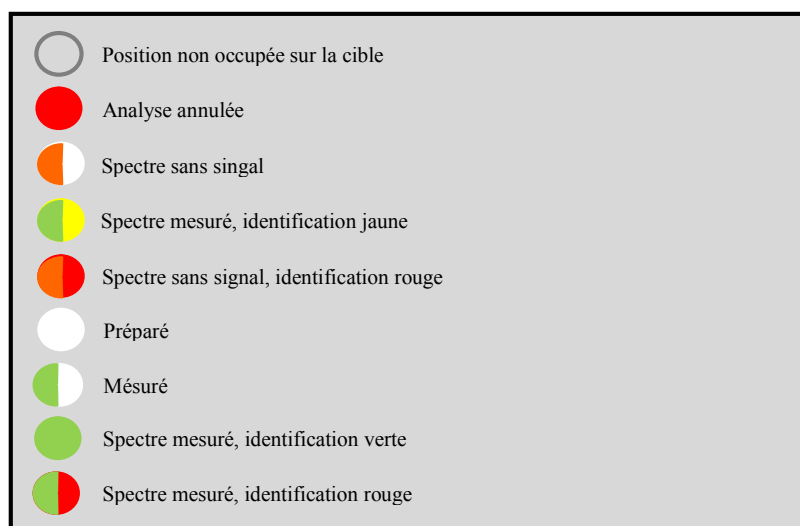


Figure 20 : Code couleur des analyses et identifications BioTyper™ 2.0 (Bruker Daltonics).

- Les spectres générés à partir des bactéries entières sont ensuite comparés aux spectres de référence présents dans la base de données BioTyper. Ces spectres de référence ont été obtenus à partir des souches types et d'isolats issus de collections internationales. La concordance des spectres obtenus à partir des isolats bactériens étudiés avec ceux de référence est traduite par des scores (de zéro à trois) qui indiquent le degré de confiance à accorder à l'identification (Tableau 4).

Tableau 4 : Score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification.

Score	Description	Symbole	Couleur
2,300 – 3,000	Forte probabilité d'identification de l'espèce	+++	vert
2,000 – 2,299	Identification du genre sécurisée, identification de l'espèce probable	++	vert
1,700 – 1,999	Identification au genre probable	+	jaune
0,000 – 1,699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	-	rouge

- Les résultats d'une cible sont exploitables seulement si les témoins T⁺ et T⁻ sont valides :

- T⁺ doit correspondre à *Escherichia coli* avec un score > 1,9 (zones vertes)

- T⁺ doit correspondre à un score sans identification < 1,7 (zone rouge)

4. Détection moléculaire du gène *mecA*

4.1. Extraction de l'ADN

L'ADN de tous les isolats a été extrait à partir de cultures fraîches de 24h. L'automate EZ1 BioRobot (EZ1 XL) de QIAGEN est utilisé selon le protocole d'extraction EZ1 Advanced XL Sample & Assay Technologies. La technique des particules magnétiques donne à l'ADN une haute qualité. Elle est utile pour une utilisation directe d'amplification.

Le kit EZ1 DNA Tissue (Qiagen) a été utilisé pour l'extraction de l'ADN selon le protocole suivant :

- Une petite colonie de chaque isolat a été mélangée avec 200 µL de tampon de lyse G2 dans des tubes à fond plat.
- Les suspensions ont été homogénéisées au vortex pendant 2 min, puis elles ont été mises dans l'automate EZ1 BioRobot (EZ1 XL) pour extraire l'ADN.
- Le tampon va permettre d'éliminer les protéines et libérer les acides nucléiques, qui sont ensuite fixées par des billes magnétiques.
- Les billes magnétiques fixées à l'ADN sont lavées à plusieurs reprises. Lors de cette étape, l'éluât se détache des billes et celles-ci sont capturées par un aimant qui les retient.
- Les éluats contenant les ADN génomiques sont alors récupérés dans des microtubes stériles et conservés à 4°C pour une utilisation immédiate ou à -20 °C pour une longue conservation.

4.2. RT-PCR

- Préparation et constitution du mix PCR : La préparation du mix a été effectuée selon les instructions du fournisseur, les amorces utilisées sont décrites dans le tableau 5.
- 650 µL du Mix Quantitec.
- 130 µL de Probe.
- 130 µL d'H₂O.

- 32,5 µL de chaque amorce.

Dans la pièce d'extraction, sous une hotte, procéder aux manipulations suivantes :

- Préparer le plan de plaque et indiquer l'emplacement des puits utilisés sur la plaque puis leur code.
- Déposer 15 µL du mix PCR dans chacun des puits (plaque 96 puits) utilisés.
- Ajouter 5 µL d'ADN extrait de chaque isolat (n=65) dans les puits selon le plan de plaque préparé.
- Ajouter le T⁺ dans le puit correspondant (souche de référence : *S. aureus mecA*⁺).
- Pour le T⁻ le puit qui correspond contient seulement 15 µL du mix PCR.
- Recouvrir la plaque d'un film optique (Applied biosystems).
- Mettre la plaque dans l'appareil PCR de type CFX96 (BioRad) et lancer la PCR.
- Le protocole de la RT-PCR comporte les programmes suivants : un programme de dénaturation de l'ADN (95 °C / 15 min), un programme d'amplification (95 °C / 30 s) et de quantification (60 °C / 1 min). Ce protocole étant répété 35 fois.

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier le gène *mecA*.

Amorces	Sequences (5'-3')	Tm °C (ThermoFisher Scientific)	Références
Forward primer	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	55,9	Strommenger <i>et al.</i> (2003) and Shahraz <i>et al.</i> (2011)
Reverse primer	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	59,8	

Les isolats (n=21) *mecA*⁺ sont ensuite envoyés au laboratoire BIOFIDAL (Laboratoire de biologie moléculaire, Lyon. France) pour l'amplification et le séquençage de leurs gènes ADNr 16S et *mecA*.

5. Identification moléculaire des isolats

L'identification de nos isolats est passée par l'amplification et le séquençage de leurs ADNr 16S. Pour cela, une PCR standard est utilisée. Les étapes réalisées pour cette identification sont les suivantes :

5.1. Lyse des colonies bactériennes

Cette technique a été inspirée d'un protocole de Hassanzadah *et al.* (2016) :

- Cultiver les bactéries *S. aureus* sur boîtes de Pétri sur milieu Chapman à 37 °C/24h.
- Prendre 10 à 12 colonies, et les mettre dans un tube de type Eppendorff de 1,5 mL, dans 330 µL de Tampon TENT (voir annexe A).
- Mettre les tubes au bain-Marie à 96 °C durant 12 min, pour lyser les parois bactériennes.
- Centrifuger les tubes à 12 000 rpm /5 minutes pour culoter les débris cellulaires.
- 2 µL de surnageant est pris pour réaliser les PCR.

5.2. Purification de l'ADN total

Le Kit AMPURE XP (Beckman Coulter, France) a été utilisé pour la purification de l'ADN au moyen de billes Magnétiques. L'ADN extrait est mis en suspension dans 20 µL de Tampon TE 1X (Tris-EDTA : 10 mM Tris et 1 mM EDTA, pH 8.0).

5.3. Amplification et séquençage du gène ADNr 16S

La PCR (Standard) a consisté à multiplier la séquence du gène ADNr 16S de nos isolats à l'aide des amorces universelles 16S-27F et 16S-1492R (Tableau 4) générant un amplicon de 1465 pb.

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur Biometra (LABGENE scientific Instruments, Archamps, France). Le mélange réactionnel d'amplification d'un volume final de 30 µL contient :

- 2 µL d'ADN extrait ;
- 6 µL du Mix HOTBIOAmp 5X à 12,5mM MgCl₂ ;

- 2 μL d'Enhancer 10X ;
- 1 μL Primer 16S-27F ;
- 1 μL Primer 16S-1492R ;
- 18 μL H_2O qsp.

Les différentes étapes de la PCR standard comprennent une étape d'activation du Mix pendant 12 min à 96 °C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN avec :

- 20 s à 96 °C (Dénaturation),
- 23 s à 56 °C (Hybridation des amorces),
- 1 min 30 s à 72 °C (Elongation),
- Extension finale de 10 min à 72 °C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

5.3.1. Contrôle qualité des amplifications PCR : le contrôle qualité des produits PCR se fait par électrophorèse sur QIAXCEL pour validation de la qualité et de la quantité de produit PCR (Une seule bande bien spécifique de taille identique à la taille attendue : environ 1460 pb pour le gène 16S).

5.3.2. Purification des produits PCR : afin d'être séquencés dans de bonnes conditions, les produits d'amplification doivent être débarrassés de tous les résidus de la réaction de PCR. Cette purification a été opérée par la méthode ExoSAP-IT® qui est la méthode de référence de nettoyage enzymatique des produits de PCR faisant appel à deux enzymes hydrolytiques : l'exonucléase I et la phosphatase alcaline de crevette (SAP : Shrimp Alkaline Phosphatase). Les enzymes ExoSAP-IT® permettent l'élimination en une seule étape des amorces et des dNTP non incorporés restants en fin de PCR.

5.3.3. Les réactions de séquence : le séquençage des produits de PCR a été effectué en utilisant le kit Big Dye V3.1 Dye Terminator Kit (Thermo Fisher Scientific). Cette PCR consiste à amplifier le forward et le reverse séparément pour les séquencer. Le séquençage a été effectué en utilisant un seul couple d'amorces (tableau 6). Le mélange réactionnel de la PCR a un volume total de 10 μL , contient 4 μL d'ADN extrait 1,5 μL de tampon du Kit Big Dye V3.1 (Thermo Fisher Scientific), 1 μL de Big Dye, 3 μL d'eau distillée et 0,5 μL d'amorce. La réaction de séquence comprend une étape de dénaturation initiale d'une

0 minute à 95 °C suivie de 25 cycles de dénaturation à 96 °C pendant 10 secondes, hybridation pendant 5 secondes à 50 °C et d'élongation à 60 °C pendant 3 minutes. Les réactions de séquence ont ensuite été purifiées avec le kit Big Dye X terminator (Thermo Fisher Scientific).

5.3.5. Le séquençage : les séquences sont analysées sur un Séquenceur 96 capillaires ABI-3730XL (Thermo Fisher Scientific). Le résultat est présenté sous forme d'un chromatogramme.

Les séquences des fragments obtenus par les deux amorces utilisées, sont des séquences qui se recouvrent en partie. À l'aide de ces parties communes entre les séquences lues, nous pouvons reconstituer la séquence consensus. Cette opération d'assemblage est réalisée par le logiciel CHROMAS Pro (Technelysium Ltd) pour créer le Contig Complet du gène ADNr 16S.

Les séquences sont comparées aux séquences homologues des banques de données nucléiques de séquence à travers le portail NCBI en utilisant le programme BlastN spécifique des séquences nucléiques non codantes au contraire de BlastX, qui lui est destiné à Blaster des ARNm.

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier et séquencer le gène ADNr 16S

	Amorces	Séquence (5'-3')	Tm °C
Amplification	16S-27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	55.9
	16S-1492R	GGTACCTTGTTACGACTT	57.7
Séquençage	16S-805R	GACTACCAGGGTATCTAATCC	55.6
	16S-52F	ATTAGATACCCTGGTAG	51.4

5.4. Alignement multiple des séquences et Analyse phylogénétique

Nous avons utilisé le programme MultAlin 5.4.1 (Corpet, 1988) disponible en ligne (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>) pour l'alignement multiple de ces 21 séquences d'ADNr16S. Cet alignement va nous permettre de ressortir des zones de forte similarité et/ou des zones de faible similarité. Celles-ci s'expliquent par des taux de

mutations (substitution ou insertion/ délétion) très élevées entre les séquences alignées. Au contraire, les zones de forte similarité retrouvées dans l'alignement multiple indiquent une forte conservation de nucléotides entre ces séquences.

Les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme Mega 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), selon la méthode des distances de Neighbor-joining. La matrice des distances est corrigée selon le modèle Kimura à deux paramètres (α pour les transitions et β pour les transversions) avant de procéder à la construction phylogénétique (Tamura *et al.*, 2011).

6. Détection moléculaire et séquençage du gène *mecA*

L'amplification du gène *mecA* est réalisée en utilisant les amorces décrites dans le tableau 7. Le mix de réaction PCR pour tous les échantillons est préparé comme expliqué dans la partie 5.3 (Page : 45). La PCR s'effectue dans un thermocycleur Biorad selon le programme suivant:

- Dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 min,
- 39 cycles comportant : 30 s de dénaturation à 95 °C, 30 s d'hybridation à 53 °C, 3 min d'élongation à 72 °C,
- Une élongation finale à 72 °C pendant 10 min permettant de terminer la synthèse des brins inachevés.

Le reste des étapes est réalisé par les mêmes étapes que celles d'ADNr 16S.

Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier et séquencer le gène *mecA*.

	Amorces	Séquences (5'–3')	T _m °C
Amplification	<i>mecA</i> -F3-36	AGTTGTAGTTGTCGGGTTTGG	55.6
	<i>mecA</i> -R6-2269	CGGAGAAGAAGTTGTAGCAGGA	51.4
Séquençage	<i>mecA</i> -R4-1073	TCACCTGTTTGAGGGTGGAT	60.6
	<i>mecA</i> -F5-886	GGCTATCGTGCACAATCGTT	63.9
	<i>mecA</i> -F6-1555	TCAGGTTACGGACAAGGTGA	60.1
	<i>mecA</i> -R3-489	GGCCAATTCCACATTGTTTC	61.0
	<i>mecA</i> -F4-399	TCCAGGAATGCAGAAAGACC	59.3
	<i>mecA</i> -R5-1574	TCACCTTGTCGTAACCTGA	62.9

7. Analyse bioinformatiques

Les analyses bioinformatiques ont concerné les séquences nucléiques des gènes ADNr16S et *mecA*.

Pour le cas des séquences ADNr 16S, un BlastN a été réalisé pour confirmer la place systématique des 21 isolats par estimation de leurs homologues avec les séquences de la base de données GenBank, puis la prédiction de la structure 2D de ce gène, avec une estimation de son énergie libre (ΔG°), a été réalisée en utilisant le programme bioinformatique MFOLD disponible en ligne (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

Les séquences géniques du *mecA* ont été alignées avec le programme BlastX pour vérifier leurs homologues avec les séquences de GenBank. Une deuxième étape a concerné la traduction de ces gènes en séquences protéiques en utilisant l'outil « Translate » sur le portail ExPASy (<https://web.expasy.org/translate>), lesquelles ont fait l'objet d'une

estimation des structures 2D et 3D. Les séquences protéiques obtenues ont été ensuite alignées (alignement multiple) en utilisant le programme MultAlin 5.4.1 (Corpet, 1988).

7.1. Prédiction de la structure secondaire du gène ADNr 16S

L'approche expérimentale (*In silico*) pour la modélisation bioinformatique de la structure 2D du gène ADNr 16S s'est basée sur les étapes suivantes :

- i. Acquisition de la structure primaire du gène : Les différentes séquences (structures primaires) ont été obtenues après amplification des gènes concernés par le séquençage. Celui-ci ayant été réalisé à Biofidal (Laboratoire de biologie moléculaire, Lyon - France).
- ii. Confirmation de l'homologie des séquences : l'homologie ayant été déterminée par Blasting des séquences sur le portail NCBI. Le programme BLASTN pour le gène ADNr 16S a été utilisé pour cette fin. Les valeurs de scores et des E-values (égales à zéro ou très proches de zéro) confirment l'homologie de nos séquences avec celles de la base de données. On peut considérer que le seuil de 20-25% (Twilight Zone) est un minimum pour distinguer une homologie d'une ressemblance fortuite.
- iii. Programmation dynamique et prédiction de la structure 2D des gènes : Contrairement à l'algorithme combinatoire de Pipas et McMahon (1975) qui calcule toutes les tiges et boucles possibles entrant dans une quelconque structure 2D (2^n possibilités si n = taille du gène) puis détermine l'énergie minimale ΔG° de repliement de la structure 2D correspondante, nous avons utilisé l'algorithme de Zuker (1981) de même principe que celui de Nussinov (1978). L'algorithme se base sur la programmation dynamique (algorithme non combinatoire mais récursif) et prédit en des temps très courts (Van Knippenberg et Hilbers, 1986) la structure secondaire du gène avec une énergie de repliement ΔG° minimale. Cet algorithme évalue la contribution des paires de bases prises individuellement (AU, GC : paires canoniques ou Watson et Crick et GU : paire non canonique ou Wobble) dans la structure 2D de la chaîne polynucléotidique du gène. Une seule différence entre Zuker et Nussinov réside dans le fait que Zuker considère que l'énergie d'une paire de base est calculée en fonction de la paire de base précédente (Stacking). Le programme bioinformatique utilisé pour prédire la structure 2D du gène est le MFOLD ver 3.6. Ce programme étant

opérationnel depuis sa mise sur site Internet en 1995 à l'école de médecine de l'Université Washington.

7.2. Prédiction des structures 2D de la PLP2a

La structure 2D a été déterminée à partir des structures primaires des séquences PLP2a. Cette modélisation 2D a pour objectif principal de déterminer :

- i. les zones de la PLP2a ayant une structure hélicoïdale alpha (α -helix),
- ii. les zones ayant une structure en feuillet bêta (β -Sheets),
- iii. les zones sans structures alpha ni bêta : zones coudes ou boucles (Turns).

Cette structure 2D est en fait le résultat de la libre rotation des deux angles Phi (Φ : C_{α} -NH) et PSI (Ψ : C_{α} -CO) ; l'angle oméga (ω : C_i - N_{i+1}) étant fixe pour toutes les structures secondaires. De manière générale, les angles dièdres Phi et Psi adoptent des valeurs déterminées spécifiques de chacune des deux conformations (alpha et bêta) : pour l'hélice alpha $\Phi = -57^\circ$ et $\Psi = -47^\circ$; pour le feuillet bêta l'angle $\Phi = -139^\circ$ et l'angle $\Psi = +135^\circ$.

La prédiction des structures 2D des séquences PLP2a a été réalisée à l'aide du programme bioinformatique GOR IV (GOR : Garnier-Osguthorpe-Robson) disponible sur le serveur du Pôle BioInformatique Lyonnais (PBIL, Lyon, France). Ce programme informatique prend en considération les trois états de la structure secondaire, à savoir l'hélice α , le feuillet β et les coudes et renvoie un résultat Q3 de 65%.

Le programme GOR VI a pour principe la propension de tout acide aminé, au sein d'une séquence de taille égale à huit résidus amino-acides, à être présent dans une structure secondaire donnée (l'hélice α , le feuillet β et les coudes) (Kouza *et al.*, 2017). Les conventions de représentation des structures 2D de base pour le programme GOR VI sont :

- i. h: helix = hélice α .
- ii. e: extended strand = feuillet β .
- iii. c: coil = coude (ou boucle).

7.3. Modélisation des structures tridimensionnelles des PLP2a

Une voie permettant la compréhension de la fonction biologique et des propriétés d'une protéine passe par l'étude de sa structure 3D. La structure de la PLP2a de *S. aureus* a déjà été déterminée expérimentalement par RMN ou par cristallographie aux rayons-X, cette structure 3D est étroitement dépendante de sa séquence en acides aminés et des modifications même minimales de cette séquence ont des répercussions profondes sur la structure 3D de la PLP2a et même sur sa fonction biologique (résistance à la méticilline).

Dans cette étude, notre objectif, de prédire la structure 3D de la PLP2a, est de pouvoir arriver à aligner les structures 3D des différents isolats pour mettre en évidence (si c'est le cas) les mutations qui seraient dues à l'environnement car nos isolats bactériens ont été récoltés de divers horizons cliniques.

7.3.1. Modélisation comparative des structures 3D de la PLP2a : dans un premier temps, une confrontation de nos séquences protéiques cibles (dont on veut modéliser leurs structures) en utilisant le programme BlastP contre la banque PDB a été réalisée, pour déterminer les « templates ou patrons » (protéines dont les structures ont été résolues expérimentalement) utilisés pour générer les modèles de structure 3D de nos protéines.

Nous avons retenu les structures qui ont un très bon pourcentage d'identité avec nos protéines cibles (97-99%) (tableau 8). Selon la qualité de ces structures, nous avons choisi une seule structure pour générer un ensemble de modèles (05) pour chaque cible en utilisant la structure 3D de cette protéine comme patron.

Tableau 8 : Pourcentage d'identité entre nos séquences protéiques cibles de la PLP2a et les templates. Le pourcentage des résidus alignés est donné entre parenthèses.

	1VQQ	1MWS	3ZG5	4BL2	4CPK	4BL3	1MWR
LISC8	99.69% (100%)	99.54% (100%)	99.84% (99%)	99.69% (99%)	99.53% (99%)	99.22% (99%)	97.36% (99%)
PMC1	99.67% (100%)	99.51% (100%)	99.51% (100%)	99.51% (100%)	99.34% (100%)	99.18% (100%)	97.19% (99%)
LISC1	100% (100%)	99.84% (100%)	99.84% (100%)	99.67% (100%)	99.51% (100%)	99.18% (100%)	99.52% (99%)

Deux types de méthodes sont appliqués pour la prédiction de la structure tertiaire des protéines : la modélisation comparative (par homologie et threading) et les méthodes *ab initio*.

La méthode de modélisation utilisée dans notre étude est la modélisation comparative par homologie compte tenu du pourcentage d'identité très élevé (99%) entre les cibles et le patron (dans notre cas, on a choisi la structure avec le code PDB : 1VQQ).

La modélisation comparative est fondée sur le fait que deux protéines qui partagent une identité de séquence élevée (plus de 30%) adoptent un même repliement (Rost, 1999; Baker et Sali, 2001). Son principe consiste à aligner la séquence d'une protéine donnée dont la structure est inconnue (cible) avec la séquence d'une ou de plusieurs protéines ayant une structure expérimentale (RMN ou Rayons-X) (patrons ou références) (Sali & Blundell, 1993).

Nous avons généré la structure de nos protéines cibles par la méthode de modélisation par homologie en utilisant le programme "MODELLER" (Sali et Blundell, 1993). Ce programme a besoin d'un alignement de séquences entre la séquence de la protéine à modéliser (la cible) et la séquence d'une protéine similaire dont la structure est connue (le patron, dans notre cas : 1VQQ). Par la suite, des modèles de structures de la cible sont générés par satisfaction des contraintes spatiales.

7.3.2. Création des modèles : la création des modèles par le programme MODELLER 9.21 va concerner les protéines des isolats LISC8 et PMC1 car la protéine de l'isolat LISC1 est à 100% d'identité de séquence avec le patron (code pdb : 1VQQ). Cinq modèles pour chaque isolat ont été modélisés par MODELLER et le modèle ayant la meilleure fonction de score objective a été choisi.

Les étapes de modélisation individuelles de ces protéines sont:

- i. Conversion du format de la séquence : il est nécessaire de convertir la séquence LISC8 cible du format FASTA vers le format PIR lisible par MODELLER (fichier "LISC8.ali"). MODELLER utilise le format PIR pour lire et écrire des séquences et des alignements.
- ii. Alignement de la cible avec le template : cette étape consiste à aligner la séquence cible (LISC8) avec la séquence du patron (code PDB : 1VQQ). Le script MODELLER aligne la séquence LISC8 du fichier "LISC8.ali" avec la structure du patron 1VQQ du fichier PDB 1VQQ.pdb (fichier "align2d.py").

iii. Construction des modèles : une fois l'alignement cible-modèle construit, MODELLER calcule automatiquement un modèle 3D de la cible, à l'aide de sa classe de modèle automatique. Ce programme générera cinq modèles similaires de LISC8 basés sur la structure du patron ayant le code PDB : 1VQQ et l'alignement dans le fichier LISC8-1VQQ.ali (fichier "model-single.py").

A la fin, un dossier contient trois fichiers de commande a été construit : fichier "LISC8.ali", fichier "align2d.py" et fichier "model-single.py". La construction de ces fichiers avec la structure du patron (1VQQ) sous format PDB est essentielle pour lancer le programme MODELLER (les scripts utilisés pour la modélisation sont donnés dans l'annexe D).

Les mêmes étapes ont été réalisées pour modéliser la structure de la deuxième protéine cible de l'isolat PMC1.

7.3.3. Visualisation des structures : le logiciel PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>; DeLano, 2002) a été utilisé pour visualiser toutes les structures 3D des protéines étudiées.

Chapitre III : Résultats

Dans cette étude, les souches de *S. aureus* ont été obtenues principalement à partir des échantillons de pus avec une fréquence de 81,54% suivis des échantillons d'urine et de sperme avec des fréquences de 12,31% et 6,15% respectivement.

1. Identification des isolats bactériens

1.1. Méthodes bactériologiques et biochimiques classiques

Un total de 65 souches de *S. aureus* ont été isolés à partir de différents prélèvements bactériologiques à visée diagnostique des infections communautaires et nosocomiales de la ville de Constantine. La purification a été basée sur les caractères culturels et les caractères morphologiques. Tout isolat pur donnant des cocci Gram positif a été retenu pour une éventuelle identification biochimique par la galerie API Staph.

1.1.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats bactériens : les isolats bactériens cultivés sur la gélose Chapman ont montré après 24 heures d'incubation à 37°C, des colonies jaunes orangés bombées de 1 à 2 µm de diamètre avec acidification du milieu Chapman.

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a montré la présence des cocci à Gram positif regroupés en diplocoque et en grappes de raisin.

Ces résultats préliminaires nous permettent de suspecter leur appartenance au genre *Staphylococcus*.

1.1.2. Identification biochimique

1.1.2.1. Les tests catalase, coagulase et DNase : les 65 souches ont été assignées à l'espèce *S. aureus* par la mise en évidence de la catalase qui les différencie des Streptocoques et la coagulase libre ainsi que la DNase qui les distinguent des Staphylocoques à coagulase négative.

1.1.2.2. Biotypage des souches de *S. aureus* selon les profils numériques en API Staph : les galeries API Staph miniaturisées reposant sur des tests enzymatiques (zymogramme) et des tests d'acidification ou d'utilisation des sucres (auxanogramme). L'identification par ces galeries a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de *S. aureus* ce qui a permis leur assignation à l'espèce *S. aureus*. Cette

identification a révélé une prédominance de cette espèce par rapport aux staphylocoques à coagulase négative.

1.2. Identification par MALDI-TOF MS

Les 65 isolats bactériens ont été soumis à une analyse de cellule entière de type MALDI-TOF MS. Le "score", basé sur les masses identifiées et la corrélation de leurs intensités, est généré et utilisé pour classer les résultats. Tous les isolats testés ont donné un profil protéique visible avec un score d'identification de 2,002 à 2,419 (Figure 21).

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E. coli (++) (A)	A1	Escherichia coli	2.079	Escherichia coli	2.002
E. coli (++) (A)	A2	Escherichia coli	2.002	Escherichia coli	1.937
E. coli (-) (C)	B1	not reliable identification	1.572	not reliable identification	1.413
E. coli (-) (C)	B2	not reliable identification	1.333	not reliable identification	1.333
Staph aureus (++) (A)	C1	Staphylococcus aureus	2.339	Staphylococcus aureus	2.271
Staph aureus (+) (B)	C2	Staphylococcus aureus	1.89	Staphylococcus aureus	1.702
Staph aureus (++) (A)	D1	Staphylococcus aureus	2.339	Staphylococcus aureus	2.278
Staph aureus (++) (A)	D2	Staphylococcus aureus	2.339	Staphylococcus aureus	2.289
Staph aureus (++) (A)	E1	Staphylococcus aureus	2.339	Staphylococcus aureus	2.284
Staph aureus (++) (A)	E2	Staphylococcus aureus	2.419	Staphylococcus aureus	2.372

Figure 21: Résultats de l'identification de quelques isolats par MALDI-TOF MS.

1.3. Identification génotypique (Amplification et séquençage de l'ADNr 16S)

Pour s'assurer de la fiabilité d'identification de nos isolats bactériens par MALDI-TOF MS, nous avons utilisé une méthode alternative basée sur le séquençage du gène qui code l'ARNr 16S (abusivement appelé ADNr 16S). Parmi les raisons du choix de cette dernière :

- Technique la plus utilisée pour l'identification des bactéries (Ward *et al.*, 1992 ; Chanama, 1999),
- Structure génique très conservée et longueur pouvant atteindre 1500 pb, l'ARNr 16S étant considéré comme étant le gène le plus apprécié pour l'identification des bactéries au niveau de l'espèce (Song *et al.*, 2003 ; Janda et Abbott, 2007),

- Les banques de données du gène 16S sont aujourd'hui très développées et très riches en séquences : jusqu'à 200 000 séquences sur la base de données EMBL (Barghoutti, 2011 ; Mizrahi-Man *et al.*, 2013).

Dans un premier temps, le gène ADNr 16S des 21 isolats bactériens a été amplifié par PCR. Les résultats de chaque amplification ont été observés par électrophorèse sur QIAXCEL. Les amplifiats d'ADN ont migré dans la région 1500 pb du QIAXCEL. Une bande d'amplification unique à 1500 pb a été obtenue pour tous les isolats (Figure 22).

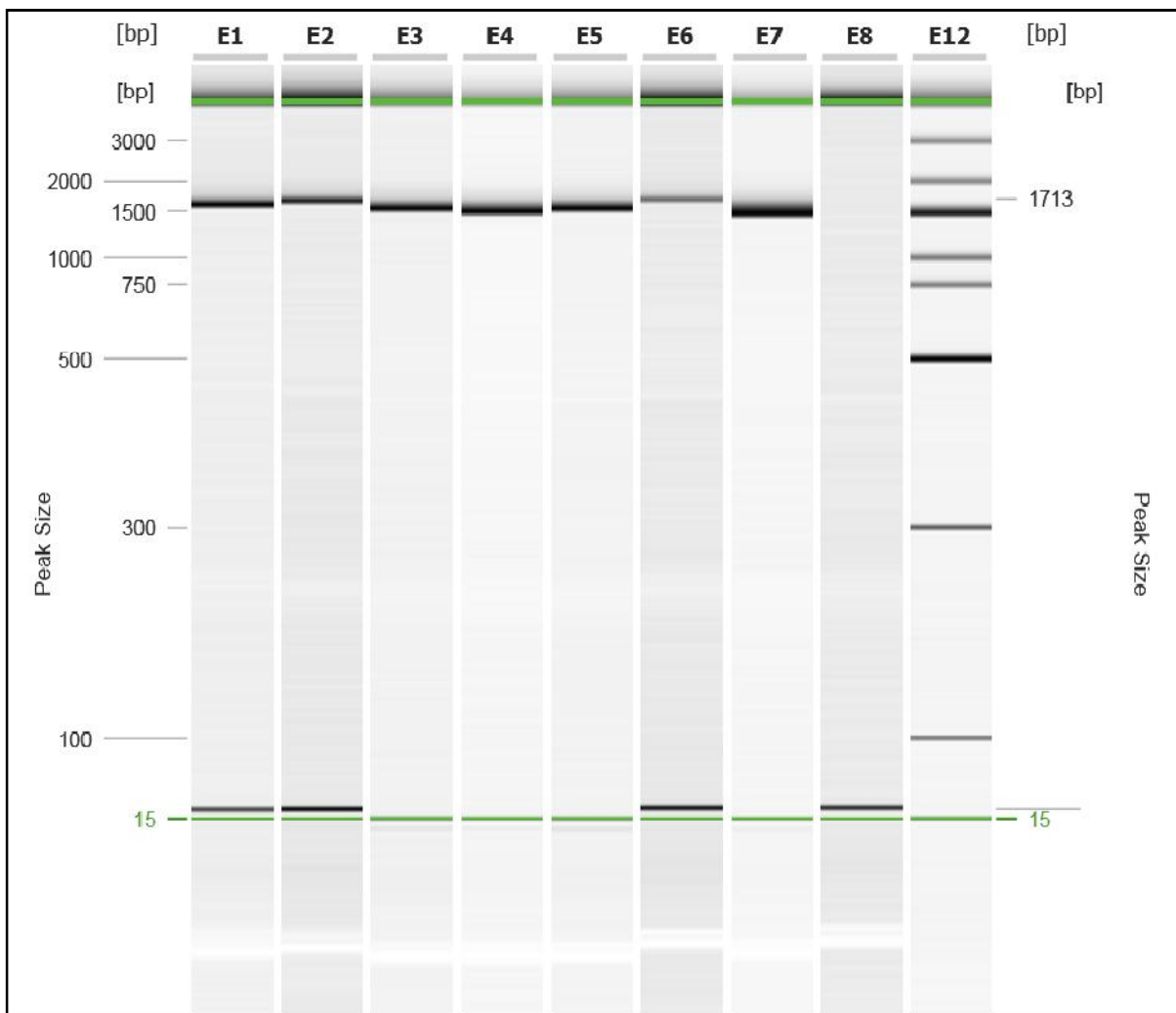


Figure 22: Produits d'amplification PCR du gène ADNr 16S de quelques isolats bactériens sur QIAXCEL.

Les résultats du séquençage des isolats peuvent être consultés en annexe B. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles de la base de données Nucleotide en utilisant l'outil bioinformatique BlastN et elles ont été enregistrées dans la banque Genbank sous les numéros d'accès mentionnés dans le tableau 9.

Les valeurs du bit score mesurent l'identité entre les deux séquences : celle de Nucleotide et la nôtre. Si la valeur de % identité, renvoyée par le programme BlastN, est supérieure ou égale à 97%, cela indique que notre souche est identique à celle de Nucleotide et nous pouvons alors proposer à notre souche le nom systématique proposé pour celle de Nucleotide. Les valeurs de E-value (ou Expect value) par contre, indiquent la probabilité de tomber sur une séquence autre que celle proposée par Nucleotide. Biologiquement, les bits scores significatifs doivent avoir des E-values très inférieures à 1,0 ; voire nulles. Le calcul de cette valeur est fonction de trois paramètres :

- le bit score (S) : les grandes valeurs de S correspondent à de très petites E-values,
- la longueur de la séquence à comparer avec Nucleotide : les valeurs de E-value peuvent augmenter dans le cas des longues séquences,
- la taille de la base de données Nucleotide: plus la taille de la banque (nombre de nucléotides) est importante, plus la valeur de E risque d'être élevée.

L'alignement multiple de ces séquences du gène ADNr 16S est présenté dans l'annexe C.

La diversité phylogénétique et la position taxonomique de ces isolats (Figure 23) ont été évaluées en utilisant le programme Mega 7.0.

Tableau 9 : Codes Genbank des séquences d'ADNr 16S pour les 21 isolats de *S. aureus*.

Isolat	Numéro d'accèsion sur GenBank
LISC1	MK523236
LISC2	MK523237
PMC1	MK523238
LPKC1	MK523239
LISC3	MK523240
PMC2	MK523241
LISC4	MK523242
PMC3	MK523243
LISC5	MK523244
LPKC2	MK523245
PMC4	MK523246
PMC5	MK523247
LISC6	MK523248
LISC7	MK523249
LISC8	MK523250
LPKC3	MK523251
PMC6	MK523252
LISC9	MK523253
PMC7	MK523254
LPKC4	MK523255
PMC8	MK523256

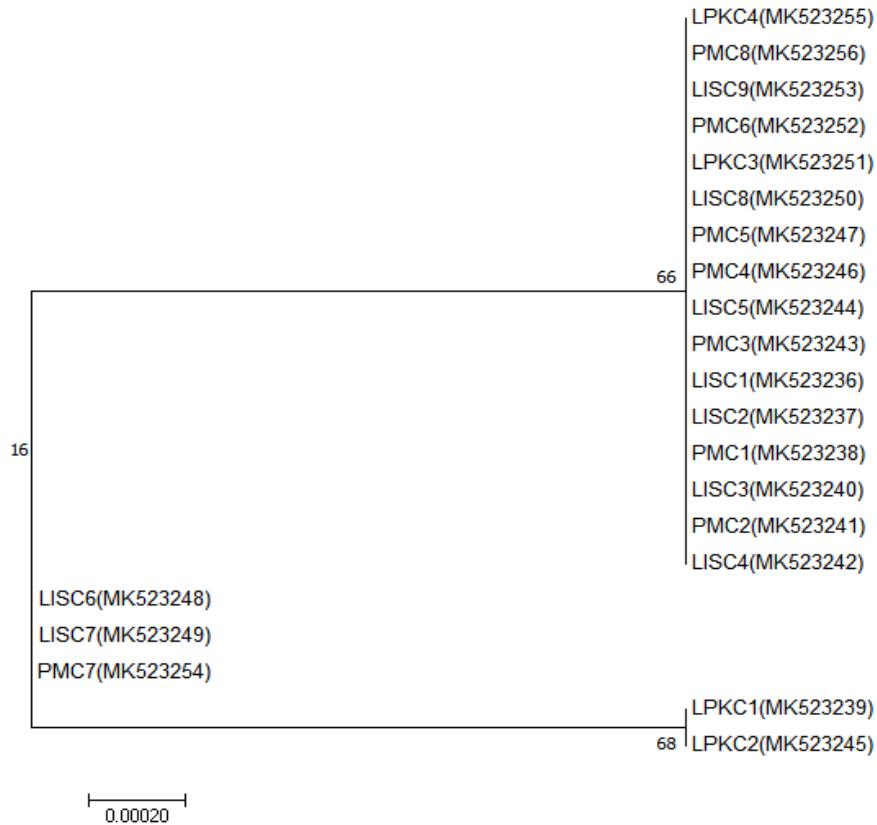


Figure 23 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode Neighbor-joining du gène 16S. Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les taux de Bootstrap (1000 répliqués), la barre 0,00020 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.

L'arbre phylogénétique montre que les souches sont très proches et étroitement liées, elles sont réparties en trois groupes.

2. Résistance de *S. aureus* aux antibiotiques

Les résultats d'antibiogramme en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé selon les recommandations décrites par le comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie (CA-SFM) illustrent le caractère multirésistant des souches de *S. aureus* présentant une résistance croisée aux β -lactamines qui s'étend à d'autres familles d'antibiotiques réduisant ainsi le choix des molécules thérapeutiques.

Une résistance plus élevée a été observée à la pénicilline G (70,77% des isolats), suivie de la céftriaxone (50,76%), de l'érythromycine (46,15%), de l'oxacilline et de la ciprofloxacine (24,61% chacun). Cependant, certains isolats étaient résistants aux glycopeptides (vancomycine 4,61% et teicoplanine 9,23 %). La classification des profils de

résistance aux antibiotiques du *S. aureus* en trois groupes : résistantes, de résistance intermédiaire et sensibles, est donnée dans le tableau 10. Comme montré le tableau 10, 23 isolats se sont avérés résistants phénotypiquement à la méticilline soit un taux de 35,38 %, tandis que les 42 restants étaient 37 (56,92 %) sensibles à la méticilline et cinq (7,69 %) ont une résistance intermédiaire. Le pourcentage de SARM était défini comme le nombre d'isolats de *S. aureus* résistants à la céfoxitine divisés par le nombre total d'isolats de *S. aureus*. La majorité des isolats de MRSA présentaient une résistance à la pénicilline G (86,95 % des isolats), à la céftriaxone (78,26 %), à l'oxacilline (65,21 %) et à l'érythromycine (56,52 %). Les isolats de SASM étaient également résistants à la pénicilline G (70,27 %), à l'érythromycine (45,64 %) et à la céftriaxone (40,54 %). Ils étaient très sensibles à la gentamicine (100 %), à l'oxacilline et à la vancomycine (97,3 % chacun).

Tableau 10: Résultats de la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques (n=65)

Antibiotiques	Nombre de souches résistantes (%)	Nombre de souches intermédiaire-résistance (%)	Nombre de souches sensibles (%)
Céfoxitine	23 (35,38 %)	5 (7,69 %)	37 (56,92 %)
Ceftriaxone	33 (50,76 %)	22 (33,84 %)	10 (15,38 %)
Ciprofloxacine	16 (24,61 %)	-	49 (75,38 %)
Clindamycine	6 (9,23 %)	-	59 (90,76 %)
Doxycycline	11 (16,92 %)	2 (3,07 %)	52 (80 %)
Erythromycine	30 (46,15 %)	-	35 (53,84 %)
Fosfomycine	5 (7,69 %)	-	60 (92,30 %)
Gentamicine	8 (12,30 %)	-	57 (87,69 %)
Linézolide	3 (4,61 %)	-	62 (95,38 %)
Oxacilline	16 (24,61 %)	-	49 (75,38 %)
Pénicilline G	46 (70,77 %)	-	19 (29,23 %)
Pristinamycine	3 (4,61 %)	-	62 (95,38 %)
Rifampicine	9 (13,84 %)	4 (6,15 %)	52 (80 %)
Teicoplanine	6 (9,23 %)	-	59 (90,76 %)
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	9 (13,84 %)	1 (1,53 %)	55 (84,61 %)
Vancomycine	3 (4,61 %)	-	62 (95,38 %)

3. RT-PCR

L'utilisation de la RT-PCR au niveau de l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes, située au niveau de la faculté de pharmacie et de médecine à Marseille, France, pour l'identification moléculaire et la détection du gène *mecA*, ont permis de détecter 21 parmi 65 isolats de *S. aureus* *mecA* positif, soit un pourcentage de SARM 32,31 % comme montrée la figure 24.

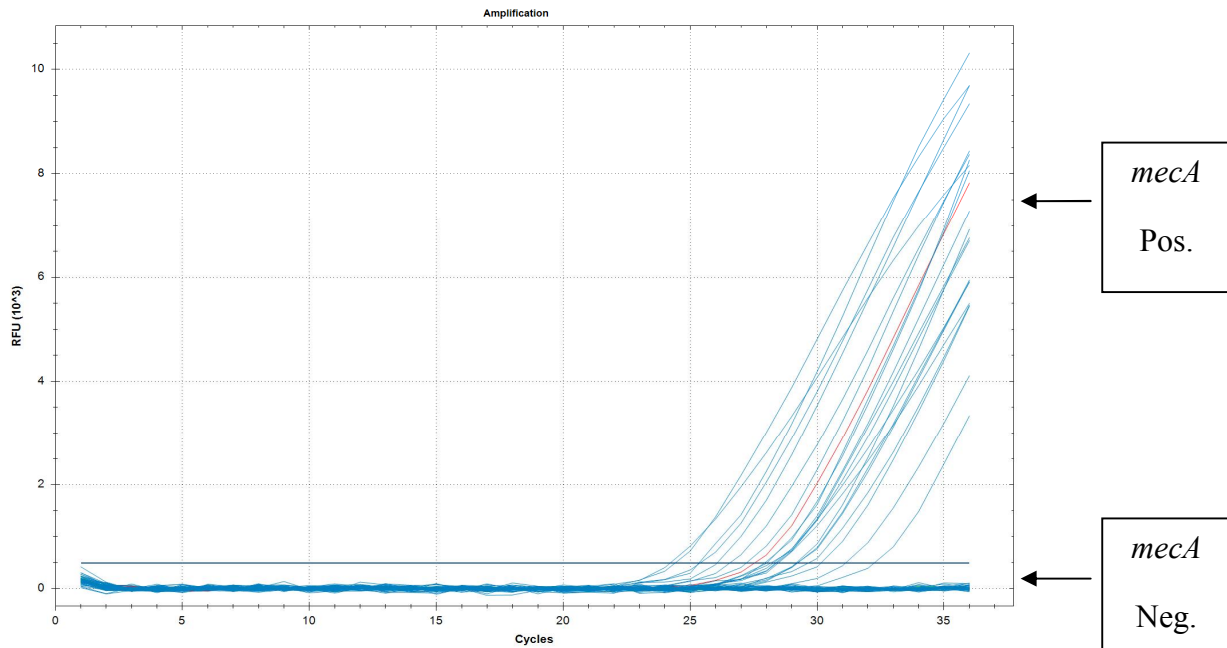


Figure 24 : Résultats représentatifs obtenus par RT-PCR pour la détection du gène *mecA*.

Les courbes d'amplicon, représentant l'amplification positive et le contrôle négatif (ligne plate). Pos: amplification positive, nég: amplification négative.

La comparaison entre les résultats de la méticillino-résistance chez *S. aureus* obtenus à partir de la détection phénotypique par l'antibiogramme et la détection génotypique par RT-PCR ont montrées dans le tableau 11. Selon les résultats obtenus par RT-PCR, 20 parmi 23 isolats, qui avérés résistants à la méticilline par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et un parmi 37 isolats sensibles à la méticilline portent le gène *mecA*. Par contre, aucune détection du gène *mecA* par les cinq isolats qui présentent une résistance intermédiaire à la méticilline.

Tableau 11: Comparaison des résultats de la méticillino-résistance de *S. aureus* (MRSA) obtenus par la méthode de la RT-PCR et la méthode de diffusion en milieu gélosé (n=65).

Méthodes	SARM		
	Résistante (%)	Intermediare resistance (%)	Sensible (%)
Antibiogramme	23 (35,38 %)	5 (7,69 %)	37 (56,92 %)
RT-PCR	20 (95,23 %)	-	1 (4,76 %)

4. Identification moléculaire du gène *mecA*

Le gène *mecA*, des 21 isolats *mecA*⁺, a été amplifié par PCR. Les résultats de chaque amplification ont été observés par électrophorèse sur QIAXCEL. Les amplifiats d'ADN ont migré dans la région 2000 pb du QIAXCEL. Une bande d'amplification unique à 2000 pb a été obtenue pour tous les isolats (Figure 25).

Les résultats de séquençage des 21 isolats peuvent être consultés en annexe B. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles de la base de données Nucleotide en utilisant l'outil bioinformatique BlastN. Une bonne identification est conséquente d'un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 97% entre isolat et celle de Nucleotide (Stackebrandt et Goebel, 1994).

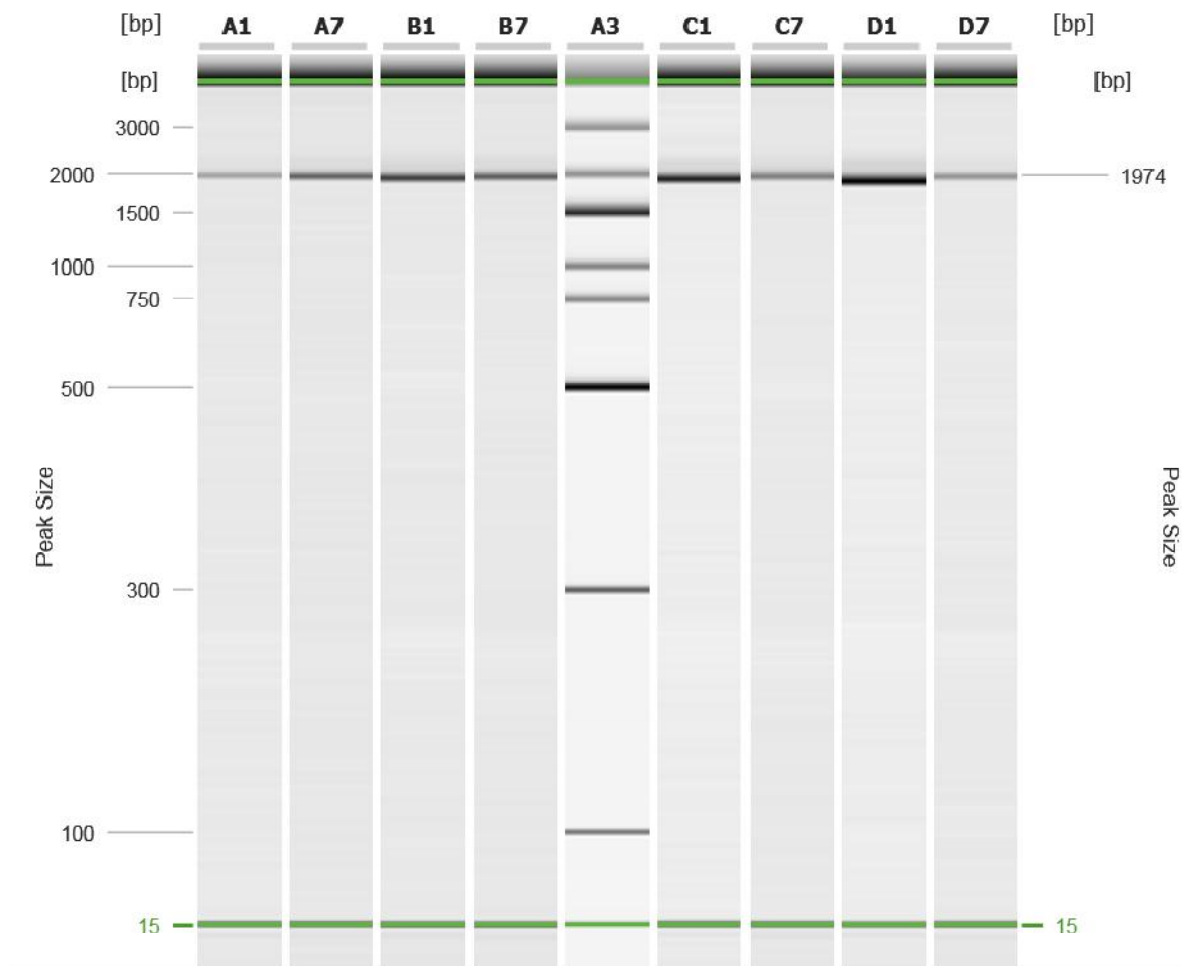


Figure 25 : Produits d'amplification PCR du gène *mecA* de quelques isolats bactériens, sur QIAXCEL.

L'alignement multiple des séquences du gène *mecA* est présenté dans l'annexe C. La diversité phylogénétique du gène *mecA* de ses isolats (Figure 26) a été évaluée en utilisant le programme Mega 7.0

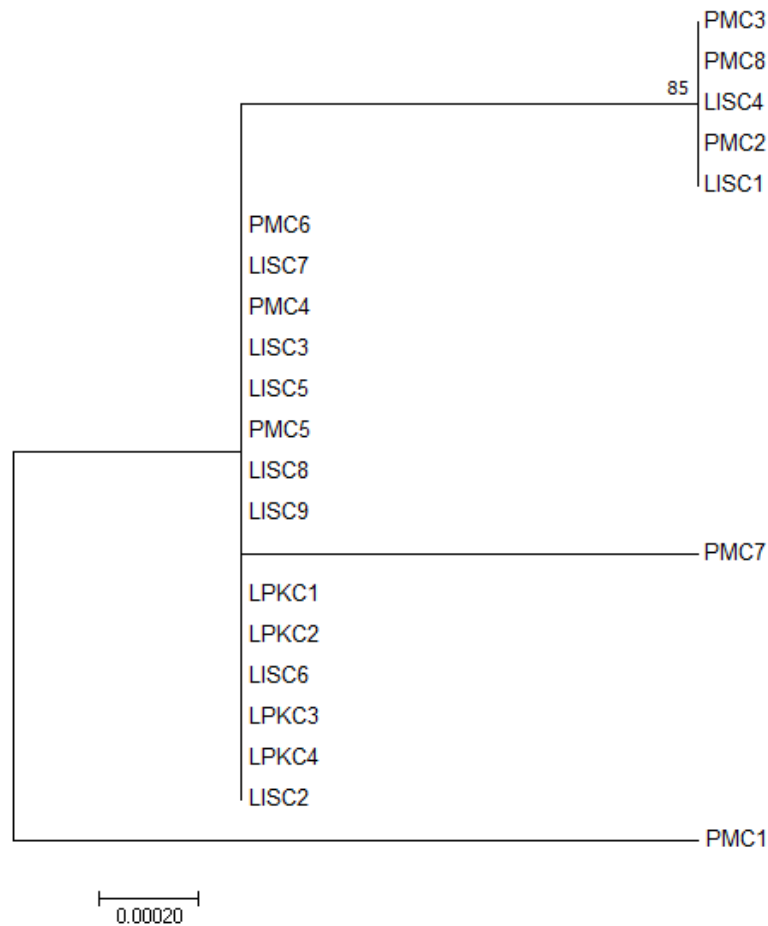


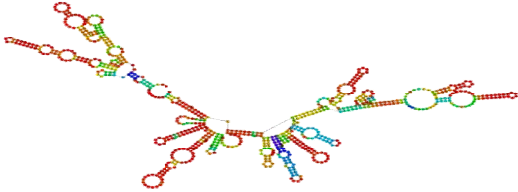
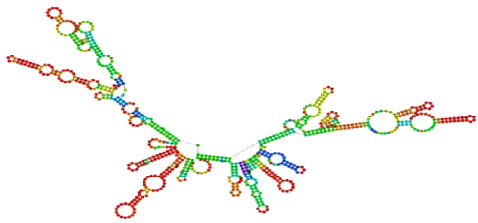
Figure 26 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode Neighbor-joining du gène *mecA*


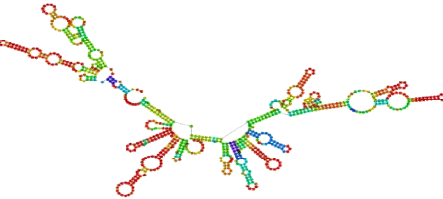
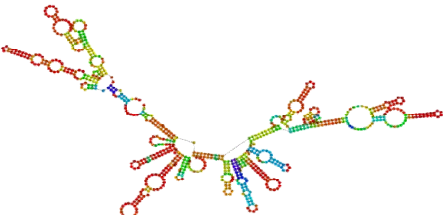
Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les taux de Bootstrap (1000 réplicats), la barre 0,00020 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.

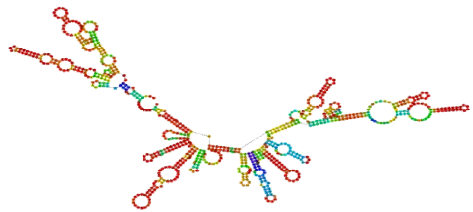
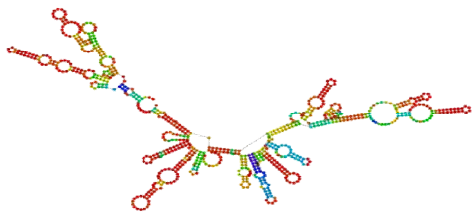
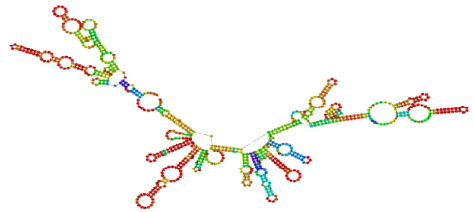
5. Analyses bioinformatiques

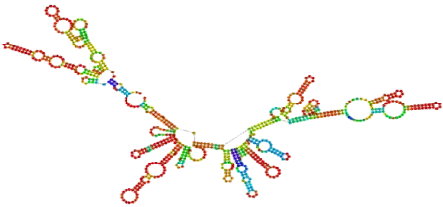
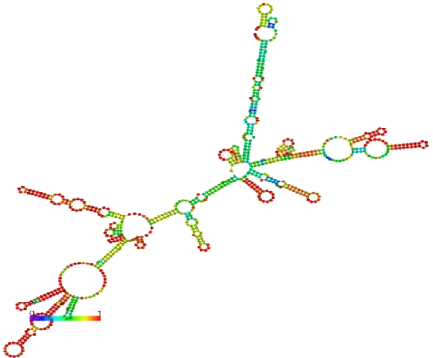
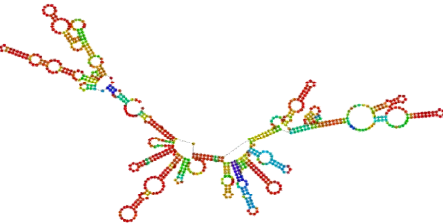
Les résultats de la prédiction des structures 2D des séquences d'ADNr 16S ainsi que les résultats de traduction des séquences génomiques du gène *mecA* en séquences protéiques de PLP2a sont présentés dans les tableaux 12 et 13.

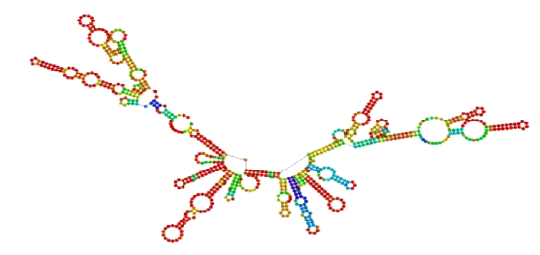
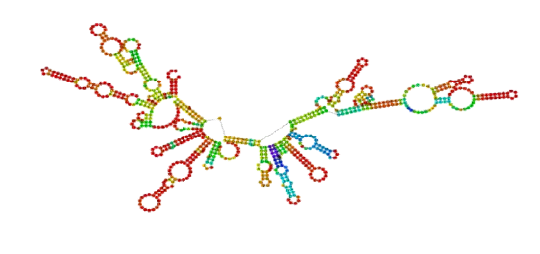
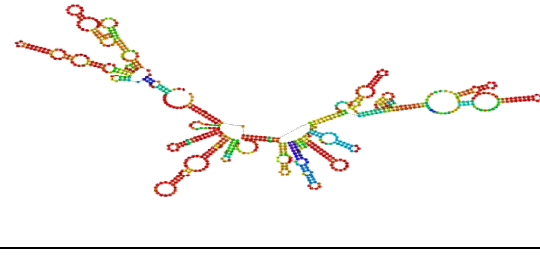
Tableau 12 : Structures 2D des ADNr 16S séquencés des 21 isolats de *S. aureus* et leurs énergies libres ΔG°

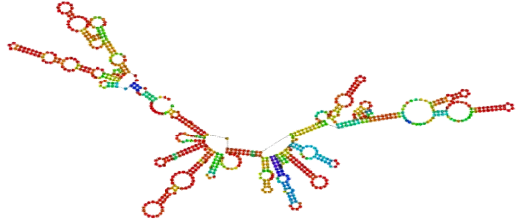
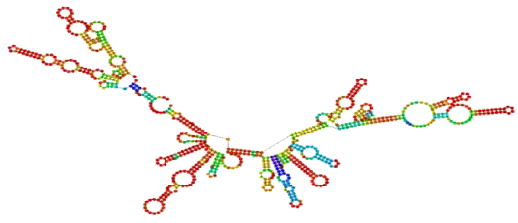
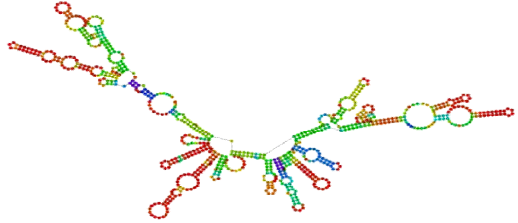
Isolat	Structure secondaire	Taille (pb)	ΔG° kcal/mol
LISC1		746	-218.34
LISC2		747	-219.21

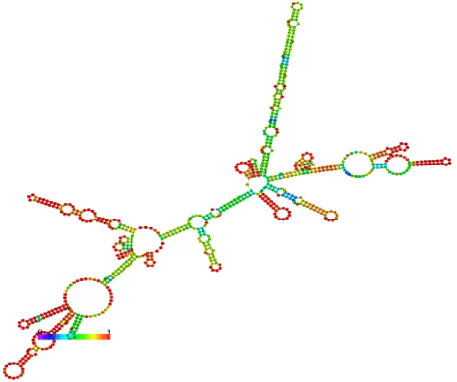

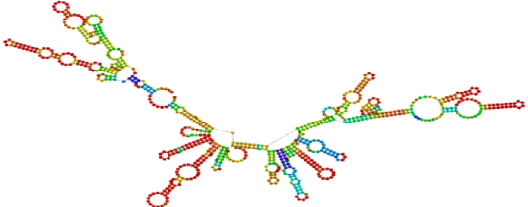
<p>PMC1</p>		<p>745</p>	<p>-218.34</p>
<p>LPKC1</p>		<p>744</p>	<p>-218.16</p>
<p>LISC3</p>		<p>746</p>	<p>-218.50</p>

<p>PMC2</p>		<p>745</p>	<p>-218.34</p>
<p>LISC4</p>		<p>745</p>	<p>-218.34</p>
<p>PMC3</p>		<p>749</p>	<p>-218.59</p>

LISC5	 A network graph with a central white node and several branches of colored nodes (red, green, blue, yellow) connected by edges. The graph is roughly V-shaped.	746	-218.50
LPKC2	 A network graph with a central white node and several branches of colored nodes (red, green, blue, yellow) connected by edges. The graph is more irregular and spread out than LISC5.	753	-220.01
PMC4	 A network graph with a central white node and several branches of colored nodes (red, green, blue, yellow) connected by edges. The graph is roughly V-shaped, similar to LISC5.	745	-218.34

PMC5	 A network graph visualization showing a central hub of nodes connected to several peripheral clusters. The nodes are colored in a repeating sequence of red, green, blue, and yellow. The connections are represented by thin lines.	744	-218.17
LISC6	 A network graph visualization similar to PMC5, showing a central hub and peripheral clusters. The nodes are colored in a repeating sequence of red, green, blue, and yellow. The connections are represented by thin lines.	752	-221.52
LISC7	 A network graph visualization similar to PMC5, showing a central hub and peripheral clusters. The nodes are colored in a repeating sequence of red, green, blue, and yellow. The connections are represented by thin lines.	744	-219.25

LISC8	 A complex molecular structure of LISC8, showing a central white region with multiple colored branches (red, green, blue, yellow) extending outwards.	744	-218.17
LPKC3	 A complex molecular structure of LPKC3, showing a central white region with multiple colored branches (red, green, blue, yellow) extending outwards.	745	-218.34
PMC6	 A complex molecular structure of PMC6, showing a central white region with multiple colored branches (red, green, blue, yellow) extending outwards.	753	-219.07

LISC9	 <p>A network graph visualization for LISC9. The graph consists of numerous nodes (small circles) and edges (lines). The nodes are colored in a spectrum from red to green. The graph is highly branched and complex, with a central hub-like structure and many peripheral nodes.</p>	748	-219.29
PMC7	 <p>A network graph visualization for PMC7. The graph consists of numerous nodes (small circles) and edges (lines). The nodes are colored in a spectrum from red to green. The graph is highly branched and complex, with a central hub-like structure and many peripheral nodes.</p>	746	-220.03
LPKC4	 <p>A network graph visualization for LPKC4. The graph consists of numerous nodes (small circles) and edges (lines). The nodes are colored in a spectrum from red to green. The graph is highly branched and complex, with a central hub-like structure and many peripheral nodes.</p>	748	-218.54

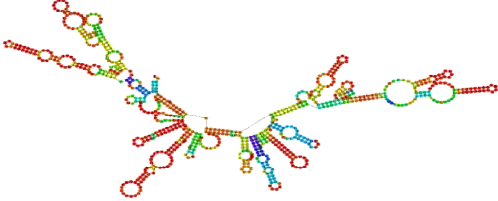
PMC8		748	-218.78
------	--	-----	---------

Tableau 13: Résultats des séquences protéiques de la PLP2a contre BlastP.

Echantillon	Séquences	Nombre AA	Nom du BLASTP	Score	% identité	E-value
LISC1	MTERPIKIYNSLGVKDINIQDRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHDSVIIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSGETAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSFGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVNKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
LISC2	MTERPIKIYNSLGVKDINIQDRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHDSVIIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSGETAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSFGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVNKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
PMC1	MTERPIKIYNSLGVKDINIQDRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHDSVIIPGMQKDQSIHIEKLSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQQMDQKWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSGETAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0

	GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKCLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVYDELYENGNKKYDIDE					
LPKC1	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHDSVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSHTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKCLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
LISC3	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHDSVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSHTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKCLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
PMC2	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHDSVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0

	KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSQTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNK VWKKNISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNAKISGKVYDELYENGNKKYDIDE					
LISC4	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHSDVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLLTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSQTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNK VWKKNISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNAKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
PMC3	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHSDVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLLTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSQTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNK VWKKNISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNAKISGKVYDEL YENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
LISC5	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHSDVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLLTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus</i>	1228	100	0

	GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSQTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSFGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLKDTKNKVVWKNISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVVYDELYENGNKKYDIDE		<i>aureus)</i>			
LPKC2	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHSDVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWVQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSQTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSFGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLKDTKNKVVWKNISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
PMC4	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHSDVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWVQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSQTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSFGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLKDTKNKVVWKNISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
PMC5	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHSDVIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSESIEDYIKQMDQNWVQDDTFVPLKTVK	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i>	1228	100	0

	KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSGETAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSFGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKKLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNAKISGKVYDELYENGNKKYDIDE		(<i>Staphylococcus aureus</i>)			
LISC6	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLWDHSHVPIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSISEDIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSGETAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSFGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKKLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNAKISGKVYDELYENGNKKYDIDE		Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)			
LISC7	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLWDHSHVPIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSISEDIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSGETAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTSFGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFFARVALELGSK KFEKGMKKLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNAKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
	MLTKDKEINNTIDAIEDKNFKQVYKDSSYISKSDNGEVEMTERPIKIYNSLGV KDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQFNFVKEDGMWKL	646	Penicillin binding protein <i>mecA</i>	1228	99.69	0

LISC8	WDHSV IIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTGTAYEIGIVPKNVSKKDYKAI AKELSISEDYIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVKKMDEYLSDFAKK FHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYKGYKDDAVIGKKG LEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDKGKDIQLTIDAKVQK SIYNNMKNDYGS GTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMYGMSNEEYNKLTED KKEPLL NK FQIT TSPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYKIDGKGWQKDKSW GGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSKKFEKGMKKLG VGE DIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQILSIYSALENNGNIN APHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTHKEDIYRSYANLIGK SGTAE LKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVKDVQDKGMASYN A KISGKVYDELYENGNKKYDIDE		(<i>Staphylococcus aureus</i>)			
LPKC3	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDWHSV IIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAI AKELSISEDYIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKK FHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDKG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGS GTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLL NK FQIT TSPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSK KFEKGMKKLG VGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAE LKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYN AKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
PMC6	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDWHSV IIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAI AKELSISEDYIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKK FHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDKG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGS GTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLL NK FQIT TSPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSK KFEKGMKKLG VGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINLLTDGMQQVVKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAE LKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYN AKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0

LISC9	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLWDHSDVPIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSISEDIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYSGGTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGINVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVVKKNIISKENINLLTDGMQQVVNKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>)	1228	100	0
PMC7	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLWDHSDVPIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIKELSISEDIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYSGGTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGINVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSK KFEKGMKLLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVVKKNIISKENINLLTDGMQQVVNKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>)	1228	100	0

LPKC4	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHSDVIIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIAKELSISEDIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSQTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSK KFEKGMKKLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVVKKNIISKENINLLTDGMQQVVNKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0
PMC8	MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQF NFVKEDGMWKLDDHSDVIIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILDRNNVELANTG TAYEIGIVPKNVSKKDYKAIAKELSISEDIKQMDQNWWQDDTFVPLKTVK KMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYK GYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDG KDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYGSQTAIHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMY GMSNEEYNKLTEDKKEPLLNFQITTPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYK IDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAISSDNIFARVALELGSK KFEKGMKKLGVGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQI LSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVVKKNIISKENINLLTDGMQQVVNKTH KEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVK DVQDKGMASYNKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	607	Penicillin binding protein <i>mecA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1228	100	0

5.1. Alignement multiple des séquences protéiques de la PLP2a

Le résultat de l'alignement multiple des séquences protéiques de la PLP2a de 21 isolats a montré que les séquences sont identiques par rapport à leurs structures primaires et par rapport à leurs longueurs (607 aa). Sauf, pour les protéines des isolats :

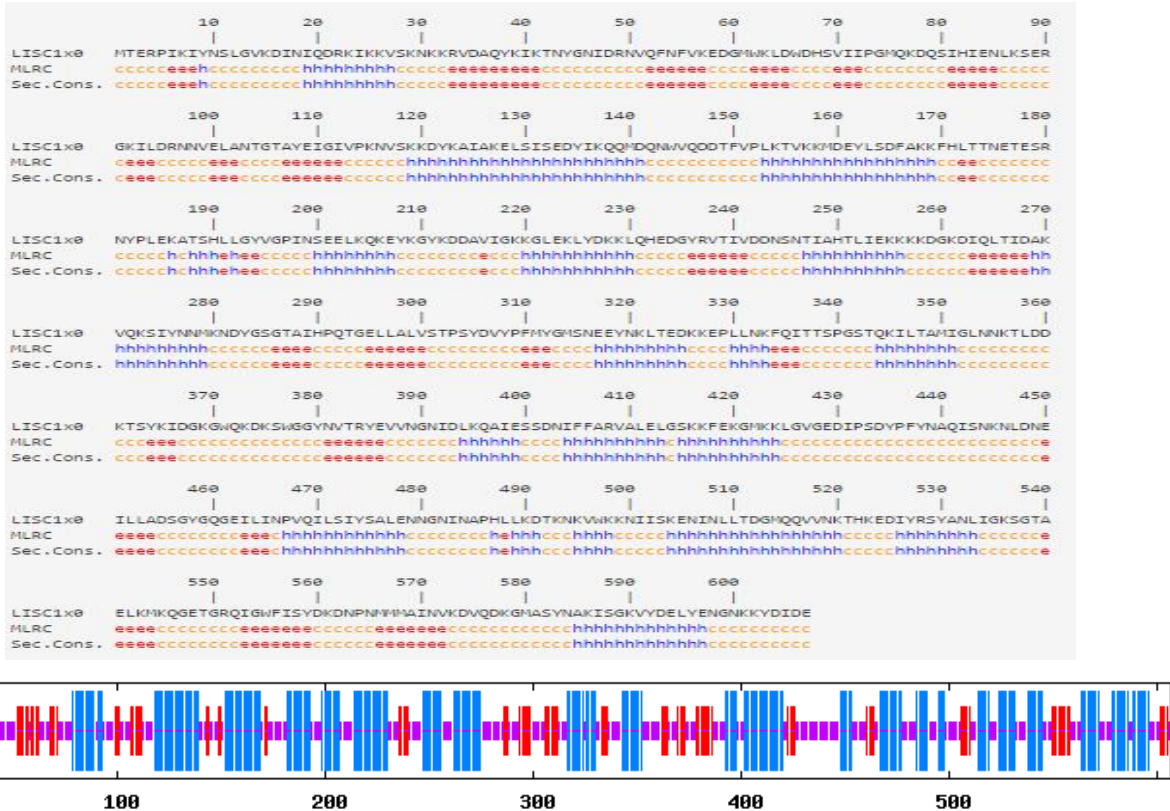
- LISC8 : la taille de cette séquence est supérieure à la taille des autres, elle contient 39 aa supplémentaire au début de la séquence (le séquençage du gène complet).
- PMC1: deux mutations ont été observées dans les positions 124 et 182, ces mutations sont de type substitution où l'acide aminé Asparagine "N" est substitué par l'acide aminé Lysine "K".

A partir de ces résultats de l'alignement, on peut dire qu'on a trois séquences protéiques différentes de la PLP2a. Celle de l'isolat LISC8, celle de l'isolat PMC1 et celle de l'isolat LISC1 (qui représente les 19 séquences identiques). Donc, la prédiction des structures 2D et 3D de la PLP2a va concerner les isolats LISC1, LISC8 et PMC1.

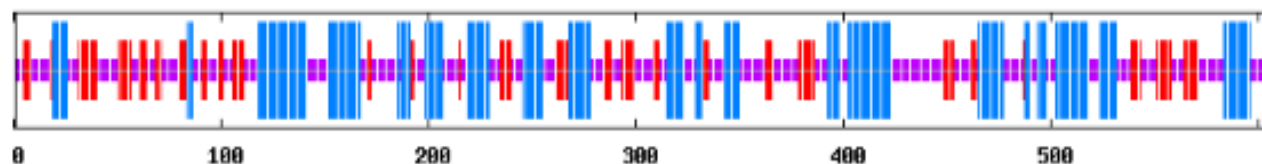
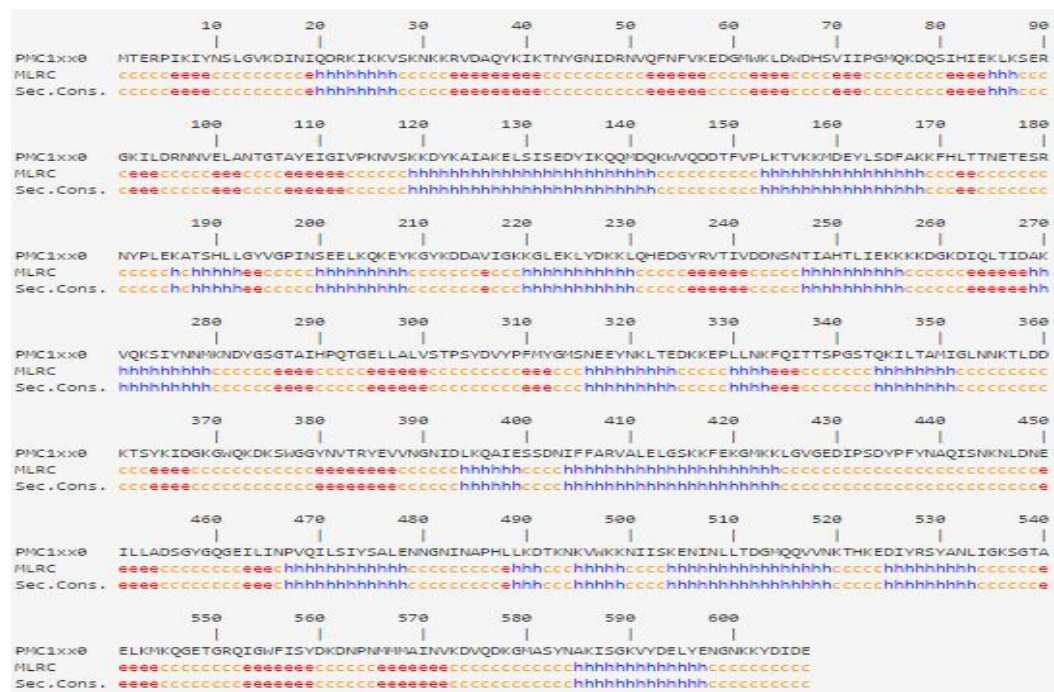
5.2. Prédiction des structures 2D et 3D de la PLP2a

Les résultats de la prédiction des structures 2D de la PLP2a de ces trois séquences sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Structures secondaires de la PLP2a prédites avec le programme bioinformatique GOR IV.

Isolat	Prédiction de la structure secondaire avec GOR IV (h : helice, e : feuillet, c : boucle)	Propriétés
LISC1	 <p>607 aa. Hélice α (Hh) : 200 (32.95%). Feuillet β (Ee) : 113 (18.62%). Coude (Cc) : 294 (48.43%).</p>	

PMC1



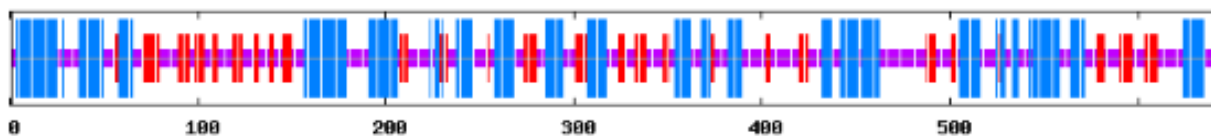
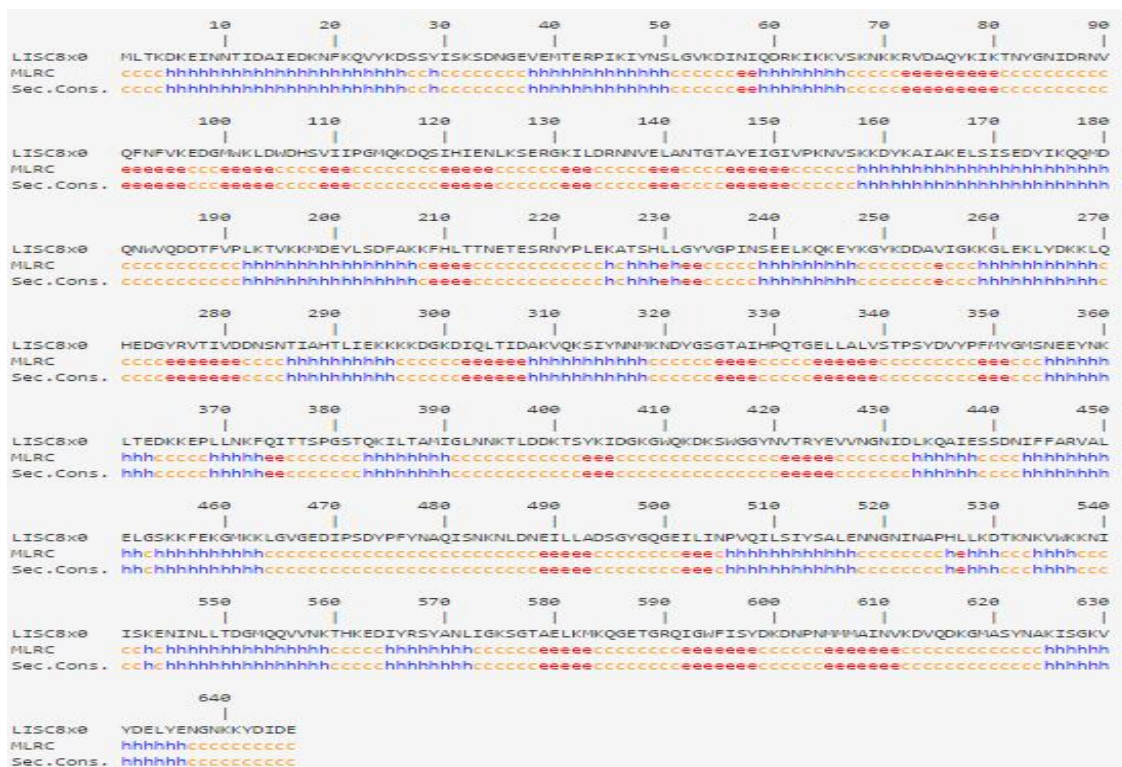
607 aa.

Hélice α (Hh) : 204 (33.61%).

Feuillet β (Ee) : 116 (19.11%).

Coude (Cc) : 287 (47.28%).

LISC8



646 aa.

Hélice α (Hh) : 220 (34,06%).

Feuillet β (Ee) : 127 (19,66%).

Coude (Cc) : 299 (46,28%).

Le programme MODELLER a généré cinq modèles de structure pour chaque protéine des deux isolats LISC8 et PMC1. Si plusieurs modèles sont calculés pour la même cible, le "meilleur" modèle peut être sélectionné en choisissant le modèle avec la valeur la plus basse de la fonction objectif MODELLER, qui est indiquée dans la deuxième ligne du fichier PDB du modèle (tableau15). La valeur de la fonction objective dans MODELLER n'est pas une mesure absolue en ce sens qu'elle ne peut être utilisée que pour classer des modèles calculés à partir du même alignement.

Tableau 15 : fonction de scores objective des cinq modèles générés par MODELLER.

Cible	La fonction objective MODELLER				
	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 4	Modèle 5
LISC8	3698.0591	3955.7136	3669.6748	3566.7026	3604.1987
PMC1	3515.6052	3691.3796	3559.7239	3707.6145	3645.0928

Le modèle 4 et le modèle 1 ont été sélectionnés pour LISC8 et PMC1, respectivement. Les structures 3D de ces modèles sont représentées dans les figures 27 et 28.

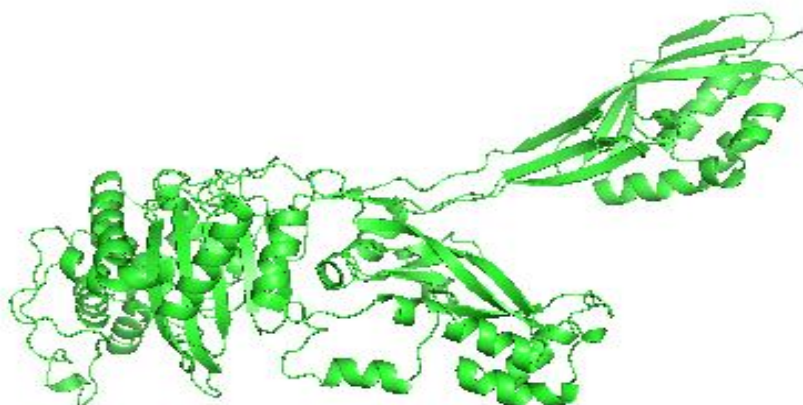


Figure 27: Structure 3D de la PLP2a de l'isolat LISC8 générée par MODELLER.

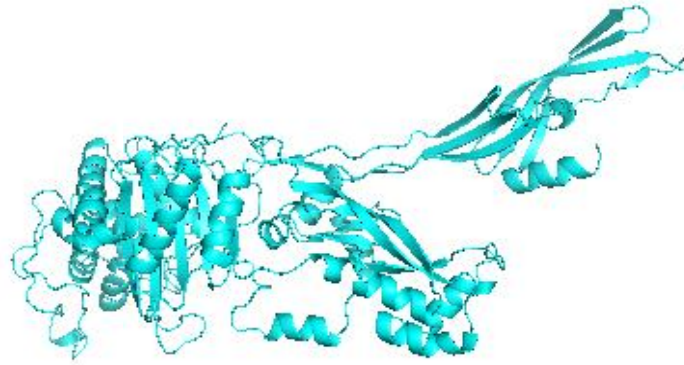


Figure 28: Structure 3D de la PLP2a de l'isolat PMC1 générée par MODELLER.

Pour comparer les résidus des cibles avec le patron, nous avons fait une analyse de leur alignement de séquence (figure 29) et de leurs structures 3D (figures 30):

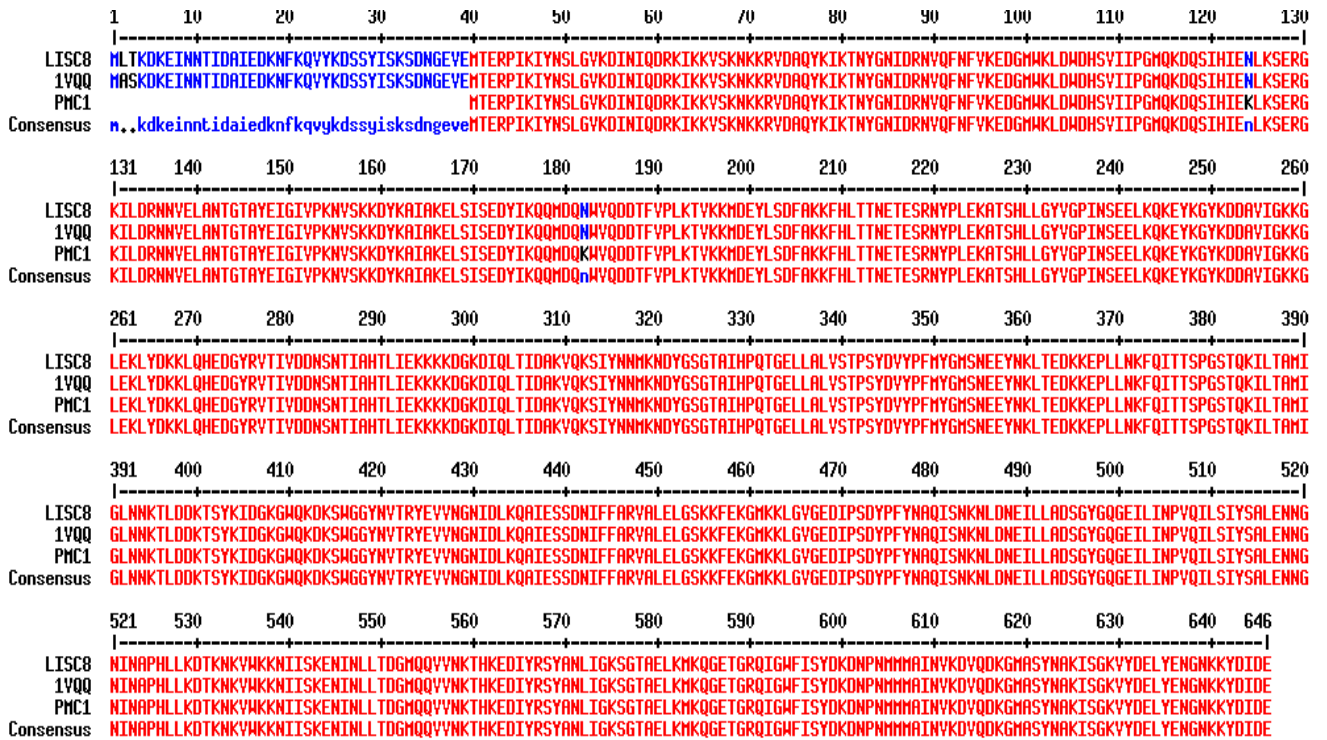


Figure 29: Alignement multiple des cibles (LISC8 et PMC1) avec leur patron (code PDB : 1VQQ).

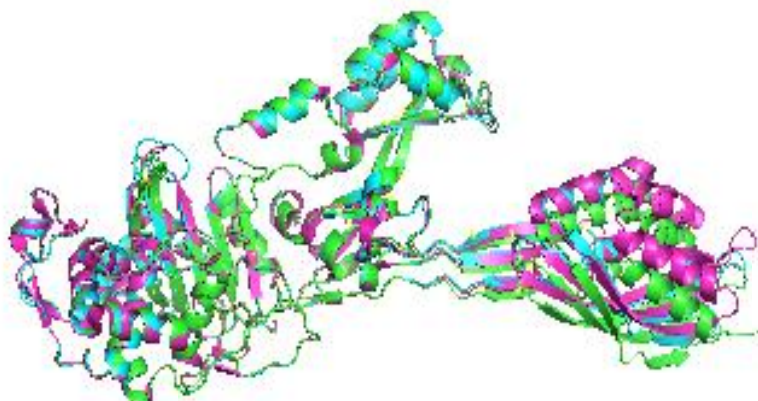


Figure 30 : Superposition des structures 3D des cibles avec le patron (code PDB: 1VQQ). Les structures des cibles des isolats LISC8, PMC1 et le patron sont représentées en cartoon vert, cyan et magenta, respectivement.

La séquence primaire de la PLP2a de l'isolat PMC1 montre une substitution de l'asparagine "N" en lysine "K" dans les positions 124 et 182. Ces mutations ont été bien identifiées par l'analyse des structures 3D (figures 31 et 32).

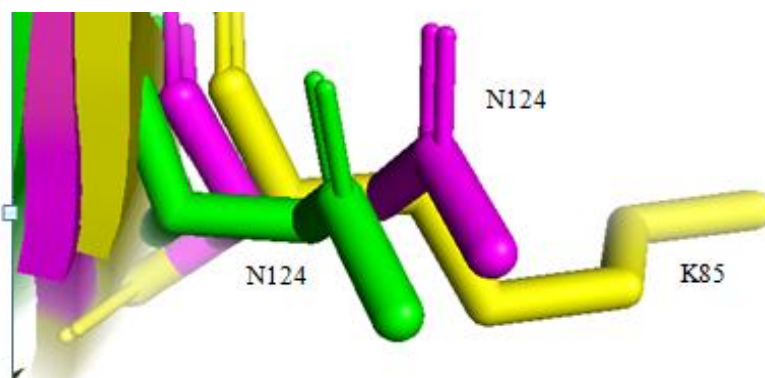


Figure 31 : Superposition des trois structures en position 124, les asparagines en position 124 pour LISC8 et le patron sont représentées en vert et magenta, respectivement. La lysine en position 85 pour l'isolat PMC1 est représentée en jaune.

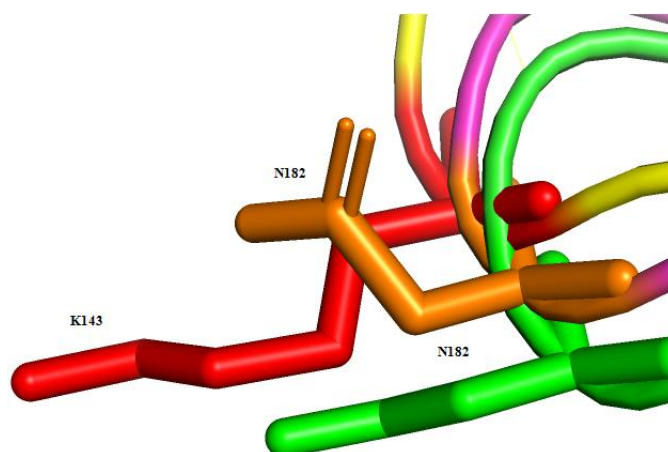


Figure 32 : Superposition des trois structures en position 182, les asparagines en position 182 pour LISC8 et le patron sont représentées en vert et orange, respectivement. La lysine en position 143 pour l'isolat PMC1 est représentée en rouge.

Chapitre IV: Discussion

1. Identification de *S. aureus*

Dans le cadre du diagnostic des infections en général et particulièrement des infections bactériennes, le laboratoire joue un rôle très important. En effet, il permet de mettre en évidence l'agent infectieux et de déterminer sa sensibilité aux antimicrobiens (Nounagnonhou et Amadou, 2008). Au nombre des bactéries d'infections les plus isolées, les staphylocoques dont *S. aureus* occupe une place de choix (Agon et Olowo, 2012 ; Ahomontin et Somakpo, 2009).

Jusqu'il y a une dizaine d'année, l'identification des microorganismes, en particulier *S. aureus* dans les laboratoires de microbiologie médicale reposait principalement sur les caractères phénotypiques : aspect des colonies, coloration de Gram, caractéristiques de croissance et caractères biochimiques (Seng *et al.*, 2009). Toutefois, les techniques conventionnelles nécessitent beaucoup de personnel et de réactifs et conduisent donc à un coût d'analyse important (Sauget, 2016). La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a donc peu à peu remplacé les techniques conventionnelles dans les laboratoires de microbiologie médicale. Plusieurs études ont démontré que les résultats d'identification obtenus avec la spectrométrie de masse (92,2 % - 99,4 % d'identifications correctes) sont meilleurs que ceux des systèmes automatisés utilisant des méthodes conventionnelles (83,1 % - 97,7 %) (Seng *et al.*, 2009; van Veen *et al.*, 2010; Cherkaoui *et al.*, 2010; Bessède *et al.*, 2011) malgré l'existence de quelques différences entre les deux techniques citées par Wieser *et al.* (2012).

En routine, il est important de distinguer les *Staphylocoques aureus* des autres Staphylocoques. Le laboratoire utilise plusieurs tests pour différencier ces deux groupes : la DNase et le Slidex Staph Plus. La fiabilité du MALDI-TOF MS en ce qui concerne l'identification des Staphylocoques, permet de ne plus effectuer de DNase et ainsi gagner 24 heures dans le diagnostic (Cariello, 2012).

Dans cette étude, l'identification de nos isolats par les méthodes phénotypiques a été confirmée par les résultats de l'identification protéomique par MALDI-TOF, ce qui implique l'existence d'une parfaite concordance entre les deux techniques. Cette concordance a été également observée chez d'autres auteurs où ils mettent en évidence les performances du MALDI-TOF comparés à certains systèmes d'identifications de référence (Seng *et al.*, 2009).

L'absence ou l'erreur d'identification par le MALDI-TOF MS, pour certaines espèces, sont attribuées le plus souvent à l'insuffisance des bases de données. Celles-ci s'étoffent chaque année de nouvelles espèces. Comme pour l'identification phénotypique traditionnelle, les techniques de biologie moléculaire résolvent les quelques échecs d'identification par MALDI-TOF MS (Khellili, 2015; Sauget, 2016; Guendouze, 2018).

Pour s'assurer de la fiabilité d'identification de nos isolats bactériens par MALDI-TOF MS, nous avons utilisé une méthode alternative basée sur le séquençage du gène qui code l'ARNr 16S (ADNr 16S). Cette technique identifie les espèces non reconnues par les méthodes phénotypiques et protéomiques. Ces méthodes sont encore relativement coûteuses et n'ont pas encore fait leur chemin dans les laboratoires microbiologiques de diagnostic de routine.

Par conséquent, nos résultats génotypiques sont en accord avec les résultats protéomiques. Le MALDI-TOF MS pourrait donc être une alternative intéressante aux techniques moléculaires basées sur le séquençage de l'ADNr 16S, généralement coûteuses. Ces constats sont en accord avec d'autres travaux (van Baar, 2000; Conway *et al.*, 2001; Fenselau et Demirev, 2001; Lay, 2001; Kumar *et al.*, 2004; Hettick *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2006; Dubois *et al.*, 2010; Bizzini *et al.*, 2011; Welker et Moore, 2011). De plus, en raison de sa rapidité, de la préparation facile de l'échantillon et de la taille réduite de ce dernier (Krishnamurthy *et al.*, 1996; Cherkaoui *et al.*, 2010), le MALDI-TOF pourrait changer l'approche des laboratoires de microbiologie et se positionner comme le test de première ligne, pour tous les isolats, à la place des techniques phénotypiques.

2. Résistance de *S. aureus* à la méticilline

Le *S. aureus* résistant à la méticilline, SARM, a été une préoccupation des professionnels de la santé depuis sa découverte au début des années 1960.

Depuis cette date, le taux de résistance des SARM a été augmenté de façon progressive. En 1970, les SARM sont émergés de façon épidémique dans les hôpitaux et constituent un problème majeur dans les infections nosocomiales au niveau mondial (Moon *et al.*, 2007).

A partir des années 1990, la majorité des SARM isolés exercent une résistance multiple à de nombreuses classes d'antibiotiques comme : les tetracyclines, aminoglycosides, macrolides, lincosamides et fluoroquinolones (Moon *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2010).

En 1997, les SARM n'ont plus été limités au secteur hospitalier, mais de nouveaux clones dits «Community-Acquired» (CA-SARM), ont été décrits comme responsables d'infections communautaires, les premières acquisitions de SARM communautaires ont été observées chez des enfants de zones rurales du Minnesota et du Nord Dakota aux États-Unis (Alioua, 2015).

Entre 1996 et 1997, la prévalence du SARM a été déterminée dans huit pays africains et Malta, elle était en dessous de 10% en Algérie et en Tunisie (Kesah *et al.*, 2003). En Algérie, ce taux de résistance était ensuite augmenté jusqu'à 14%, en 2001 (Ramdani-Bougoussa *et al.*, 2006). Entre 2003 et 2004, une étude prospective de plusieurs centres a été réalisée avec la participation de neuf hôpitaux universitaires dans la région méditerranéenne et le pourcentage des SARM était de 35,5% en Algérie (Amazian *et al.*, 2006). Les hôpitaux algériens ont de ce fait, démontré une augmentation importante de *S. aureus* résistant à la méticilline en ces dernières années (Bekkhoucha *et al.*, 2009).

Selon le 13ème rapport d'évaluation du réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en 2011, l'analyse globale des données concernant l'espèce *S. aureus* aboutit à un pourcentage de résistance à la méticilline de 35,37 % des isolats (Touaitia, 2016).

Dans cette étude, 23 parmi 65 isolats de *S. aureus* ont une résistance à la méticilline soit un pourcentage de 35,38 %, ce résultat se rapproche de celui enregistré en 2006 (Amazian *et al.*, 2006).

En plus, ce pourcentage est statistiquement élevée que celle de 32,7 % obtenue par Aouati *et al.*, en 2010 au CHU Ben Badis de Constantine et moins importante que celles de 52% rapportée par Rebiahi *et al.*, (2011) au CHU de Tlemcen et 62,2 % rapportée par Alioua *et al.*, (2014) au CHU de Annaba.

La résistance du SARM à d'autres antibiotiques a également été rapportée. Dans cette étude, nous avons constaté que 8,69 % des isolats étaient résistants à la vancomycine, tandis que dans des études connexes; toutes les souches de SARM isolées des échantillons cliniques étaient susceptibles à la vancomycine (100 %) (Kesah *et al.*, 2003; Al-Zu'Bi *et al.*, 2004). Shahraz *et al.* (2012) ont signalé que 26,6 % des souches de *S. aureus* isolées à partir du hamburger emballé étaient résistantes à la vancomycine.

Selon notre étude, le SARM était résistant à l'érythromycine et à la gentamycine soit un pourcentage de 56,52% et 34,78% respectivement. Ramdani-Bougoussa *et al.* (2005) a rapporté que 25% et 7% des souches de SARM isolées de l'hôpital Mustapha Pacha en Algérie et Ouchenane *et al.* (2010), 25% et 6,25% des souches de SARM isolées de l'hôpital Didouche Mourad en Algérie étaient résistantes à l'érythromycine et à la gentamicine, respectivement. La comparaison entre ces résultats et le notre a montré une résistance importante à l'érythromycine et à la gentamycine dans nos isolats.

3. Corrélation entre les méthodes phénotypiques et génotypiques pour la détection de la méticillino-résistance

Ces dernières années, plusieurs études ont démontré la grande capacité des méthodes moléculaires telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la RT-PCR et les méthodes PCR pour augmenter la rapidité et la précision des tests de résistance (Lacey *et al.*, 1973; Martineau *et al.*, 2000; Pe'Rez-Roth *et al.*, 2001; Strommenger *et al.*, 2003; Sabet *et al.*, 2007; ; Kumar *et al.*, 2010; Shahraz *et al.*, 2012).

Dans notre étude, la détection moléculaire du gène *mecA*, en tant que cible spécifique parmi les gènes de SARM, a été réalisée pour l'ensemble des 65 isolats de *S. aureus*. Nous avons comparé les résultats de la diffusion du disque en milieu gélosé, en tant que méthode phénotypique, avec la présence du gène *mecA* par la PCR en temps réel, en tant que méthode génotypique. Dans l'ensemble, nous avons trouvé une forte corrélation entre ces deux méthodes. Cette corrélation a été démontrée précédemment dans d'autres études (Pe'Rez-Roth *et al.*, 2001; Strommenger *et al.*, 2003; Al-Zu'Bi *et al.*, 2004; Shahraz *et al.*, 2012).

La présente étude indique que parmi 23 souches, 3 étaient résistantes à la méticilline et 5 sur 65 ont une résistance intermédiaire selon la méthode standard de diffusion sur disque, mais elles sont *mecA⁻* selon la méthode PCR. Une des 37 souches était sensible à la méticilline selon la méthode standard de diffusion sur disque mais elle est *mecA⁺* selon la méthode PCR. Conformément à cette étude et aux rapports précédents, les souches phénotypiquement résistantes à la méticilline mais qui ne portent pas le gène *mecA* (souches BORSA: borderline *Staphylococcus aureus*) semblent montrer une mauvaise expression du gène *mecA* ou une hyperproduction de la méticillinase ou de β -lactamase (Moon *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2010). La résistance à la méticilline dans les souches *mecA⁻* négatives a été supposée, dans des études antérieures, résulter de la modification des PLP normales

chez des souches ne produisant pas de bêta-lactamase (souches MODSA : modified *Staphylococcus aureus*) (Mcdougal et Thornsberry, 1986; Chambers, 1997). Kumar *et al.*, (2010), ont indiqué que le gène *mecA* est présent mais n'est pas amplifié parce que le site d'amplification n'est pas disponible ou n'est pas exprimé ou exprimé à un faible niveau, en raison des conditions de croissance ou pourrait être limité dans les méthodes microbiologiques.

De même, les souches pourraient présenter une résistance intermédiaire à la méticilline due à l'hyper-production d'une β -lactamase lorsque le gène *mecA* est absent (Bergeron et Ouellette, 1998). Les niveaux de résistance intermédiaires pourraient également être dus à des mutations du gène *mecA* endogène (Pe'Rez-Roth *et al.*, 2001).

4. Analyses bioinformatiques

La connaissance de la structure secondaire 2D des ARNs aide à comprendre la fonction biologique dans laquelle sont impliqués ceux-ci. De plus, elle contribue considérablement à la confirmation de la place systématique et phylogénétique de l'isolat au sein de la communauté bactérienne, car on admet que les ARNs dont la fonction moléculaire est similaire doivent avoir des structures secondaires voisines (Allali, 2005 ; Tahi, 2014). Singh et Somvanshi (2009) ajoutent même que la structure secondaire de l'ARNr peut fournir de nouvelles perspectives pour comprendre l'évolution et la stabilité des espèces bactériennes.

Dans leur étude, Lusvarghi *et al.* (2013) ont montré que les structures d'ARN à deux dimensions sont plus précises lorsqu'elles sont obtenues par la prédiction *in silico* que par la prédiction par la seule approche d'analyse par haut débit. Cette structure 2D qui est due à un repliement modulaire et hiérarchisé (i : liaisons Hydrogène entre bases et ii : empilement des bases) aboutissant à une architecture précise et spécifique voire plus importante que le repliement 2D des protéines du point de vue informationnel car elle comporte quatre types de monomères (AUGC) et six angles de torsion du squelette d'ARN alors que les protéines n'en comportent que deux : phi et psi (Lecouste-Philipps, 2006).

La description des agencements hélicoïdaux compatibles avec nos structures secondaires a permis de mettre en évidence les différences au niveau de la topologie candidate 2D des différents isolats. A ce stade, notons que toutes nos structures 2D prédites pour le cas du 16S DNA ne comportent aucun motif structural du type G-quadruplexe ; ce qui confirme que toutes les structures primaires analysées ne sont pas riches en Guanine (Lorenz, 2013).

Nous constatons que tous les isolats de *S. aureus* ont montré une topologie 2D comparable et voisine avec des énergies libres très voisines de -218 Kcal/mol. Cette topologie structurale a été également observée par prédiction avec le logiciel Rfam par les travaux de Skrodenyte-Arbaciauskiene V. (2016) référencié sous le numéro de code JQ795921 dans la base de données EMBL (ENA).

De plus, Ehresmann *et al.* ont rapporté dans leurs travaux, que l'hétérogénéité des séquences primaires nucléotidiques affectent les caractéristiques des structures secondaires du gène 16S ; or nos isolats ont exprimé une forte identité entre leurs séquences primaires. Maly et Brimacombe (1983), en travaillant sur des séquences 16S et 23S, avec un total de 50 000 nucléotides, ont prédit les modèles affinés des structures 2D des deux gènes et ont conclu une attention particulière à la résolution des différences entre les différentes structures secondaires publiées pour ces molécules dans lesquelles ils ont observé 45 régions hélicoïdales dans les différentes topologies 2D de la molécule du 16S. Ils ajoutent également, que l'appariement de bases proposé par les prédictions de ces régions est encore ouvert à la discussion ; ce qui confirme encore une fois que les algorithmes n'arrivent à prédire que 80 % (Juan et Wilson, 1999) tout au plus de la structure 2D des gènes ; d'où les différences observées dans certains cas de prédiction entre les différents chercheurs. Mais Low et Weeks (2010) affirment de leur côté que les précisions de prédiction sur les structures 2D des ADNr atteignent $\geq 95\%$ avec l'avènement des algorithmes de programmation dynamique. Cependant, il faut bien mentionner que ces différences prédictives ne sont pas du tout significatives surtout que des précisions ont été apportées à l'échelle d'une ou deux nucléotides.

Jusqu'à 1985, les seules méthodes permettant de déterminer la structure protéique étaient la diffraction des rayons X ou cristallographie et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire RMN (Guillaume, 2004), devenues alors très coûteuses et plus lentes. Le recours à des méthodes de bioinformatique semblait être une bonne solution (Bouziane *et al.*, 2008).

La structure secondaire de la PLP2a a montré les principaux éléments qui entrent les conformations d'une structure 2D. En effet, nous avons observé des structures en hélice α , des feuillets plissés en forme β et des coudes (appelés aussi Boucles ou Tours). Chacune de ces structures a été observée avec des fréquences spécifiques. En effet, nous avons noté une distribution des formes α : 32,95 %, 33,61 % et 34,06 %. Les formes β ont été distribuées avec 18,62 %, 19,11 % et 19,66 %. Enfin, le profil des coudes a été observé avec les plus

grandes distributions comparativement aux formes α et β : 48,43 %, 47,28 % et 46,28 % pour les isolats LISC1, PMC1 et LISC8 respectivement. Notons que ses distributions sont en accord avec les valeurs observées par De Breven (2004) où il note que les formes en hélice α contribuent dans les structures protéiques 2D avec une fréquence 28 % - 35 %, les formes β : 18 % - 26 % et les coudes : 40 % - 50 %. En 1978, Levitt avait identifié trois principes généraux : (i) les résidus aliphatiques favorise la formation de feuillets β , (ii) les résidus avec une chaîne latérale courte ainsi que la proline et la glycine favorisent les coudes, enfin (iii) la plupart des autres résidus préfèrent former des hélices (Levitt, 1978). Ces observations ont été confirmées et affinées par de nombreuses études (Thomas *et al.*, 2001; Offmann *et al.*, 2007; Malkov *et al.*, 2009).

La prédiction des structures secondaires apporte des informations structurales importantes. Elle est souvent considérée comme une première étape vers la prédiction des structures tertiaires (Bornot, 2009).

L'alignement des structures tertiaires de la PLP2a des isolats LISC8 et PMC1 générées par MODELLER montre une mutation de type substitution dans les positions 124 et 182 où l'asparagine "N" est substituée en lysine "K" dans la cible de l'isolat PMC1. Les modifications, même minimales, de la séquence primaire d'une protéine ont des répercussions profondes sur sa fonction biologique. Dans le cas de l'anémie falciforme (drépanocytose), l'hémoglobine a perdu sa fonction à cause d'une mutation ponctuelle qui conduit à la substitution d'un aa par un autre en position Cis de la chaîne bêta (Gregory et Dagmar, 2008).

Par contre, d'autres études sur l'hémoglobine, ont démontré que des protéines analogues (au niveau de leur fonction) dans des organismes éloignés phylogénétiquement peuvent avoir divergé fortement au cours de l'évolution en ce qui concerne leur séquence précise en aa. Ces modifications d'un ou plusieurs aa de l'hémoglobine n'altèrent pas la fonction de cette protéine (Gregory et Dagmar, 2008).

Dans cette étude, les mutations de la PLP2a de l'isolat PMC1 ne changent pas sa structure 3D et n'altèrent pas la fonction de cette protéine car les deux souches résistent à la méticilline. Pour que cette mutation soit significative et caractéristique de notre population, il est nécessaire de faire une étude plus poussée avec un plus grand échantillonnage.

Conclusion générale et perspectives

Notre étude a porté sur l'identification de 65 souches de *S. aureus* isolées à partir de différentes origines pathologiques dans la ville de Constantine, dont la première partie a concerné les performances de la technique MALDI-TOF MS dans l'identification des bactéries, en particulier *S. aureus*. Tous les isolats bactériens ont été correctement identifiés comme des *S. aureus* par cette technique spectrométrique. En comparaison avec les méthodes phénotypiques (Coloration de Gram, recherche de catalase, Dnase...) et génotypiques (ADNr16S) réalisées dans cette thèse, nous avons constaté que la technique protéomique, MALDI-TOF MS, constitue un outil majeur dans la routine de microbiologie clinique. Cette méthode, peu coûteuse, précise et plus rapide que les méthodes de la microbiologie traditionnelle et nécessitant moins d'expertise technique que les méthodes génotypiques, et ayant le même niveau de discrimination que celles-ci. Enfin, d'autres études sont nécessaires pour tester l'applicabilité du MALDI-TOF pour détecter la résistance des bactéries aux antibiotiques. Un diagnostic étiologique plus rapide peut permettre d'une part de préserver le pronostic vital dans des situations infectieuses graves et d'autre part d'épargner les antibiotiques à large spectre.

Par la suite, une évaluation des niveaux de résistance aux antibiotiques a permis de mettre en évidence 23 souches de *S. aureus* résistant à la méticilline et une détection moléculaire du gène responsable de la méticillino-résistance a été réalisée par RT-PCR. La comparaison entre les résultats de la diffusion du disque en milieu gélosé, en tant que méthode phénotypique, avec la présence du gène *mecA* par la PCR en temps réel, en tant que méthode génotypique, pour la détection de la méticillino-résistance chez *S. aureus* a montré une forte corrélation entre ces deux méthodes. Cependant, nous avons détecté une souche phénotypiquement sensible mais exprime le gène *mecA*, cette détection peut être due à une mauvaise expression du gène *mecA* ou une hyperproduction de la β -lactamase. Trois souches sont apparues résistantes phénotypiquement à la méticilline mais ne portent pas le gène *mecA*, en raison d'une modification des PLP normales chez des souches ne produisant pas de β -lactamase. Il serait intéressant donc, d'étudier une population plus importante pendant une période plus longue pour décrire le taux des infections à SARM et de pouvoir approfondir l'aspect génétique de cette résistance tout en explorant les mécanismes intervenant dans la régulation.

Dans la deuxième partie, nous avons mis en évidence l'assistance des programmes bioinformatiques comme outils d'aide à la décision, dans le vaste domaine de la systématique bactérienne. Nous avons essayé de montrer que la prédiction des structures

secondaires voire tertiaires par calculs bioinformatiques, à partir des séquences primaires de gènes d'intérêt (codants et/ou non), apportait des éléments et des informations supplémentaires pour confirmer la place de l'isolat dans l'arbre phylogénétique bactérien.

L'alignement des structures tertiaires de la PLP2a des isolats LISC8 et PMC1 générées par MODELLER montre une mutation de type substitution dans les positions 124 et 182 où l'asparagine "N" est substituée en lysine "K". Ces mutations ne changent pas la structure 3D de la protéine et n'altère pas sa fonction comme résistante à la méticilline. Pour que cette mutation soit significative et représentative de notre population, il est nécessaire de faire une étude plus poussée avec un plus grand échantillonnage.

Il reste, cependant, à développer des programmes plus puissants (temps et score des réponses) pour aligner ses structures secondaires et tertiaires afin d'attribuer des motifs structuraux et fonctionnels spécifiques pour chaque groupe bactérien faisant foi d'une signature et d'une empreinte moléculaires.

Références bibliographique

- Abraham A. L. (2008). Caractérisation et analyse évolutive des répétitions intragéniques : une étude au niveau des gènes, des séquences protéiques et des structures tridimensionnelles. Thèse de Doctorat en Analyse des Génomes et Modélisation Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie, Paris. France.
- Agon S. I. A. et Olowo P. P. (2012). Détermination des espèces et profils de résistances aux antibiotiques des souches de Staphylocoques isolées d'échantillons pathologiques au CNHU-HKM. Mémoire de fin de formation pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. École Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC). Bénin.
- Ahomontin H. L. et Somakpo F. A. (2009). Utilisation du mannitol et production de la DNase chez les Staphylocoques. Mémoire de fin de formation pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. École Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC). Bénin.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M. Toberts K. et Watson J. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing inc., New-York, London.
- Alioua M. A. (2015). Les Staphylocoques: sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Mécicilline. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- Alioua M. A., Labid A., Amoura K., Bertine M., Gacemi-Kirane D. et Dekhil M. (2014). Emergence of the European ST80 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of healthcare-associated infections in Eastern Algeria. *Med. Mal. Infect.*, 44(4) : 180-3.
- Allali J. 2005. *Comparaison des structures secondaires d'ARN*. Thèse de Doctorat. Université Marne-la-vallée. France.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller, W., et Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17) : 3389-402.

- Al-Zu'Bi E., Bdour S. and Shehabi A. A. (2004). Antibiotic resistance patterns of *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens and nasal carriage. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*. 10(4) : 321-324.
- Amazian K., Fendri C., Missoum M. F. K., Bouzouaia N., Rahal K., Savey A., Saadatian-Elahi M. et Fabry J. (2006). Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 25 : 340-343.
- Anfinsen C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 181 : 223-230.
- Anhalt J. P. et Fenselau C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 47 (2) : 219-225.
- Aouati H., Arafa N., Benlabeled K., Boulahrouf A. and Bousseboua H. (2010). Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* at university hospital center Ben Badis of Constantine Algeria. *Rev. Tunis. Infect.*, 4 : 129-133.
- Bajorath J., Stenkamp R. et A. (1994). Knowledge-based model building of proteins : Concepts and examples. *Protein Sci*. 2 : 1798-1810.
- Barghoutti S. A. (2011). A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *Indian J. Microbiol*. 51 : 430-444.
- Bates P. A., Kelley L. A., MacCallum R. M. et Sternberg M. J. (2001). Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3d-jigsaw and 3d-pssm. *Proteins*, 5 : 39-46.
- Bayer C., von Kalm L. et Fristrom J. W. (1996). Gene regulation in imaginal disc and salivary gland development during *Drosophila* metamorphosis. *Gilbert, Tata, Atkinson*. 321-361.
- Bekkhoucha S. N., Cady A., Gautier P., Itim F. et Donnio P. Y. (2009). A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean sea: molecular characteristics of isolates from Western Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 28 : 553-555.

- Berendsen H. J. C., van der Spoel D. and van Drunen R. (1995). GROMACS – A Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation. *Computer Physics Communications*, 91 : 43-56.
- Berger-Bachi B. (1994). Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol.*, 2 (10) : 389-393.
- Bergeron M. G. et Ouellette M. (1998). Preventing Antibiotic Resistance through Rapid Genotypic Identification of Bacteria and of Their Antibiotic Resistance Genes in the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology.*, 36(8) : 2169-2172.
- Bessède E., Angla-Gre M., Delagarde Y., Sep Hieng S., Ménard A. et Mégraud F. (2011). Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17(4) :533-8.
- Bizzini A. et Greub G. (2010). MALDI-TOF MS, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16 : 1614-9.
- Bornot A., (2009). Analyse et prédiction de la relation séquence-structure locale et flexibilité au sein des protéines globulaires. Thèse de Doctorat. Université Paris, France.
- Bouziane H., Messabih B. et Chouarfia A. (2008). Prédiction de la structure 2D des protéines par les réseaux neurones. Université des sciences de la technologie, Oran. Algérie.
- Branden C. I. et JohnTooze. (1999). Introduction to Protein Structure. *Garland Science*.
- Bronner S., Monteil H. et Prévost G. (2004). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28(2) : 183-200.
- Brooks B. R., Brucoleri B. D., Olafson R. E., States D. J., Swaminathan S. et Karplus M. (1983). Charmm: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.*, 4 : 187-217.
- Cain T. C., Lubman, D. M., Weber, W. J., et Vertes, A. (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight

- mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8(12) : 1026-1030.
- Cariello C. (2012). La spectrométrie de masse MALDI-TOF et le diagnostic microbiologique. ICHV, Laboratoire de microbiologie, Sion. Travail de Diplôme.
- CA-SFM. (2015). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., et Connell N. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 69(2) : 330-339.
- Chambers H. F. (1997). Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4): 781-791.
- Chanama S. (1999). Comparative 16S rRNA sequence analysis. *Warasan Wichai Witthayasat Kanphaet*, 13 : 107-117.
- Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P. *et al.* (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.*, 48 : 1169-1175.
- Cheung A. L., Bayer M. G. et Heinrichs J. H. (1997). Sar genetic determinants necessary for transcription of RNAPII and RNAPIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 179 (12) : 3963-3971.
- Chien Y. et Cheung A. L. (1998). Molecular interactions between two global regulators, sar and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 273 (5) : 2645-2652.
- Chien Y., Manna A. C., Projan S. J. et Cheung A. L. (1999). SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J. Biol. Chem.*, 274 (52) : 37169-37176.
- Chou P. Y. et Fasman G. D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, 13: 222-245.
- Claessens M., Van Cutsem E., Lasters I. et Wodak S. (1989). Modelling the polypeptide backbone with 'spare parts' from known protein structures. *Protein Eng.*, 2(5) : 335-45.

- Clarridge J. E. et Alerts C. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17(4) : 840-862.
- Claydon M. A., Davey S. N., Edwards-Jones V. et Gordon D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, 14(11) : 1584-1586.
- Conway G. C., Smole S. C., Sarracino D. A., Arbeit R. D. et Leopold P. E. (2001). Phyloproteomics: species identification of *Enterobacteriaceae* using matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3 : 103-112.
- Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W. et Kollman P. A. (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19) : 5179-5197.
- Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, 16 (22) : 10881-10890.
- Couture B. (1990). Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15- 32.
- De Breven A. G. (2004). <http://www.ebgm.jussieu.fr/~debreven/>
- Delsaux N. (2008). Développement d'une méthode de prédiction des sites d'interaction Protéines-Molécules à partir de la structure primaire. Thèse de doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Académie Universitaire Wallonie-Europe, Belgique.
- Denis F., Poly M.C., Martin C. *et al.* (2007). Bactériologie médicale, technique usuelles, Elsevier Masson. pp : 14-20.
- Descy J., Meex C., Melin P., Hayette M. P., Huynen P. et De Mol P. (2010). Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. *Rev. Med. Liège*, 65 : 29-34.

- Deurenberg R. H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A. W., Bruggeman C. A. and Stobberingh E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13 : 222-235.
- Donnio P.-Y., Preney L., Gautier-Lerestif A.-L., Avril J.- L. and Lafforgue N. (2004). Changes in staphylococcal cassette chromosome type and antibiotic resistance profile in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a French hospital over an 11 year period. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53 : 808-813.
- Dubois D., Leyssene D., Chacornac J.P., Kostrzewa M., Schmit P.O., Talon R. *et al.* (2010). Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 48 : 941-945.
- Dunman P. M., Murphy E., Haney S., Palacios D., Tucker-kellogg G. Wu S. *et al.* (2001). Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *SarA* loci. *J. Bacteriol.*, 183(24) : 7341-7353.
- Edgar R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32 : 1792-1797.
- Ehresmann C., Stiegler P., Mackie G. A., Zimmermann R. A., Ebel J. P. and Fellner P. (1975). Primary sequence of the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2(2) : 265-78.
- El-Anzi O. (2014). Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *staphylococcus aureus* isolées au centre hospitalier Ibn Sina de rabat. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V - Souissi. Faculté De médecine et de pharmacie, Rabat.
- Emonet S., Shah H. N., Cherkaoui A. and Schrenzel J. (2010). Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16(11) : 1604-13.
- Fauchère J. L. et Avril J. L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris. 213-217.

- Feng D. F. et Doolittle R. F. (1997). Converting amino acid alignment scores into measures of evolutionary time: a simulation study of various relationships. *J. Mol. Evol.*, 44 : 361-370.
- Fenselau C. et Demirev P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4) : 157-171.
- Ferron F. P. (2005). Approches bioinformatiques et structurales des réplicases virales. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences de Luminy. Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, France.
- Ferroni A., Suarez S., Beretti J. L. Dauphin B., Bille E., Meyer J. *et al.* (2010). Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 48 : 1542-1548.
- Fetrow J. S. (1995). Omega Loops: Nonregular Secondary Structures Significant in Protein Function and Stability. *The FASEB Journal*, 9(9) : 708-717.
- Fiser A., Sanchez R., Melo F. and Sali A. (2001). Comparative protein structure modelling. In O. Becker, A.D. Mackerell Jr., B. Roux and M. Watanabe, editors, *Computational Biochemistry and Biophysics*, chapitre 14. Marcel Dekker N. Y.
- Fuqua W. C., Winans S. C. and Greenberg E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 176(2) : 269-75.
- Garnier J., Gibrat J. F. et Robson B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.*, 266 : 540-53.
- Garnier J., Osguthorpe D. J. et Robson B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 120 : 97-120.
- Garrity G. M., Johnson K. L., Bell J. and Searles D. B. (2002). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edn. Springer-verlag, New York.

- Ghosh D. et Gupta-Bhattacharya S. (2011). Allergen Bioinformatics: Recent Trends and Developments. *Selected Works in Bioinformatics*, 1-17.
- Ghouzam Y. (2016). Nouvelles approches pour l'analyse et la prédiction de la structure tridimensionnelle des protéines. Thèse de Doctorat en Biotechnologies et Biothérapies. Université Paris, France.
- Gracy J., Chiche L. et Sallantin J. (1993). Improved alignment of weakly homologous protein sequences using structural information. *Protein engineering*, 6(8): 821-9.
- Gregory A. P. et Dagmar R. (2008). Structure et fonction des protéines. Edition De Boeck.
- Guendouze A. (2018). Un apport des techniques moléculaires et bioinformatiques pour l'identification et la caractérisation fonctionnelle de germes causant les mammites subcliniques et les infections respiratoires chez les bovins à Constantine et à Batna. Thèse de Doctorat en biotechnologie. Université des Frères Mentouri Constantine.
- Guillaume C. (2004). Prédiction de la structure d'une protéine. *Soluscience*, 1-31.
- Hassanzadeh S., Pourmand M. R., Afshar D., Dehbashi S. et Mashhadi R. (2016). TENT: A Rapid DNA Extraction Method of *Staphylococcus aureus*. *Iran J. Public Health*, 45(8) : 1093-1095.
- Helms V. et McCammon J. A. (1998). Conformational transitions of proteins from atomistic simulations. In P. Deuffhard, J. Hermans, B. Leimkuehler, A.E. Mark S. Reich, and R.D. Skeel, editors, *Lecture Notes in Computational Science and Engineering*, pages 66-77. Springer.
- Henikoff S. et Henikoff J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22) : 10915-9.
- Hettick J. M., Kashon M. L., Slaven J. E., Ma Y., Simpson J. P., Siegel P. D. *et al.* (2006). Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics*, 6 : 6416-6425.

- Hiramatsu K., Cui L. Kuroda M. et Ito T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *TRENDS in Microbiology*, 9 (10) : 486-493.
- Holland R. D., Wilkes J. G., Rafii F., Sutherland J. B. Persons, C. C., Voorhees K. J. et Lay Jr J. O. (1996). Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(10) : 1227-1232.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) : Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (12) : 4961-4967.
- Ito T., Ma X. X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H. et Hiramatsu K. (2004). Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7) : 2637-2651.
- Jacobson M. and Sali A. (2004). Comparative protein structure modeling and its applications to drug discovery. *Annual Reviews Medicinal Chemistry*, in press.
- Janda J. M. and Abbot S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45 : 2761-2764.
- Ji X., Von Rosenvinge E. C., Johnson W. W., Tomarev S. I., Piatigorsky J., Armstrong R. N. et Gilliland G. L. (1995). Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry*, 34(16) : 5317-28.
- Jones D. T. (1998). THREADER : Protein Sequence Threading by Double Dynamic Programming. (in) *Computational Methods in Molecular Biology*. Steven Salzberg, David Searls, and Simon Kasif, Eds. Elsevier Science.
- Jones T. A. et Thirup S. (1986). Using known substructures in protein model building and crystallography. *EMBO J.*, 5(4) : 819-22.

- Juan V. and Wilson C. (1999). RNA Secondary Structure Prediction Based on Free Energy and Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Biology*, 289(4) : 935-947.
- Kamberaj H. et Helms V. (2001). Monte-carlo simulation of biomolecular systems with biomcsim. *Computer Physics Communications.*, 141(3) : 375-402.
- Karas M. et Hillenkamp F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, 60(20) : 2299-301.
- Katayama Y., Ito T., et Hiramatsu K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents and Chemother*, 44 (6) : 1549-1555.
- Kelley L. A. et Sternberg M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols*, 4(3): 363-71.
- Kelley L. A., MacCallum R. M. et Sternberg M. J. E. (1999). Recognition of remote protein homologies using three-dimensional information to generate a position specific scoring matrix in the program 3D-PSSM. *Proceedings of the third annual international conference on Computational molecular biology*, 218-225.
- Kesah C., Ben Redjeb S., Odugbemi T. O., Boye C. S.-B., Dosso M., Ndinya Achola J. O., Koulla-Shiro S., Benbachir M., Rahal K. et Borg M. (2003). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9 : 153-156.
- Keys C. J., Dare D. J., Sutton H., Wells G., Lunt M., McKenna T. *et al.* (2004). Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect. Genet. Evol.*, 4 : 221-242.
- Khelili K. (2015). Application des outils biomoléculaires 16S, MALDI-TOF et métagénomique pour la détermination des variantes taxonomiques bactériennes telluriques. Thèse de Doctorat en biotechnologie. Université des Frères Mentouri Constantine.
- Khemili S. (2013). Prédiction des épitopes B de l'allergène Der p 5 et étude in silico de la structure et de l'état oligomérique des allergènes d'acariens

- des familles 5 et 21. Thèse de Doctorat. Université M'hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.
- Koehl P. et Delarue M. (1995). A self consistent mean field approach to simultaneous gap closure and sidechain positioning in homology modelling. *Nat. Struct. Biol.*, 2(2) : 163-70.
- Koubek J., Uhlik O., Jecna K., Junkova P., Vrkoslavova J., Lipov J. *et al.* (2012). Whole-cell MALDI-TOF: Rapid screening method in environmental microbiology. *Int. Biodeterior Biodegrad*, 69 : 82-86.
- Kouza M., Faraggi E., Kolinski A. et Kloczkowski A. (2017). The GOR Method of Protein Secondary Structure Prediction and Its Application as a Protein Aggregation Prediction Tool (pp. 7–24). Humana Press, New York, NY.
- Krid A. (2008). Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant. Thèse de magister en chimie théorique. Université des Frères Mentouri Constantine1, Algérie.
- Krishnamurthy T. et Ross P. L. (1996). Rapid identification of bacteria by direct matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10 (15) : 1992-1996.
- Kumar M. P., Vairamani M., Raju R. P., Lobo C., Anbumani N., Kumar C. T. et Shanmugasundaram S. (2004). Rapid discrimination between strains of *beta streptococci* by intact cell mass spectrometry. *Indian J. Med. Res.*, 119 : 283-288.
- Kumar R., Yadav B. R. et Singh R. S. (2010). Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Mastitic Crossbred Cattle. *Curr. Microbiol.*, 60: 379-386.
- Kumar S., Stecher G. et Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*.
- Lacey R. W. (1973). Genetic basis, epidemiology, and future significance of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: A review. *J. clin. Path.*, 26 : 899-913.

- Laskowski R. a., MacArthur M. W., Moss D. S. et Thornton J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2) : 283-291.
- Lay J. O. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4) : 172-194.
- Le Loire Y. and Gautier M. (2010). *Staphylococcus aureus*. LAVOISIER edition.
- Lecouste-Philipps A. (2006). *Extraction de contraintes structurales à partir de comparaisons de séquences et de structures tridimensionnelles d'ARN*. Thèse Doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg, France.
- Levitt M. (1978). Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry*, 17 : 4277-4285.
- Levitt M. (1992). Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching. *J. Mol. Biol.*, 226 : 507-533.
- Lim D. et Strynadka N. C. J. (2002). Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature structural biology*, 9 (11) : 870-876.
- Lim V. I. (1974). Algorithms for prediction of alpha-helical and beta-structural regions in globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 88 : 873-894.
- Lina G. Jarroud S. Ji G. *et al.* (1998). Transmembrane topology and histidine protéine kinase activity of ArgC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 28(3) : 655-662.
- Lindahl E., Hess B. and Van Der Spoel D. (2001). GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling*, 7 : 306-317.
- Lorenz R., Bernhart S. H., Qin J., Siederdisen C. H. zu Tanzer A., Amman F., *et al.* (2013). 2D Meets 4G: G-Quadruplexes in RNA Secondary Structure Prediction. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 10(4) : 832-844.

- Low B. W. et Baybutt R. B. (1952). The II Helix-A Hydrogen Bonded Configuration Of The Polypeptide Chain. *Journal of the American Chemical Society*, 74(22) : 5806-5807.
- Low J. T. et Weeks K. M. (2010). SHAPE-directed RNA secondary structure prediction. *Methods (San Diego, Calif.)*, 52(2) : 150-8.
- Lowy F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.*, 111 : 1265-1273.
- Lu W. P., Sun Y., Bauer M. D., Paule S., Koenigs P. M. et Kraft W. G. (1999). Penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: kinetic characterization of its interactions with bêta-lactams using electrospray mass spectrometry. *Biochemistry*, 38 (20) : 6537-6546.
- Lusvarghi S., Sztuba-Solinska J., Purzycka K. J., Rausch J. W. et Le Grice S. F. J. (2013). RNA secondary structure prediction using high-throughput SHAPE. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (75) : e50243.
- MacKerell A. D., Brooks B., Brooks C. L., Nilsson L., Roux B., Won Y. et Karplus M. (1998). Charmm : The energy function and its parameterization with an overview of the program. *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, 1 : 271-277.
- Maier T., Klepel S., Renner U. et Kostrzewa M. (2006). Fast and reliable MALDI-TOF MSbased microorganism identification. *Nat. Methods*, 3 : i-ii.
- Malkov S. N., Zivkovic M. V., Beljanski M. V., Stojanovic S. D. et Zaric S. D. (2009). A reexamination of correlations of amino acids with particular secondary structures. *Protein J.*, 28 : 74-86.
- Maly P. et Brimacombe R. (1983). Refined secondary structure models for the 16S and 23S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 11(21) : 7263-86.
- Martineau F, Picard F. J., Lansac N., Ménard C., Roy P. H., Ouellette M. et Bergeron M. J. (2000). Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and

- Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2) : 231-238.
- Marti-Renom M. A., Fiser A., Madhusudhan M.S., John B., Stuart A., Eswar N., Pieper P., Mirkovic N., Shen M. Y. et Sali A. (2003). Comparative protein structure modeling. Current Protocols in Bioinformatics, 5. Updated version of Unit 5.1 in CPBI.
- Marti-Renom M.A., Stuart A., Fiser A., S´anchez R., Melo F. et Sali A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 29 : 291-325.
- Maupetit J. (2007). Prédiction de la structure des protéines. Thèse de Master 2. Université de Paris Diderot, France.
- Mcdougal L. K. et Thornsberry C.(1986). The Role of β -Lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5) : 832-839.
- Mellmann A. et Müthing J. (2013). MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Microbial Identification. *Adv. Tech. Diagn. Microbiol.*, 187-207.
- Melo F. et Feytmans E. (1998). Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *Journal of molecular biology*, 277(5) : 1141-52.
- Mizrachi-Man O., Davenport E. R. et Gilad Y. (2013). Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS ONE*, 8(1).
- Momtaz H. et Hafezi L. (2014). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Iranian hospitals: virulence factors and antibiotic resistance properties. *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, 14(4) : 219-226.
- Moon J.-S., Lee A.-R., Kang H.-M., Lee E.-S., Kim M.-N., Paik Y. H., Park Y. H., Joo Y.-S. et Koo H. C. (2007). Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. *J. Dairy Sci.*, 90 : 1176-1185.

- Morfeldt E., Taylor D., von Gabain A. et Arvidson (1995). Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoding antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* 14, 4569-4577.
- Moult J., Fidelis K., Kryshtafovych A. et Tramontano A. (2011). Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)--round IX. *Proteins*, 79 (1) : 1-5.
- Nagano K. (1973). Logical analysis of the mechanism of protein folding. I. Predictions of helices, loops and beta-structures from primary structure. *J. Mol. Biol.*, 75 : 401-420.
- Nounagnonhou M. et Amadou P. E. (2008). Problématique des colonies d'entérobactérie à reflet métallique sur la gélose EMB. Mémoire de fin de formation pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. École Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC). Bénin.
- Novick P., Brennwald P., Walworth N. C., Kabcenell A. K., Garrett M., Moya M., Roberts D., Müller H., Govindan B. et Bowser R. (1993). The cycle of SEC4 function in vesicular transport. *Ciba Found Symp.*, 176 : 218-28.
- Novick R. P. et Geisinger E. (2008). Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.*, 42 : 541-64.
- Nussinov R. et Jacobson A. B. (1980). Fast algorithm for predicting the secondary structure of single-stranded RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11) : 6309-13.
- Oezguen N., Zhou B., Negi S. S., Ivanciuc O., Schein C. H., Labesse G., Braun W., Jay J. et Drive H. (2009). Comparative 3D-modeling of allergenic proteins and amino acid composition of potential conformational IgE epitopes. 45(14) : 3740-3747.
- Offmann B., Tyagi M. et de Brevern A. G. (2007). Local Protein Structures. *Current Bioinformatics*, 2 : 165-202.
- Ogston A. (1884). Classics in infectious diseases. *Reviews of infectious diseases*, 6(1) : 122-128.
- Ouchenane Z., Smati S., Rolain J. M., Raoult D. (2010). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. *Journal of Pathologie Biologie*, 59 : 129-132.

- Palaveceno E. (2007). Clinical, Epidemiological, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections. *Methods Mol. Biol.*, 391: 1- 19.
- Parmentier D. (2014). Fonction de la protéine Tex chez *Staphylococcus aureus*: un lien potentiel avec les ARN régulateurs ? Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
- Pe'Rez-Roth E., Claverie-Marti'N F., Villar J. et Me'Ndez-A'Lvarez S. (2001). Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11) : 4037-4041.
- Petrey D., Xiang Z., Tang C. L., Xie L., Gimpelev M. *et al.* (2003). Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteins*, 53 (6) : 430-5.
- Pieper U., Eswar N., Braberg H., Madhusudhan M. S., Davis F. P., Stuart A. C. *et al.* (2004). MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Research*, 32(90001) : 217-222.
- Pipas J. M. et McMahon J. E. (1975). Method for predicting RNA secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(6) : 2017-21.
- Prescott L. M., Harley J. P. et Klein D. (2010). Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université.
- Ramachandran G. N. et Sasisekharan V. (1968). Conformation of Polypeptides and Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 23 : 283- 438.
- Ramachandran G. N., Ramakrishnan C. et Sasisekharan V. (1963). Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7 : 95-99.
- Ramdani-Bougoussa N. Bes M., Meugnier H., Forey F., Reverdy M. E., Lina G., Vandenesch F., Tazir M. et Etienne J. (2006). Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Resistant to Multiple Antibiotics and Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes in an Algiers Hospital. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3) : 1083-1085.

- Rebiahi S. A. (2012). Caractérisation de souches de *staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de Doctorat en microbiologie. Université de Tlemcen.
- Rebiahi S. A., Abdelouahid D. E., Rahmoun M., Abdelali S. et Azzaoui H. (2011). Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). *Médecine et maladies infectieuses*, 41 : 646-651.
- Reller L. B., Weinstein M. P. et Petti C. A. (2007). Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44(8) : 1108-1114.
- Robert D. (2013). *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université d'Angers.
- Romilly C., Caldelari I., Parmentier D., Lioliou E., Romby P. et Fechter P. (2012). Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in *Staphylococcus aureus*. *RNA Biol.*, 9 : 402-413.
- Ronsin C. (2005). L'histoire de la biologie moléculaire (Pionniers & héros), De Boeck university, 1er Ed. 295p.
- Rost B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.*, 12 : 85-94.
- Sabet N. S., Subramaniam G., Navaratnam P. et Sekaran S. D. (2007). Detection of *mecA* and *ermA* genes and simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* using triplex real-time PCR from Malaysian *S. aureus* strain collections. *International Journal of Antimicrobial Agent*, 29 : 582-585.
- Sali A. et Blundell T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 234 : 779-815.

- Sánchez R., Pieper U., Melo F., Eswar N., Martí-Renom M. A., Madhusudhan M. S., Mirković N. et Sali A. (2000). Protein structure modeling for structural genomics. *Nat. Struct. Biol.*, 7 : 986-90.
- Sanger F., Nicklen S. et Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Nat. Acad. Sci. USA.*, 74 : 5463-5467.
- Sauget M. (2016). Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF: application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales. Thèse de Doctorat. Université De Franche-Comte, France.
- Schwede T., Kopp J., Guex N. et Peitsch M. C. (2003). Swiss-model : an automated protein homology modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31 : 3381-3385.
- Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P. E., Rolain J. M. *et al.* (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.*, 49 : 543-551.
- Shahraz F., Dadkhah H., Khaksar R., Mahmoudzadeh M., Hosseini H., Kamran M. et Bourke P. (2012). Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. *Meat Science*, 90 : 759-763.
- Shen H. D., Tam M. F., Huang C. H., Chou H., Tai H. Y., Chen Y. S., Sheu S. Y. et Thomas W. R. (2011). Homology modeling and monoclonal antibody binding of the Der f 7 dust mite allergen. *Immunology and cell biology*, 89(2) : 225-30.
- Shen M. et Sali A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, 15 : 2507-2524.
- Singh V. et Somvanshi P. (2009). Computational modeling analyses of RNA secondary structures and phylogenetic inference of evolutionary conserved 5S rRNA in the prokaryotes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 27(7) : 770-776.
- Smith L., Sanders J., Kaiser R., Hughes P., Dodd C., Connell C. *et al.* (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nat.*, 321(6071) : 674-9.

- Song Y., Liu C., McTeague M. et Finegold S.M. (2003). 16S ribosomal DNA sequencebased analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J. Clin. Microbiol.*, 41 : 1363-1369.
- Spicer W. (2003). Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 28-29.
- Stackebrandt E. et Goebel B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 (4) : 846-9.
- Staden R. (1979). A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic Acids Res.*, 6(7) : 2601-10.
- Strommenger B., Kettlitz C., Werner G. et Witte W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9) : 4089-4094.
- Suh M. J. et Limbach P. A. (2004). Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *Eur. J. Mass. Spectrom.*, 10 : 89-99.
- Sutcliffe M. J., Haneef I., Carney D., et Blundell T. L. (1987). Knowledge based modelling of homologous proteins, part i: Three dimensional frameworks derived from the simultaneous superposition of multiple structures. *Protein Eng.*, 1 : 377-384.
- Swordlow H., Zhang J., Chen D., Harke H., Grey R., Wu S. *et al.* (1991). Three DNA sequencing methods using capillary gel electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Anal. Chem.*, 63(24) : 2835-41.
- Tahi F. (2014). Bioinformatique des ARNs non-codants : Algorithmes pour leur identification et la prédiction de leur structure. Thèse d'Habilitation. Université d'Evry-Val d'Essonne. 84p.
- Tamura K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. et Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10) : 2731-2739.
- Taylor A. H. et Kerr G. P. (1941). The Distribution of Energy in the Visible Spectrum of Daylight. *Journal of the Optical Society of America*, 31(1) : 3.
- Thomas A., Bouffieux O., Geurickx D. et Brasseur R. (2001). Pex, analytical tools for PDB files. I. GF-Pex: basic file to describe a protein. *Proteins*, 43 : 28-36.
- Thomas P. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 77(9) : 5201-5.
- Thompson J. D., Plewniak F. et Poch O. (1999). A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res.*, 27 : 2682-2690
- Thompson J. D., Thierry J. C. et Poch O. (2003). RASCAL: rapid scanning and correction of multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 19 : 1155-1161.
- Tomasz A., Drugeon H. B., De Lencastre H. *et al.* (1989). New mechanism for methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 : 1869-1874.
- Tomasz A., Nachman S. et Leaf H. (1991). Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.*, 35 : 124-129.
- Touaitia R. (2016). *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline: Emergence et mécanismes de résistance. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba. Faculté Des Sciences, Département de Biochimie.
- Trouillet S. (2011). Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Mémoire: Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche école pratique des hautes études.
- Uhlik O., Strejcek M., Junkova P., Sanda M., Hroudova M., Vlcek C. *et al.* (2011). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)–Time of Flight Mass Spectrometry and MALDI Biotyper-Based Identification of Cultured Biphenyl-

- Metabolizing Bacteria from Contaminated Horseradish Rhizosphere Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 : 6858–6866.
- Van Baar B.L. (2000). Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24 : 193-219.
- Van Knippenberg P. H. et Hilbers C W. (1986). Structure et Dynamics of RNA.
- Van Veen S. Q., Claas E. C. et Kuijper E. J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 48(3) : 900-7.
- Vieu G. (2014). Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Etude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université Paul Sabatier, Toulouse.
- Voet D. et Voet J. G. (2011). *Biochemistry*. John Wiley & Sons. ISBN : 978-2-8041-7101-8. 607-610.
- Vogel C., Teichmann S. A. et Chothia C. (2004). Looking at the bigger picture. *Development*, 131(10) : 2238-2240.
- Waldispuhl J. (2004). Modélisation et Prédiction de la Structure des Protéines Transmembranaires. Thèse de Doctorat en informatique. Ecole polytechnique, France.
- Ward D. M., Bateson M. M. Weller R. et Ruff-Roberts A. L. (1992). Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv. Microb. Ecol.*, 219-286.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. et Lane D. J. (January 1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *Journal of Bacteriology*, 173 (2) : 697-703.

- Welker M. et Moore E. R. B. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34 : 2-11.
- Wieser A., Schneider L., Jung J. et Schubert S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93 : 965-974.
- Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2) : 221-271.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105/>
- Xiaoguang W., Lin O., Lingfei L., Jiqian L., Chiping S., Cuizhen L., Hongjing Y. et Ping W. (2016). Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolates in a hospital of shanghai. Oncotarget, Advance Publications.
- Yang A. S. et Honig B. (2000). An integrated approach to the analysis and modeling of protein sequences and structures. i. protein structural alignment an a quantitative measure for protein structural distance. *Journal of Molecular Biology*, 301 : 665-678.
- Yang A. S. et Honig B. (2000). An integrated approach to the analysis and modeling of protein sequences and structures. III. A comparative study of sequence conservation in protein structural families using multiple structural alignments. *J. Mol. Biol.*, 301(3) : 691-711.
- Zhang J. H., Wu L. Y. et Zhang X. S. (2003). Reconstruction of DNA sequencing by hybridization. *Bioinformatics*, 19(1) : 14-21
- Zhang K., McClure J. A., Elsayed S., Louie T. et Conly J. M. (2005). Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 43(10) : 5026.
- Zuker M. et Stiegler P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Research*, 9(1) : 133-48.

Annexes

Annexe A

Composition du tampon de lyse TENT :

- 0,2 mL de Tampon TRIS 1 M pH 8.0 ;
- 4 mL de NaCl 0,5 M ;
- 40 μ L d'EDTA 0,5 M ;
- 5 mL de Triton X100 à 20% ;
- 10,76 mL H₂O qsp.

Annexe B

Résultats du blastN des séquences nucléiques de l'ADNr 16S *et*
mecA des 21 isolats de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 10 : Confrontation par Blast des 21 séquences du gène ADNr 16S

Souche	Séquences	Taille pb	% couverture	% identité	E-value	Nom du Blast
LISC1	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTGCGCATTTCC ACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGCGGTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGC	746	99	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
LISC2	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTGCGCATTTCC ACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGCGGTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGCGA	747	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
PMC1	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTGCGCATTTCC ACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGCGGTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGC	745	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>

LPKC1	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTTACGCCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCAGCGGGCTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAAATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGGC	744	99	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
LISC3	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTTACGCCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCAGCGGGCTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAAATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGCA	746	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
PMC2	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTTACGCCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCAGCGGGCTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAAAATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGC	745	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTTACGCCCAATAAT	745	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>

LISC4	TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACCTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGC					
PMC3	CATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAATAATTCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCC TACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGT CCGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACCTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGCAG	749	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
LISC5	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCA CCGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACCTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCA	746	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
	TTTCGCATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCCAATAATTCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGATCCTTCTGATTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGA	753	99	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>

LPKC2	GATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCTATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACCTTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTACCCCGTCCGCCGTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGGCAG					
PMC4	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTCCACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGA TCCGAAGACCTTCACTACTCACGCGCGGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACCTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGC	745	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
PMC5	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTCCACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGA TCCGAAGACCTTCACTACTCACGCGCGGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACCTTTGAACCATGCGGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAG	744	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
LISC6	CTTTCGCTCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAAT GACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTACG CCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGT GGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAACA GAGCTTACGATCCGAAAACCTTCACTACTCACGCGCGGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCG GAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCA CCCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTAGCCRTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCG CGGTTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCACCTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAAACAAGCA	752	100	99	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>

	TCCGGTATTAGCCCCGTTTCCCGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA CCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCAC GCCGCCAGCGTTTCGTCTGAG					
LISC7	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCGACG	744	99	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
LISC8	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAG	744	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
LPKC3	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTTACGCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT	745	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>

	TCATCCTGAGC					
PMC6	GCTTTCGCTCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTC TACGCATTTACCCGTACACGTGGAATTCACCTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAA TGACCCCTCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTAC GCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG TGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTGCAACGGTACTTGTCTTCCCTAAACAAC AGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGC GGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC ACCCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCRTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCC GCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTCAAACAAGC ATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTC ACCCGTCCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCA CGCCGCCAGCGTTCGTCTGAC	753	100	99	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
LISC9	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCACCTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA TTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACGA TCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACCTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGCATG	748	99	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
PMC7	TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTC ACCGCTACACATGGAATTCACCTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCCAATAAT TCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGG TTAGGTACCGTCAAGACTTGTTCACTAATAACAAATTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTACGA TCCTAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCT ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTC GGCTACGTATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGGTCCATCT ATAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTCAACATTGAACCATGCGGTTCAATATATTATCCGGTATTAG CCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGC CTAACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCATCTGTTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC GTTTCATCCTGAGC	746	99	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>
	CATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATT TCACCGCTACACATGGAATTCACCTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCC	748	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>

LPKC4	<p>ACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAATAA TTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTG ATTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACG ATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCC TACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCCTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGT CGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGCA</p>					
PMC8	<p>CTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATT CACCGTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCC ACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAATAA TTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTG ATTAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTACG ATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCC TACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCCTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGT CGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGATCCATCT ATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCT CCGGTTTCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGTAGGTTATCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCT AACATCAGAGAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT TCATCCTGAGCA</p>	748	100	100	0.0	<i>Staphylococcus aureus</i>

Tableau 2: Confrontation par Blast des 21 séquences du gène *mecA*

Souche	Séquences	Taille pb	% couverture	% identité	E-value	Nom du Blast
LISC1	TATGCTTACAAAGATAAAAGAAATTAATAATACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTT ATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAA TATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAAAGTATCTAAAAATA AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACAACTACGGTAAACATTGATCGCAACGTTCAATTTA ATTTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATCCAGGAATGCAGAA AGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAAACAATGTGGA ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGCTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAAATGGATCAAAAATGGGTACA AGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAAA TTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAAGTCGTAACATATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAACCTGAAAGAATTAACAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAAATTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTC CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAAG ATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAAGTTCAAAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTAAGTCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT CCATTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTCCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACGCAATGATTGGGTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAAGATAAATCTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA AAAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAAATGGGTGGTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGTGTGTTACTT CTCCCTAAATACAATTTCTTCAATTTCTATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTCAAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTTAATAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACAACCTTCTTCTCCGAC	2202	99	99	0.0	<i>mecA</i>
	GTTGGTAATATTTTATGCTTCAAAGATAAAAGAAATTAATAATACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAAT TTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAAC GTCCGATAAAAAATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAAAG	2214	99	99	0.0	<i>mecA</i>

LISC2	<p>TATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTTAAAACAAACACTACGGTAACATTGATCGCA ACGTTCAATTTAATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTC AGGAATGCAGAAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCG AAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAA AAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCA AAATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGAT TTCGCAAAAAAATTTTCATCTTACAACCTAATGAAACAGAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACTT CACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACCTCTGAAGAATTTAAAAAAGAAATATAAAGGCTATAA AGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGG CTATCGTGCACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAA AGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAAAGAGTATTATAACAACATGAAAAA TGATTATGGCTCAGGTAAGTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCAT ATGACGCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAG AACCTCTGCTCAACAAGTTCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGAT TGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGA TAAATCTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGC AATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAAATTTGAAAA GGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAA ACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCC AGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA GACACGAAAAACAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGT ATGCAACAAGTCGTAATAAAAAACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAAT CCGGTACTGCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTTATATCATATG ATAAAGATAATCCAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCT ACAATGCCAAAAATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAG ATGAATAACAAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAA GTGCTGTTACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACGAGT CCATTTCTTTTTTATGGATTTCTATTTGTAATTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACA GGTTAATAAATTTAACGTTATTCATTTGTGTCTGCTACACTTTCTTCTCCGA</p>					
PMC1	<p>TATGCTTNCAGATAAAGAAATTAATAATACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTTA TAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAAAT ATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAAAGTATCTAAAAATAA AAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTTAAAACAAACACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAAT TTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCAGGAATGCAGAAAAG ACCAAAGCATACATATTGAAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAAACAATGTGGAAT TGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAGATTATAAAG CAATCGTAAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCAAAAAGTGGGTACAAG ATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTTCGCAAAAAAAT TCATCTTACAACCTAATGAAACAGAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGT TATGTTGGTCCCATTAACCTCTGAAGAATTTAAAACAAAAAGAAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAGTT ATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTACACA</p>	2200	99	99	0.0	<i>mecA</i>

	<p>ATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAGAT ATTCAAATAACTATTGATGCTAAAAGTTCAAAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAG GTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTATCCA TTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAAC AAGTTCAGATTACAACCTCACCAGGTCAACTCAAAAAATTAACAGCAATGATTGGGTAAATAACA AAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAAGATAAATCTTGGGGTG GTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCATCAG ATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAACT AGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGAT AATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTT CAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCATTATTAAGACACGAAAAACA AAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTAACGTATGGTATGCAACAAGTCGT AAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAATCCGGTACTGCAGA ACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCC AAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAAAT CTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAAAA CAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTTCT CCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACATTGTAACGAGTCCATTTCTTTTTT ATGGATTCTTATTGTAAATTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAATTT AACGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACACTTCTCTCCGA</p>					
LPKC1	<p>TATGCTTTCAAAGATAAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTT ATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAA TATATAATAGTTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATA AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTA ATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATCCAGGAATGCAGAA AGACCAAAGCATACATATTGAAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAACAATGTGGA ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGCTAAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAATGGATCAAAATTTGGGTACA AGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTGCAAAAAAA TTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAACCTGAAGAATTAACAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTC CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAG ATATTCAAATAACTATTGATGCTAAAAGTTCAAAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT CCATTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTTCAGATTACAACCTCACCAGGTCAACTCAAAAAATATTAACGCAATGATTGGGTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAAGATAAATCTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTT</p>	2201	99	99	0.0	<i>mecA</i>

	<p>AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA AAAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGGAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAATATCAATCTATTA ACTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAAAACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAAATTGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTT CTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTTCTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTCAAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACACTTTCTTCTCCGA</p>					
LISC3	<p>TAGTGTAGTGTCCCGGTTGGTAATATTTTATGCTCAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCA ATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAG TAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATAAAAACATTCAGGATC GTAAAATAAAAAAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTA AAAACAAAACACTACG GTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCA TAGCGTCATTATCCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATAACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGG TAAAATTTTAGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCC AAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAA ACAACAAATGGATCAAAATTTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGA TGAATATTTAAGTGATTTTCGCAAAAAAATTTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACATACT CTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTA AAAACAAAAG AATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGC TCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAAT AGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAGATATTCAACTAATATTGATGCTAAAAGTTCAAAAAGAGTATTTA TAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTAAGTCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTT GTAAGCACACCTTCATATGACGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTA CCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTCAACTTCACCAGGTTCAACTCAAAAAA TATTAACAGCAATGATTGGGTTAAATAACAAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTA AAGGTTGGCAAAAAAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATA TCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAG TAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTAT AATGCTCAAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTG AAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGC ACCTCACTTATTA AAAAGACACGAAAAACAAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAATATCAA TCTATTA ACTGATGGTATGCAACAAGTCGTAAATAAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCA AACTTAATTGGCAAAATCCGGTACTGCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATGGG TGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATA AAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATA AAAAATACGATATAGATGAATAACAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATT ATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTG</p>	2229	99	99	0.0	<i>mecA</i>

	ACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTTTATGGATTTCTATTTGTAATTTACAGCGATAACGTACAATGTAT TACCTGGGTATACAGGTTAATAAAATTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACACTTCTCTCCGA					
PMC2	TATGCTTACAAAGATAAAAGAAATTAATAATACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTT ATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAA TATATAATAGTTTAGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATA AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTA ATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATCCAGGAATGCAGAA AGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAATTTTAGACCGAAAACAATGTGGA ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGTAAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCAAAAATGGGTACA AGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAAA TTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACATATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAACCTGAAAGAATTAACAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAAAGTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTA CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAAG ATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT CCATTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTCCAGATTACAACTTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACGCAATGATTGGGTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAACAAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAAATGCTCAAAATTTCAAACAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA AAAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGAAGAAAAATATTTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTA ACTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAAATGGGTGGTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTATTATGAATTATTAATAAGTGTGTTACTT CTCCCTTAAATACAATTTCTTCAATTTTCTATTGATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACAACCTTCTCTCCG	2200	99	99	0.0	<i>mecA</i>
	TATGCTTACAAAGATAAAAGAAATTAATAATACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTT ATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAA TATATAATAGTTTAGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATA AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTA ATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATCCAGGAATGCAGAA AGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAATTTTAGACCGAAAACAATGTGGA ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGTAAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCAAAAATGGGTACA AGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAAA TTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACATATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAACCTGAAAGAATTAACAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAAAGTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTA CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAAG ATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT CCATTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTCCAGATTACAACTTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACGCAATGATTGGGTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAACAAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAAATGCTCAAAATTTCAAACAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA AAAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGAAGAAAAATATTTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTA ACTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAAATGGGTGGTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTATTATGAATTATTAATAAGTGTGTTACTT CTCCCTTAAATACAATTTCTTCAATTTTCTATTGATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACAACCTTCTCTCCG	2201	99	99	0.0	<i>mecA</i>

LISC4	<p>ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGCTAAAAGAAGTAAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCAAAAATTGGGTACA AGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTTCGCAAAAAA TTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACATATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAACCTGAAAGAATTAACAAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAAAGTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTC CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAG ATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT CCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTCCAGATTACAACCTCCACCAGTTCAACTCAAAAAATATTAACGCAATGATTGGGTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAACAAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAAGATAAATCTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTATTATCCATTTTATAATGCTCAAAATTTCAAAACAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA AAAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAAATCAATCTATTA ACTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACCTAATGGCAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTATTATGAATTATTAATAAGTGTGTTACTT CTCCCTAAATACAATTTCTTCAATTTTCATTTGATTTGAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACAACCTTCTTCTCCGA</p>					
PMC3	<p>TATGCTTACAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTT ATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAA TATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAGTATCTAAAAATA AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTA ATTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCAGGAATGCAGAA AGACCAAAGCATACATATTGAAAAATTTAAAAATCAGAACGTGGTAAAATTTTAGACCGAAACAATGTGGA ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGCTAAAAGAAGTAAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCAAAAATTGGGTACA AGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTTCGCAAAAAA TTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACATATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAACCTGAAAGAATTAACAAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAAAGTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTC CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAG ATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT</p>	2199	99	99	0.0	<i>mecA</i>

	<p>CCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTTCAGATTACAACTTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACGCAATGATTGGGTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA AAAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAATATCAATCTATTA ACTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAA ACTTAATTGGCAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAAATGGGTGGTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGTGTGTTACTT CTCCCTAAATACAATTTCTTCAATTTTCATTGATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACAACCTTCTCTCC</p>					
LISC5	<p>GTTGGTAAAATTTTATGCTTCAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAAT TTCAAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAAC GTCCGATAAAAAATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAAAG TATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTA AAAACAACTACGGTAAACATTGATCGCA ACGTTCAATTTAATTTTGTAAAGAAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCC AGGAATGCAGAAAAGACCAAGCATACATATTGAAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTTAGACCG AAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAA AAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAAGA ACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCA AAATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGAT TTCGCAAAAAATTTTCACTTACA ACTAATGAAACAGAAAAGTCGTA ACTATCCTCTAGAAAAAGCGACTT CACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTA ACTCTGAAGAATTA AAAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAA AGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGG CTATCGTGCACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAA AGATGGCAAAGATATTCAACTA ACTATTGATGCTAAAAGTTCAAAGAGTATTATAACAACATGAAAAA TGATTATGGCTCAGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTGTGAAGCACACCTTCAT ATGACGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAG AACCTCTGCTCAACAAGTTCAGATTACA ACTTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGAT TGGGTAAAATAACAAAACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGA TAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGC AATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAA GGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAA ACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTACAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCC AGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA AAA GACACGAAAAACAAGTTTGAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAATATCAATCTATTA ACTGATGGT</p>	2215	99	99	0.0	<i>mecA</i>

	<p>ATGCAACAAGTCGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACCTTAATTGGCAAAT CCGGTACTGCAGAACTCAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATTGGGTGGTTATATCATATG ATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCT ACAATGCCAAAATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAG ATGAATAACAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAA GTGCTGTACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGT CCATTTCTTTTTTATGGATTTCTTATTTGTAATTTTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACA GGTTAATAAAATTAACGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACAACCTTTCTTCTCCGA</p>					
<p>LPKC2</p>	<p>GGTTGGTAATATTTTATGCTTCAAAGATAAAGAAATTAATAATACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAA TTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAA CGTCCGATAAAAAATATAAATAGTTTAGCGTTAAAGATAAAAACTCAGGATCGTAAAATAAAAAAA GTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACACTACGGTAACATTGATCGC AACGTTCAATTTAATTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTC CAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACC GAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTA AAAAAGATTATAAAGCAATCGTAAAAGAATAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAAATGGATC AAAATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGA TTTCGCAAAAAATTTTCACTTACAATAATGAAACAGAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACT TCACATCTATTAGTTATGTTGGTCCCATAACTCTGAAGAATTAACAACAAAAGAATATAAAGGCTATA AAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATG GCTATCGTGTCAACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAA AAGATGGCAAAAGATTTCACTAATGCTAATGCTAAAGTTCAAAGAGTATTATAACAACATGAAAA ATGATTATGGCTCAGGTACTGCTATCCACTCAAACAGGTGAATTTAGCACTTGTAAAGCACACCTTC ATATGACGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAAATAAATAACCGAAGATAAAAA AGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATG ATTGGGTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAAAAAGTTATAAAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAA GATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAATCGACTTAAACAA GCAATAGAAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAA AAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAAATTC AAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAAC CCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAA AAGACACGAAAAACAAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTAACGTATG GTATGCAACAAGTCGTAAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACCTTAATTGGCAA ATCCGGTACTGCAGAACTCAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATTGGGTGGTTATATCATA TGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAG CTACAATGCCAAAATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATAT AGATGAATAACAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAAT AAGTGCTGTACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGA GTCCATTTCTTTTTTATGGATTTCTTATTTGTAATTTTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATA CAGGTTAATAAAATTAACGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACAACCTTTCTTCTCCGA</p>	<p>2216</p>	<p>99</p>	<p>99</p>	<p>0.0</p>	<p><i>mecA</i></p>

<p>PMC4</p>	<p>TATGCTTCAAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAATTTCAAACAAGTTT ATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAA TATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATAAAAAATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAGTATCTAAAAATA AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTA ATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCAGGAATGCAGAA AGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAAATCAGAACGTGGTAAAATTTTAGACCGAAACAATGTGGA ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAAGAAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGCTAAAAGAATAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAATGGATCAAAAATGGGTACA AGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTCGCAAAAAA TTTTCATTTACAACAAATGAAACAGAAAGTCGTAACATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAACCTCGAAGAATTAACAACAAAAAGAAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAAATTTACGATAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTC CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAG ATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTACTGCTATCCACCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT CCATTATGATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTTCAGATTACAACCTCACAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGAAAA ACAAAAGTTTGAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAAAACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTT CTCCCTAAATACAATTTCTTCAATTTTCATTGTATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTTAATAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACACTTCTCTCCGA</p>	<p>2201</p>	<p>99</p>	<p>99</p>	<p>0.0</p>	<p><i>mecA</i></p>
<p>PMC5</p>	<p>TGTAANATTTTATGCTTCAAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAATTTT AAACAAGTTTATAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGT CCGATAAAAAATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAGTA TCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACAACTACGGTAACATTGATCGCAAC GTTCAATTTAATTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATCCAG GAATGCAGAAAAGCCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAAATCAGAACGTGGTAAAATTTTAGACCGAA ACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAAGAAATGTATCTAAAA AAGATTATAAGCAATCGCTAAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAACAACAATGGATCAAA ATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATT</p>	<p>2210</p>	<p>99</p>	<p>99</p>	<p>0.0</p>	<p><i>mecA</i></p>

	<p>CGCAAAAAATTCATCTTACAAC TAATGAAACAGAAAAGTCGTAAC TATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCA CATCTATTAGGTTATGTTGGTCCATTAAC TCTGAAGAATTA AACCAAAAAAGAAATATAAAGGCTATAAAAG ATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAA CTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCT ATCGTGCACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAAG ATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTC AAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATG ATTATGGCTCAGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATAT GACGTCTATCCATTATGATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAA CCTCTGCTCAACAAGTTCAGATTACAAC TTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTG GGTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAAGATA AATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAGCAA TAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGG CATGAAAAAAGTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAAATTTCAAAC AAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATT CAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAG TACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGA CACGAAAAACAAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATT TCCAAAAGAAAAATCAATCTATTAACGTATGGTAT GCAACAAGTCGTAAATAAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAATCC GGTACTGCAGAACTCAAAATGAAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTTGGGTGGTTTATATCATATGAT AAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTAC AATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGAT GAATAACAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGT TGTCTACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGT GCTGTACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTCATT TTTCAATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACGAGTCC ATTTTCTTTTTTATGGATTTCTTATTTGTAATTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGG TTTAATAAATTTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACAAC TTTCTCTCCG</p>					
LISC6	<p>TATGCTTACAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTT ATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAA TATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATA AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTA AAAACA AACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTA ATTTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATCCAGGAATGCAGAA AGACCAAAGCATACATATTGAAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAAACAATGTGGA ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAAGAAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAAATGGATCAAAATTTGGGTACA AGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAA AATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAAA TTTCATCTTACAAC TAATGAAACAGAAAAGTCGTAAC TATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAAC TCTGAAGAATTA AAAACA AAAAAAGAAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAA CTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCA CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAAGATGGCAAAG ATATCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTC AAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT CCATTTATGATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTCCAGATTACAAC TTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAAACAGTTATAAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAAGATAAATCTTGGG</p>	2202	99	99	0.0	<i>mecA</i>

	<p>GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGGGAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAAAACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTT CTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACGGGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACAACCTCCTTCTCCGA</p>					
LISC7	<p>TATGCTTACAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTT ATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAA TATATAATAGTTTtaggcgTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAGTATCTAAAAATA AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTA ATTTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATCCAGGAATGCAGAA AGACCAAAGCATAATTTGAAAAATTAATAACAGAACGTTGGTAAAAATTTAGACCGAAACAATGTGGA ATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAA AGCAATCGTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAACAACAATGGATCAAAATTTGGGTACA AGATGATACCTTCCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAAA TTTCATCTTACAACATAAAGAACAGAAAGTCGTAACATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAG GTTATGTTGGTCCCATTAACCTGAAAGAATTAACAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAG TTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCA CAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAAGATGGCAAAG ATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAAGTTCAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTC AGGTAAGTGTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTAATAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTAT CCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTTCCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAAACAGTTATAAAATCGATGGTAAAGTTGGCAAAAAAGATAAACTTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGGGAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAAAACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAATCCGGTACTGCA GAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA</p>	2202	99	99	0.0	<i>mecA</i>

	ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTT CTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTTAATAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACAACCTTTCTTCTCCGA					
LISC8	TATGCTTACAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTT TATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCGGATAAAAA ATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAGTATCTAAAAAT AAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAACAACACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTT AATTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATCCAGGAATGCAGA AAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAAACAATGTGG AATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAAGAAATGTATCTAAAAAAGATTATA AAGCAATCGTAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAACAACAATGGATCAAAAATGGGTAC AAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTAAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCGCAAAAA ATTTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTA GGTTATGTTGGTCCCATTAACCTGAAAGAATTAACAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCA GTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCT ACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACAATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAA GATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAAGTTCAAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCT CAGGACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTA TCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC AACAAGTTCCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTAAATA ACAAAACATTAGACGATAAAAACAAAGTTATAAAAATCGATGGTAAAGTTGGCAAAAAAGATAAATCTTGGG GTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCAT CAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAA AACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTT AGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATC CTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGAAAA ACAAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAAGAAAAATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACAAGT CGTAAATAAAAACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAATCCGGTACTGCA GAACCTAAAAATGAAACAAGGAGAAAACCTGGCAGACAAAATGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAAT CCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAA ATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAA AACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTTACTT CTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTT TTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAAT TTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACAACCTTTCTTCTCCGA	2203	99	99	0.0	<i>mecA</i>
	TTGGTATATATTTTATGCTTCAAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAAT TTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAAC GTCCGATAAAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAG	2214	99	99	0.0	<i>mecA</i>

<p>LPKC3</p>	<p>TATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTTAAAACAAACACTACGGTAACATTGATCGCA ACGTTCAATTTAATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTC AGGAATGCAGAAAAGCCAAAGCATAACATATTGAAAATTTAAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCG AAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAA AAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAATAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCA AAATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGAT TTCGCAAAAAAATTTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAAGTCGTAACATCCTCTAGAAAAAGCGACTT CACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACCTCTGAAGAATTTAAAAAAGAAATATAAAGGCTATAA AGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGG CTATCGTGTACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAA AGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTCAAAAAGAGTATTATAACAACATGAAAAA TGATTATGGCTCAGGTAAGTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCAT ATGACGCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAG AACCTCTGCTCAACAAGTTCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGAT TGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGA TAAATCTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGC AATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAAATTTGAAAA GGCATGAAAAAAGTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAA ACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCC AGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA GACACGAAAAACAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTAACCTGATGGT ATGCAACAAGTCGTAATAAAAAACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAAT CCGGTACTGCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTTATATCATATG ATAAAGATAATCCAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCT ACAATGCCAAAAATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAG ATGAATAACAAAAAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTATTATGAATTATTAATAA GTGCTGTACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACGAGT CCATTTCTTTTTTATGGATTTCTATTTGTAATTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACA GGTTAATAAATTTAACGTTATTCATTTGTGTCTCTGCTACAACCTTCTCTCCGA</p>					
<p>PMC6</p>	<p>TATGCTCCAAAGATAAAGAAATTAATAATACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTTA TAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAAAT ATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAAAGTATCTAAAAATAA AAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTTAAAACAAACACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAAT TTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCAGGAATGCAGAAAAG ACCAAAGCATAACATTTGAAAAATTTAAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAAACAATGTGGAAT TGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAG CAATCGTAAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAAACAACAAATGGATCAAAAATGGGTACAAG ATGATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTTCGCAAAAAAAT TCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGT TATGTTGGTCCCATAACTCTGAAGAATTTAAAAAAGAAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAGTT ATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTACA</p>	<p>2210</p>	<p>99</p>	<p>99</p>	<p>0.0</p>	<p><i>mecA</i></p>

	<p>ATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAGAT ATTCAAATAACTATTGATGCTAAAAGTTCAAAAAGAGTATTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAG GTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGTCTATCCA TTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAAC AAGTTCAGATTACAACCTCACCAGGTCAACTCAAAAAATTAACAGCAATGATTGGGTTAAATAACA AAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAAGATAAATCTTGGGGTG GTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCATAGAATCATCAGA TAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAACTA GGTGTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAATTTAGATA ATGAAATATTATTAGCTGATTACGGTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTC AATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGAAAAACAA AGTTTGGAAGAAAAATATTTTCCAAAGAAAAATCAATCTATTAAGTATGGTATGCAACAAGTCGTA AATAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAATCCGGTACTGCAGAAC TCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTTATCATATGATAAAGATAATCCAA ACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATCT CAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAAAACA GTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGTGCTGTACTTCTCC CTTAAATACAATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTTTAT GGATTTCTTATTGTAATTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTTAAATAAATTTAA CGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACACTTCCTTCTCCGATTCTCTCCGA</p>					
LISC9	<p>TTGGTATATATTTTATGCTTCAAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAAT TTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAAC GTCCGATAAAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAAAAG TATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTAAAAACAAACTACGGTAAACATTGATCGCA ACGTTCAATTTAATTTTGTAAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCC AGGAATGCAGAAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCG AAACAATGTGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAA AAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAAATGGATCA AAATTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGAT TTCGCAAAAAAATTTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACTT CACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACCTGGAAGAATTAACAACAAAAAGAATATAAAGGCTATAA AGATGATGACAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGG CTATCGTGTACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAA AGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAAAGAGTATTATAACAACATGAAAAA TGATTATGGCTCAGGTAAGTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCAT ATGACGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAG AACCTCTGCTCAACAAGTCCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGAT TGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAAG TAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGC AATAGAATCATCAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAA GGCATGAAAAAAGTGGTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTATAATGCTCAAATTTCAA</p>	2214	99	99	0.0	<i>uecA</i>

	<p>ACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCC AGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA GACACGAAAAACAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTA ACTGATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAAAACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTT AATTGGCAAAATCCGGTACTGCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATTTGGG TGGTTATATCATATGATAAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACA AAGATAAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAAATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATG AGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAACAAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGAT GGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAATGTGCTGTTACTTCTCCCTTAAATACA AATTTCTTCATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCTTTTTTATG GATTTCTATTTGTAATTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAA ATTTAACGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACAACCTTCTCTCCGA</p>					
<p>PMC7</p>	<p>ATCAGGTTATTTTATGCTTCAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAA ATTCAAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAAT GACTGAACGTCCGATAAAAAATATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCG TAAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTA AAAACA AACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAATTTGTAAAAGAAAGATGGTATGTGGAAG TTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCCAGGAATGCAGAAAAGACCAAAGCATACATATTGAA AATTTAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGA ACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAA AGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAACAACAAATGGATCAAATTTGGGTACAAGATGA TACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTTCGCAAAA AAATTTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACT TACATCTATTAGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTA AAAACA AAAAAGAATATAA AGGCTATAAAGATGATGCAAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAG CTCAACATGAAGATGGCTATCGTGTACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATA CTTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCA AAAAGAGTATTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTAAGTATCCACCCTCAAACAG GTGAATTATTAGCACTGTAAAGCACACCTTCATATGACGCTATCCATTATGTATGGCATGAG TAACGAAGAATATAATAAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAG ATTACAACCTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATGGGTTAAATAACA AAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAAT CTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACA AGCAATAGAATCATCAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAAT TTGAAAAAGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATA ATGCTCAAAATTTCAAACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGG ACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATA AATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGAAAAACAAGTTTGGAAAGAAAAAT ATTATTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTAACTGATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAAA ACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAAATTGGCAAAATCCGGTACTGCAG AACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATTTGGGTGGTTATATCATATGATAA AGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAAGGAATGG CTAGCTACAATGCCAAAAATCTCAGGTAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATA AAAAATACGATATAGATGAATAACAAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCA CTGTTTTATTATGAATTATTAATAAATGTGCTGTTACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTC ATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACGAGT</p>	<p>2210</p>	<p>99</p>	<p>99</p>	<p>0.0</p>	<p><i>mecA</i></p>

	CCATTTCTTTTTTATGGATTCTTATTTGTAATTCAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAATAAATTTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACAACCTGCATCG					
LPKC4	ACATTGGTATATATTTTATGCTTCAAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAA AATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTG AACGTCGATAAAAAATATAAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAA AAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTA AAAACAAACTACGGTAAACATTGATC GCAACGTTCAATTTAATTTTGTAAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTAT TCCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATAACATATTGAAAATTTAAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGA CCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATC TAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAAGTAACTTCTGAAAGACTATATCAAACAACAAATGGA TCAAAATTTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTAAAAAAAATGGATGAATATTTAAGT GATTTTCGCAAAAAATTTCACTTCAACTAATGAAACAGAAAAGTTCGTAACATCCTCTAGAAAAAGCGA CTTCACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTA AAAACAAAAAGAAATATAAAGGCTA TAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGACTCGAAAAA ACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGA TGGCTATCGTGTACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAA AAAAGATGGCAAAAGATATTTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAAAGAGTATTTATAACAACATGAA AAATGATTATGGCTCAGGTAAGTCTATCCACCCTCAAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCT TCATATGACGTCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAA AAGAACCCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACCTCACAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAAT GATTGGGTTAAATAACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTAAAGGTTGGCAAAA AGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAATATCGACTTAAAAACA AGCAATAGAATCATCAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAA AAAGGCATGAAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTATAATGCTCAAATTT CAAACAAAAATTTAGATAATGAAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTA CCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTA AAAGACACGAAAAACAAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATCAATCTATTAAGTAT GGTATGCAACAAGTTCGTAATAAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCA AATCCGGTACTGCAGAACTCAAAAATGAAACAAGGAGAAACTGGCAGACAAATGGGTGGTTATATCAT ATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTA GCTACAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAAATAAAAAATACGATA TAGATGAATAACAAAAACAGTGAAGCAATCCGTAAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTTAA TAAGTGCTGTACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTCAATTTTCATTGTATGTTGAAAGTGACACTGTAACG AGTCCATTTCTTTTTTATGGATTCTTATTTGTAATTTCAAGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTAT ACAGGTTAATAAATTTAACGTTATTCATTTGTGTTCTCTGCTACAACCTTCTTCCGATGCA	2221	99	99	0.0	<i>mecA</i>
	TACGGATATGCTTACAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAAC AAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCGGAT AAAAATATAAATAGTTTAGGCGTTAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAAATAAAAAAGTATCTAA AAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAAATTA AAAACAAACTACGGTAAACATTGATCGCAACGTTCA ATTTAATTTTGTAAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCAGGAATG CAGAAAGACCAAAGCATAACATATTGAAAATTTAAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAACAAT	2211	99	99	0.0	<i>mecA</i>

PMC8

GTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGAT
TATAAAGCAATCGCTAAAGAACTAAGTATTCTGAAGACTATATCAAACAACAATGGATCAAAATGG
GTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTTAAAAAATGGATGAATATTTAAGTGATTTCCGCAA
AAAAATTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCT
ATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTAACAAAAAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGAT
GCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGT
GTCACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGC
AAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAAGTTCAAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATG
GCTCAGGTAAGTCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGT
CTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCT
GCTCAACAAGTTCCAGATTACAACCTCACAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAATGATTGGGTTA
AATAACAAAACATTAGACGATAAAAACAAGTTATAAAAAATCGATGGTAAAAGGTTGGCAAAAAGATAAAATCT
TGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAA
TCATCAGATAACATTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGA
AAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCAAACAAAAA
TTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAACCCAGTACAG
ATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATAATGGCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGA
AAAACAAAGTTTGAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATATCAATCTATTAAGTATGGTATGCAAC
AAGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACCTAATTGGCAAATCCGGTAC
TGCAGAACTCAAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATTGGGTGGTTATATCATATGATAAAGA
TAATCCAAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGC
CAAAATCTCAGGTAAAGTGTATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATA
ACAAAACAGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTTATTATGAATTATTAATAAGTGTGTT
ACTTCTCCCTTAAATACAATTTCTTCAATTTTCAATTTGATGTTGAAAAGTGACACTGTAACGAGTCCATTTCT
TTTTTATGGATTTCTTATTTGTAATTTACGCGATAACGTACAATGTATTACCTGGGTATACAGGTTAAT
AAATTTAACGTTATTCATTTGTGTTCTGCTACAACCTTCTTATCCGTAGC

Annexe C

Alignement multiple des séquences génomiques de l'ADNr 16S *et MecA* des 21 isolats de *S. aureus*.

Annexe D

Scripts pour la modélisation comparative

Fichiers utilisés pour la modélisation de la structure de la PLP2a de l'isolat LISC8 sur la base de la structure expérimentale de la PLP2a code PDB : 1VQQ par le programme MODELLER :

Le fichier de commande 'LISC8.ali'

```
>P1;LISC8
sequence:LISC8:::::0.00: 0.00
MLTKDKEINNTIDAIEDKNFKQVYKDSYISKSDNGEVEMTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVKSNKRVDAQYK
IKTNYGNIDRNVQFNFKEDGMWKLWDHVSIIIPGMQKQDSIHENLKSERGKILDRNNVELANTGTAYEIGIVPKNV
SKKDYKAIKEL SISEDYIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVKKMDEYL SDFAKKFHL TTNETESRNYPLEKATSHLLGYV
GPINSEELKQKEYKGYKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEGVRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDGDQDIQLTIDAKVQK
SIYNNMKNDYGGSTAHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMYGMSNEEYNKLTEDKKEPLL NKFQITTS PGSTQKILTAMI
GLNNTLDDKTSYKIDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNGNIDLKQAIESSDNIFARVALELGSKKFEKGMKKLGVGE
DIPSDYPFYNAQISKNLDNEILLADSGYGQGEILINPVQILSIYSALENNGNINAPHLKDTKNKVWKKNIISKENI
NLLTDGMQQVNVNKT HKEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVKDQVQDKGMASYN
KISGVYDELYENGNKKYDIDE*
```

Le fichier de commande 'align2d.py'

```
from modeller import *
env = environ()
aln = alignment(env)
mdl = model(env, file='1vqq', model_segment=('FIRST:A','LAST:A'))
aln.append_model(mdl, align_codes='1VQQ', atom_files='1vqq.pdb')
aln.append(file='LISC8.ali', align_codes='LISC8')
aln.align2d()
aln.write(file='LISC8-1vqq.ali', alignment_format='PIR')
aln.write(file='LISC8-1vqq.pap', alignment_format='PAP')
```

Le fichier de commande 'model-single.py'

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *
#from modeller import soap_protein_od
env = environ()
a = automodel(env, alnfile='LISC8-1vqq.ali',
              knowns='1VQQ', sequence='LISC8',
              assess_methods=(assess.DOPE,
                              #soap_protein_od.Scorer(),
                              assess.GA341))
a.starting_model = 1
a.ending_model = 5
a.make()
```


Fichiers utilisés pour la modélisation de la structure de la PLP2a de l'isolat PMC1 sur la base de la structure expérimentale de la PLP2a code PDB : 1VQQ par le programme MODELLER:

Le fichier de commande 'PMC1.ali'

```
>P1;PMC1
sequence:PMC1::::: 0.00: 0.00
MTERPIKIYNSLGVKDINIQRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYGNIDRNVQFNFVKEDGMWKLWDHDSVIIPGM
QKDQSIHIEKLGKSERGKILDRNNVELANTGTAYEIGIVPKNVSKDYKAIKEL SISEDYIKQQMDQKWVQDDTF
VPLKTVKKMDEYL SDFAKKFHL TTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYKGYKDDAVIGKKGLEKL
YDKKLQHEDGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKKDGKDIQLTIDAKVQKSIYNNMKNDYSGTAIHPQTGELLALV
STPSYDVYPFMYGMSNEEYNKLTEDKKEPLL NKFQITTSFGSTQKIL TAMI GLNKTLD DKT SYKIDGKGWQKDK
SWGGINVTRYEVVNGNIDLKQAI ESSDNIF FARVALELGSKKFEKGMKLG VGEDIPSDYPFYNAQISNKNLDNE
ILLADSGYGQGEILINPVQILSIYSAL ENNGNINAPHL LKDTKNKVWKKNIISKENINLL TDGMQVVNKTHKED
IYRSYANLIGKSGTAELKMKQGETGRQIGWFISYDKDNPMMMAINVKDVQDKGMASYNAKISGKVYDEL YENGN
KKYDIDE*
```

Le fichier de commande 'align2d.py'

```
from modeller import *
env = environ()
aln = alignment(env)
mdl = model(env, file='1VQQ', model_segment=('FIRST:A', 'LAST:A'))
aln.append_model(mdl, align_codes='1VQQ', atom_files='1VQQ.pdb')
aln.append(file='PMC1.ali', align_codes='PMC1')
aln.align2d()
aln.write(file='PMC1-1VQQ.ali', alignment_format='PIR')
aln.write(file='PMC1-1VQQ.pap', alignment_format='PAP')
```

Le fichier de commande 'model-single.py'

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *
#from modeller import soap_protein_od
env = environ()
a = automodel(env, alnfile='PMC1-1VQQ.ali',
              knowns='1VQQ', sequence='PMC1',
              assess_methods=(assess.DOPE,
                              #soap_protein_od.Scorer(),
                              assess.GA341))
a.starting_model = 1
a.ending_model = 5
a.make()
```

Productions scientifique

ARTICLES

Ayeche A., Lebsir N. and Hamidechi M. A. (2017). Correlation Between The Genotype Detection Determined By RT- PCR Assays And The Phenotypic Detection Determined By Antibiotic Susceptibility Patterns Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clinical isolates in Algeria. *International journal of advanced research*. 5(5) : 950-955.

PRESENTATIONS AFFICHEES

Ayeche A., Guendouze A., Yagoubat M., Hamidechi M. A. Phenotypic and genotypic detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from infected patients. International Seminar of applied Biotechnologies on; Agriculture, Health and Environment. SIBAASE 17-19 April 2016. Khenchela, Algeria.

Guendouze A., Djeghader A., Ayeche A., Labed L., Hamidechi M. A. Identification Of Bacteria Causing Subclinical Cow Mastitis Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS). International Seminar of applied Biotechnologies on; Agriculture, Health and Environment. SIBAASE 17-19 April 2016. Khenchela, Algeria.



ISSN NO. 2320-5407

Journal Homepage: -www.journalijar.com

INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH (IJAR)

Article DOI:10.21474/IJAR01/4203
DOI URL: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/4203>



INTERNATIONAL JOURNAL OF
ADVANCED RESEARCH (IJAR)
ISSN 2320-5407
Journal homepage: <http://www.journalijar.com>
Journal DOI:10.21474/IJAR01

RESEARCH ARTICLE

CORRELATION BETWEEN THE GENOTYPE DETECTION DETERMINED BY RT-PCR ASSAYS AND THE PHENOTYPIC DETECTION DETERMINED BY ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CLINICAL ISOLATES IN ALGERIA.

*Amina Ayeche¹, Névine Lebsir² And Mohamed Abdelhafid Hamidechi¹.

1. Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université des frères Mentouri Constantine1, Rue Ain El bey- 25000 Constantine-Algérie.
2. Laboratoire de Microbiologie, Hôpital de pédiatrie d'El-Mansourah, Constantine-Algérie.

Manuscript Info

Manuscript History

Received: 14 March 2017
Final Accepted: 12 April 2017
Published: May 2017

Key words:-

Staphylococcus aureus, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *mecA*, RT-PCR.

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major public health problem causing both hospital and community associated infections worldwide. Methicillin resistance is usually due to the *mecA* gene that codes for a 78-kD penicillin binding protein (PBP2a), with decreased affinity to methicillin and all beta-lactam antibiotics. A total of 65 *S. aureus* isolates were collected from a pediatric hospital and clinical laboratories in Constantine, from December 2014 to September 2015. All isolates were identified using matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The phenotypic detection of methicillin-resistant was investigated using the standard disk-diffusion method on Mueller-Hinton agar. The isolates were tested with 16 antibiotics: Penicillin, oxacillin, Cefoxitin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Gentamicin, Teicoplanin, Vancomycin, Erythromycin, Clindamycin, Pristinamycin, Doxycycline, Fosfomycin, Linezolid, Rifampicin and Trimethoprim-sulfamethoxazole. They were incubated at 37°C for 24 h. Results showed that 35.38% of isolates were methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. According to the obtained results from RT-PCR analysis of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *mecA* gene was present in 86.95% of the resistant isolates. The results of comparison between RT-PCR detection of *mecA* gene and standard disk diffusion test showed high degree of correlation.

Copy Right, IJAR, 2016.. All rights reserved.

Introduction:-

Staphylococcus aureus is recognized as one of the most important pathogens responsible for a variety of diseases in both humans and animals worldwide [1,2, 3, 4]. *Staphylococcus aureus* was first identified in 1880 in Aberdeen, Scotland [2, 5]. Until the treatment of patients with penicillin in 1940 [2, 5], the mortality rate caused by *S. aureus* was 80%. In 1942, the first strains developed resistance to penicillin, due to β -lactamase production, were detected in hospital [2]. The introduction of methicillin in 1959 was necessary to solve the problems of penicillinase-producing *S. aureus* resistant to penicillin [6, 7]. Resistance to methicillin in *S. aureus* was identified for the first time in UK in the early 1960 [2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14], within 2 years after its introduction [6, 7, 12]

Corresponding Author:- Amina Ayeche.

Address:-Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université des frères Mentouri Constantine1, Rue Ain El bey- 25000 Constantine-Algerie.

Since then, the resistance rate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has gradually increased and become a serious problem in both community and hospital infections worldwide in 1970 [12]. Until the mid-1990s, the majority of MRSA isolates exhibited multiple resistance to several antimicrobial agents including tetracyclines, aminoglycosides, macrolides, lincosamides and fluoroquinolones [5, 12, 15, 16].

Resistance to methicillin in *S. aureus* is primarily mediated by the production of penicillin binding protein (PBP 2a), an additional penicillin-binding protein with low affinity for beta-lactam antibiotics, encoded by *mecA* gene [1, 5, 17] which is absent in methicillin susceptible strains. This gene is carried on the SCCmec element [13].

The detection of MRSA has become an important tool in clinical diagnosis for the management and treatment of patients [6, 17]. Routine methods used in microbiology laboratories for identification of methicillin resistance in *S. aureus* are based on antibiotic susceptibility disk diffusion agar and dilution [14, 17]. These methods detect only phenotypic expression of methicillin resistance without the presence of the *mecA* gene [17]. Since phenotypic methods are not discriminating enough and are highly dependent on growth conditions, the use of genetic approach, such as DNA hybridization and PCR, is essential to stop the spread of *S. aureus* methicillin-resistant and to increase the rapidity and accuracy of their identification and their antibiotics resistance patterns [6].

The aim of this study was therefore to show the prevalence and antibiotic susceptibility of *S. aureus* methicillin-resistance isolated from the pediatric hospital and clinical laboratories in Constantine, Algeria, and to compare the degree of correlation between the phenotypic detection of methicillin-resistance in *S. aureus* by standard disk diffusion test with the genotypic detection of *mecA* gene by RT-PCR.

Material and Methods:-

Bacteria isolates:-

A total of 65 *S. aureus* strains were isolated from infected patients. The isolates were collected from the pediatric hospital and clinical laboratories in Constantine (Algeria) from December 2014 to September 2015. The isolates were first identified with standard bacteriological technique and biochemical tests using the API system 20E® (biomérieux., Marcy l'Etoile, France).

Identification of *S. Aureus*:-

A confirmation of the *staphylococcus aureus* identification for all the isolates was performed by using matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Colonies were deposited directly on the MALDI-TOF target plate (Four spots per isolate) and were covered with 1.5 µL of matrix solution (2 points of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid + 500ml of acetonitrile HPLC + 475ml of distilled water + 25ml of trifluoroacetic-acid). Spots were analyzed using a Bruker Daltonics Microflex (Bremen, Germany). Peptidic spectra were compared with the Bruker database using Biotyper software, version 2.0, and the identification score was noted.

Antibiotic resistance Test:-

Antibiotic resistance of *S. aureus* isolates was tested using the standard disk-diffusion method on Mueller–Hinton agar according to recommendations of the Antibiotic Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM) [18]. The isolates were tested with sixteen antibiotics: Penicillin (10 µg), oxacillin (5 µg), Cefoxitin (30 µg), Ceftriaxone (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Gentamicin (15 µg), Teicoplanin (30 µg), Vancomycin (30 µg), Erythromycin (15 µg), Clindamycin (15 µg), Pristinamycin (15 µg), Doxycycline (30 µg), Fosfomycin (50 µg), Linezolid (30 µg), Rifampicin (30 µg), Trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg) and were incubated at 37°C for 24 h. Antibiotic disks were purchased from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France).

DNA Extraction:-

For detection of *mecA* gene, all DNA samples were extracted with the DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) using EZ1 Advanced instrument (Qiagen). One colony of each isolate was mixed with 200 µL of extraction buffer. Extracted DNA was eluted in 200 µL, analysed immediately after extraction and stored at -20°C.

Rt-Pcr:-

Amplification of the methicillin resistance gene *mecA* was performed using primers as previously described by Strommenger et al. (2003) and Shahrzad et al. (2011): forward primer (5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3') and reverse primer (5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'). Quantitative real-time PCR (CFX96, C1000

Thermal Cycler, Bio-Rad) was carried out to detect the encoding gene (*MecA*). The PCR mixture was prepared for each isolate (10µL of Mix Quantitec, 2 µL of Probe, 2 µL of H₂O, 0.5 µL of each primer and 5 µL of DNA extracted) in accordance with the manufacturer's instructions. *S. aureus* ATCC 29213 was used as positive control. The experimental run protocol used was as follows: denaturation program (95 °C for 15 min), amplification and quantification programs repeated 35 times (95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min).

Results:-

Identification of *S. Aureus*:-

Identification of *S.aureus* with standard bacteriological technique and biochemical tests using the API was confirmed by the Bruker Daltonics MALDI-TOF.

Antibiotic susceptibility:-

In this study the specimens of *S. aureus* were mainly obtained from pus samples with a frequency of 81.53 % followed by urine and semen samples with respectively 12.30 and 6.15 %.

The results of resistance rate of all the strains to antibiotics testing according to the French CASFM 2015 revealed that the isolates were multidrug resistant. Higher resistance was observed to penicillin G (70.77% of the isolates), followed by ceftriaxone (50.76%), erythromycin (46.15%), oxacillin and ciprofloxacin (24.61% each). However, some isolates were resistant to glycopeptides (vancomycin 4.61% and teicoplanin 9.23%). The classification of antibiotic resistance patterns of the isolated *S. aureus* into three groups of resistant, intermediate-resistance and susceptible is given in Table 1. As shown in Table 1, 23 isolates were found to be methicillin-resistant (35.38%), while the remaining (42) were 37 (56.92%) methicillin-susceptible and 5 (7.69%) intermediate resistant. The percentage of MRSA was defined as the number of *S. aureus* isolates resistant to ceftiofime divided by the total number of *S. aureus* isolates. The majority of the MRSA isolates showed resistance to penicillin G (86.95% of the isolates), ceftriaxone (78.26%), oxacillin (65.21%) and erythromycin (56.52%). MSSA isolates were also resistant to penicillin G (70.27%), erythromycin (45.64%) and ceftriaxone (40.54%). They were highly susceptible to gentamicin (100%), oxacillin and vancomycin (97.3% each).

RT-PCR:-

Real-time PCR results showed that 21 out of 65 *S. aureus* isolates were positive for the *MecA* gene as shown in figure 1. Comparison of the results of the MRSA pattern obtained from PCR with the standard disk-diffusion methods is shown in Table 2. According to RT-PCR results, 20 of 23 MRSA strains, 0 of 5 intermediate and 1 of 37 methicillin-susceptible, carried a *MecA* gene.

Discussion:-

Methicillin-resistant *S. aureus* is an important human pathogen and is responsible for both hospital and community associated infections worldwide. Its frequency in most African countries has not been reported [19].

Between 1996 and 1997, the prevalence of MRSA was determined in eight northern African countries and Malta, it was relatively high in Nigeria, Kenya, and Cameroon (21 to 30%) and below 10% in Tunisia, Malta and Algeria [19]. In 2001, the resistance rate increased to 14% in Algeria [9]. Prospective, multicentre study was conducted between 2003 and 2004 with participation of nine university hospitals in the Mediterranean area, and the percentage of *S. aureus* strains resistant to methicillin (MRSA) was 35.5% in Algeria [20].

In our study, among 65 *S. aureus* isolates 23 were MRSA (35.38%). These results showed a high similarity with results obtained by previous studies in Algeria.

Resistance of MRSA to other antibiotics has also been reported. In this study, we found that 8.69% of isolates were resistant to vancomycin, while in related studies; all MRSA strains isolated from clinical samples were susceptible to vancomycin (100%) [17, 19]. Shahrzad et al. (2012) reported that 26.6% of *S. aureus* strains isolated from packaged hamburger were resistant to vancomycin.

According to our study, MRSA were resistant to erythromycin (56.52%) and gentamycin (34.78%), Ramdani-Bougoussa et al. 2005 reported that 25% and 7% of PVL-positive MRSA strains isolated from Mustapha Pacha hospital in Algeria and Ouchenane et al. 2010 reported that 25% and 6.25% of MRSA strains isolated from

Didouche Mourad hospital in Algeria, were resistant to erythromycin and gentamicin, respectively. Comparison between these results showed a high resistance to erythromycin and gentamicin in our isolates.

In recent years, several studies have demonstrated the high capacity of molecular methods such as Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), RT-PCR and PCR-based methods to increase the rapidity and accuracy of resistance testing [1, 6, 14, 15, 16, 21, 22].

In our study, molecular detection of *mecA* gene as a specific target of MRSA genes was performed for all 65 *S. aureus* isolates. As shown in Table 2, we have compared the results of standard disk-diffusion, as a phenotypic method, with real-time PCR, as a genotypic method. Overall, we found high correlation between these two methods. This correlation has been demonstrated previously in other studies [6, 14, 15, 17].

The present study indicate that among 23 strains, 3 were resistant to methicillin and 5 of 65 have intermediate-resistance according to standard disk-diffusion method but they are susceptible according to PCR method. Two of 39 strains were methicillin-susceptible according to standard disk-diffusion method but are resistant according to PCR method. In accordance with this study and previous reports, strains that are phenotypically resistant to methicillin but are not carried a *mecA* gene seemed to show poor expression of *mecA* gene or production of methicillinase or β -lactamase hyper-production [12, 16]. Borderline resistance in *mecA*-negative strains has been hypothesized, in previous studies, to result from modification of normal PBP genes [8, 23]. Kumar et al., 2010, indicated that *mecA* gene is present, but is not amplified because the amplification site is not available enough or is not expressed or expressed at low level due to growth conditions or might be limitations in detection in microbiological methods.

Similarly, strains could exhibit intermediate-resistance of methicillin due to overexpression of a β -lactamase when *mecA* is absent [24]. Intermediate resistance levels could be due also to mutations in the endogenous *mecA* gene [6].

In conclusion, the high prevalence of MRSA in Algerian hospitals, as our results showed, is necessary that rapid identification of methicillin-resistance and genotypic detection of *mecA* gene will have a major impact on the treatment of infectious diseases and to reduce the emergence of drug resistance. Although microbiological susceptibility testing are still widely used in clinical microbiology laboratories for analysis of phenotypic resistance of MRSA, molecular detection of *mecA* gene with RT-PCR is highly rapid, sensitive and specific. Moreover, all the studies reported to date indicate a high correlation between methicillin-resistance and the presence of the *mecA* gene. In this study, comparison between phenotypic detection of methicillin-resistance in *S. aureus* by standard disk diffusion test and genotypic detection of *mecA* gene by RT-PCR method showed a high degree of correlation.

Table1: Antibiotic resistance of *S. aureus* strains isolated from infected patients (n=65).

Antibiotic tested	Number of resistant strains	No. of intermediate-resistance strains(%)	No. of susceptible strains(%)
Penicillin	46 (70.77%)	-	19 (29.23%)
Oxacillin	16 (24.61%)	-	49 (75.38%)
Cefoxitine	23 (35.38%)	5 (7.69%)	37 (56.92%)
Ceftriaxone	33 (50.76%)	22 (33.84%)	10 (15.38%)
Ciprofloxacin	16 (24.61%)	-	49 (75.38%)
Gentamicin	8 (12.30%)	-	57 (87.69%)
Teicoplanin	6 (9.23%)	-	59 (90.76%)
Vancomycin	3 (4.61%)	-	62 (95.38%)
Erythromycin	30 (46.15%)	-	35 (53.84%)
Clindamycin	6 (9.23%)	-	59 (90.76%)
Pristinamycin	3 (4.61%)	-	62 (95.38%)
Doxycycline	11 (16.92%)	2 (3.07%)	52 (80%)
Fosfomycin	5 (7.69%)	-	60 (92.30%)
Linezolid	3 (4.61%)	-	62 (95.38%)
Rifampicin	9 (13.84%)	4 (6.15%)	52 (80%)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	9 (13.84%)	1 (1.53%)	55 (84.61%)

Table 2:- Comparison of the results of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) pattern obtained from RT-PCR and standard disk-diffusion methods for isolated strains from infected patients (n=65).

Method	Methicillin-resistance		
	No. of resistant strains (%)	No. of intermediate-resistant strains (%)	No. of susceptible strains (%)
Standard disk-diffusion	23 (35.38%)	5 (7.69%)	37 (56.92%)
RT-PCR	20 (95.23%)	-	1 (4.76%)

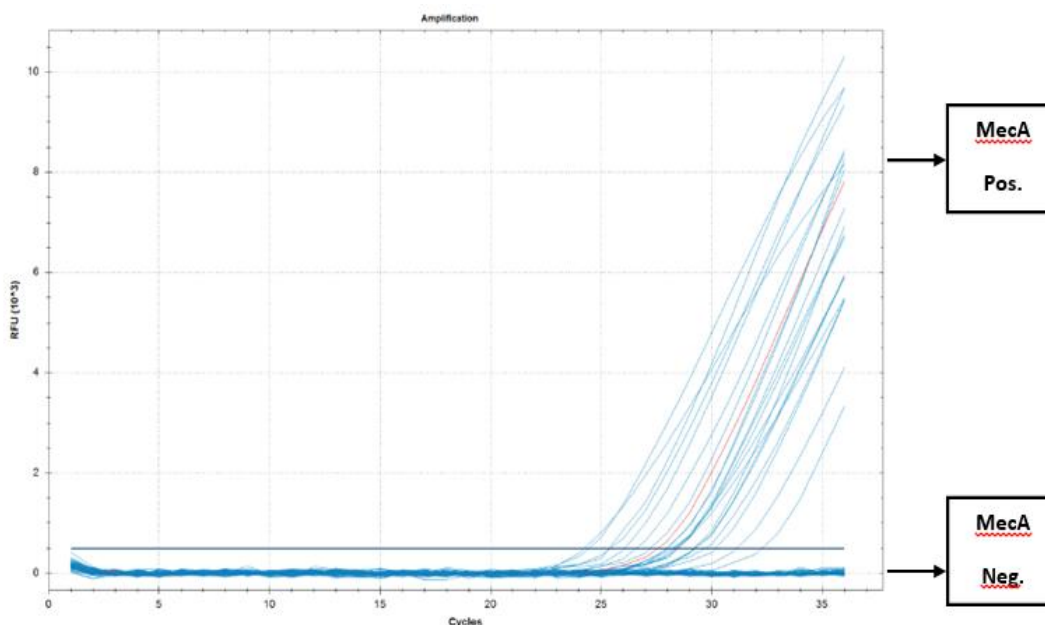


Figure 1:- Representative results obtained in real-time polymerase chain reaction assay for *mecA* gene. The amplicon curves, representing positive amplification and negative control (flat line). Pos., positive amplification; neg., negative amplification.

Acknowledgements:-

We acknowledge the Professor Jean-Marc Rolain (Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), Aix Marseille University, France) for permitting us to perform the experimental part of this work.

References:-

- Martineau F, Picard F. J., Lansac N., Ménard C., Roy P. H., Ouellette M. and Bergeron M. J. (2000). Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2):231.
- Deurenberg R. H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A. W., Bruggeman C. A. and Stobberingh E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13:222–235.
- Kumar R., Yadav B. R. and Singh R. S. (2011). Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. *J. Biosci.*, 36(1):175–188.
- Momtaz H. and Hafezi L. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Iranian hospitals: virulence factors and antibiotic resistance properties. *Bosn. J. Basic. Med. Sci.*, 14(4):219–226.
- Xiaoguang W., Lin O., Lingfei L., Jiqian L., Chiping S., Cuizhen L., Hongjing Y. and Ping W. (2016). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a hospital of Shanghai. www.impactjournals.com/oncotarget.
- Pe'Rez-Roth E., Claverie-Marti'N F., Villar J. and Me'Ndez-A'Lvarez S. (2001). Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11):4037–4041.

7. Zhang K., McClure J.-A., Elsayed S., Louie T. and Conly J. M. (2005). Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 43(10):5026.
8. Chambers H. F. (1997). Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4):781–791.
9. Ramdani-Bougoussa N. Bes M., Meugnier H., Forey F., Reverdy M. E., Lina G., Vandenesch F., Tazir M. and Etienne J. (2006). Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Resistant to Multiple Antibiotics and Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes in an Algiers Hospital. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3):1083-1085.
10. Donnio P.-Y., Preney L., Gautier-Lerestif A.-L., Avril J.-L. and Lafforgue N. (2004). Changes in staphylococcal cassette chromosome type and antibiotic resistance profile in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a French hospital over an 11 year period. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5):808–813.
11. Durand G., Bes M., Meugnier H., Enright M. C., Forey F., Liassine N., Wenger A., Kikuchi K., Lina G., Vandenesch F. and Etienne J. (2006). Detection of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Containing the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene Responsible for Hospital- and Community-Acquired Infections in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3):847-853.
12. Moon J.-S., Lee A.-R., Kang H.-M., Lee E.-S., Kim M.-N., Paik Y. H., Park Y. H., Joo Y.-S. and Koo H. C. (2007). Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. *J. Dairy Sci.*, 90:1176-1185.
13. Ouchenane Z., Smati S., Rolain J.-M., Raoult D. (2010). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. *Journal of Pathologie Biologie*, 59:129-132.
14. Shahraz F., Dadkhah H., Khaksar R., Mahmoudzadeh M., Hosseini H., Kamran M. and Bourke P. (2012). Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. *Meat Science*, 90:759–763.
15. Strommenger B., Kettlitz C., Werner G. and Witte W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9):4089–4094.
16. Kumar R., Yadav B. R. and Singh R. S. (2010). Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Mastitic Crossbred Cattle. *Curr. Microbiol.*, 60:379-386.
17. Al-Zu'Bi E., Bdour S. and Shehabi A. A. (2004). Antibiotic resistance patterns of *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens and nasal carriage. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, 10(4):321–324.
18. CA-SFM, Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2011, Recommandations 2011, [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm 2011.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm%202011.pdf)
19. Kesah C., Ben Redjeb S., Odugbemi T. O., Boye C. S.-B., Dosso M., Ndinya Achola J. O., Koulla-Shiro S., Benbachir M., Rahal K. and Borg M. (2003). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9: 153–156.
20. Amazian K., Fendri C., Missoum M. F. K., Bouzouaia N., Rahal K., Savey A., Saadatian-Elahi M. and Fabry J. (2006). Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 25:340–3.
21. Lacey R. W. (1973). Genetic basis, epidemiology, and future significance of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: A review. *J. clin. Pathol.*, 26:899-913.
22. Sabet N. S., Subramaniam G., Navaratnam P., Sekaran S. D. (2007). Detection of *mecA* and *ermA* genes and simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* using triplex real-time PCR from Malaysian *S. aureus* strain collections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29:582–585.
23. McDougal L. K. and Thornsberry C. (1986). The Role of β -Lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5):832-839.
24. Bergeron M. G. and Ouellette M. (1998). Preventing Antibiotic Resistance through Rapid Genotypic Identification of Bacteria and of Their Antibiotic Resistance Genes in the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(8): 2169–2172.

Résumés

Résumé

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) constitue un problème majeur de la santé publique, causant à la fois des infections nosocomiales et communautaires dans le monde entier. La résistance à la méticilline est due généralement au gène *mecA* qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline (PLP2a) additionnelle, de faible affinité pour la méticilline et tous les antibiotiques bêta-lactamines.

La première partie de notre thèse, consiste à identifier 65 isolats de *S. aureus*, collectées à partir de différents prélèvements pathologiques à Constantine, par MALDI-TOF MS. Nos résultats ont montré une grande fiabilité et rapidité de l'identification de *S. aureus* par la technique protéomique MALDI-TOF MS par rapport aux techniques phénotypiques et génotypiques (séquençage de l'ADNr 16S).

La résistance à la méticilline de ces souches a été détectée par la méthode de diffusion du disque de céfoxitine en milieu gélosé de Mueller-Hinton, accompagnée par la recherche du gène *mecA* par RT-PCR. La comparaison entre ces deux méthodes a révélé un degré élevé de corrélation.

La deuxième partie de notre thèse, consiste à la prédiction des structures secondaire et tertiaire de la PLP2a *in silico* par l'utilisation d'outils bioinformatiques appropriés. La connaissance de la structure 3D de la PLP2a nous a permis de mieux comprendre sa fonction ainsi que le mécanisme de résistance de SARM à la méticilline.

L'alignement de nos structures tertiaires de la PLP2a des isolats LISC8 et PMC1 générées par MODELLER montre une mutation de type substitution dans les positions 124 et 182 où l'asparagine "N" est substituée en lysine "K".

Mots clés : SARM, MALDI-TOF MS, *mecA*, PLP2a, structure 3D.

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major public health problem, causing both nosocomial and community-acquired infections worldwide. Methicillin resistance is generally due to the *mecA* gene which encodes an additional penicillin binding protein (PBP2a) with low affinity for methicillin and all beta-lactam antibiotics.

The first part of our thesis, consists in identifying 65 isolates of *S. aureus*, collected from different pathological samples in Constantine, by MALDI-TOF MS. Our results showed a high reliability and rapid identification of *S. aureus* by proteomics technology MALDI-TOF MS compared to phenotypic and genotypic techniques (sequencing of the 16S rDNA).

Resistance to methicillin in these strains was detected by the cefoxitin disk diffusion method in Mueller-Hinton agar, accompanied by the search for the *mecA* gene by RT-PCR. The comparison between these two methods revealed a high degree of correlation.

The second part of our thesis, consists of the prediction of the secondary and tertiary structures of PBP2a *in silico* by the use of appropriate bioinformatics tools. The knowledge of the 3D structure of PBP2a has allowed us to better understand its function as well as the resistance mechanism of MRSA to methicillin.

Alignment of our tertiary structures of PBP2a of LISC8 and PMC1 isolates generated by MODELLER shows a mutation in positions 124 and 182 where asparagine "N" is substituted by lysine "K".

Key words : MRSA, MALDI-TOF MS, *mecA*, PBP2a, 3D structure.

ملخص الاطروحة

تعد المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) إحدى المشكلات الرئيسية في مجال الصحة العمومية ، متسببة في أن واحد في عدوى المستشفيات والمجتمع في جميع أنحاء العالم. ترجع مقاومة الميثيسيلين عمومًا إلى جين *mecA* الذي يرمز إلى بروتين رابط بين البنسلين (PLP2a) إضافي منخفض الارتباط مع الميثيسيلين وجميع المضادات الحيوية. β -lactamines.

الجزء الأول من أطروحاتنا يتضمن تحديد 65 عينة من البكتيريا العنقودية الذهبية ، التي تم جمعها من عينات مرضية مختلفة في قسنطينة ، بواسطة MALDI-TOF MS. أظهرت النتائج التي توصلنا إليها موثوقية عالية وتعرف سريع على المكورات العنقودية الذهبية بواسطة MALDI-TOF MS مقارنة مع تقنيات النمط المظهري والوراثي (1'ADNr 16S).

تم الكشف عن مقاومة *meticillin* من هذه السلالات من خلال طريقة نشر قرص *cefoxitin* في وسط أجار مولر هينتون ، يرافقه البحث عن الجين *mecA* بواسطة RT-PCR أظهرت المقارنة بين هاتين الطريقتين درجة عالية من الارتباط.

يتكون الجزء الثاني من أطروحاتنا من التنبؤ بالبنية الثانوية والثالثية لل-PLP2a *in silico* عن طريق استخدام أدوات المعلوماتية الحيوية المناسبة. لقد سمحت لنا معرفة البنية ثلاثية الأبعاد ل-PLP2a بفهم وظيفتها بشكل أفضل وكذلك آلية مقاومة MRSA للميثيسيلين.

مقارنة البنية الثلاثية ل-PLP2a للعينات PMC1 و LISC8 يظهر طفرة في المواضع 124 و 182 حيث تم استبدال الحمض الأميني "N" asparagine بـ الحمض الأميني "K" lysine.

الكلمات المفتاحية : MRSA ، MALDI-TOF MS ، *mecA* ، PLP2a , البنية ثلاثية الأبعاد .

<p>Nom : AYECHÉ</p> <p>Prénom : Amina</p>	<p>Diplôme : Doctorat 3ème cycle LMD</p> <p>Date de soutenance : 11/07/2019</p>
<p align="center">Titre : Approches génétique et bioinformatique pour la prédiction de la structure 3D de la PLP2a du gène <i>mecA</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	
<p align="center">Résumé</p> <p>Le <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM) constitue un problème majeur de la santé publique, causant à la fois des infections nosocomiales et communautaires dans le monde entier. La résistance à la méticilline est due généralement au gène <i>mecA</i> qui code pour une protéine de liaison à la pénicilline (PLP2a) additionnelle, de faible affinité pour la méticilline et tous les antibiotiques bêta-lactamines.</p> <p>La première partie de notre thèse, consiste à identifier 65 isolats de <i>S. aureus</i>, collectées à partir de différents prélèvements pathologiques à Constantine, par MALDI-TOF MS. Nos résultats ont montré une grande fiabilité et rapidité de l'identification de <i>S. aureus</i> par la technique protéomique MALDI-TOF MS par rapport aux techniques phénotypiques et génotypiques (séquençage de l'ADNr 16S).</p> <p>La résistance à la méticilline de ces souches a été détectée par la méthode de diffusion du disque de céfoxitine en milieu gélosé de Mueller-Hinton, accompagnée par la recherche du gène <i>mecA</i> par RT-PCR. La comparaison entre ces deux méthodes a révélé un degré élevé de corrélation.</p> <p>La deuxième partie de notre thèse, consiste à la prédiction des structures secondaire et tertiaire de la PLP2a <i>in silico</i> par l'utilisation d'outils bioinformatiques appropriés. La connaissance de la structure 3D de la PLP2a nous a permis de mieux comprendre sa fonction ainsi que le mécanisme de résistance de SARM à la méticilline.</p> <p>L'alignement de nos structures tertiaires de la PLP2a des isolats LISC8 et PMC1 générées par MODELLER montre une mutation de type substitution dans les positions 124 et 182 où l'asparagine "N" est substituée en lysine "K".</p> <p>Mots clés: SARM, MALDI-TOF MS, <i>mecA</i>, PLP2a, structure 3D.</p>	