

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Constantine I  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

**THÈSE**

*En vue de l'obtention du diplôme de*

**DOCTORAT EN SCIENCES**

*En*

**Microbiologie Appliquée**

*Présentée par*

***Abla HECINI- HANNACHI***

***Streptococcus pneumoniae***  
**dans les infections invasives :**  
**identification, résistance aux antibiotiques**  
**et sérotypage**

Soutenue le : 25/06/2014

Devant le jury :

**Président :** Laid DEHIMAT. *Professeur Univ. Constantine I*  
**Directeur de thèse:** Kaddour BENLABED. *Professeur Univ. Constantine III*  
**Examineurs :** Chafia BENTCHOUALA. *MCA Univ. Constantine III*  
Fatih BEDJOU. *Professeur Univ. A.Mira Bejaia*  
Abdelhafid HAMIDECHI. *Professeur Univ. Constantine I*  
Rabah ARHAB. *MCA Univ. L. Benmhidi Oum el Bouaghi*

*Année Universitaire 2013/2014*

# TABLE DES MATIERES

Dédicaces et remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Liste des abréviations

	Page
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. Aspects microbiologiques du pneumocoque.....	5
1.1 Historique.....	5
1.2 Classification.....	6
1.3 Caractères bactériologiques.....	8
1.3.1 Caractères morphologiques.....	8
1.3.2 Caractères cultureux.....	9
1.3.3 Caractères biochimiques.....	9
1.3.4 Structure antigénique.....	11
1.3.5 Identification.....	12
2. Physiopathologie et pouvoir pathogène.....	15
2.1 Pneumocoque et Portage rhinopharyngé.....	16
2.2 Pneumocoque et immunité.....	18
2.3 Pneumocoque et facteurs de virulence.....	20
2.3.1 La capsule.....	20
2.3.2 La pneumolysine.....	21
2.3.3 Autres facteurs de virulence.....	22
2.4 Facteurs prédisposant à l'infection invasive à pneumocoque .....	25
2.5 Physiopathologie des infections invasives à pneumocoque.....	26
2.5.1 Pneumopathie à pneumocoque .....	26
2.5.2 Bactériémie à pneumocoque.....	27
2.5.3 Méningite à pneumocoque.....	27
2.6 Epidémiologie des infections invasives à pneumocoque .....	28
3. Résistance aux antibiotiques.....	30

3.1 Historique .....	30
3.2 Mécanismes de résistance.....	31
3.2.1 Résistance aux bêta-lactamines .....	31
3.2.2 Résistance aux macrolides.....	33
3.2.3 Résistance aux autres antibiotiques.....	37
3.3 Aspects épidémiologiques de la résistance aux antibiotiques.....	39
4. Distribution des sérotypes .....	42
5. Pneumocoque et vaccins.....	44
5.1 Le vaccin polysidique 23- valent.....	44
5.2 Le vaccin heptavalent conjugué PCV7 .....	46
<b>DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>50</b>
1. Cadre d'étude.....	50
2. Origine des souches.....	50
3. Contrôle de qualité des tests effectués .....	50
4. Conservation.....	51
5. Isolement et culture.....	51
6. Identification des souches .....	51
6.1 Méthodes conventionnelles .....	51
6.1.1 Examen macroscopique des colonies.....	51
6.1.2 Examen microscopique après coloration de Gram .....	51
6.1.3 Test de lyse par les sels biliaires .....	51
6.1.4 Test de sensibilité à l'optochine.....	52
6.1.5 Test d'agglutination au latex .....	52
6.2 Méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight).....	54
6.3 Méthodes moléculaires .....	58
6.3.1- Réaction de Polymérisation en Chaîne en temps réel (RT-PCR) pour les deux gènes <i>plyN</i> (pneumolysine) et <i>lytA</i> (autolysine).....	58
6.3.2 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) standard pour le produit de 740 pb du gène <i>rpoB</i> (beta subunit of RNA polymerase) et séquençage.....	63
7- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	69
7.1 Antibiogramme standard.....	69
7.2 Détection de la résistance aux bêta-lactamines .....	69

7.3 Détection de la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones.....	70
7.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	70
8- Détermination des gènes de résistance aux macrolides.....	74
9. Sérotypage.....	77
10. Etude statistique.....	78
11. Recherche bibliographique.....	78
<b>TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....</b>	<b>80</b>
<b>1. Identification.....</b>	<b>80</b>
1.1 Résultats de l'identification par méthodes phénotypiques.....	80
1.2 Résultats de l'identification par spectrométrie de masse.....	82
1.3 Résultats de l'identification par PCR en temps réel (gènes <i>plyN</i> et <i>lytA</i> ).....	84
1.4 Résultats de l'identification par PCR (gène <i>rpoB</i> ).....	86
<b>2. Caractéristiques épidémiologiques.....</b>	<b>91</b>
2.1 Fréquence des infections invasives à pneumocoque en fonction de la nature de l'infection et de l'âge.....	91
2.2 Répartition saisonnière des infections invasives à pneumocoque par année	93
2.3 Fréquence des infections invasives à pneumocoque en fonction du sexe	93
2.4 Fréquence du pneumocoque dans les méningites purulentes.....	96
<b>3. Résistance de <i>Streptococcus pneumoniae</i> aux antibiotiques.....</b>	<b>98</b>
3.1 Résistance aux bêta-lactamines.....	98
3.1.1 Résistance à la pénicilline.....	98
3.1.2 Résistance aux autres bêta-lactamines.....	101
3.2 Résistance aux macrolides et apparentés.....	107
3.3 Résistance aux autres antibiotiques.....	107
3.4 Résistances associées et multirésistance.....	107
<b>4. Pneumocoque et sérotypes.....</b>	<b>113</b>
4.1 Distribution globale des sérotypes.....	113
4.2 Fréquence des sérotypes de pneumocoque et leur répartition en fonction de l'infection.....	113
4.3 Fréquence des sérotypes en fonction de l'âge.....	118
4.4 Relation sérotype – résistance.....	118
4.4.1 Relation sérotype – résistance aux bêta-lactamines.....	120
4.4.2 Relation sérotype – résistance aux macrolides.....	124

<i>4.4.3 Sérotype et multirésistance</i> .....	124
<b>5. Phénotypes et géotypes de résistance aux macrolides</b> .....	124
<b>6. Sérotypes et vaccins</b> .....	127
<i>6.1. Couverture vaccinale théorique</i> .....	127
<i>6.2. Relation entre sérotypes vaccinaux et résistance [résistance à la pénicilline (PSDP) et multirésistance]</i> .....	127
<b>7. Evolution des infections invasives à pneumocoque</b> .....	131
<b>DISCUSSION</b> .....	133
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	183
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	187- 211
<b>ANNEXES</b>	
<b>RESUMES</b>	
<b>ACTIVITES SCIENTIFIQUES</b>	

## *Dédicaces*

*Ce travail est dédié à mes parents, Qui, de leur vivant, avaient toujours cru en moi.*

## *Remerciements*

*Ce travail n'aurait pas été concrétisé sans le concours d'un bon nombre de personnes qui, chacune à sa façon, ont apporté une aide précieuse à sa réalisation. C'est pour cette raison que je tiens à leur exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude.*

*A Monsieur le doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laid Dehimat pour me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.*

*A Monsieur le professeur Kaddour Benlabed pour avoir accepté d'encadrer cette thèse, pour son aide, ses encouragements et sa patience.*

*A Mesdames et messieurs les professeurs, Chafia Bentchouala, Fatiha Bedjou, Abdelhafid Hamidechi, et Rabah Arhab pour avoir accepté de faire partie du jury. Je les remercie tous pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger mon travail.*

*A toute l'équipe du service de Microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire Benbadis de Constantine, techniciens, secrétaires, médecins, pharmaciens, et tout particulièrement au professeur Hocine Laouar pour avoir mis à ma disposition les souches de pneumocoques, au docteur Abdesslem Lezzar et à Karima Meheni sans oublier Hanen, Hanifa, Leila, Seloua, Abla, Meriem, Batoun, Sonia, Ratiba et Salima... pour leur soutien moral.*

*A toutes mes amies de la Faculté de Médecine et de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie qui n'ont cessé de m'encourager.*

*Ma plus profonde reconnaissance à Monsieur le professeur Jean Marc Rolain pour son accueil à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de la Timone, à l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes (URMITE) à Marseille, où j'ai été initiée aux techniques de biologie moléculaire.*

*Je suis également reconnaissante envers Madame le professeur Véronique Roux de l'hôpital de la Timone pour son aide dans les techniques moléculaires.*

*A Madame le docteur Emmanuelle varon du Centre National de Référence des pneumocoques (CNRP) de l'hôpital George Pompidou à Paris pour m'avoir assistée au sérotypage.*

*A mes frères et sœurs et leurs familles pour leur soutien au quotidien depuis le début de ma thèse. Fouzia, Nora, merci pour votre compréhension et surtout pour m'avoir soutenue depuis le premier jour, dans les instants difficiles comme dans les moments de joie.*

*A mon frère Tarek pour son aide dans l'élaboration de cette thèse.*

*A Meriem Berrezeg, Meriem Touati et Seydina Diene qui ont toujours répondu à mes questions.*

*A Sabrina Belguedj pour avoir facilité mes déplacements.*

*Merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin à la réalisation de ce travail.*

*Et Bien sûr à Nasser, pour son attention de tous les moments, que de sacrifices !*

*A Maya Haoua et Mey Melissa, mes deux princesses, pardonnez- moi de vous avoir souvent négligées.*

## Liste des tableaux

	Pages
<b>Tableau 1.</b> Classification de <i>S.pneumoniae</i>	7
<b>Tableau 2.</b> Caractères biochimiques de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
<b>Tableau 3.</b> Classification des 90 sérotypes de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
<b>Tableau 5.</b> Composition des mélanges réactionnels pour les PCR en temps réel	62
<b>Tableau 6.</b> Programme de l'amplification de la PCR en temps réel	62
<b>Tableau 7.</b> Amorces et sondes utilisées	64
<b>Tableau 8.</b> Composition des mélanges réactionnels pour la PCR standard	65
<b>Tableau 9.</b> Composition du mélange réactionnel pour la PCR de séquençage	
<b>Tableau 10.</b> Programme de l'amplification : PCR de séquençage	68
<b>Tableau 11.</b> Antibiotiques testés et critères d'interprétation des diamètres d'inhibition pour <i>Streptococcus pneumoniae</i> selon les normes du CLSI 2007	71
<b>Tableau 12.</b> Bandes E-Test et gradients de concentration	73
<b>Tableau 13.</b> Critères d'interprétation des CMI de <i>Streptococcus pneumoniae</i> selon les normes du CLSI 2007	73
<b>Tableau 14.</b> Critères d'interprétation des CMI de <i>Streptococcus pneumoniae</i> selon les normes du CLSI 2011	74
<b>Tableau 15.</b> Programme de l'amplification du gène ermB	76
<b>Tableau 16.</b> Programme de l'amplification du gène mefA	77
<b>Tableau 17.</b> Séquences des amorces utilisées	77
<b>Tableau 18.</b> Distribution en échiquier de 90 sérotypes de <i>S.pneumoniae</i> selon les pools (A-I) et les pools (P-T)	79
<b>Tableau 19.</b> Résultats de l'identification par les méthodes conventionnelles	81
<b>Tableau 20.</b> Résultats de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS	81
<b>Tableau 21.</b> Résultats des tests d'agglutination et des PCR pour les gènes ply et lyt en fonction de la sensibilité à l'optochine et la solubilité dans les sels biliaires	85

<b>Tableau 22.</b> Caractéristiques phénotypiques et génotypiques de 10 souches de <i>S.pneumoniae</i> présentant des résultats non concordants	87
<b>Tableau 23.</b> Caractéristiques phénotypiques et génotypiques de 9 souches de Streptocoques présentant des résultats non concordants	89
<b>Tableau 26.</b> Distribution des 100 souches de <i>S. pneumoniae</i> en fonction de la nature du prélèvement et de l'âge	92
<b>Tableau 27.</b> Profil de résistance et CMI de 100 souches de <i>S.pneumoniae</i> à 5 antibiotiques	102
<b>Tableau 28.</b> Description des souches résistantes aux bêta-lactamines (n= 11)	105
<b>Tableau 29.</b> Description des souches moins sensibles au céfotaxime (CMI > 0,016 µg/ml) qu'aux pénicillines isolées de méningites (n=10)	106
<b>Tableau 30.</b> Résistance aux bêta-lactamines de <i>S. pneumoniae</i> en fonction de la pathologie et de l'âge	106
<b>Tableau 31.</b> Fréquence des sérotypes dans les infections invasives quelque soit l'âge en fonction de la nature de l'infection	117
<b>Tableau 32.</b> Fréquence (%) des sérotypes en fonction de l'âge (Enfant ≤17 ans, Adulte ≥18 ans)	119
<b>Tableau 34.</b> Relation sérotype-résistance	121
<b>Tableau 35.</b> Fréquence des sérotypes des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline	123
<b>Tableau 36.</b> Corrélations entre phénotypes et génotypes de résistance aux macrolides	126
<b>Tableau 37.</b> Couverture sérotypique (%) théorique des vaccins conjugués 7-valent (PCV7), 10-valent (PCV10) et 13-valent (PCV13) et du vaccin polysaccharidique 23-valent (Pn-23v) en fonction de l'âge	128
<b>Tableau 38.</b> Relation entre sérotypes vaccinaux et résistance (résistance à la pénicilline (PSDP) et multirésistance)	130
<b>Tableau 39.</b> Caractéristiques des souches causant le décès	132

<b>Tableau 40.</b> Evolution de la résistance du pneumocoque à la pénicilline en Algérie	149
<b>Tableau 41.</b> Répartition des sérotypes en fonction de l'infection	161
<b>Tableau 42.</b> Répartition des sérotypes en fonction de l'âge	162
<b>Tableau 43.</b> Fréquence des sérotypes parmi les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline	164
<b>Tableau 44.</b> Fréquence des gènes de résistance aux macrolides selon les données de la littérature	166

## Liste des figures

	<b>Pages</b>
<b>Figure 1.</b> Aspect microscopique de <i>S.pneumoniae</i>	8
<b>Figure 2.</b> Culture de <i>S.pneumoniae</i> sur gélose au sang	10
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique des facteurs de pathogénéicité et de virulence des pneumocoques	24
<b>Figure 4.</b> Représentation partielle de la structure secondaire des domaines Vet II de l'ARN23S	35
<b>Figure 5.</b> 26 clones de sensibilité diminuée à la pénicilline et à d'autres antibiotiques caractérisés par PMEN	41
<b>Figure 6.</b> Les pays qui ont introduit le PCV7 jusqu'en 2008	49
<b>Figure 7.</b> Schéma simplifié d'un appareil MALDI-TOF	55
<b>Figure 8.</b> Principe de la PCR en temps réel utilisant une sonde Taqman	60
<b>Figure 9.</b> Principe de l'électrophorèse sur système QIAxcel ScreenGel	76
<b>Figure 11.</b> Dendrogramme à partir des résultats de la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS	83
<b>Figure 21.</b> Arbre phylogénique basé sur un produit du gène rpoB	90
<b>Figure 22.</b> Distribution des 100 souches de <i>S. pneumoniae</i> en fonction de la pathologie et de l'âge	92
<b>Figure 24.</b> Répartition saisonnière des infections invasives à pneumocoques	94
<b>Figure 25.</b> Répartition des infections invasives à pneumocoque en fonction du sexe	95
<b>Figure 26.</b> Répartition des infections invasives à pneumocoque en fonction du sexe et de l'âge	95
<b>Figure 27.</b> Répartition des infections invasives à pneumocoque en fonction du sexe et la nature de l'infection	95
<b>Figure 28.</b> Place du pneumocoque dans les méningites	97
<b>Figure 30.</b> Evolution du nombre des PSDP en fonction de l'année	99
<b>Figure 31.</b> Répartition de la résistance de 100 souches de <i>S.pneumoniae</i> à 15 antibiotiques	99
<b>Figure 32.</b> Fréquence de la résistance à la pénicilline selon les normes du CLSI	100

<b>Figure 33.</b> Distribution des souches de pneumocoques en fonction de leur CMI de pénicilline, amoxicilline et céfotaxime (n=100)	104
<b>Figure 42.</b> Résistance isolées et résistances associées	108
<b>Figure 43.</b> Résistance aux autres antibiotiques et nature de l'infection	110
<b>Figure 44.</b> Résistance aux autres antibiotiques en fonction de l'âge	111
<b>Figure 45.</b> Distribution des sérotypes de 83 souches de pneumocoques	114
<b>Figure 46.</b> Distribution des sérotypes dans les infections invasives quelque soit l'âge en fonction de la nature de l'infection	115
<b>Figure 47.</b> Répartition des sérotypes des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline	122
<b>Figure 48.</b> Distribution des sérotypes en fonction de la résistance aux macrolides	125
<b>Figure 49.</b> Sérotype et multirésistance	126
<b>Figure 52.</b> Distribution des sérotypes chez l'enfant dont l'âge est $\leq$ à 5 ans (n=30) et couverture vaccinale théorique par le vaccin conjugué	129
<b>Figure 53.</b> Place du pneumocoque dans les méningites bactériennes en Algérie	144
<b>Figure 54.</b> Facteurs favorisant l'émergence de la résistance à la pénicilline	147
<b>Figure 55.</b> Fréquence de <i>S. pneumoniae</i> de sensibilité diminuée à la pénicilline dans le monde	151
<b>Figure 56.</b> Résistance de <i>S.pneumoniae</i> aux macrolides dans le monde	154
<b>Figure 57.</b> Les cinq sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans les infections invasives par continent	159
<b>Figure 58.</b> Incidence des infections invasives à <i>S.pneumoniae</i> chez l'enfant aux USA avant et après introduction du PCV7	170
<b>Figure 59.</b> Pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) en France : évolution de 1984 à 2008	171
<b>Figure 60.</b> Incidence des méningites à pneumocoques chez l'enfant âgé de moins de 2 ans en France (2001-2006)	172
<b>Figure 61.</b> Incidence des bactériémies à pneumocoques chez l'enfant âgé de moins de 2 ans en France (2001-2006)	172
<b>Figure 62.</b> Evolution de la distribution des sérotypes dans les infections invasives chez l'enfant âgé de moins de deux ans en France avant et après l'introduction du PCV7 (2001-2002 et 2006)	173
<b>Figure 63.</b> Distribution des sérotypes des souches sensibles	

(barres blanches), intermédiaires (barres grises) et résistantes (barres noires) à la pénicilline responsables d'infections invasives chez l'enfant âgé de moins de cinq ans (A) et l'adulte âgé de plus de 50 ans (B) durant la période 1998 –1999 et 2004 –2005 178

**Figure 64.** Taux de mortalité par infections pneumococciques chez l'enfant âgé de 1 à 59 mois/100 000 enfants de moins de 5 ans (HIV-négatif) dans le monde 180

**Figure 65.** Couverture sérotypique (%) des vaccins PCV7, PCV10 et PCV13 dans les infections invasives chez l'enfant âgé de moins de 5 ans dans le monde 182

## Liste des annexes

**Annexe 1.** Composition des milieux utilisés

**Annexe 2. Tableau 4.** Valeurs des scores et description pour l'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF MS

**Annexe 3. Figure 10.** Souche de *S.pneumoniae* sensible à l'optochine

**Annexe 4.** Résultats de l'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF MS

**Annexe 5. Figures 12 -19.** Résultats de la PCR en temps réel

**Annexe 6. Figure 20.** Résultats de l'amplification par PCR du gène rpoB

**Annexe 7.** Séquences du gène rpoB pour 41 souches de pneumocoques, 9 souches de streptocoques et 4 souches de référence

**Annexe 8. Tableaux 24 et 25.** Pourcentages d'identité et affiliation phylogénique des 50 souches étudiées

**Annexe 9. Figure 23.** Résultats de l'analyse factorielle des correspondances étudiant l'association de l'âge et la nature de l'infection

**Annexe 10. Figures 29, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41.** Résultats des concentrations minimales inhibitrices à différents antibiotiques

**Annexe 11. Tableau 33.** Relation sérotype-résistance

**Annexe 12. Figure 50 et 51.** Résultats de l'amplification par PCR des gènes de résistance aux macrolides

**Annexe13.** Séquences du gène ermB pour 12 souches de *S.pneumoniae*

## Liste des abréviations

<b>A</b>	Adénine
<b>ADH</b>	Arginine dihydrolase
<b>ADN</b>	Acide désoxy- ribonucléique
<b>AMI</b>	Amidon
<b>ANC</b>	Acide nalidixique, colistine
<b>ARA</b>	L-Arabinose
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATCC</b>	American Type Collection Culture
<b>BET</b>	Bromure d’Ethidium
<b>BHM</b>	Barrière hémato-méningée
<b>BHS</b>	Bouillon Hypersalé
<b>Blast</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BTS</b>	Bruker Bacterial Test Standard
<b>C</b>	Cytosine
<b>CIE</b>	Contre-immuno-Electrophorèse
<b>CIP</b>	Collection de l’Institut Pasteur
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CNRP</b>	Centre National de Référence des Pneumocoques
<b>COA</b>	Co-agglutination
<b>CRM</b>	<i>Corynebacterium diphtherae</i>
<b>CRP</b>	C-reactive protein
<b>Ct</b>	Cycle threshold
<b>dNTP</b>	désoxynucléotides triphosphates
<b>ERY</b>	Erythromycine
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetra acetic
<b>EPIBAC</b>	Réseau de surveillance des infections invasives à <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> (B) et <i>Streptococcus pyogenes</i> (A)
<b>ESC</b>	Esculine
<b>G</b>	Guanine
<b>GAVI</b>	Alliance Globale pour les Vaccins et l'Immunsation
<b>GLY</b>	Glycérol

<b>HCCA</b>	alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid
<b>HPLC</b>	High-performance liquid chromatography
<b>IL</b>	Interleukine
<b>INSP</b>	Institut National de Santé Publique
<b>INU</b>	Inuline
<b>KDa</b>	kilo Daltons
<b>LAC</b>	Lactose
<b>LCR</b>	Liquid céphalorRachidienLLT : linear technology
<b>LTA</b>	Lipoteichoïc Acid
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time- Of-Flight
<b>MAN</b>	Mannitol
<b>Mm</b>	Millimolaire
<b>MSD</b>	Merck sharp and Dohme
<b>m/z</b>	masse par charge
<b>mefA</b>	macrolide-lincosamide-streptogramin B efflu pump
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de magnésium
<b>MLS<sub>B</sub></b>	macrolides lincosamides streptogramines B
<b>MLST</b>	Multilocus Sequence Typing
<b>Nan</b>	Neuraminidase
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnologie Information
<b>OMA</b>	Otite Moyenne Aigue
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ORL</b>	Oto-rhino-laryngologie
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PCV</b>	Pneumococcal Vaccine
<b>PEN</b>	Pénicilline
<b>PG</b>	Peptidoglycane
<b>PLP</b>	Protéines liant la pénicilline
<b>PMEN</b>	Pneumococcal Molecular Epidemiology Network
<b>PROTEKT</b>	Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin
<b>PSDP</b>	Pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline
<b>Ps C</b>	polysaccharide C
<b>Psp</b>	Pneumococcal surface protein

<b>PVX</b>	Polyvitex
<b>QRDR</b>	Quinolone resistance determining region
<b>RAF</b>	Raffinose
<b>RIB</b>	Ribose
<b>rpm</b>	<b>rotation par minute</b>
<b>RTC</b>	Real-Time Classification
<b>RT-PCR</b>	Real time Polymerase chain reaction
<b>SOR</b>	Sorbitol
<b>SOS</b>	Sorbose
<b>SXT</b>	Cotrimoxazole
<b>T</b>	Thymine
<b>TA</b>	Teichoïc acid
<b>TBE</b>	TRIS, Borate, EDTA
<b>TET</b>	Tétracycline
<b>TFA</b>	Trifluoroacetic acid
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TRE</b>	Tréhalose
<b>Tris</b>	2-amino-2-hydroxyméthyl-1, 3-propanediol
<b>UFC</b>	unités formant colonie
<b>UNICEF</b>	United Nations International Children's Emergency Fund
<b>URMITE</b>	Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience Humaine
<b>VP</b>	Réaction de Voges-Proskauer

### INTRODUCTION

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) ou pneumocoque est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures essentiellement le nasopharynx. La virulence accrue de *S. pneumoniae* est liée essentiellement à la présence d'une capsule dont la variabilité antigénique permet de distinguer plus de 90 sérotypes différents (Henrichsen , 1995 ; Calix *et al.*, 2012 ). Le portage de *S. pneumoniae* varie selon l'âge. Il est plus élevé chez les enfants d'âge préscolaire, et plus bas chez les adolescents et les adultes (Regev-Yochay *et al.*, 2004).

*S. pneumoniae* représente une cause importante de méningites, de pneumonies, de bactériémies, d'otites et de sinusites. Il peut être aussi à l'origine d'autres types d'infections telles que les conjonctivites, arthrites purulentes, mastoïdites, péritonites, péricardites, abcès sous-cutanés...etc. Les maladies dites invasives (méningites, bactériémies, pneumopathies ...) sont grevées d'une morbidité et d'une mortalité importantes, surtout dans les classes d'âge les plus susceptibles envers les pneumocoques, à savoir les jeunes enfants et les personnes âgées. En 2005, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), estime que 1,6 millions de personnes meurent chaque année d'infections pneumococciques, parmi elles, 700 000 à 1 million d'enfants âgés de moins de cinq ans (WHO, 2007). Le pneumocoque est la première cause de surdit e acquise chez l'enfant, il entraîne des séquelles neurophysiques et il peut être à l'origine de séquelles invalidantes (Thabet *et al.*, 2007)

La similitude entre *Streptococcus pneumoniae* et les autres streptocoques du groupe *viridans* peut entraîner une erreur d'identification de ces microorganismes, Ce qui pourrait causer une surestimation de la résistance aux antibiotiques (Richter *et al.*, 2008).

Jusqu'en 1967, la pénicilline G était l'antibiotique de choix pour le traitement des infections pneumococciques, le pneumocoque étant naturellement sensible à cet antibiotique. L'antibio-résistance, qui est apparue comme phénomène alarmant à la fin des années 70 en Afrique du Sud, est désormais répandue dans le monde entier (Benbachir *et al.*, 2001; Ramdani-Bougoussa *et al.*, 2003; Reinert *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004a; Reinert *et al.*, 2007; Smaoui *et al.*, 2009; Varon, 2012). Les pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) sont aussi moins sensibles aux céphalosporines, aux macrolides, et à d'autres familles d'antibiotiques (Whitney *et al.*, 2000; Van der kooi *et al.*,

## INTRODUCTION

---

2005; van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2012). La prévalence de pneumocoques présentant une sensibilité diminuée à la pénicilline varie considérablement d'un pays à l'autre. Des taux élevés sont signalés en Europe comme en France et en Espagne (Chardon *et al.*, 2002; Garcia-Suarez *et al.*, 2006), en Afrique (Benbachir *et al.*, 2012; Charfi *et al.*, 2012) et en Asie (Xue *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011).

Devant l'augmentation importante ces dernières années du taux de PSDP, les macrolides constituent le traitement de première intention dans les infections pulmonaires et ORL (Ip *et al.*, 2001). Mais la résistance du pneumocoque à ces molécules prend actuellement de l'ampleur. Elle est en augmentation rapide et parfois plus importante que la résistance aux bêta-lactamines dans de nombreux pays (Farrell *et al.*, 2004a ; Borg *et al.*, 2009; Varon, 2011).

Un autre point d'intérêt est la répartition des différents sérotypes de pneumocoque surtout dans les groupes à risque et dans les infections graves. Cependant un nombre limité de sérotypes serait associé aux infections invasives à pneumocoques chez l'enfant. En effet 7 sérotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) sont responsables de la majorité des infections invasives chez l'enfant (Bingen, 2002; Isaacman *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que ces 7 sérotypes sont ceux qui composent le vaccin conjugué heptavalent PCV7. Ce sont aussi les sérotypes les plus fréquemment isolés dans le portage nasopharyngé chez l'enfant, qui représente le point de départ des infections pneumococciques (Bingen, 2002), et les plus résistants aux antibiotiques (Sa Leao *et al.*, 2000).

La meilleure stratégie pour diminuer l'incidence des infections invasives à pneumocoques et pour diminuer la diffusion de l'antibio-résistance serait l'administration d'un vaccin anti-pneumococcique. Le vaccin heptavalent conjugué à une protéine porteuse, immunogène dès l'âge de deux mois est introduit aux Etats-Unis en 2000 et en France en 2002, et est inclus dans le calendrier vaccinal de plus de 40 pays dont la Tunisie. L'introduction de ce vaccin a entraîné une diminution des infections invasives à pneumocoques dans la population cible, mais aussi dans la population non vaccinée par la diminution du portage nasopharyngé des sérotypes vaccinaux, et une augmentation du portage des sérotypes non vaccinaux (CDS, 2008a,c). De ce fait, depuis l'introduction du PCV7, l'incidence des infections invasives dues aux sérotypes vaccinaux a significativement diminué, mais celle des infections dues aux sérotypes non vaccinaux, notamment le 19A, a augmenté (Varon, 2012). Ce phénomène de remplacement est important car si l'incidence des infections invasives chez les enfants de moins de deux ans

## INTRODUCTION

---

reste inférieure à ce qu'elle était avant l'introduction du vaccin conjugué 7-valent, dans le reste de la population, l'incidence des infections invasives à pneumocoques est en augmentation. Dans ce contexte, deux autres vaccins conjugués, les PCV10 et PCV13 sont commercialisés.

Donc les caractéristiques des infections à pneumocoque d'une part, l'émergence puis la dissémination des pneumocoques résistants voire multi résistants d'autre part posent un véritable problème de santé publique à travers le monde qui demande la mise en place d'une surveillance étroite et active.

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

Le taux de résistance à la pénicilline qui est le reflet des résistances à toutes les bêta-lactamines est en nette augmentation dans notre pays. Le taux de PSDP est de 12,5% en 1994 (Smati *et al.*, 1994), et atteint 23,5% dans les méningites en 2010 (Tali-Maamar *et al.*, 2012).

En Algérie, le vaccin anti-pneumococcique n'est pas obligatoire. Selon l'OMS, les pathologies pneumococciques sont la première cause de mortalité évitable par un vaccin (WHO, 2007).

Notre travail est une étude monocentrique qui porte sur 100 souches de *S. pneumoniae* responsables d'infections invasives chez l'enfant et l'adulte, isolées de liquides céphalorachidiens, d'hémocultures et de liquides pleuraux de patients hospitalisés ou évacués à l'Hôpital Benbadis de Constantine durant une période de 7 ans (janvier 2005-décembre 2011).

Notre étude porte pour objectifs :

- La confirmation de l'identification des souches de *S.pneumoniae* par des méthodes moléculaires : la similitude entre *Streptococcus pneumoniae* et les autres streptocoques du groupe *mitis* peut entraîner une erreur d'identification de ces microorganismes. Il est suggéré que la mauvaise identification des streptocoques en pneumocoques dans les programmes de surveillance pourrait causer une surestimation de la résistance aux antibiotiques.

## INTRODUCTION

---

- L'étude des caractéristiques épidémiologiques des souches de *S. pneumoniae* isolées chez l'enfant et l'adulte (âge, nature de l'infection, variations saisonnières.....).
- L'étude de la résistance des pneumocoques aux principaux antibiotiques actifs : les bêta-lactamines (pénicilline, amoxicilline, céfotaxime et imipénème), et d'autres antibiotiques tels que les macrolides, cotrimoxazole, tétracyclines, fluoroquinolones, glycopeptides et aminosides : les pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) ont une tendance globale à être beaucoup plus résistants aux antibiotiques que les pneumocoques sensibles à la pénicilline. Cependant, le taux le plus élevé de résistance des PSDP semble être celui aux macrolides.
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des bêta-lactamines et de l'érythromycine : l'antibiogramme ne peut pas apprécier le niveau de résistance à la pénicilline G ou aux autres bêta-lactamines et l'utilisation d'autres disques de bêta-lactamines ne permet pas de déterminer le niveau de résistance à ces molécules. Outre le dépistage à l'oxacilline, on recommande la mesure des CMI à la pénicilline et à au moins 3 autres bêta-lactamines en cas d'infection sévère. La détermination de la CMI à l'érythromycine nous informe sur les niveaux de résistance à cet antibiotique.
- La mise en évidence des gènes responsables de la résistance aux macrolides : deux mécanismes sont à l'origine de cette résistance, le premier est la modification de la cible ribosomale sous le contrôle du gène ermB et le phénotype de résistance est noté MLS<sub>B</sub> (résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramines). Le deuxième mécanisme est l'efflux actif de l'antibiotique qui est contrôlé par les gènes mefA et le phénotype ainsi obtenu est noté M (résistance isolée aux macrolides). Notre but est de déterminer les gènes de résistance et leur corrélation avec le phénotype de résistance.
- Le sérotypage des pneumocoques : la surveillance des sérotypes de pneumocoques nous permettra d'évaluer les relations sérotype et gravité de l'infection, sérotype et âge du patient, enfant ou adulte, sérotype et résistance aux antibiotiques et enfin sérotypes circulants et vaccins. Nous souhaitons aider à trouver la place du vaccin et participer à l'évaluation de son efficacité par la surveillance des sérotypes émergents.

## PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Aspects microbiologiques du pneumocoque

#### 1.1 Historique

*Streptococcus pneumoniae* est isolé pour la première fois par Louis Pasteur en 1881, de la salive d'un enfant mort de la rage ; il l'appelle "microbe septique de la salive". En 1883, Talamon isole ce germe dans les crachats rouillés des pneumoniques et l'appelle "coccus lancéolé de la pneumonie". La description de cette espèce est réalisée par Fraenkel et Weichselbaum en 1886. En 1910, différents types sérologiques sont découverts et permettent l'emploi d'antisérums spécifiques. Ces derniers constituent le premier traitement efficace de la pneumonie à pneumocoque. En 1923, Griffith observe que le pneumocoque virulent possède une capsule donnant aux colonies un aspect lisse ou smooth (S) ; la perte héréditaire de la capsule entraîne la perte de la virulence et les colonies prennent un aspect rugueux ou rough (R). En 1928, ce même auteur montre qu'une souche R de *S. pneumoniae* non capsulée et non pathogène pour la souris, peut être transformée en une souche S capsulée et pathogène. En 1944, MacLeod et MacCarthy montrent *in vitro* que l'ADN est le facteur transformant chez les pneumocoques. La transformation de *S. pneumoniae* constitue la première description de transfert génétique chez les bactéries ; c'est ainsi qu'est établi le rôle de l'ADN en tant que support chimique de l'hérédité, ouvrant ainsi la voie à la biologie moléculaire. L'évolution des connaissances concernant ses caractères bactériologiques et taxinomiques a fait varier au fil du temps ses dénominations : « *Micrococcus pneumoniae* » par Klein en 1884, puis « *Diplococcus pneumoniae* » et « *Streptococcus pneumoniae* » par Chester en 1901. Sherman établit la première classification complète des streptocoques en 1937. Du groupe de la « phtisie » et des « maladies de poitrine », la pneumonie est individualisée sur le plan anatomique par Laennec en 1819 et sur le plan clinique par Grisolle en 1841. En 1883, Talamon établit le rapport entre le germe et la pneumonie. Lemierre, en 1935, puis Bariety précisent les modalités évolutives et la diversité des infections à pneumocoque (Brisou *et al.*, 2004). Après la deuxième guerre mondiale, l'utilisation de la pénicilline G bouleverse le pronostic des infections à pneumocoque. Cependant, la résistance à cet antibiotique est signalée dès 1943 au laboratoire et en 1967 chez des patients en Australie. En 1977, les premières souches multirésistantes apparaissent en Afrique du Sud. Depuis, la diffusion de ces

souches à un grand nombre de pays a transformé le problème thérapeutique en problème de santé publique. Les études sur la structure chimique et immunologique du pneumocoque ont permis de développer des techniques d'identification et des vaccins. Tentée dès 1911 avec des germes entiers tués, la vaccination n'a connu d'essor qu'avec les vaccins polysidiques capsulaires partiellement purifiés. Ils ont contenu successivement six (1940), 14 (1977) puis 23 valences (1983). Les vaccins conjugués sont venus plus récemment compléter l'arsenal préventif (Black *et al.*, 2004 ; Bingen *et al.*, 2008).

### 1.2 Classification

*Streptococcus pneumoniae* appartient au Règne: *Bacteria*, Phylum: *Firmicutes*, Classe: *Bacilli*, Ordre: *Lactobacillales*, Famille: *Streptococcaceae*, Genre: *Streptococcus*. Ce genre comprend actuellement 44 espèces et sous-espèces, regroupées en trois ensembles : pyogènes, oraux et du groupe D (tableau 1).

- Dans l'ensemble des streptocoques pyogènes :
  - *Streptococcus pyogenes* est l'espèce type du genre ; c'est le streptocoque  $\beta$ -hémolytique du groupe A.
  - *Streptococcus agalactiae* possédant l'antigène de groupe B est souvent désigné streptocoque B.
  - Dans le sous-ensemble 3, on trouve les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques des groupes C, G ou L.
  - Les souches des sous-ensembles 4 et 5, non hémolytiques, sont d'origine animale.
- Dans l'ensemble des streptocoques du groupe D, on trouve trois espèces commensales du tube digestif de l'homme et des animaux. *S. bovis* est le plus fréquemment isolé.
- Les streptocoques oraux correspondent aux streptocoques autrefois dénommés *viridans*. Ils sont, pour la plupart, alpha- ou non-hémolytiques et non groupables.

*S. pneumoniae* est inclus dans l'ensemble des streptocoques oraux, mais reste dans le *Bergey's manual*, édition 1986, parmi les streptocoques pyogènes pour son pouvoir pathogène. Les streptocoques oraux sont regroupés en cinq sous-ensembles (or1, or3 à or6). *S. pneumoniae* constitue à lui seul le sous-ensemble or3. L'analyse génomique montre une étroite similitude entre *S. pneumoniae* et les espèces *S. mitis* et *S. oralis*. Ces trois espèces sembleraient capables d'échanger entre elles des fragments d'acide

désoxyribonucléique (ADN) formant ainsi une mosaïque complexe, plutôt que trois espèces séparées (Thierry *et al.*, 2007).

**Tableau 1.** Classification de *S.pneumoniae*

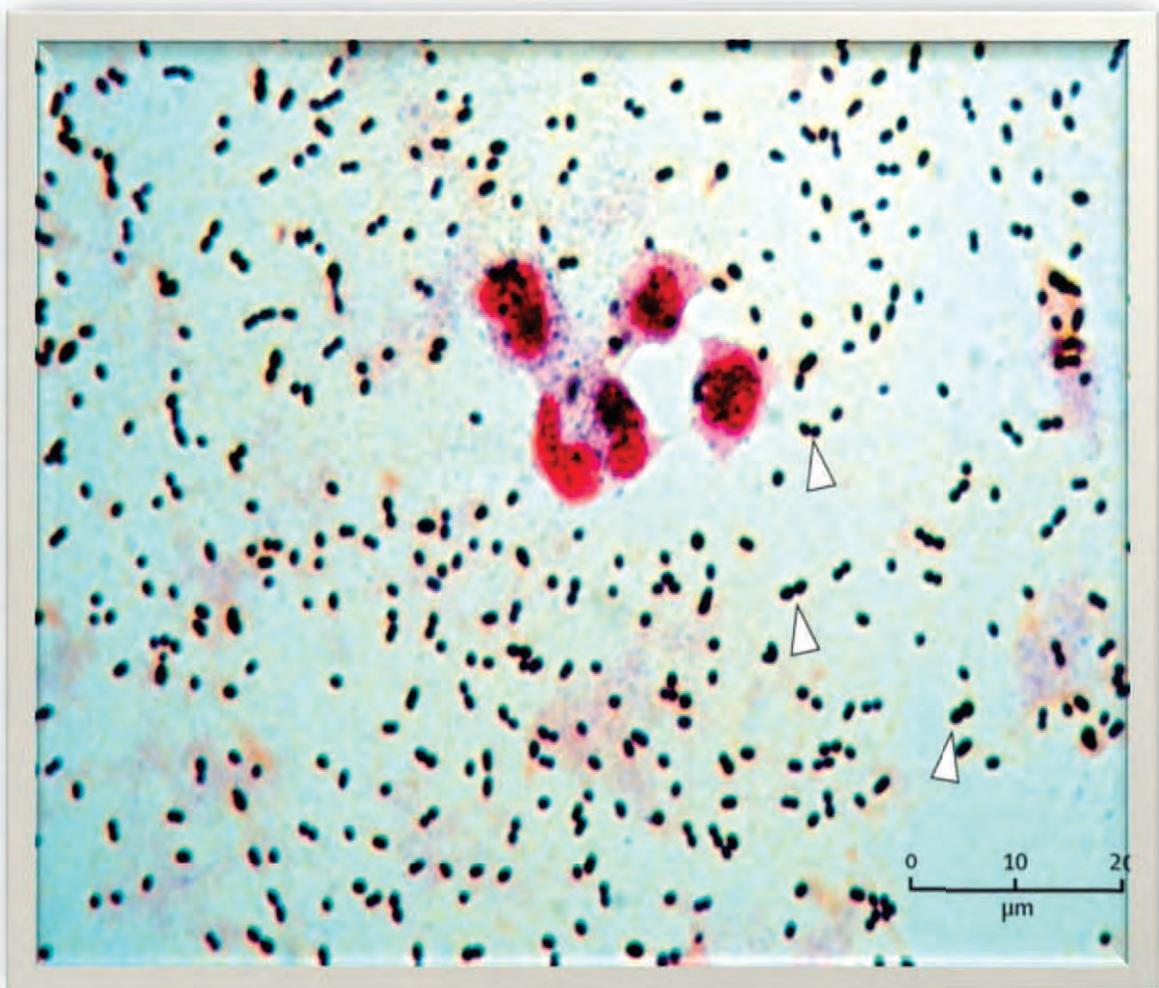
PYOGÈNES	GROUPE D	ORAUX
<b>sous-ensemble 1</b>	<i>S. bovis</i>	<b>sous-ensemble 1</b>
<i>S. pyogenes</i>	<i>S. equinus</i>	<i>S. mitis, St. sanguis</i>
	<i>S. alactolyticus</i>	<i>S. oralis</i>
		<i>S. gordonii</i>
<b>sous-ensemble 2</b>		<b>sous-ensemble 2</b>
<i>S. agalactiae</i>		
<b>sous-ensemble 3</b>		<b>sous-ensemble 3</b>
<i>S. equismilis</i>		<i>S. pneumoniae</i>
<i>S. dysgalactiae</i>		
<b>sous-ensemble 4</b>		<b>sous-ensemble 4</b>
		<i>S. milleri</i>
<b>sous-ensemble 5</b>		<b>sous-ensemble 5</b>
		<i>S. mutans</i>
		<b>sous-ensemble 6</b>
		<i>S. salivarius</i>

On dit souvent que *S.pneumoniae* appartient au groupe *mitis*, c'est-à-dire le groupe qui regroupe *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus gordonii* et *Streptococcus sanguinis*.

### 1.3 Caractères bactériologiques

#### 1.3.1 Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, le pneumocoque présente un aspect de diplocoque en flamme de bougie, en "8" ou en courtes chaînettes, Gram positif (figure 1). Les formes virulentes sont capsulées. Cependant, l'aspect n'est pas toujours évocateur. Par exemple, si l'environnement est carencé en magnésium ou en présence d'anticorps dirigés contre le sérotype capsulaire, on peut observer des chaînettes relativement longues. Dans certains cas, si le malade est sous traitement, les pneumocoques peuvent prendre un aspect pseudo-bacillaire. Dans certains produits pathologiques fibrineux et dans les cultures anciennes, le pneumocoque prend mal le Gram et peut apparaître Gram négatif (Albert *et al.*, 1991).



**Figure 1.** Aspect microscopique de *S. pneumoniae* (Van der Poll & Opal, 2009)

### 1.3.2 Caractères cultureux

- **Milieux de culture**

La culture de *S. pneumoniae* nécessite l'adjonction de facteurs de croissance. Les milieux les plus couramment utilisés sont la gélose Trypticase soja, la gélose Columbia ou la gélose Mueller-Hinton enrichies de 5 % de sang de cheval ou de mouton. On peut utiliser également la gélose chocolat dont la composition est proche de celle du milieu de Mueller-Hinton dont lequel sont incorporés 1 % d'hémoglobine et un mélange polyvitaminique remplaçant les facteurs de croissance du sang. La culture en milieu liquide se fait en bouillons cœur-cervelle ou Todd-Hewitt tamponnés qui favorisent la croissance bactérienne. L'utilisation d'un milieu sélectif comme la gélose Columbia ANC (acide nalidixique, colistine) permet l'inhibition de la flore bactérienne à Gram négatif des produits poly-microbiens. L'addition de gentamicine à la concentration de 6 µg/ml rend le milieu sélectif au pneumocoque (Thierry *et al.*, 2007) .

- **Conditions de culture**

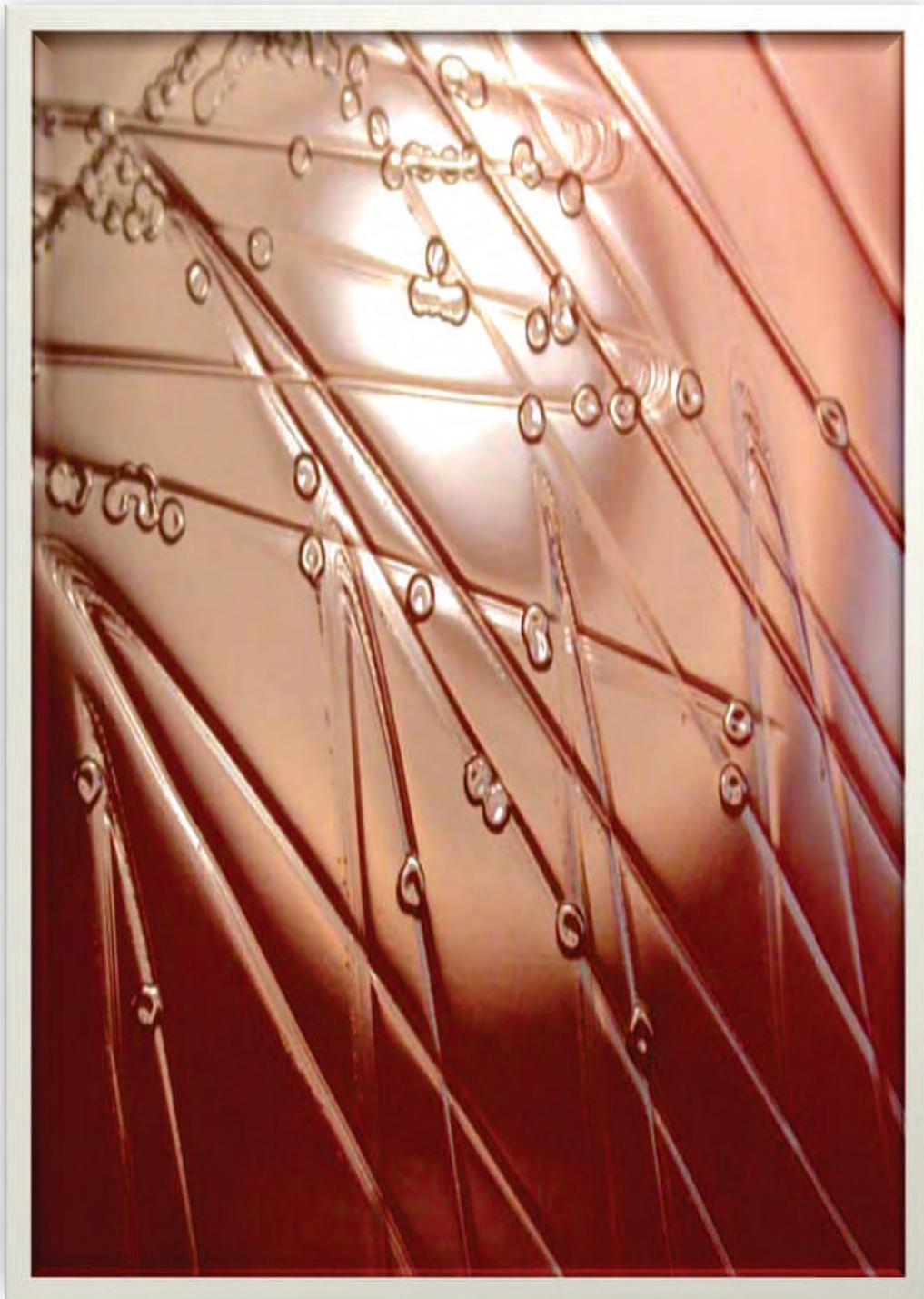
La culture du pneumocoque peut être réalisée à une température comprise entre 25 et 42°C et à des pH situés entre 6,5 et 8,3. En routine, on cultive le germe en 24 à 48 heures, entre 35 et 37°C. Le pH optimal est de 7,8. Ce germe nécessite des conditions d'anaérobiose ou tout au moins une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> à 5%.

- **Aspect macroscopique des colonies**

Les pneumocoques se présentent sous forme de petites colonies transparentes, rondes, de 0,5 à 1,5mm de diamètre. Ils développent une hémolyse de type alpha avec un verdissement du milieu, comme les streptocoques *viridans*. Les pneumocoques en culture sont sujets à une autolyse spontanée ; une ombilication au centre de la colonie correspond à un début d'autolyse (figure 2). Les colonies ont un aspect muqueux lorsque la capsule est de grande taille. Des colonies rugueuses, d'aspect ridé, sont rarement observées ; elles sont formées par des souches non capsulées.

### 1.3.3 Caractères biochimiques

Le pneumocoque ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation de l'eau oxygénée responsable en partie de son autolyse. Ce germe fermente le glucose, le lévulose, le maltose, pousse sur la gélatine sans la liquéfier. D'autres caractères



**Figure 2.** Culture de *S.pneumoniae* sur gélose au sang (Ho, 2008)

biochimiques de *Streptococcus pneumoniae* sont présentés dans le tableau 2.

Les galeries biochimiques s'avèrent décevantes quand à la discrimination de *S.pneumoniae* des autres streptocoques.

**Tableau 2.** Caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae* (Lemozy & Suc, 1997)

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

VP : Réaction de Voges-Proskauer

RAF: Raffinose

(-)=Caractère négatif

ADH : Arginine di-hydrolase

SOS : Sorbose

(+)=Caractère positif

ESC : Esculine

INU : Inuline

(d)=Caractère variable

ARA : L-Arabinose

LAC : Lactose

BHS : bouillon hypersalé

RIB : Ribose

MAN: Mannitol

AMI : Amidon

SOR: Sorbitol

GLY : Glycérol

TRE:Tréhalose

### ***1.3.4 Structure antigénique***

La caractérisation antigénique des pneumocoques se fait essentiellement à l'aide de la capsule, polysaccharide immunogène. Les anticorps produits sont spécifiques de sérotype.

Ce polysaccharide antigénique est la base de la classification sérotypique des pneumocoques. La structure antigénique de la capsule permet de reconnaître des sérotypes qui, sur la base de spécificités antigéniques communes, sont regroupés en 46 sérogroupes numérotés de 1 à 48 (les chiffres 26 et 30 ne sont pas attribués). Dans les formules antigéniques, la lettre "a" désigne la spécificité antigénique caractéristique du sérotype ou commune aux sérotypes d'un même sérotype. Les lettres "b", "c", ... désignent les spécificités antigéniques additionnelles. Les sérotypes d'un même sérotype sont désignés

par des lettres capitales "A", "B", ... La lettre "F" (pour first) est parfois utilisée pour désigner le premier sérotype d'un sérogroupe. Dans le sérogroupe 9, les lettres "L", "N" et "V" sont également utilisées pour la désignation des sérotypes (L pour Lederle, N pour Neufeld et V pour Valdemar). Les 90 sérotypes identifiés sont présentés sur le tableau 3.

La nomenclature utilisée pour les sérotypes est la nomenclature danoise dite de Kauffmann-Lund. La nomenclature américaine, actuellement très peu utilisée, figure entre parenthèses (Henrichsen, 1995). Trois autres serotypes sont identifiés. Il s'agit des serotypes 11E (Calix *et al.*, 2002), 6C (Park *et al.*; 2007), et 6D (Jin *et al.*; 2009).

### **1.3.5 Identification**

- **Identification par méthodes conventionnelles.**

L'identification des pneumocoques repose sur trois critères :

- la sensibilité à l'optochine ;
- la lyse par la bile ;
- la mise en évidence d'une capsule.

L'inoculation à l'animal sensible permet également de mettre en évidence avec certitude *Streptococcus pneumoniae* (Albert *et al.*, 1991; Lemozy & Suc, 1997)

- **Sensibilité à l'optochine (éthylhydrocupréine)**

L'optochine est un dérivé proche de la quinine. Des disques de 6mm de diamètre sont chargés de 5µg d'optochine, dose calculée pour provoquer sur une culture de pneumocoque sur gélose au sang, une zone d'inhibition dont le diamètre est compris entre 14 et 35mm. Les autres streptocoques sont résistants à l'optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque. Cependant, 0,5 à 5% des pneumocoques sont résistants à l'optochine et quelques streptocoques *viridans* sont sensibles à l'optochine. Il convient donc d'être nuancé et de tenir compte du diamètre de la zone d'inhibition : la plupart des pneumocoques en phase S (smooth) ou R (rough) ont un diamètre d'inhibition supérieur à 14- 20 mm. Pour un diamètre inférieur à 14 mm, il est nécessaire de pratiquer des tests complémentaires (Lund, 1959).

**Tableau 3.** Classification des 90 sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* (Henrichsen, 1995).

Sérotypes	Formules antigéniques	Sérotypes	Formules antigéniques	Sérotypes	Formules antigéniques
1 (1)	1a	15F (15)	15a, 15b, 15c, 15f	28A (79)	28a, 28c, 23d
2 (2)	2a	15A (30)	15a, 15c, 15d, 15g	29 (29)	29a, 29b, 13b
3 (3)	3a	15B (54)	15a, 15b, 15d, 15e, 15h	31 (31)	31a, 20b
4 (4)	4a	15C (77)	15a, 15d, 15e	32F (32)	32a, 27b
5 (5)	5a	16F (16)	16a, 16b, 11d	32A (67)	32a, 32b, 27b
6A (6)	6a, 6b	16A	16a, 16c	33F (70)	33a, 33b, 33d
6B (26)	6a, 6c	17F (17)	17a, 17b	33A (40)	33a, 33b, 33d, 20b
7F (51)	7a, 7b	17A (78)	17a, 17c	33B (42)	33a, 33c, 33d, 33f
7A (7)	7a, 7b, 7c	18F (18)	18a, 18b, 18c, 18f	33C (39)	33a, 33c, 33e
7B (48)	7a, 7d, 7e, 7h	18A (44)	18a, 18b, 18d	33D	33a, 33c, 33d, 33f, 6a
7C (50)	7a, 7d, 7f, 7g, 7h	18B (55)	18a, 18b, 18e, 18g	34 (41)	34a, 34b
8 (8)	8a	18C (56)	18a, 18b, 18c, 18e	35F (35)	35a, 35b, 34b
9A (33)	9a, 9c, 9d	19F (19)	19a, 19b, 19d	35A (47, 62)	35a, 35c, 20b
9L (49)	9a, 9b, 9c, 9f	19A (57)	19a, 19c, 19d	35B (66)	35a, 35c, 29b
9N (9)	9a, 9b, 9e	19B (58)	19a, 19c, 19e, 7h	35C (61)	35a, 35c, 20b, 42a
9V (68)	9a, 9c, 9d, 9g	19C (59)	19a, 19c, 19f, 7h	36 (36)	36a, 9e
10F (10)	10a, 10b	20 (20)	20a, 20b, 7g	37 (37)	37a
10A (34)	10a, 10c, 10d	21 (21)	21a	38 (71)	38a, 25b
10B	10a, 10b, 10c, 10d, 10e	22F (22)	22a, 22b	39 (69)	39a, 10d
10C	10a, 10b, 10c, 10f	22A (63)	22a, 22c	40 (45)	40a, 7g, 7h
11F (11)	11a, 11b, 11e, 11g	23F (23)	23a, 23b, 18b	41F (38)	41a, 41b
11A (43)	11a, 11c, 11d, 11e	23A (46)	23a, 23c, 15a	41A (74)	41a
11B (76)	11a, 11b, 11f, 11g	23B (64)	23a, 23b, 23d	42 (80)	42a, 20b, 35c
11C (53)	11a, 11b, 11c, 11d, 11f	24F (24)	24a, 24b, 24d, 7h	43 (75)	43a, 43b
11D	11a, 11b, 11c, 11e	24A (65)	24a, 24c, 24d	44 (81)	44a, 44b, 12b, 12d
12F (12)	12a, 12b, 12d	24B (60)	24a, 24b, 24e, 7h	45 (72)	45a
12A (83)	12a, 12c, 12d	25F (25)	25a, 25b	46 (73)	46a, 12c, 44b
12B	12a, 12b, 12c, 12e	25A	25a, 25c, 38a	47F (52)	47a, 35a, 35b
13 (13)	13a, 13b	27 (27)	27a, 27b	47A (84)	47a, 43b
14 (14)	14a	28F (28)	28a, 28b, 16b, 23d	48 (82)	48a

### - *Lyse par la bile ou phénomène de NEUFELD*

A pH neutre, les pneumocoques provenant d'une culture en bouillon et mis en suspension dans de l'eau stérile, sont lysés par une solution de désoxycholate de sodium de 2 à 10%. La lyse se traduit par un éclaircissement du milieu en quelques minutes. Selon les auteurs, 86 à 100% des pneumocoques sont lysés par la bile. L'addition de bile ou de sels biliars à une culture neutralisée, active une autolysine, impliquée dans la division cellulaire, qui clive la liaison entre l'acide N-acétyl-muramique et l'alanine. Le peptidoglycane est ainsi altéré et la bactérie apparaît soluble dans la bile. En pratique, la recherche de la lyse par la bile est rarement effectuée car elle est de réalisation plus complexe que la recherche de la sensibilité à l'optochine (Lund, 1959)

### - *Mise en évidence de l'antigène capsulaire*

Elle s'effectue à l'aide d'un sérum anti-pneumococcique polyvalent, dirigé contre tous les types capsulaires. La réaction peut s'effectuer, soit à partir de cultures, soit à partir de produits pathologiques (Lalitha *et al.*, 1996; Brisou *et al.*, 2004) . Il existe plusieurs méthodes :

\*réaction du "gonflement capsulaire" ou réaction de NEUFELD.

Cette technique est aussi la méthode de choix utilisée pour le sérotypage des pneumocoques.

\* réactions d'agglutination :

- agglutination de particules de latex sensibilisés
- coagglutination (COA) avec des staphylocoques tués

\* contre-immuno-électrophorèse (CIE).

### - *Inoculation à l'animal sensible*

Les souris et les lapins sont hautement sensibles à l'infection par les pneumocoques. La méthode de choix utilise l'inoculation intra péritonéale à une souris jeune (12 à 14g). Celle-ci meurt en 24-48 heures à la suite d'une péritonite aiguë et bactériémie. Cependant, 5% des souris inoculées survivent pendant une période plus longue, et dans ce cas, il faut les sacrifier au plus tard 96 heures après l'infection. Les pneumocoques sont ainsi isolés en culture pure dans l'hémoculture.

#### • *Identification par méthodes moléculaires*

Le génome de *S.pneumoniae* a été totalement séquencé et est composé de 2160837 paires de bases avec 2236 régions codantes (5% de séquences d'insertion qui témoignent de phénomènes de réarrangements avec du matériel génétique d'autres bactéries) (Van der Poll & Opal, 2009).

Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées surtout depuis qu'une nouvelle espèce: *Streptococcus pseudopneumoniae* est décrite qui est résistante à l'optochine en incubation sous CO<sub>2</sub> mais apparaît sensible à l'optochine en atmosphère ambiante (Arbique *et al.*, 2004). Parmi ces techniques :

- hybridation moléculaire par sonde Accuprobe<sup>R</sup> (Richter *et al.*, 2008)
- PCR avec amorces spécifiques :
  - amplification de gènes codant pour des facteurs de virulence :  
gènes très documentés : PlyN, LytA, PsaA .....(Arbique *et al.*, 2004).
  - Gène sodA: comparaison après PCR et séquençage du gène sodA à une banque de donnée (Arbique *et al.*, 2004).
  - Gène ARN 16S, qui présente 99% d'homogénéité avec *S.mitis* et *S.oralis* (El Aila *et al.*, 2010).
  - Multi-Locus Sequence Typing (MLST): amplification et séquençage de 7 panels de gènes essentiels au métabolisme de la bactérie et présentant un faible taux de mutation (El Aila *et al.*, 2010).

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

## 2. Physiopathologie et pouvoir pathogène

Les pneumocoques sont responsables d'infections très sévères à tous les âges, avec une incidence élevée chez les enfants de moins de deux ans et les sujets de plus de soixante

---

ans. Ces bactéries peuvent atteindre les méninges par contiguïté ou par voie hémotogène provoquant une méningite purulente d'évolution souvent sévère ou compliquée par la survenue de cloisonnements de l'espace sous-arachnoïdien.

La pneumonie franche lobaire aiguë est la plus classique des pneumococcies ; elle cède bien aux traitements antibiotiques mais reste redoutable chez le sujet âgé ou immunodéprimé. Parfois l'infection respiratoire à pneumocoques est une bronchite grave chez le nourrisson (bronchite capillaire), le vieillard ou l'immunodéprimé. Les séreuses peuvent être infectées : pleurésie avec risque d'empyème, péricardite, synovite ou péritonite.

Les pneumocoques sont également responsables d'infections ORL (otites, mastoïdites, sinusites) mais aussi d'angines, pharyngites ou laryngites. Ces infections sont plus fréquentes chez l'enfant (Thierry *et al.*, 2007).

### **2.1 *Pneumocoque et Portage rhinopharyngé***

Le rhinopharynx de l'enfant est colonisé par une flore riche et variée et présente un écosystème qui d'une part représente un effet barrière contre les bactéries étrangères, et d'autre part constitue le réservoir de bactéries impliquées dans les principales infections de l'enfant (otites moyennes aiguës, sinusites et pneumonies) et en particulier à *Streptococcus pneumoniae*. Ce portage rhinopharyngé précède l'infection, mais celle-ci ne survient que dans un petit nombre de cas.

De précédentes études montrent que la colonisation du rhinopharynx par *S. pneumoniae* est un processus dynamique, évoluant dans le temps et en fonction de nombreux facteurs. Le rhinopharynx est la niche écologique de *S. pneumoniae* qui possède la propriété de coloniser les cellules du rhinopharynx, en particulier grâce à une adhésine. Cette protéine lie de façon non covalente d'une part, la phosphoryle choline des acides teichoïques de la bactérie, et d'autre part des ligands de la cellule eucaryote tels que l'acide sialique.

La dynamique de la colonisation du rhinopharynx par *S. pneumoniae* a été étudiée il y a 20 ans par Gray & Dillon (1988), en se basant sur l'étude du sérotypage. La première acquisition d'une souche de *S. pneumoniae* a lieu vers 6 mois, et les enfants acquièrent en moyenne 1 à 3 sérotypes en 3 ans. La colonisation du nasopharynx apparaît précocement au cours de la vie. Elle est plus précoce dans les populations des pays en voie de développement, vers 2- 3 mois. Dans les pays industrialisés, la colonisation est plus

tardive ; une étude rapporte chez le nourrisson bien portant un pourcentage d'enfants porteurs de *S. pneumoniae* variant de 12% entre 1 et 3 mois à 32% à 18 mois (Aniansson *et al.*, 1992). On note un taux de colonisation aux Etats-Unis et en Suède de l'ordre de 50% à la fin de la 1<sup>ère</sup> année de vie. D'autres études montrent que tous les enfants ont été en contact avec le pneumocoque avant l'âge de deux ans et 50% des enfants de cet âge sont porteurs (Raymond *et al.*, 2002; Chavanet *et al.*, 2011). Cette colonisation est maximale en âge préscolaire, vers 2-3 ans, puis décline progressivement, pour atteindre 10% chez l'adolescent et 2 à 9% chez l'adulte sans contact avec de jeunes enfants.

La fréquence du portage est augmentée par d'autres facteurs, comme la vie en collectivité de jeunes enfants notamment en crèche, l'importance de la fratrie, la saison froide ou encore l'existence d'une infection virale concomitante. Ces facteurs, et particulièrement l'existence d'une fratrie, exposent au risque d'une colonisation plus précoce (Sung *et al.*, 1995; Bouskraoui *et al.*, 2011).

La fréquence du portage est diminuée par les traitements antibiotiques qui diminuent le portage en fin de traitement, mais cet effet disparaît en moins d'un mois. Ces souches de portage subissent une forte pression de sélection antibiotique. En conséquence, ce sont les mêmes sérotypes impliqués dans le portage qui seront les plus résistants aux antibiotiques (Dunais *et al.*, 2008).

Dans l'étude de Raymond *et al.* (2002), les sérotypes les plus fréquents sont les 23F, 19F, 14 et 6B dont 94.6% présentent une sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP). Dans celle de Charveriat *et al.* (2005) parmi les PSDP, 82% des souches avaient pour sérotypes les 14, 9V, 19F, 23F et 6B. Dans une étude marocaine en 2007, le taux des PSDP est de 34.7% et le sérotypage des isolats de *S. pneumoniae* montre la fréquence élevée des sérogroupes et sérotypes 19F, 6, 14, 23, 18 et 9 (Bouskraoui *et al.*, 2011). Le portage de souches de PSDP est largement favorisé, à titre individuel, par la pression de sélection exercée par le nombre de traitements antibiotiques et à titre collectif, par la dissémination des ces souches résistantes

La fréquence du portage est aussi diminuée par le vaccin conjugué anti-pneumococcique heptavalent (PCV7). Des études montrent que la vaccination par le PCV7 a un impact sur le portage nasopharyngé : diminution du portage global, diminution du portage des sérotypes vaccinaux et augmentation des sérotypes non vaccinaux (Cohen *et al.*, 2010).

Pourtant, l'influence de ce vaccin sur la colonisation nasopharyngée par le pneumocoque dans une population d'enfants fréquentant les crèches collectives a été étudiée dans deux départements français entre 1999 et 2006 et cette étude a mis en évidence une diminution du portage de pneumocoque de sensibilité diminuée (PSDP), et une augmentation de la proportion des sérotypes non vaccinaux, mais, le taux de prévalence de portage de pneumocoque n'a pas subi de modification significative ; ceci est associé au fait que la fréquentation d'une crèche multiplie le risque de portage de pneumocoque par un facteur de 1,5 (Dunais *et al.*, 2008).

Dans les pays où le PCV7 a été introduit, on remarque une diminution globale de la résistance à la pénicilline mais un maintien du taux de portage dû à l'installation (émergence ou sélection) de sérotypes pneumococciques non vaccinaux tels le 19A et 6A. Cette modification de la répartition des sérotypes témoigne de l'effet du vaccin sur l'écologie bactérienne du nasopharynx.

Dans l'étude de Chavanet *et al.* (2011), parmi les souches de portage, le taux des PSDP a atteint 50%, globalement les sérotypes non vaccinaux sont les plus fréquents dans 41% des cas et représentaient 19% de la résistance à la pénicilline.

Le rôle éventuel de ces souches de remplacement sur l'avenir des pathologies dues au pneumocoque doit inciter à poursuivre une surveillance soutenue.

### **2.2 *Pneumocoque et immunité***

Le principal mécanisme de défense vis-à-vis des bactéries à développement extracellulaire repose essentiellement sur la phagocytose par les polynucléaires ou les macrophages. Cette phagocytose est rendue possible par l'opsonisation de la bactérie qui permet son attachement aux cellules phagocytaires. Cette opsonisation se fait grâce aux composés du complément, aux anticorps ou à des protéines de l'inflammation comme la protéine C réactive (CRP).

En fonction de la nécessité ou non de l'aide des lymphocytes T pour la production d'anticorps on distingue des antigènes thymo-dépendants et des antigènes thymo-indépendants. Deux types d'antigènes thymo-indépendants sont décrits :

- Les antigènes thymoindépendants de type I, possédant des caractéristiques physicochimiques qui en font, à fortes doses, des stimulateurs de tous les lymphocytes B, immatures et matures.
- Les antigènes thymoindépendants de type 2, ne pouvant stimuler que des lymphocytes B matures. De ce fait, ces antigènes sont peu immunogènes chez le jeune enfant de moins de 24 mois mais leur immunogénicité augmente avec l'âge.

Les polysaccharides du pneumocoque, de la paroi et de la capsule appartiennent à cette classe d'antigène

Au cours de la colonisation par le pneumocoque, il existe une réponse immune dirigée contre les différents antigènes de la bactérie : polysaccharides capsulaires, polysaccharides de la paroi et notamment phosphorylcholine, pneumolysine et autres protéines bactériennes (PspA). Cependant, les anticorps dirigés contre les polysaccharides capsulaires constituent les anticorps les plus efficaces pour la protection de l'hôte ; les anticorps dirigés contre les autres antigènes ayant un rôle protecteur mineur.

La réponse humorale induite par l'infection pneumococcique est liée au développement d'anticorps spécifiques du type capsulaire des pneumocoques infectants, elle entraîne la protection quasi absolue des animaux immunisés vis-à-vis d'une souche ayant le même sérotype, mais pas vis-à-vis d'autres sérotypes (Lagrange, 1994). Les antigènes polysaccharides sont des antigènes thymo-indépendants (de classe II). Ils ont comme limitation principale leur faible pouvoir immunogène et l'absence de développement de mémoire immunologique. Une deuxième injection n'entraîne aucun effet de rappel. Certains sérotypes (23F, 6A, 14, 19) sont plus faiblement immunogéniques que d'autres, la conjugaison des polysaccharides à des protéines porteuses est associée à une réponse thymo-dépendante donc au développement de cellules T- mémoire.

Les réponses humorales anti-pneumococciques concernent dans la grande majorité des cas les IgM et les IgG<sub>2</sub> chez l'adulte et les IgG<sub>1</sub> chez l'enfant. Le développement d'IgA sécrétoires se produit au cours de l'infection, néanmoins, aucune augmentation de fréquence, ni aucune gravité particulière des infections pneumococciques n'ont été observées chez les individus atteints de déficits en IgA. Par contre, les déficits en IgG, sont toujours associés à une fréquence plus élevée de rechutes (Sanders *et al.*, 1993).

Les sérotypes n'ont pas tous ni le même pouvoir pathogène, ni le même pouvoir immunogène. Les sérotypes 3 et 4, isolés plus souvent chez l'adulte, sont très virulents, et entraînent une forte réponse immunitaire. A l'inverse, les sérotypes 6A et 14, isolés surtout chez l'enfant, sont à la fois moins virulents et moins protecteurs.

Ceci est lié à la nature du produit de clivage du fragment C3 présent à la surface du pneumocoque après opsonisation, qui est spécifique du polysaccharide capsulaire.

Dans le cas du sérotype 3 ou 4, il s'agit de C3d, dont le récepteur CR2 est sur les lymphocytes B, ce qui va permettre une bonne réponse anticorps. Au contraire, les sérotypes 6A ou 14 dont la capsule permet l'opsonisation par le C3b, dont le récepteur CR3 est sur les polynucléaires neutrophiles, sans activation en C3d, sont plus facilement phagocytés et n'induisent que peu d'anticorps car ils sont rapidement éliminés par phagocytose (Varon, 2001).

### ***2.3 Pneumocoque et facteurs de virulence.***

La paroi de *S.pneumoniae* est composée de peptidoglycanes et d'acides teichoïques majoritairement représentés par le polysaccharide C commun à toutes les souches de *S.pneumoniae* quel que soit le sérotype. Le peptidoglycane est constitué de chaînes polysaccharidiques de N-acétyl glucosamine et d'acide N-acétyl muramique reliés par des ponts peptidiques. Celui-ci est surmonté d'une capsule épaisse composée de polysaccharides.

Les facteurs majeurs de virulence de *S. pneumoniae* sont la capsule et la pneumolysine (figure 3)

#### ***2.3.1 La capsule***

La capsule est le premier facteur de virulence découvert et le plus important. Elle a l'aspect d'un gel muqueux constitué de polymères homo- et hétéropolyosidiques de haut poids moléculaire (500 à 2000 kDa) branchés ou linéaires et spécifiques du type capsulaire. C'est le premier antigène connu, non protéique, qui induit une réponse anticorps sans pour autant induire de réponse mémoire. Toutes les souches isolées chez l'homme sont capsulées (Alonso *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 1995).

Les polysaccharides capsulaires sont à l'origine de la classification sérotypique. La différence de virulence est attribuée à la qualité du polysaccharide qui est respectivement

constitué de glucose et d'acide glucuronique ou de glucose uniquement. De même, à composition égale, la quantité de capsule influe sur la virulence d'une souche puisqu'une diminution de la production de polysaccharide capsulaire diminue la virulence (Varon, 2011). L'influence de la composition de la capsule sur la virulence a été confirmée, des souches de sérotypes 6, 5 et 2 transformées en sérotype 3 ont respectivement une virulence augmentée, diminuée ou inchangée (Rieux, 2002).

D'un sérotype à l'autre, la structure primaire de la chaîne polysaccharidique varie selon la nature, le nombre, la taille, la séquence, le type de liaison et la présence de substituants non osidiques.

La capsule gêne considérablement l'opsonophagocytose et permet la croissance des bactéries. Elle joue un rôle de barrière physique en empêchant les récepteurs CR1 et CR3 des cellules phagocytaires d'entrer en contact avec les fragments C3b du complément qui se sont éventuellement fixés sur la paroi des bactéries.

### ***2.3.2 La pneumolysine***

Protéine de 53 kDa, la pneumolysine, est une toxine cytoplasmique libérée dans le milieu extérieur sous l'action d'une autolysine, la LytA. Sa pathogénicité est multifonctionnelle : elle est d'une part liée à son activité cytotoxique sur les cellules respiratoires et endothéliales et d'autre part à un effet pro-inflammatoire. Dans les méningites, la pneumolysine entraîne la destruction des jonctions serrées des cellules endothéliales de la barrière hémato-méningée. Elle joue aussi un rôle dans l'apoptose neuronale et dans la survenue de surdité post-méningitique.

La pneumolysine est responsable d'une diminution de l'activité bactéricide des monocytes et des polynucléaires neutrophiles. Il y a également inhibition de la prolifération des lymphocytes et réduction de la synthèse des anticorps. La partie C-terminale de la pneumolysine est capable de se fixer aux fragments Fc des immunoglobulines et C1q du complément. Cette région possède aussi des séquences homologues à celle de la protéine C-réactive (CRP), une protéine de l'inflammation qui opsonise normalement les bactéries et favorise ainsi l'activation du complément par la voie classique en l'absence d'anticorps (Mitchell & Andrew, 1997). En activant et en détournant le système du complément au profit du pneumocoque, la pneumolysine permet la libération des fragments C3a et C5a qui provoquent l'afflux et l'activation des polynucléaires, et l'amplification de la réaction

inflammatoire avec production de cytokines pro-inflammatoires telles IL-1 et le TNF-alpha, aboutissant à la destruction de l'épithélium des voies respiratoires supérieures et des alvéoles sans qu'il y ait pour autant destruction des pneumocoques (Rieux, 2002).

La pneumolysine est immunogène et les anticorps produits confèrent une solide immunité contre les infections pneumococciques, ce qui fait de cette protéine un bon candidat pour l'élaboration de nouveaux vaccins (Sicard *et al.*, 2000). Les mutants de pneumocoque dont le gène codant pour la pneumolysine a été inactivé ont une virulence atténuée mais non abolie, ce qui souligne que d'autres facteurs jouent aussi un rôle dans la virulence du pneumocoque.

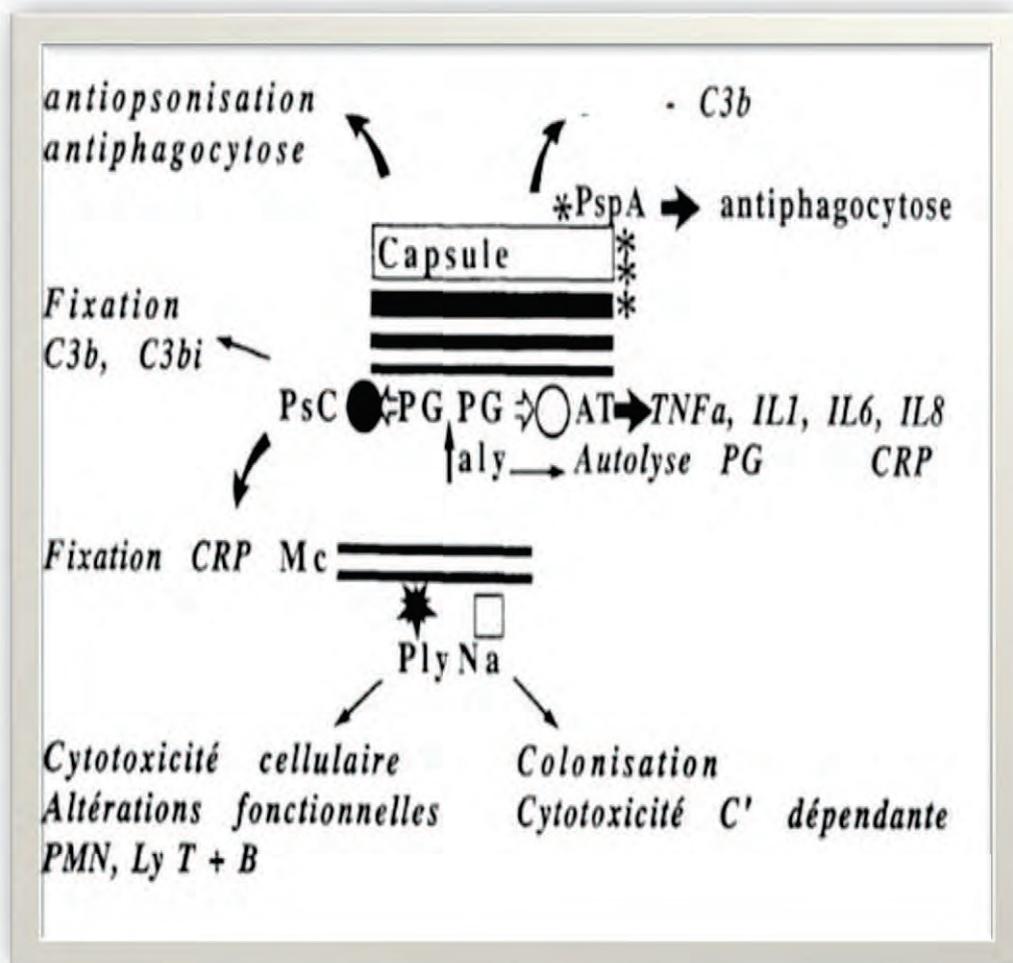
### ***2.3.3 Autres facteurs de virulence***

D'autres facteurs sont déterminants dans l'expression de la virulence du pneumocoque. Les principaux facteurs de virulence sont classés en fonction du type de réponse qu'ils induisent chez l'hôte (Bedos *et al.*, 1991; Alanso *et al.*, 1995).

- Parmi les éléments de surface du pneumocoque, la protéine de surface PspA (pneumococcal surface protein), ancrée aux résidus choline des acides teichoïques et lipoteichoïques, et qui facilite l'invasion systémique du pneumocoque en inhibant la voie alterne du complément. Elle interférerait avec la déposition du C3b, un facteur du complément qui s'associe aux antigènes bactériens, et/ou inhiberait la formation de la C3 convertase qui permet d'amplifier l'activation de la voie alterne du complément sans laquelle la déposition de C3b reste limitée. D'autre part, la PspA est capable de se lier à la lactoferrine, apportant à la bactérie la quantité de fer nécessaire à sa croissance.
  - Les éléments de la paroi bactérienne induisent des réactions inflammatoires puissantes. Le peptidoglycane active la voie alterne du complément, les acides teichoïques TA ou polyoside C et lipoteichoïques LTA interviennent à différents niveaux dans la réponse inflammatoire.
  - Certaines protéines hydrolytiques cytoplasmiques (Varon, 2001) :
    - la neuraminidase aide à l'adhésion aux cellules épithéliales et à la colonisation du système respiratoire.
    - la hyaluronidase facilite la migration des pneumocoques du site de colonisation au système vasculaire et participe au processus d'invasion de l'hôte et induit notamment des méningites.
-

- L'immunoglobuline A1 protéase qui inactive les IgA1 sécrétoires humaines, Après clivage des IgA1, les fragments Fab peuvent toujours se fixer aux antigènes bactériens et empêcher la phagocytose en protégeant les bactéries d'une opsonisation par des immunoglobulines fonctionnelles. Les IgA protéases semblent particulièrement impliquées dans le portage oropharyngé et la colonisation des muqueuses.

La contribution relative de ces différents facteurs selon les souches et le foyer infecté permet d'expliquer les divers degrés de sévérité des infections. L'étude approfondie des facteurs de virulence et la découverte de nouvelles protéines ou voies métaboliques impliquées dans la virulence permettront d'améliorer la compréhension de la pathogenèse du pneumocoque. Les facteurs protéiques Ply, PspA,, NanA, ..., constituent de nouvelles cibles pour la découverte de molécules plus sûres et de vaccins plus performants.



**Figure 3.** Représentation schématique des facteurs de pathogénicité et de virulence des pneumocoques. les facteurs de pathogénicité sont liés à la présence d'acide teichoïque (AT) induisant la libération de facteurs pro-inflammatoires ( $TNF\alpha$ ,  $IL_{-1\beta}$ ,  $IL_{-6}$ ,  $IL_{-8}$ , CRP), et au polysaccharide C (Ps C) qui entraîne l'activation du complément avec la fixation de  $C_{3bi}$  et de la CRP. Les facteurs de virulence sont représentés par la capsule ayant une activité antiphagocytaire et prévenant l'opsonisation, renforcée par la présence de la protéine de surface (PspA). Un autre facteur de virulence constitutif correspond à la pneumolysine (Ply) qui est relarguée après autolyse des bactéries sous l'action d'une autolysine (aly) qui coupe le peptidoglycane (PG). Cette autolyse s'accompagne aussi du relargage de neuraminidase (Na) qui intervient dans la colonisation et la cytotoxicité cellulaire complément (C') dépendante (Lagrange, 1994).

### ***2.4 Facteurs prédisposant à l'infection invasive à pneumocoque***

L'incidence des infections invasives à pneumocoques est fortement corrélée à l'âge, mais aussi à la présence de différents facteurs de risque comme le diabète, la bronchite chronique, une insuffisance cardiaque, une drépanocytose, la consommation d'alcool, le tabagisme, l'existence d'un cancer solide, d'une hémopathie ou d'une infection par le VIH (Loeb *et al.*, 2009). La connaissance de ces facteurs de risque devrait permettre d'identifier les cibles prioritaires de la prévention, et notamment de la vaccination. L'existence de maladies chroniques sous-jacentes prédisposant aux méningites à pneumocoques est signalée chez l'adulte comme chez l'enfant (Floret, 2001). En dehors des anomalies de la rate, sont considérés comme facteur pouvant être favorisants, l'âge surtout lorsqu'il est associé au diabète, l'éthylisme chronique, la cirrhose, une immunodépression congénitale ou acquise (Infection par le VIH, traitement par immunosuppresseur, cancer évolutif). Un âge supérieur à 60 ans est significativement associé à des facteurs sous-jacents prédisposant à une méningite à pneumocoques: sinusites, otites, facteurs d'immunosuppression ou maladie chronique. Le diabète est reconnu comme un facteur majorant le risque infectieux en général, de même, l'éthylisme chronique et la cirrhose sont considérés comme des états d'immunodépression favorisant la survenue d'infections pneumococciques. Au cours de l'infection par le VIH, les infections invasives à pneumocoque sont beaucoup plus fréquentes que dans la population générale (Obaro *et al.*, 2011). Pour les méningites à pneumocoques, chez l'enfant (Levy *et al.*, 2009), dans plus d'un tiers des cas, une otite moyenne aiguë est associée à la méningite. Plus rarement, la porte d'entrée est une sinusite, une ethmoïdite ou une mastoïdite. L'association à une pneumonie est encore plus rare. Les facteurs de risque représentaient 6,8% chez les enfants de moins de deux ans et 26,2% chez les plus âgés. Une brèche méningée a été retrouvée dans 5,5% des cas, une asplénie fonctionnelle ou organique dans 1,3% des cas, une cardiopathie dans 1,1% des cas et une infection par le VIH retrouvée encore plus rarement (Bingen *et al.*, 2005). Aux États-Unis, Arditi *et al.*, (1998) ont retrouvé une condition préexistante ou un facteur de risque dans 21% des cas. Les facteurs individuels de l'hôte aggravent le risque de survenue et le pronostic des méningites à pneumocoque. Les facteurs de risques retrouvés le plus souvent sont les brèches méningées, l'infection VIH, l'hypo/asplénie et certains déficits immunitaires héréditaires, certains défauts du complément, l'asplénie congénitale et les déficits lymphocytaires B et T (Picard, 2008).

Certains facteurs favorisent significativement le risque d'être infecté par une souche de sensibilité diminuée à la pénicilline. Les facteurs dominants sont les âges extrêmes de la vie, les séjours en collectivité, la prise d'antibiotiques. Les antibiotiques en cause sont les bêta-lactamines, même à dose faible, mais aussi le cotrimoxazole et les macrolides. En cas de souche résistante, le facteur le plus significatif est la prise de bêta-lactamines dans les 3 mois précédents (Bedos & Bruneel, 2006).

### ***2.5 Physiopathologie des infections invasives à pneumocoque***

Le pneumocoque est un microorganisme non toxigène, invasif, à multiplication extracellulaire. Dans tous les processus infectieux, il va agir en deux étapes : adhésion et invasion.

#### ***2.5.1 Pneumopathie à pneumocoque***

Celle-ci se produit dans la grande majorité des cas par l'inhalation des bactéries colonisantes de l'appareil respiratoire supérieur. Néanmoins, si le portage est fréquent, la prévalence de la maladie pulmonaire est faible, liée aux mécanismes locaux non spécifiques et spécifiques de défense. Pour entraîner la maladie, l'existence d'un déficit de ces mécanismes ou l'importance et la nature de l'inoculum (souches virulentes et invasives) explique la diminution de la clairance bactérienne au niveau du poumon profond (Brisou *et al.*, 2004)

Normalement la présence d'anticorps et de complément baignant l'alvéole permettent l'opsonisation et l'ingestion par les macrophages alvéolaires. Par ailleurs, l'activation du complément permet l'accumulation de polynucléaires. Néanmoins, certaines souches sont capables, du fait de leur structure particulière de la capsule, de ne pas entraîner l'opsonisation, ni l'afflux de polynucléaires et ainsi de se multiplier localement au sein des alvéoles pulmonaires.

Cette multiplication bactérienne et les effets (liés à l'autolysine) qu'elle produit constituent la deuxième étape aboutissant à la constitution des lésions, typiques de la pneumonie lobaire (Lagrange, 1994).

### 2.5.2 *Bactériémie à pneumocoque*

La bactériémie à pneumocoques est parfois associée aux lésions tissulaires, en particulier pulmonaires. Elle est toujours d'un mauvais facteur pronostique. Néanmoins, certaines bactériémies sont reconnues sans notion de l'existence de foyer cliniquement patent.

Les mécanismes et la porte d'entrée des pneumocoques dans le courant sanguin sont mal connus. Il a ainsi été décrit la possibilité de passage à partir du nasopharynx. Au niveau des poumons, les pneumocoques résistants aux conditions locales peuvent, après destruction des cellules endothéliales capillaires, se retrouver dans la circulation sanguine. Une autre voie serait leur passage dans la circulation lymphatique, le système lymphatique pourrait servir de réservoir intermédiaire de la réplication des pneumocoques (Lagrange, 1994).

### 2.5.3 *Méningite à pneumocoque*

La barrière hémato-méningée (BHM) est composée de deux structures distinctes. La première, constituée par l'endothélium des capillaires méningés, est caractérisée par l'existence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales. La seconde structure est représentée par les plexus choroïdes, lieux de synthèse du LCR, situés au niveau des ventricules. (Brisou *et al.*, 2004).

L'envahissement des espaces méningés par *S. pneumoniae* suppose différentes étapes préalables :

- Colonisation des muqueuses nasopharyngées ;
- Translocation vers le sang ;
- Résistance aux défenses de l'organisme et multiplication dans le sang ;
- Traversée de la BHM et multiplication dans le LCR.

De nombreuses études cliniques et expérimentales ont suggéré l'existence d'une relation entre la magnitude de la bactériémie et le développement d'une méningite. L'ensemencement du LCR nécessite une bactériémie élevée et prolongée. Ainsi les méningites à *S. pneumoniae* s'observent plus fréquemment chez les enfants ayant une bactériémie à un taux  $> 10^2$  unités formant colonie (ufc)/ml (86%) que chez ceux dont le taux est  $< 10^2$  ufc/ml (4%). Le maintien d'un seuil critique de bactériémie apparaît donc comme un pré-requis pour la traversée de la BHM. L'aptitude de *S. pneumoniae* à développer une méningite est associée à sa capacité spécifique de résister aux défenses de

---

l'organisme au cours de la phase systémique. Il découle de ces notions, d'une part que l'hémoculture représente un élément important du diagnostic des méningites bactériennes et d'autre part que le traitement doit avoir, en plus de l'activité bactéricide au niveau du LCR, une activité bactéricide systémique pour assurer une efficacité au cours de la phase de dissémination sanguine (Bell, 1985).

D'autres infections invasives existent mais sont plus rares :

- Les arthrites à pneumocoques ne représentent que 5 à 6% des arthrites (Renou *et al.*, 2007). Ces infections sont favorisées par un état d'immunodépression ou par une maladie chronique sous-jacente.
- Les péricardites à pneumocoques sont devenues exceptionnelles (9%) depuis l'utilisation large des antibiotiques, la plupart s'associe à une pneumopathie et une bactériémie (Geri *et al.*, 2008).
- Les péritonites primitives, responsables de 1% des urgences abdominales de l'enfant, sont devenues exceptionnelles, notamment chez l'adulte (Guerin *et al.*, 1983).

### ***2.6 Épidémiologie des infections invasives à pneumocoque***

Les pneumococcies sont avant tout des infections communautaires. L'infection pneumococcique est en règle sporadique. Les variations saisonnières sont marquées par une recrudescence hivernale. C'est en cette saison que l'on peut observer de petites épidémies de pneumopathies. Ces épidémies surviennent de préférence dans des collectivités où règne la promiscuité, comme les crèches (Brisou *et al.*, 2007).

Les infections invasives à pneumocoque sont fréquentes. Leur incidence est plus élevée dans les pays en développement que dans les pays industrialisés (O'Brien *et al.*, 2009). En France, parmi les étiologies bactériennes responsables d'infections communautaires, le pneumocoque tient la première place dans les méningites et les pneumonies. Les estimations évaluent le nombre de cas annuels à 132 000 pneumonies, 5 000 bactériémies et 400 à 500 méningites (Gaillat, 1998). Chez l'enfant, les infections invasives à pneumocoque, méningites, bactériémies et pneumopathies présentent un pic d'incidence dans les 2 premières années de vie.

Ainsi, en 1997, l'incidence des infections à *S. pneumoniae*, était de 45/100 000 chez les nourrissons de moins d'un an et de 12/100 000 chez ceux de 1– 4 ans. L'incidence des

---

méningites à pneumocoque était d'environ 1/100 000 dans la population générale, et atteignait 4 à 10/100 000 chez les moins de deux ans. Parmi les bactéries à l'origine des méningites de l'enfant, la fréquence relative de *S. pneumoniae* était de 60 % chez les 2–11 mois. *S. pneumoniae* est la première cause de méningite bactérienne chez les enfants de moins de deux ans dans de nombreux pays. Chez les enfants âgés de 6 à 24 mois, l'incidence annuelle des infections invasives à pneumocoque varie de 10 à 40 cas pour 100 000 dans des pays comme le Danemark, la Finlande, la France, l'Allemagne et le Royaume-Uni, tandis qu'elle est comprise entre 50 et 170 cas pour 100 000 chez les enfants espagnols (Black *et al.*, 2004).

Les infections invasives à *Streptococcus pneumoniae* sont un thème récurrent en infectiologie. En effet, dans les pays industrialisés, les dernières années ont été marquées, d'une part, par l'émergence de résistances aux antibiotiques, et d'autre part par la vaccination des enfants en bas âge par le vaccin anti-pneumococcique conjugué heptavalent (Wintenberger, 2010).

La mise sur le marché du conjugué heptavalent a influencé l'épidémiologie des infections pneumococciques. La vaccination est efficace, puisqu'on remarque une nette diminution de l'incidence des pneumococcies chez les enfants de moins de cinq ans (cible vaccinale), mais aussi chez les adultes de plus de 65 ans, probablement par un effet indirect (Pilishvili *et al.*, 2010). Mais on note aussi un changement des sérotypes en cause dans les infections invasives : ainsi, si les sérotypes vaccinaux sont en nette diminution, on remarque une augmentation de l'incidence des sérotypes non vaccinaux.

Depuis l'introduction de la vaccination des enfants en bas âge, une diminution de l'incidence des infections invasives à pneumocoques chez les enfants de moins d'un an est observée; diminution d'autant plus remarquable que l'incidence de ces infections était préalablement en hausse depuis dix ans (File, 2004). Si l'incidence des infections invasives à pneumocoque diminue chez les enfants en bas âge, on remarque, en revanche, une augmentation de ces dernières chez les adultes. Cette augmentation de l'incidence, et la mortalité toujours importante de ces infections, plaident pour une politique de prévention s'adressant aux adultes (Varon, 2012).

### 3. Résistance aux antibiotiques

#### 3.1 Historique

*Streptococcus pneumoniae* présente une résistance naturelle aux aminosides (résistance de bas niveau), à l'acide nalidixique, à l'acide fusidique (résistance de bas niveaux) et aux polymyxines.

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

En revanche, *Streptococcus pneumoniae* possède une sensibilité naturelle à de nombreux antibiotiques (bêta-lactamines à l'exception du mécillinam et de l'aztréonam, tétracyclines, chloramphénicol, macrolides, lincosamides, synergistines, sulfamides, triméthoprime, rifampicine, fosfomycine et glycopeptides) et la réalisation d'un antibiogramme a longtemps été considérée comme superflue car la pénicilline G était l'antibiotique de choix.

En fait, au cours des années, des souches de pneumocoques ont acquis une résistance vis-à-vis de tous les antibiotiques à l'exception des glycopeptides : sulfamides (1943), tétracyclines (1963), érythromycine (1967), pénicilline G (souches de sensibilité diminuée aux bêta-lactamines) (1967), chloramphénicol (1970), rifampicine (1977), streptomycine (résistance de haut niveau) (1977), kanamycine (résistance de haut niveau) (1977), pénicilline G + chloramphénicol (1977), pénicilline G + érythromycine + chloramphénicol + tétracycline + cotrimoxazole (1977), sulfamides + tétracyclines + érythromycine + chloramphénicol (1979) (Chardon, 2008).

Les pneumocoques sont naturellement très sensibles aux bêta-lactamines avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très basses : 0,004 à 0,06 mg/L pour pénicilline G, amoxicilline et céfotaxime. En Australie, en 1967, ont été décrits les premiers isollements de pneumocoques avec des CMI augmentées pour la pénicilline G; ces souches dites de sensibilité diminuée (PSDP) restent accessibles à un traitement par forte dose de la pénicilline, sauf dans les méningites. En Afrique du Sud, en 1977, des souches avec des CMI de pénicilline encore plus élevées (CMI de 4 à 8 mg/L) et des souches multi-résistantes ont été isolées. Elles étaient responsables d'échecs thérapeutiques lors de méningites traitées à fortes doses de pénicilline. Les antibiotiques de référence

restent les bêta-lactamines. L'acquisition de résistances vis-à-vis de ces familles d'antibiotiques représente aujourd'hui un problème de santé publique. Dans ce contexte, de nouvelles molécules actives sur le pneumocoque ont été développées : une synergistine (quinupristine/dalfopristine), un kétolide (télithromycine), une fluoroquinolone (lévofloxacine) et une oxazolidinone (linézolide) (Chardon, 2008).

### **3.2 Mécanismes de résistance**

#### **3.2.1 Résistance aux bêta-lactamines**

Les bêta-lactamines sont des antibiotiques bactéricides qui agissent en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, structure essentielle de la paroi bactérienne. Les cibles des bêta-lactamines sont des protéines situées à la surface externe de la membrane cytoplasmique, les PLP (protéines de liaisons à la pénicilline) ou Penicillin Binding Protein. *Streptococcus pneumoniae* possède six PLP, cinq de haut poids moléculaire (PLP 1a, 1b, 2x, 2a, 2b) et une de bas poids moléculaire (PLP 3). A l'opposé de certaines bactéries, comme *H. influenzae*, qui produisent une bêta-lactamase, la résistance des pneumocoques à la pénicilline se fait par modification de l'affinité des PLP pour les bêta-lactamines. Ces dernières accèdent facilement à leurs cibles pariétales après avoir diffusé librement à travers la capsule et le peptidoglycane. Elles se lient de façon covalente aux PLP en se fixant à la sérine du site actif de l'enzyme. Le complexe ainsi formé est inactif du point de vue enzymatique, entraînant un arrêt de la synthèse du peptidoglycane (Doit & Bingen, 1996). Chez *S. pneumoniae*, la résistance aux bêta-lactamines, est d'origine chromosomique, liée à une modification des PLP par la survenue de recombinaisons dans leurs gènes. Ces recombinaisons font suite à des échanges de gènes de PLP issus d'espèces voisines, et aboutissent à la formation de PLP mosaïques, c'est à dire avec alternance de régions identiques à celles des souches sensibles et de régions très variables provenant d'évènement de transformation et de recombinaison inter ou intra espèces. Cette structure en mosaïque des gènes suggère que les séquences divergentes ont été introduites dans les gènes de PLP du pneumocoque par recombinaison au cours de transformation. En effet, *S.pneumoniae* est une espèce naturellement transformable. L'ADN recombinant provient probablement d'espèces proches du pneumocoque. Il a été montré que les régions modifiées des gènes de la PLP 2b de certaines souches résistantes sont similaires à celles

de certains *S.mitis* (Dowson *et al.*, 1993). De même, des régions des gènes des PLP 2x semblent provenir des gènes des PLP de *S.oralis*. En fait, la structure en mosaïque de ces gènes paraît complexe, faisant probablement intervenir des fragments d'ADN provenant de plusieurs espèces au cours de multiples recombinaisons successives. La sélection de mutants serait variable en fonction des différentes molécules de bêta-lactamines. L'étude de la fixation de différentes bêta-lactamines sur les PLP des souches sensibles montre que l'affinité pour les différentes PLP varie d'une molécule à l'autre. La diversité des modifications des gènes des PLP des souches résistantes rend compte de l'hétérogénéité de la résistance aux bêta-lactamines : la liaison des différentes molécules est plus ou moins affectée en fonction de leur structure et des modifications moléculaires d'une ou plusieurs PLP. Ainsi, selon le nombre et la nature des PLP modifiées, le niveau de résistance aux différentes bêta-lactamines sera variable. La diminution de l'affinité de la PLP 2x semble être responsable de la résistance de bas niveau à la pénicilline G. Le haut niveau de résistance à la pénicilline G requiert une diminution d'affinité de quatre PLP : 2 x, 2 b, 1 a et 2 a (Martin *et al.*, 1992).

Le niveau de résistance est variable en fonction des molécules, ce qui impose en pratique la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des molécules susceptibles d'être utilisées pour toutes les PSDP isolées en situation clinique. Certaines bêta-lactamines restent constamment plus actives que la pénicilline G, c'est le cas de l'amoxicilline, de l'imipénème, des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération injectables comme le céfotaxime ou le ceftriaxone. Les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> générations et les céphalosporines orales, à l'exception du cefpodoxime, sont moins actives que la pénicilline G (Goldstein, 1997).

La résistance aux céphalosporines provient d'une mutation des PLP 1a et 2x. Les souches possédant un haut niveau de résistance à toutes les bêta-lactamines le seraient par mutation successive de leurs PLP de haut poids moléculaire. En pratique, pour la plupart des souches PSDP, seule la CMI de la pénicilline augmente et les études montrent peu de souches résistantes à l'amoxicilline ou au céfotaxime. D'autre part, la résistance aux bêta-lactamines est associée dans presque 50% des cas à une résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques comme les tétracyclines, les macrolides, le chloramphénicol ou le triméthoprime- sulfaméthoxazole (pneumocoques multirésistants)

D'un point de vue épidémiologique, deux mécanismes peuvent expliquer la diffusion des

souches résistantes: la diffusion clonale d'une souche résistante, la diffusion horizontale de gène de résistance par transformation et recombinaison.

### 3.2.2 Résistance aux macrolides

Les macrolides forment une classe d'antibiotiques ayant comme structure commune un grand noyau lactone sur lequel peuvent être branchés des sucres aminés ou non. Parmi les macrolides commercialisés, trois groupes sont distingués selon le nombre d'atomes formant ce cycle ; les diverses molécules diffèrent en outre par les sucres. On distingue ainsi les macrolides à noyau lactone à 14 atomes (comme l'érythromycine), à 15 atomes (azithromycine), et à 16 atomes (comme la spiramycine). Récemment, les kétolides sont venus s'ajouter à cette liste, en particulier la télithromycine. Cette molécule est un dérivé de l'érythromycine A où l'un des sucres, le L-cladinose, a été remplacé par une fonction cétone et où une chaîne 11-12-carbamate modifiée par une chaîne alkyle a été branchée. On rapproche des macrolides et des kétolides des antibiotiques apparentés non par leur structure chimique mais par leurs sites et mécanisme d'action, les lincosamides (clindamycine et lincomycine) et les streptogramines B (pristinamycine I, quinupristine virginiamycine B) utilisées en association avec les streptogramines A (pristinamycine II, dalfopristine, virginiamycine M) sous forme de pristinamycine, de quinupristine-dalfopristine ou de virginiamycine. Cet ensemble d'antibiotiques forme le groupe dit MLS<sub>B</sub>, (pour macrolides, lincosamides et streptogramines facteur B) (Canu *et al.*, 2002).

D'autre part, le ribosome est formé d'une petite sous-unité ribosomale 30S et d'une grosse sous-unité 50S. Cette dernière est composée d'ARN 23S et 5S et d'au moins 30 protéines désignées par la lettre L (large) et numérotées. La structure secondaire de l'ARN 23S est repliée du fait de l'appariement de bases complémentaires et forme 6 domaines numérotés de I à VI (Leclercq & Courvalin, 2002). L'érythromycine se fixe sur cette sous-unité 50S du ribosome bactérien. La liaison d'une seule molécule par ribosome entraîne une inhibition de la synthèse protéique. Le site de liaison de l'érythromycine est situé à proximité de la base de la cavité qui contient le centre peptidyl transférase où s'effectue la synthèse du peptide, à l'entrée du tunnel qui permet sa libération. La surface de ce tunnel est formée par les domaines I à V de l'ARN 23 S, par les parties globulaires de L22 et L4 et par une chaîne  $\beta$  de L22.

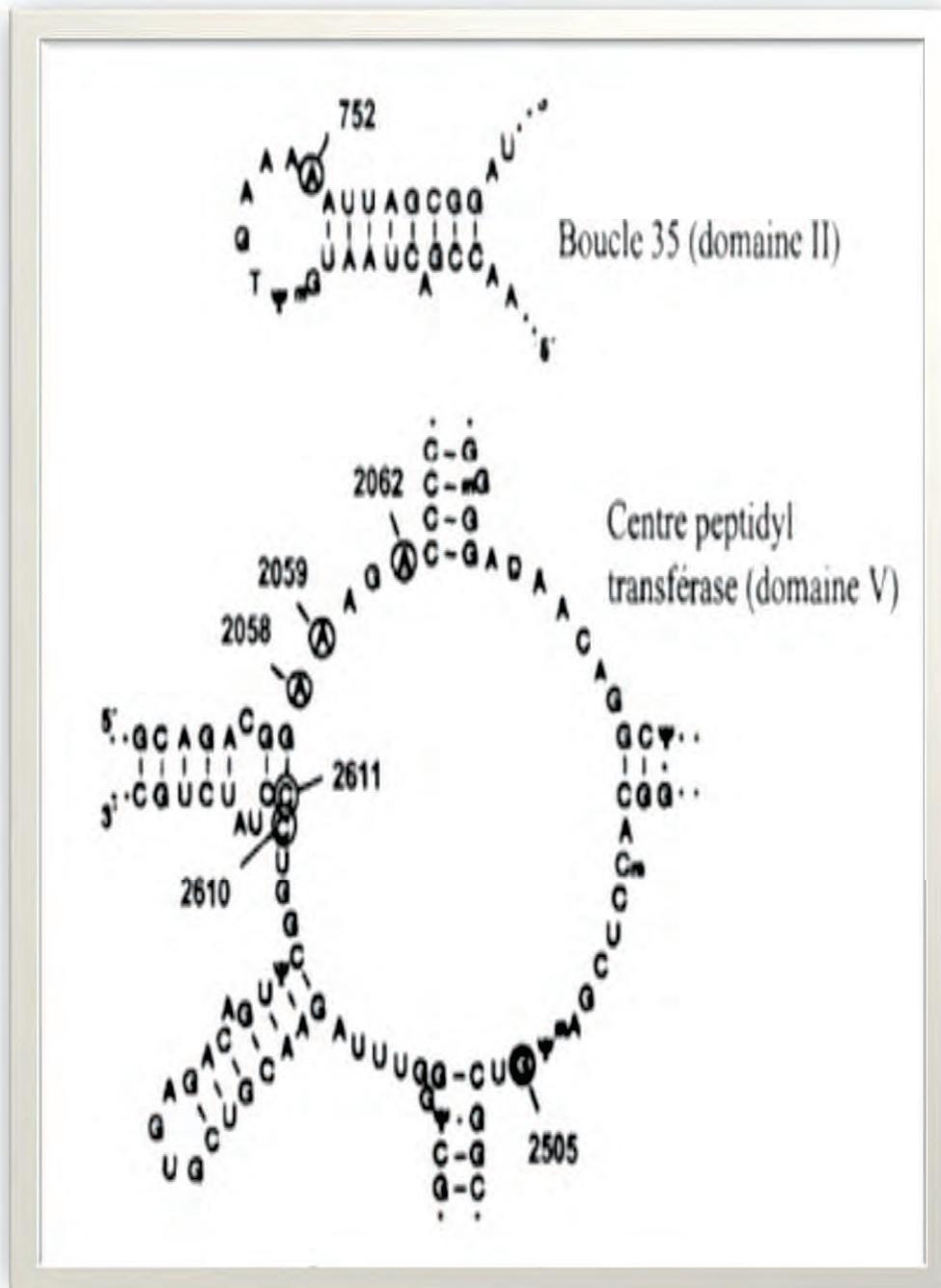
Le site de liaison majeur de l'érythromycine se situe au niveau de 2 séquences de l'ARN 23S constituées par la boucle centrale du domaine V associée au centre peptidyl transférase et la boucle 35 du domaine II qui sont contiguës en configuration spatiale. Les bases cruciales étaient les adénines en position 752 (domaine II), 2058,2059 et 2062, la guanine 2505 et l'uridine 2609 (domaine V) (figure 4). L'érythromycine bloque par encombrement stérique la croissance de la chaîne peptidique et provoque la dissociation du peptidyl-ARNt. De plus, l'érythromycine empêche aussi l'assemblage du ribosome au moment de l'initiation de la synthèse protéique.

Les bactéries peuvent utiliser plusieurs moyens afin de résister aux macrolides:

- la diminution de l'affinité pour leur site de fixation par modification enzymatique de celui-ci ou par mutation (La modification de la cible par mutation est un nouveau mécanisme récemment décrit)
- la diminution de l'accès à la cible par efflux actif des molécules.

- **Modification de la cible ribosomale : le phénotype  $MLS_B$**

Ce type de résistance résulte de l'acquisition d'un gène *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) en règle générale transposable chez le pneumocoque. Ce gène code pour une méthylase ribosomale qui par di-méthylation de l'adénine 2058 de l'ARN ribosomal 23S empêche la liaison de l'érythromycine sur le domaine V (Weisblum, 1995). Comme il a été indiqué plus haut, l'adénine en position 2058 est un point de contact essentiel pour les macrolides. Sa modification réduit l'affinité de l'érythromycine pour sa cible soit en empêchant son accès soit en modifiant la structure du site de fixation. Chez la grande majorité des souches de pneumocoque, ce mécanisme est inductible, à des degrés divers, par l'ensemble des macrolides et lincosamides mais non par les kétolides. Il confère une résistance de niveau variable qui dépend du degré de méthylation et qui est croisée à l'ensemble des macrolides (avec un cycle à 14, 15 et 16 atomes), aux lincosamides et à la streptogramine B (phénotype de résistance  $MLS_B$ ). Cette résistance s'exprime le plus souvent à haut niveau.



**Figure 4.** Représentation partielle de la structure secondaire des domaines V et II de l'ARN23S. Les bases dont la mutation est associée à la résistance aux macrolides sont entourées (Canu *et al.*, 2002).

Chez *S. pneumoniae*, cette enzyme, qui est codée par le gène *ermB*, est habituellement localisée sur un transposon conjugatif de type Tn1545 (Trieu-Cuot *et al.*, 1990), transférable de chromosome à chromosome chez les pneumocoques, le plus souvent avec d'autres gènes de résistance (*tetM* pour les tétracyclines et *aphA-3* pour la kanamycine). Ainsi, la diffusion de ces gènes de résistance peut se faire sur le mode clonal, et par transferts horizontaux, expliquant le maintien de la multirésistance.

- **Résistance par efflux**

La résistance acquise aux macrolides par efflux actif qui consiste à rejeter l'antibiotique en dehors de la bactérie est sous la dépendance d'une pompe, qui comporte douze domaines membranaires se localisant dans la membrane cytoplasmique (Leclercq & Courvalin, 2002), codée par le gène *mefA*. La spécificité de cette pompe fait que la résistance n'affecte que les macrolides à noyau à 14 et 15 atomes, n'affecte ni les macrolides avec un cycle à 16 atomes, ni les lincosamides, ni les kétolides, Cette résistance s'exprime le plus souvent à bas niveau (Johnston *et al.*, 1998). Les souches restent parfaitement sensibles aux macrolides à 16 atomes, aux lincosamides et aux streptogramines B, même après induction par l'érythromycine, car ces antibiotiques ne semblent pas être des substrats de la pompe. Celle-ci confère un profil de résistance particulier (phénotype M) exprimé par le gène *mefA* qui est transférable de pneumocoque à pneumocoque et serait porté par un grand transposon : le transposon Tn1207.1 de 7,244 kilobases décrit par un groupe italien, de même que le transposon MEGA de 5,4 à 5,5 kilobases décrit aux Etats-Unis (Gay & Stephens, 2001).

- **Résistance par mutation ribosomale**

Les études de divers mutants de pneumocoques sélectionnés *in vitro* par différents macrolides ont révélé que plusieurs des structures qui participent aux sites de liaison des macrolides dans les domaines V et II de l'ARN 23S (bases A752, A2058, A2059, C2610 et C2611) et les protéines L22 et L4 présentent des mutations qui peuvent être responsables de la résistance aux MLS (Tait-Kamradt *et al.*, 2000). La plupart des mutations affectent l'ARN 23S. La sensibilité aux macrolides diminue en fonction du nombre de copies mutées et une résistance franche n'était obtenue qu'avec un minimum de deux copies mutées. Le phénotype de résistance conféré par mutation de la cible 23S varie en fonction du nombre de copies mutées. Des phénotypes spécifiques sont caractérisés chez le pneumocoque qui présentent des mutations ponctuelles d'une des bases A2058 ou A2059.

Par exemple, les substitutions A2058G et A2058U confèrent un phénotype MLS<sub>B</sub> et donnent le plus haut degré de résistance aux macrolides à noyau à 14, 15 et 16 atomes. Alors que les mutations de type A2059G confèrent une résistance élevée à l'érythromycine et à l'azythrimycine, modérée à la clarithromycine et à la clindamycine définissent le phénotype ML.

### 3.2.3 Résistance aux autres antibiotiques

- **Fluoroquinolones.**

L'activité anti bactérienne des fluoroquinolones est de type bactéricide et repose sur l'inhibition de la réplication, et donc de la synthèse de l'ADN. Les fluoroquinolones ont deux cibles potentielles: l'ADN gyrase et la topoisomérase IV.

La résistance aux fluoroquinolones est liée soit à des mutations dans ou l'autre de ces deux cibles (Gutmann & Varon, 2002), soit à l'augmentation d'un efflux actif (Daporta *et al.*, 2004). Les mutations siègent en général dans une région appelée QRDR (quinolone resistance determining region). La modification d'une seule des deux cibles est responsable d'un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones, alors que l'addition d'une mutation dans la deuxième cible conduit à un haut niveau de résistance. La résistance aux fluoroquinolones est le plus souvent due à des mutations dans la QRDR de la sous-unité C de la topo-isomérase IV (ParC) ou de la sous-unité A de la gyrase (GyrA), plus rarement dans la sous-unité E de la topo-isomérase IV (*ParE*). Le mécanisme d'efflux est lié à la mise en jeu de pompe(s) qui empêche(nt) certaines fluoroquinolones comme la ciprofloxacine et la norfloxacine d'accéder à leurs cibles.

- **Chloramphénicol**

C'est un antibiotique à large spectre qui bloque la synthèse bactérienne en se fixant sur la sous-unité 50S au niveau de l'ARN ribosomale 23S

Les souches résistantes ont acquis une chloramphénicol-acétylase responsable de la conversion du chloramphénicol en des dérivés incapables de se fixer sur l'unité 50S du ribosome. La résistance au chloramphénicol est codée par le gène *cat* porté par le transposon conjugatif Tn5253 (Dang-Van *et al.*, 1978).

- ***Tétracycline***

Les tétracyclines, en se liant de façon irréversible à la sous-unité 30S du ribosome, empêchent l'incorporation de nouveaux acides aminés et inhibent la synthèse bactérienne. Les souches résistantes ont fait l'acquisition d'un gène *tetM* agissant au niveau de l'unité 30S du ribosome et localisé sur les transposons Tn1545 et Tn5251 (Martin *et al.*, 1986).

- ***Sulfamides, triméthoprime et cotrimoxazole***

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques, mais leur association est synergique et bactéricide. Ils agissent en bloquant la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, nécessaire à la synthèse des acides nucléiques.

La résistance aux sulfamides est liée à une modification du gène codant pour la dihydroptéroate synthétase et la résistance au triméthoprime à une mutation dans le gène de la dihydrofolate réductase (Charpentier & Tuomanen, 2000).

- ***Linézolide***

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

- ***Glycopeptides***

La vancomycine et la teicoplanine sont actives contre le pneumocoque. L'utilisation de la vancomycine est recommandée en association à la ceftriaxone ou au céfotaxime dans les méningites à *S. pneumoniae*, lorsque la CMI du céfotaxime est supérieure à 0,25 mg/L pour la souche en cause. Aucune résistance à la vancomycine n'est décrite mais des souches tolérantes sont signalées (Charpentier & Tuomanen, 2000).

- ***Rifampicine***

Elle agit sur les bactéries par fixation sur l'une des sous-unités de l'ARN polymérase ADN-dépendant entraînant un blocage de transcription de l'ADN en ARN.

Les souches deviennent résistantes par des mutations portant sur le gène *rpoB* codant pour la ARN polymérase ADN dépendante. Les souches résistantes à cet antibiotique sont rares,

à noter l'apparition de mutants *in vivo* si cet antibiotique est prescrit en monothérapie (Charpentier & Tuomanen, 2000).

- **Aminosides**

Naturellement résistant à bas niveau à l'ensemble des aminosides (défaut de pénétration intrabactérienne de l'antibiotique), *S. pneumoniae* est exceptionnellement résistant à la gentamicine et fréquemment résistant à la kanamycine (croisée avec l'amikacine). Le gène qui code pour la résistance à la kanamycine est le plus souvent situé sur un transposon qui contient un gène de résistance *tetM* et *ermB* (Mc Dougal *et al.*, 1998).

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

Sur l'antibiogramme, le pneumocoque, comme les autres streptocoques et l'entérocoque, ne doit pas être catégorisé « sensible » ou « résistant », mais « bas niveau de résistance » ou « haut niveau de résistance », niveau qui se mesure à l'aide de disques fortement chargés en aminosides.

### ***3.3 Aspects épidémiologiques de la résistance aux antibiotiques***

Depuis 1984, une augmentation régulière de la proportion de pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) est observée dans le monde entier et qui atteint plus de 50 % des souches isolées (Benbachir *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2004a ; Reinert *et al.*, 2005a ; Charfi *et al.*, 2012; Varon, 2012).

Aux Etats-Unis, les taux de PSDP ont atteint 18% en 1991, 25% en 1995 jusqu'à 34.2% en 2000, les souches les plus résistantes à la pénicilline avaient une CMI à 4mg/L (Doern *et al.*, 2001).

En France, le taux des PSDP a suivi une progression constante entre 1984 et 1997 : 0.5 % en 1984 pour atteindre 48% en 1997 (Chardon *et al.*, 2002).

En Afrique, de 1996 à 1997, on remarque déjà des taux élevés de PSDP : 41.3% en Tunisie et 61.7% au Sénégal (Benbachir *et al.*, 2001).

La mise en place d'un plan ayant pour objectif de maîtriser et de rationaliser la prescription des antibiotiques dans certains pays comme la France, a permis de diminuer de 26,5 % le nombre des prescriptions d'antibiotiques entre 2002 et 2007. D'un autre côté, La

vaccination par le PCV-7 a contribué à modifier l'épidémiologie de *S. pneumoniae*. La proportion de souches de sensibilité diminuée à la pénicilline ainsi qu'aux autres bêta-lactamines a régulièrement diminué (Varon, 2012).

Malgré la diminution de la fréquence de résistance du pneumocoque aux antibiotiques, la France reste l'un des pays d'Europe où l'incidence des PSDP est la plus élevée. En 2007 en Europe, 29 pays ont rapporté les résultats de la surveillance des infections invasives à pneumocoques. En Norvège et aux Pays Bas, la proportion de PSDP est restée faible, proche de 2 %. Certains pays ont vu cette proportion augmenter, tels que la Finlande (13.2%), l'Italie (14.8%), et l'Irlande (17.5%) (Jenkins *et al.*, 2008)

Dans les travaux de Song *et al.*, les plus hauts taux de résistance aux antibiotiques sont retrouvés en Asie (Song *et al.*, 2004a).

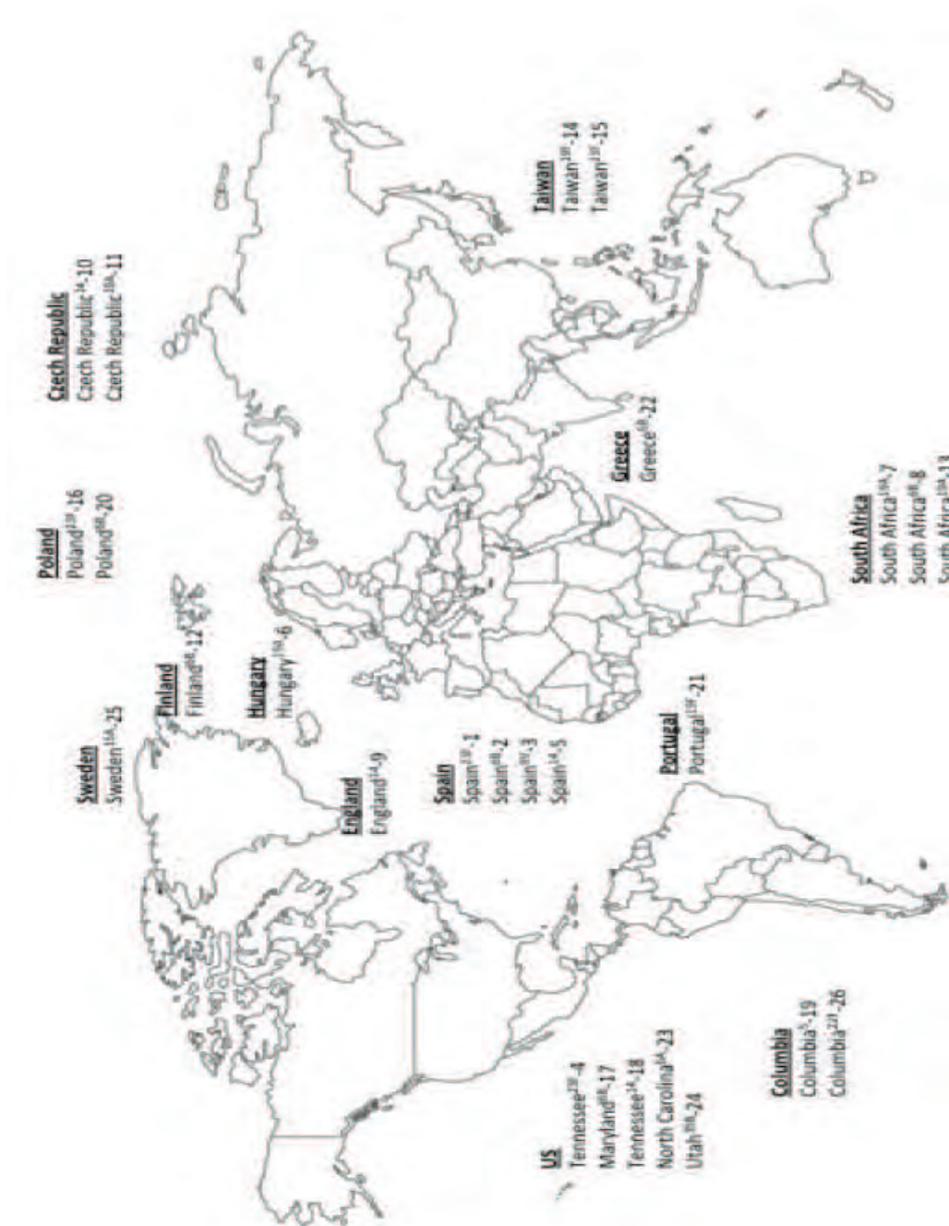
L'augmentation de la sensibilité diminuée à la pénicilline, due à la consommation accrue et inappropriée de bêta-lactamines, est attribué à l'expansion de clones résistants caractérisés dans l'étude Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) (McGee *et al.*, 2001a) (figure 5). Ces clones résistants sont associés aux sérotypes de portage appartenant aux sérogroupes 6 et 19.

Concernant les macrolides, les taux de résistance ont dépassé les 50% dans certains pays d'Europe (Varon & Gutmann, 2006). Les plus hauts taux de résistance sont observés en Asie (Song *et al.*, 2004a, 2004b).

Suite à l'introduction du PCV7, la diminution de résistance aux bêta-lactamines s'est accompagnée d'une diminution de la résistance aux macrolides, chez les enfants et les adultes dans plusieurs pays.

Concernant la résistance aux fluoroquinolones, les taux de résistance sont < à 5% en Europe, aux USA et en Amérique du nord dépassant les 11,8% dans certains pays asiatiques (Pletz *et al.*, 2004 ; Song *et al.*, 2004a ; Reinert *et al.*, 2005a ; Adam *et al.*, 2009) .

En France, la résistance aux fluoroquinolones anti-pneumococciques n'a pas évolué de façon significative depuis 2001, et reste faible de l'ordre de 1 % en 2009 en France, essentiellement retrouvée parmi les souches isolées chez des adultes. La surveillance de la résistance aux fluoroquinolones indique que 0,7 % des souches étudiées en 2009 ont acquis au moins un mécanisme de résistance aux fluoroquinolones. Comme dans les autres



**Figure 5.** 26 clones de sensibilité diminuée à la pénicilline et à d'autres antibiotiques caractérisés par PMEN. Ces clones sont nommés selon le pays où ils ont été identifiés, le sérotype (exposant), et le nombre de clones dans l'ordre chronologique. Ces clones sont responsables de la propagation de la résistance aux antibiotiques en raison de leur expansion (McGee *et al.*, 2001a).

pays, c'est chez le sujet âgé de plus de 60 ans et parmi les souches isolées d'infections respiratoires que l'on retrouve le plus de souches ayant acquis un mécanisme de résistance aux fluoroquinolones (Lee *et al.*, 2010).

Les principaux facteurs de risques d'acquisition d'une souche de pneumocoque résistant aux fluoroquinolones identifiés par Ho *et al.* (2001) sont l'existence d'une broncho-pneumopathie chronique, l'hospitalisation ou la résidence en institution, l'exposition antérieure aux fluoroquinolones, quelle qu'en soit l'indication.

Selon beaucoup d'études, la résistance du pneumocoque aux antibiotiques varie selon l'âge du patient, le type de prélèvement et les régions. Ces variations peuvent être spécifiques à chaque antibiotique. Quel que soit le type de prélèvement, les résistances sont plus fréquentes chez l'enfant que chez l'adulte. Chez l'enfant bien davantage que chez l'adulte, les niveaux de résistance varient avec le site de prélèvement. Notons que les taux de résistance sont plus élevés chez l'enfant dans les infections non invasives comme les infections ORL où l'utilisation des antibiotiques est accrue. Enfin, les résistances peuvent, pour un même type de prélèvement, sur un même terrain, varier selon les régions (Varon *et al.*, 2010).

#### **4. Distribution des sérotypes**

Depuis l'avènement des antibiotiques, l'utilisation de ces molécules a entraîné une modification des sérotypes responsables des infections. Ainsi, depuis des années, on a pu constater une nette diminution de l'incidence des sérotypes « épidémiques » (sérotypes 1,3 et 5) associée à une augmentation de l'incidence des sérotypes de « portage ». La distribution des sérotypes de pneumocoque a été étudiée dans beaucoup de pays et les sérotypes les plus fréquents sont les 23, 14, 19 et 6 et sont les plus résistants à la pénicilline (Reinert *et al.*, 2010; Mehr & Wood, 2012). Ensuite, l'évolution de la résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque a été fortement influencée par les changements dans la distribution des sérotypes sous la pression vaccinale du PCV7 (Hicks *et al.*, 2007 ; Hanquet *et al.*, 2010 ; Ansaldi *et al.*, 2011 ; de Sevilla *et al.*, 2012 ; Demczuk *et al.*, 2012 ; Varon, 2012). En France, depuis 2003, on observe la quasi-disparition des sérotypes vaccinaux dont environ 80 % étaient porteurs de gènes de résistance, et l'émergence de sérotypes non vaccinaux dont la plupart sont sensibles aux antibiotiques à l'exception de quelques uns comme le sérotype 19A, très majoritairement (85 %) de sensibilité diminuée à la pénicilline et résistant aux macrolides (Varon, 2012).

L'incidence des infections invasives à pneumocoque a diminué. Mais, une importante diminution de l'incidence des infections invasives dues aux sérotypes vaccinaux est observée, celle-ci s'accompagne d'une augmentation de l'incidence des infections à sérotypes non vaccinaux. Cette augmentation est liée au remplacement des sérotypes vaccinaux par des sérotypes non vaccinaux. Ce phénomène, particulièrement marqué en France (Varon, 2012), explique que, contrairement aux États-Unis (Pilishvili *et al.*, 2010), il n'a pas été observé de bénéfice de la vaccination dans la population non vaccinée. En effet, la diminution du portage rhino-pharyngé des sérotypes vaccinaux chez les enfants vaccinés a entraîné une diminution de leur circulation dans le reste de la population. Cependant, la diminution des infections dues aux sérotypes vaccinaux a été annulée par l'augmentation de l'incidence des infections à sérotypes non vaccinaux dans tous les groupes d'âges sauf chez les enfants de moins de deux ans.

Le remplacement des sérotypes vaccinaux par des sérotypes non vaccinaux observé dans les infections invasives, est en partie lié aux modifications de distribution des sérotypes colonisant le rhino-pharynx des jeunes enfants qui constitue le principal réservoir de pneumocoques. Le sérotype 19A est devenu le sérotype non vaccinal prédominant en situation de portage (Cohen *et al.*, 2010).

Un sérotype vaccinal peut échapper à la pression immunitaire par échange ou « switch » capsulaire au cours d'un transfert horizontal. En effet, le locus capsulaire de *S. pneumoniae* est une région pouvant être échangée en une étape par recombinaison homologue (transformation). Ainsi, un pneumocoque peut changer de sérotype tout en conservant le reste de son génome (Coffey *et al.*, 1998). De plus, deux des cibles des bêta-lactamines que sont les PLP sont codées par les gènes flanquant le locus capsulaire (PLP2x en amont et PLP1a en aval). Il a été montré qu'un ou deux de ces gènes pouvaient être transmis au cours du « switch » capsulaire (Trzcinski *et al.*, 2004). Ce mécanisme permet donc à une souche de pneumocoque d'échapper à la double pression de sélection antibiotique et vaccinale. Ainsi, de rares souches de sérotype 19A de sensibilité diminuée à la pénicilline isolées aux États-Unis dérivent de souches virulentes de sérotype 4 (vaccinal).

Une autre possibilité est qu'un ou plusieurs sérotypes avec des capacités d'échappement au vaccin soi(en)t déjà présent(s) et puisse(nt) être sélectionné(s) sous la pression vaccinale et/ou antibiotique. En effet, bien avant l'introduction du PCV7, sous la pression des antibiotiques, les « switch » capsulaires ont joué un rôle important dans l'adaptation du

pneumocoque à son hôte, entraînant la dissémination de clones multirésistants dans le monde entier. Et de fait, la plupart des souches de remplacement de sérotype 19A dérivent de l'expansion de clones sélectionnés avant l'introduction du PCV7, aux États-Unis comme en France.

### **5. Pneumocoque et vaccins**

La difficulté de développer des vaccins pneumococciques est liée à la multiplicité des sérotypes (93 sont aujourd'hui mis en évidence). Idéalement, pour obtenir un vaccin possédant une couverture optimale, il faudrait combiner dans un seul vaccin les polysides capsulaire de tous les sérotypes. En pratique, ceci s'avère impossible, et il a donc été nécessaire de se limiter aux sérotypes les plus fréquemment rencontrés. Le développement du vaccin pneumococcique s'est donc fait parallèlement à l'amélioration des connaissances sur la répartition des sérotypes isolés dans les infections pneumococciques.

#### ***5.1 Le vaccin polysidique 23- valent***

Le Pneumo 23 de Sanofi Pasteur appartient à la seconde génération de vaccin commercialisée aux États-Unis en 1983, puis en France en 1987, ce vaccin polysaccharidique contient 23 valences (sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F et 33F) qui représentent entre 85 et 90% des sérotypes isolés dans les formes invasives de la pathologie pneumococcique humaine.

Le vaccin polysaccharide à 23 valences induit des anticorps spécifiques du sérotype de chacun des polysaccharides contenus dans le vaccin, qui participent à l'opsonisation des pneumocoques. Les essais cliniques réalisés avec ce vaccin montrent une excellente réponse immunitaire chez les adultes jeunes et en bonne santé : à l'issue d'une injection unique, plus de 80% d'entre eux multiplient par 2 au moins leur titre d'anticorps pré-vaccinal pour toutes les valences. Ces anticorps protecteurs anti-polysides capsulaires apparaissent à partir du 15<sup>ème</sup> jour après la vaccination. Leur maintien à un taux protecteur pendant 5 ans et peut être davantage reste discuté. Ces anticorps ne sont spécifiques que des sérotypes des polysaccharides contenus dans le vaccin et n'assurent pas d'immunité croisée vis-à-vis des autres sérotypes de pneumocoques. Plusieurs études ont confirmé que les réponses en anticorps des sujets âgés en bonne santé sont comparables à celles des adultes jeunes.

L'efficacité du vaccin pneumococcique polysidique est démontrée en France, où un essai contrôlé effectué chez des sujets âgés vivant en institution (âge moyen 74 ans) suivis pendant 2 ans, montre que l'incidence des pneumopathies est significativement réduite dans le groupe des sujets vaccinés, l'efficacité vaccinale étant évaluée à 77% (Gaillat, *et al.*, 1985).

Lors d'une étude de cohorte indirecte aux Etats-Unis (Bolan *et al.*, 1986), les sujets immunocompétents étaient protégés à 63% contre les méningites.

Chez les sujets immuno-déficients à haut risque d'infection pneumococcique (splénectomisés, maladie de Hodgkin, lymphomes, myélome multiple, leucémie, séropositivité pour le virus de l'immunodéficience humaine ...), de nombreuses études montrent qu'il existe une réponse en anticorps après la vaccination, même si elle est parfois diminuée par rapport à celle des sujets sains (Rodriguez-Barradas, 1992)

Chez les enfants, la réponse au vaccin anti-pneumococcique 23 est médiocre avant l'âge de 2 ans. Le vaccin induit une réponse thymo-indépendante, l'effet immunogène est donc nul avant cet âge. A partir de cet âge, la réponse, partielle et hétérogène, varie en fonction du sérotype : très bonne pour le type 3 (qui répond même à partir de 6 mois), elle est relativement bonne pour les types 4, 8 et 18C, variable pour les types 9V, 14 et mauvaises pour les autres sérotypes. En fait, il faut attendre l'âge de 8 à 10 ans pour que l'immunogénicité du vaccin soit comparable chez l'enfant et chez l'adulte (Lee *et al.*, 1995).

Cependant, il convient d'insister sur le fait que les enfants à haut risque d'infection pneumococcique (splénectomisés, drépanocytaires ...) répondent aussi bien à la vaccination que les enfants normaux.

Ce vaccin n'est pas efficace dans la prévention des infections non systémiques et ne diminue pas le portage rhinopharyngé. Néanmoins, il est recommandé tous les 5 ans dans certaines pathologies chroniques pour prévenir les infections invasives à pneumocoque chez l'adulte et l'enfant de plus de deux ans (Whitney *et al.*, 2006).

### 5.2 Le vaccin heptavalent conjugué PCV7

En février 2000, un vaccin antipneumococcique conjugué heptavalent dénommé Prevenar® a été conçu pour être actif contre sept sérotypes de pneumocoques. Il est enregistré aux Etats-Unis et dans plusieurs autres pays dont la France pour la prévention des infections invasives dues au pneumocoque, de l'otite moyenne et de la pneumonie chez les enfants et nourrissons.

Le vaccin Prévenar contient les polysaccharides capsulaires purifiés de 7 sérotypes conjugués à l'anatoxine diphtérique (CRM197). Le couplage des antigènes polysaccharidiques du pneumocoque, thymo-indépendants, à une protéine porteuse permet de les transformer en antigènes thymo-dépendants. Ceci présente un double avantage : une meilleure immunogénicité chez les jeunes enfants âgés de moins de 2 ans, non répondeurs au vaccin polysaccharidique, et l'obtention d'une réponse immunitaire mémoire et de meilleure qualité.

Le Prévenar® contient 7 valences (sérotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F) et inclut les sérotypes en cause en France en 2005 dans 45% des infections invasives à pneumocoque de l'enfant de moins de deux ans et de 35 à 42% des infections invasives de l'adulte, ainsi que les sérotypes de plus de 65% des pneumocoques résistants à la pénicilline (Varon & Gutmann, 2006). De nombreuses études réalisées chez l'enfant démontrent son efficacité clinique, en termes d'immunogénicité et de protection clinique contre les infections invasives, mais aussi en termes de réduction de l'incidence des infections à PSDP et du portage de ces souches (Black *et al.*, 2004). Une étude cas-témoins réalisée au Etats-Unis chez les enfants de 3 mois à 3 ans met en évidence une efficacité du vaccin de 96% dans la prévention des infections invasives à pneumocoque chez l'enfant en bonne santé, et de 81% chez ceux ayant une maladie chronique. Dans cette même étude, l'efficacité du vaccin sur les souches de sensibilité diminuée ou résistantes à la pénicilline (PSDP) était de 76% (Reinert, 2003).

Des études évaluant l'immunogénicité du vaccin conjugué réalisées chez l'adulte n'ont pas montré de supériorité du vaccin conjugué comparativement au vaccin polysaccharidique en termes de niveau d'anticorps induit. Cependant, la capacité opsonisante des anticorps induits, meilleur indicateur de protection, est supérieure avec le vaccin conjugué (Temime & Dab, 2007).

Chez les sujets atteints de maladie systémique, qui ont un risque élevé d'infection à pneumocoque, en particulier en cas de traitement immunosuppresseur, les données disponibles montrent une bonne tolérance du vaccin antipneumococcique polysaccharidique chez ces patients et une immunogénicité satisfaisante, même si la réponse en anticorps est souvent inférieure à celle qui est observée chez les sujets sains. Malgré l'absence de données d'efficacité clinique, ces observations incitent à vacciner ces patients contre le pneumocoque. Cependant, les médecins restent souvent réticents à vacciner les patients soignés pour une maladie systémique, en raison du manque de clarté des données d'efficacité et de tolérance dans ce contexte. Ces éléments justifient le développement de stratégies vaccinales anti-pneumococciques bien tolérées mais plus immunogènes que celles obtenues avec le vaccin polysaccharidique. Un schéma vaccinal combinant les vaccins conjugué et polysaccharidique, déjà évalué dans d'autres situations d'immunodépression (infection par le VIH, transplantation rénale, maladie de Hodgkin), pourrait être bénéfique chez les sujets atteints de maladie systémique. Ce schéma comportant une primo-vaccination par une injection de vaccins conjugué, complétée par une vaccination de « rappel » avec le vaccin polysaccharidique, pourrait ainsi permettre une réponse mémoire T-dépendante contre le 7 sérotypes communs aux deux vaccins, en plus de la réponse T-indépendante vis-à-vis des antigènes du vaccin polysaccharidique Pneumo23®, stratégie dite de « prime-boost » (Duchet-Niedziolka, *et al.*, 2009).

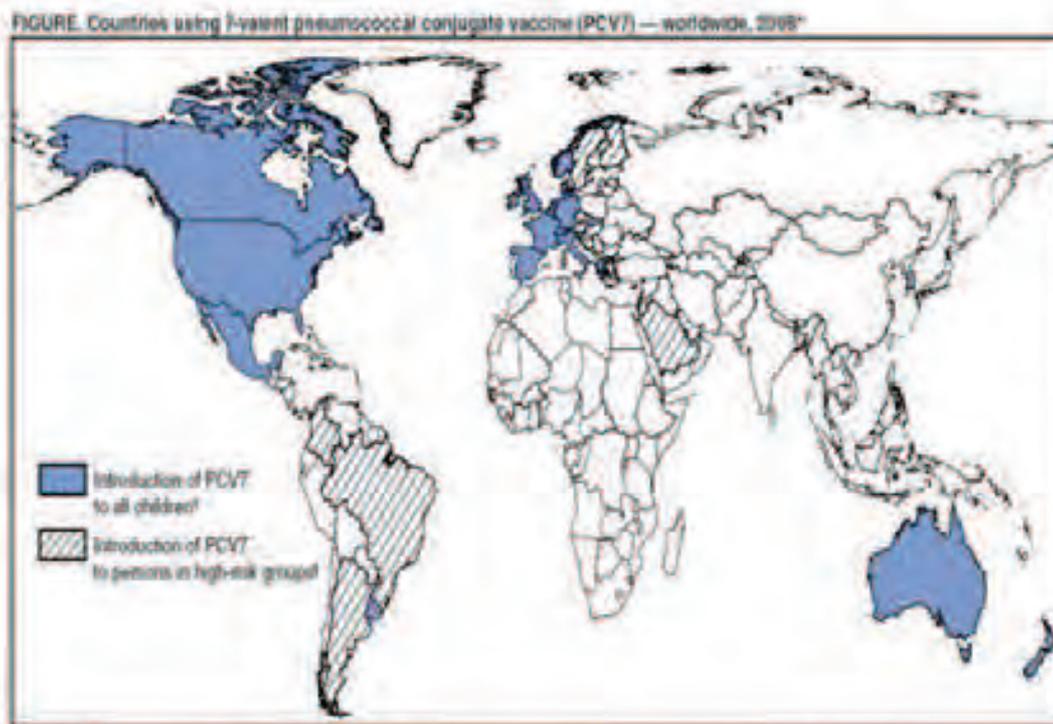
Le vaccin conjugué a montré aux Etats-Unis qu'il est capable de réduire les infections méningées provoquées par 7 types différents de pneumocoques (d'où son nom) (Whitney *et al.*, 2006). Pourtant, en France, Ferré *et al.*, en 2009 publient deux cas « d'infection massive à pneumocoques » chez des enfants de moins de deux ans. L'observation d'une bactériémie à pneumocoque 19A et d'une méningite à pneumocoque 10A confirme le remplacement des souches incluses dans le vaccin, observé dans les pays où cette vaccination est généralisée, par d'autres souches de pneumocoques. Elle pose le problème de la politique vaccinale et de la place de nouveaux vaccins en cours de développement. Ces deux cas témoignent d'un problème majeur. En fait, le vaccin ne protège que contre 7 types de pneumocoques or il en existe beaucoup plus. Et ceux pour lesquels le vaccin ne protège pas sont parfois plus virulents et plus difficiles à traiter, on les dit résistants aux antibiotiques.

Si la vaccination massive des enfants par le PCV7 a pu, pendant un temps, éviter des méningites par les 7 sérotypes qu'il vise, il a aussi permis à d'autres pneumocoques de prendre leur place. La conséquence, c'est que de nombreux cas de méningites à pneumocoques résistants, comme ceux des deux enfants, risquent de survenir.

En fait, des chercheurs américains tirent la sonnette d'alarme dès janvier 2009 en publiant une étude dans un grand journal de médecine, le *New England Journal of Medicine* (Hsu *et al.*, 2009) qui confirme que si effectivement une réduction du nombre de méningites a pu être obtenu, en revanche, cela se fait au prix d'une explosion des méningites à pneumocoque non couverts par le vaccin et ces pneumocoques sont très fortement résistants aux antibiotiques connus posant des problèmes thérapeutiques majeurs.

Les pédiatres français concluent de leur observation qu'elle « confirme le remplacement des souches incluses dans le vaccin, observé dans les pays où cette vaccination a été généralisée, par d'autres souches de pneumocoques. Elle pose le problème de la politique vaccinale. Suite au phénomène de remplacement, des vaccins conjugués à 10 et 13 valences sont développés. En cours d'année 2010, un nouveau vaccin conjugué, le vaccin 13-valent, comportant 6 valences supplémentaires (1, 3, 5, 6A, 7F et 19A) a remplacé le PCV7, offrant à la population cible une couverture sérotypique plus large.

Dans les pays en développement, Le Kenya est le premier pays africain à introduire le vaccin anti-pneumococcique conjugué heptavalent en 2011, ensuite le Nicaragua, la Guyane, le Yémen, et la Sierra Leone ont introduit le vaccin grâce au soutien de l'Alliance mondiale pour les vaccins et la vaccination (GAVI), qui réunit des gouvernements, l'UNICEF et l'OMS. GAVI s'est engagée à soutenir l'introduction des vaccins contre le pneumocoque dans 19 pays en développement en moins d'un an, et prévoit de les généraliser dans plus de 40 pays d'ici 2015 (figure 6).



**Figure 6.** Les pays qui ont introduit le PCV7 jusqu'en 2008 (CDC 2008c)

- Pays ayant introduit le PCV7 (chez tous les enfants, estimation de la couverture vaccinale à > 50%, année de l'introduction, n= 26) : Australie (2005, haut risque 2001), Bahreïn (2008, haut risque 2002), Belgique (2007, haut risque 2004), Canada (2002), Chypre (2007, haut risque 2003), Danemark (2007), France (2006, haut risque 2003), Allemagne (2006, haut risque 2002), Grèce (2006), Irlande (2008, haut risque 2002), Italie (2003), Koweït (2006), Luxembourg (2005, haut risque 2003), Mexique (2008, haut risque 2006), Hollande (2006), Nouvelle Zélande (2008), Norvège (2006, haut risque 2001), Qatar (2005), Slovaquie (2008, haut risque 2003), Corée du Sud (2003), Espagne (2003), Suisse (2006, haut risque 2001), Emirats Arabes (2007, haut risque 2004), Grande Bretagne (2006, haut risque 2001), Etats Unis (2000), Uruguay (2008, haut risque 2006).
- Pays ayant introduit le PCV7 uniquement chez les enfants à haut risque (HIV, maladies chroniques... année de l'introduction, n= 13): Argentine (2006), Autriche (2002), Brésil (2004), Colombie (2007), République Tchèque (2006), Finlande (2002), Israël (2004), Lettonie (2006), Malte (2006), Micronésie (2007), Arabie Saoudite (2006), Slovénie (2005), Suède (2005).

## DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

### 1. Cadre d'étude

Ce travail est une étude monocentrique, réalisée au laboratoire de Microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire Benbadis de Constantine durant une période de 7 ans [janvier 2005 à décembre 2011 (étude continue)]. Les méthodes moléculaires, la spectrométrie de masse et le sérotypage sont réalisés à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de la Timone [Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes URMITE, Aix-Marseille-Université (France)], au Centre de Référence du Pneumocoque (CNRP) à l'hôpital Georges Pompidou (Paris, France) et au centre de référence des méningites à l'Institut Pasteur d'Algérie.

### 2. Origine des souches

Le recueil des souches est réalisé au laboratoire de Microbiologie du l'hôpital Benbadis de Constantine. La taille de l'échantillon est représentée par 100 souches non redondantes de *Streptococcus pneumoniae*, isolées à partir de prélèvements effectués chez des patients (enfants et adultes) hospitalisés ou évacués à l'hôpital Benbadis et à l'origine d'infections invasives (les infections invasives concernent tous les cas où une souche de pneumocoque est isolée de sites stériles comme le sang, le liquide céphalo-rachidien, le liquide pleural, le liquide péricardique, le liquide péritonéal....). Les prélèvements proviennent de différents services (service des maladies infectieuses, service de pédiatrie, service de pneumo-physiologie, service d'hématologie, service de neurochirurgie et service de réanimation médicale). Nos souches sont isolées de ponctions lombaires (LCR), d'hémocultures (sang) et de ponctions pleurales (liquides pleuraux). Dans le cas où plusieurs souches identiques sont isolées chez un même patient une seule est retenue et par ordre de priorité : LCR puis hémoculture. Toutes les souches suspectées d'être des pneumocoques par une identification préliminaire (aspect des colonies, hémolyse alpha) sont prises en considération puis soumises à d'autres tests pour l'identification formelle.

### 3. Contrôle de qualité des tests effectués

Le contrôle de qualité des tests est effectué grâce à l'utilisation de souches de référence :

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (souche de référence souvent utilisée pour l'antibiogramme et CMI).
- *Streptococcus pneumoniae* CIP102911 [souche de référence utilisée pour RT-PCR (gènes *plyN* et *lytA*) et PCR pour le gène *rpoB*].

#### 4. Conservation

La conservation des souches est réalisée sur milieux solides et liquides, selon les moyens par :

- Repiquage mensuel sur gélose au sang de mouton inclinée (2005-2008).
- Congélation à -20°C dans du bouillon Mueller Hinton + 15% de glycérol (2009-2010)
- Congélation à -80°C dans du bouillon Mueller Hinton+ 15% de glycérol (2011).

#### 5. Isolement et culture

- Le milieu de culture utilisé est la gélose au sang constituée du milieu de base : Gélose nutritive, gélose Columbia et/ou gélose Mueller- Hinton additionné de 5% de sang de mouton frais ou cuit (annexe 1). Une gélose chocolat polyvitex est parfois utilisée (PVX BioMérieux Marcy l'Etoile). Le milieu de culture changeait en fonction de la disponibilité du milieu de base.
- L'incubation est effectuée dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5 %), à 37°C et à pH optimum de 7,2, pendant 24 à 48 heures.

#### 6. Identification des souches

##### 6.1 Méthodes conventionnelles

##### 6.1.1 Examen macroscopique des colonies

*Streptococcus pneumoniae* donne sur gélose au sang de petites colonies à dépression centrale, transparentes, rondes, et développant une hémolyse de type alpha.

##### 6.1.2 Examen microscopique après coloration de Gram

L'observation au microscope optique après coloration de Gram, montre des diplocoques Gram positif à forme lancéolée, en flamme de bougie, encapsulés, groupés par paire (diplocoque), parfois en courtes chaînettes. L'examen microscopique peut être très indicateur pour les pneumocoques qui ont une morphologie bien spécifique, mais il n'est pas suffisant.

##### 6.1.3 Test de lyse par les sels biliaires

Réalisé pour 50 souches (41 souches de *S.pneumoniae* seulement pour des problèmes de conservation et 9 souches de streptocoques  $\alpha$ - hémolytiques autres que pneumocoques)

### ***A- Réalisation du test***

Le test est réalisé selon la méthode de Lund (1959). Une riche suspension bactérienne correspondant à 2 Mc Farland est préparée à partir d'une culture jeune de pneumocoque dans de l'eau physiologique stérile puis séparée dans deux tubes. A l'un on a ajouté 0,5 ml de désoxycholate de sodium à 2% (Merck, Germany) et à l'autre, 0,5ml d'eau physiologique. Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 15 min.

### ***B- Lecture des résultats***

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

#### ***6.1.4 Test de sensibilité à l'optochine***

Réalisé pour les 100 souches de *S.pneumoniae* durant l'étude et refait pour 41 souches après congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  en 2012 selon la méthode de Lund (1959). Nous avons utilisé des disques d'optochine à 5 $\mu\text{g}$  contenant 5 $\mu\text{g}$  d'éthylhydrocupréine (BioRad Disks, MastDiscs<sup>TM</sup> ID, selon les recommandations du fournisseur)

### ***A- Réalisation du test***

Après avoir prélevé une colonie suspecte alpha-hémolytique avec une anse stérile, celle ci est ensemencée en stries sur gélose au sang. Un disque à l'optochine de 6 mm de diamètre est déposé à l'extrémité de la strie, là où a commencé l'ensemencement, et la boîte est incubée 18 à 24 heures à 35-37 °C dans un incubateur à CO<sub>2</sub>.

### ***B- Lecture des résultats***

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

#### ***6.1.5 Test d'agglutination au latex***

Réalisé pour 50 souches (41souches de *S.pneumoniae* et 9 souches de streptocoques)

### ***A- Principe***

Ce test repose sur l'agglutination de particules de latex recouvertes d'anticorps anti-antigènes de *Streptococcus pneumoniae* en présence d'une souche de *Streptococcus pneumoniae*. Il s'effectue à l'aide d'un sérum antipneumococcique polyvalent (omni-sérum) [Kit Pneumo-Test-Latex (Statens Serum Institut Copenhague, Denemark), selon les recommandations du fournisseur].

C'est un antisérum contenant un mélange d'anticorps de lapins dirigés contre tous les antigènes capsulaires pneumococciques connus. Les souches de pneumocoque ne réagissant pas avec L'omni-sérum », sont déclarées “ non typables ”.

Le kit est composé de 3 réactifs :

R1: latex *Streptococcus pneumoniae* (latex sensibilisé par des anticorps anti-*Streptococcus pneumoniae*)

R2 : latex contrôle négatif (latex non sensibilisé)

R3: contrôle positif (polysaccharides de *Streptococcus pneumoniae*)

### ***B- Réalisation du test***

Après avoir ramené les réactifs à température ambiante et homogénéisé les suspensions de latex, 2 gouttes d'eau physiologique stérile sont déposées sur une lame en dissociant dans chaque goutte quelques colonies de façon à obtenir une suspension légèrement opalescente. Dans une goutte, on ajoute 1 goutte de réactif R1 (latex anti-*Streptococcus pneumoniae*), Dans l'autre goutte, on ajoute 1 goutte de réactif R2 (latex contrôle négatif, non sensibilisé). Sur une seconde lame, on dépose 2 gouttes d'eau physiologique. Dans une goutte, on ajoute 1 goutte de réactif R1, dans l'autre goutte, 1 goutte de réactif R2. On mélange avec un agitateur différent pour chaque goutte, on donne à chaque lame un mouvement de rotation pendant 1 min et on observe l'apparition d'agglutinats.

### ***C- Lecture des résultats***

- ***lecture des témoins***
  - Témoins négatifs

Témoin 1 : suspension de la souche + R2 (latex contrôle négatif = latex non sensibilisé), il vérifie la spécificité de la réaction. On ne doit pas observer d'agglutination.

Témoin 2 : eau physiologique + R1, il vérifie la spécificité de la réaction. On ne doit pas obtenir d'agglutination.

Témoin 3 : eau physiologique + R2, il vérifie la spécificité de la réaction. On ne doit pas obtenir d'agglutination.

Si les témoins sont corrects, on peut valider le résultat du test échantillon + R1.

- Témoin positif (contrôle périodique): R1+R3, il vérifie la réactivité du latex R1. On doit observer une agglutination.
- **Lecture du test**
  - Agglutination dans les 2 minutes : présence d'antigènes de *Streptococcus pneumoniae* : la souche testée est *Streptococcus pneumoniae*.
  - Absence d'agglutination : absence d'antigènes de *Streptococcus pneumoniae* : la souche testée n'est pas, à priori, *Streptococcus pneumoniae*.

Causes d'erreur :

Résultat faussement négatif si :

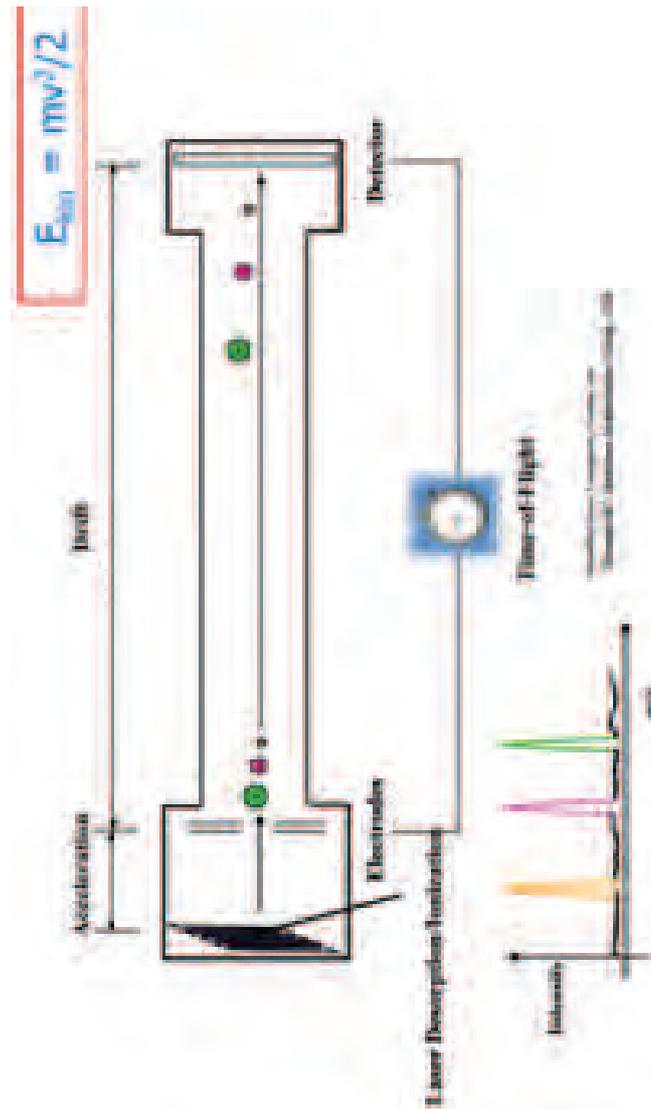
- Nombre insuffisant de colonies
- Souche de pneumocoque dépourvue d'antigènes capsulaires.

## ***6.2 Méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight)***

### ***A- Principe***

Des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique se déplacent, et la distance parcourue en un temps donné est fonction du rapport masse sur charge ( $m/z$ ). La première étape consiste à mélanger l'échantillon à la matrice, l'évaporation des solvants conduisant à la cristallisation de la matrice avec l'échantillon. Chaque dépôt est soumis à l'action du rayon laser UV. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes. Les ions ainsi formés, généralement de charge +1 dans le cas du MALDI, vont être mis en mouvement sous l'action d'un champ électrique, et l'analyseur va les séparer en fonction de leur rapport  $m/z$ . Ils traversent ensuite un certain nombre de grilles d'extraction avant d'atteindre le « tube de vol » à l'extrémité duquel se trouve le détecteur. Les ions sont séparés selon leur temps de vol, ceux de petite taille atteignant les premiers le détecteur. Le temps de vol (time of flight) pour atteindre le détecteur est utilisé pour

calculer la masse de chaque particule. La somme des ions analysés va former un spectre caractéristique de l'échantillon (figure 7). Un ordinateur pilote l'appareil et effectue l'acquisition des données réduites sous forme de spectres de masse qu'il permet d'analyser. (Carbonnelle & Nassif, 2011). Dans son application en microbiologie, la technique du MALDI-TOF repose sur la détection de peptides. Il s'agit essentiellement de protéines cytosoliques basiques, en quantité abondante, hydrophiles, dont les principales identifiées sont les protéines ribosomales.



**Figure 7.** Schéma simplifié d'un appareil MALDI-TOF  
(Gidenne, 2011)

**B- Réalisation du test**

- La technique est réalisée pour 41 souches de *S.pneumoniae* et 9 souches de streptocoques selon la méthode de Seng *et al.* (2009).
- La cible MALDI utilisée est de type Microflex modèle « MSP 96 target polished steel » ref 224989. Nous avons également utilisé le spectromètre de masse (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).

• **Préparation de la matrice**

Pour 1 ml de matrice, on introduit 2 spatules d'alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) dans un tube polypropylène de 1,5 ml, auxquelles on ajoute 500 µl d'acétonitrile HPLC, 250 µl de TFA à 10% (trifluoroacetic acid) et 250 µl d'eau HPLC. Après avoir bien mélangé au vortex, on sonique 10 min ((F: 50/60 Hz) à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution saturée. La solution est centrifugée pendant 1 min à 13000 rpm puis le surnageant est transféré dans un tube polypropylène à 1,5 ml propre.

• **Réalisation des dépôts sur cible MALDI**

L'échantillon est déposé en fine couche homogène dans les zones définies (cercles) (ne pas déposer trop de bactéries et éviter d'avoir des aspérités sur le dépôt). Pour une série de 4 dépôts par échantillon, différentes colonies bactériennes sont prélevées, sans salir la cible (traces de doigts, matrice renversée, ...) ni la rayer (supports métalliques en acier inoxydable extrêmement lisse). Le plan de la cible MALDI utilisée est complété (plan de cible MSP 96) en indiquant la référence des échantillons déposés. Ensuite 4 spots du témoin positif (1,5 µL de Bruker Bacterial Test Standard BTS) sont déposés en recouvrant chaque dépôt de 1 µL de matrice, et sur la ligne suivante dans la même colonne, 4 spots du témoin négatif (1µL de matrice) sont étalés. Sur les lignes suivantes de la cible MALDI, les échantillons sont déposés en quatre exemplaires dans les zones définies (cercles), en prélevant une colonie bactérienne à l'aide d'une pointe de cône de pipette 10 µL. Chaque dépôt d'échantillon est finalement recouvert avec 1 µL de la solution matrice et laissé sécher.

- ***Introduction de la cible MALDI dans le spectromètre de masse Microflex LT et lancement de l'acquisition MALDI-TOF-MS Biotyper***

L'analyse est effectuée dans un spectromètre MALDI -TOF MS (Microflex ; Bruker Daltonics avec un laser à azote réglé à 337 nm) avec un logiciel de contrôle FLEX (Bruker Daltonics). Les ions sont accélérés avec une tension de 20 kV. L'extraction des ions pulsés a été optimisée pour 1000 Da.

Un transfert direct des données vers un logiciel d'identification est effectué : logiciel Biotyper RTC type Bruker Biotyper 2.0 avec une approche MSP (Main Spectra Projection) qui retient tous les spectres, il est installé sur le PC d'acquisition associé au spectromètre Microflex .

Les spectres de masse sont obtenus à fréquence maximale (20 Hz soit 20 tirs/seconde par point de dépôt). Une série de 20 tirs suffira à l'acquisition d'un spectre, et les spectres sont traités pour déterminer un spectre moyen par dépôt (Tous les nuages d'ions moléculaires provoqués par les différents tirs du laser ne sont pas identiques à 100%. C'est pourquoi tous les pics sont additionnés par masse. Cela donne un spectre statistique moyen qui est celui qui sera utilisé).

Le spectre obtenu est ensuite comparé avec tous les spectres de référence dans la base de données où les spectres de 2881 espèces sont enregistrés. Le processus d'identification compare et aligne les listes de pics de spectres inconnus avec des listes de pics de spectres de références. Dans la première étape les spectres inconnus sont calibrés avec les spectres de références. Le Biotyper tente de sélectionner et d'aligner les plus hauts pics de chaque spectre. Dans la deuxième étape, le matching des spectres inconnus avec les spectres de référence sera évalué en se basant sur une valeur de score dédiée. Pour cela, l'information des pics du spectre de référence est transformée en une valeur de score maximal accessible. Aussi bien les pics que leur intensité relative sont comparés et repris dans un calcul de corrélation. Le score est le résultat de ce calcul. Si le logarithme de ce score  $[\log(\text{score}) \text{ maximal } 3]$  est plus grand que 1,9, l'identification se fait au niveau de l'espèce. Si la valeur se situe entre 1,9 et 1,7, l'identification ne va pas plus loin que le genre. Des valeurs inférieures à 1,7 ne permettent pas une identification.

### ***C- Validation des résultats d'identification Biotyper :***

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

- T+ doit correspondre à *E.coli* avec un score > 1,9.
- T- doit correspondre à un score sans identification < 1,7.

Les résultats d'identification des bactéries sont donnés, sous Biotyper RTC, par un score entre 0 à 3 selon la méthode de Seng *et al* (2009). L'identification d'un germe est validée lorsque le score est supérieur à 1,9 pour 2 dépôts (même germe retrouvé). Le meilleur score d'identification MS de chaque dépôt est noté. Si l'un des deux scores de l'échantillon est inférieur à 1,9 ou si l'on retrouve 2 germes différents, l'identification n'est pas valide. Cet échantillon est remis sur deux positions supplémentaires et son analyse est relancée (annexe 2, tableau 4).

A partir des valeurs des scores, la construction d'un dendrogramme est effectuée par le logiciel Biotyper MSP. Pour cela nous avons utilisé 46 souches (37 souches de pneumocoques et 9 souches de streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques). Les Clusters sont ensuite détaillés et analysés en fonction d'un niveau de distance arbitraire de 500.

### ***6.3 Méthodes moléculaires***

Les méthodes moléculaires sont réalisées pour 41 souches de *S.pneumoniae* et 9 souches de streptocoques.

#### ***6.3.1- Réaction de Polymérisation en Chaîne en temps réel (RT-PCR) pour les deux gènes *plyN* (pneumolysine) et *lytA* (autolysine)***

##### ***A- Principe***

La PCR en temps réel est une technique qui repose d'une part sur l'amplification des acides désoxyribonucléiques (ADN) par une ADN polymérase, à partir d'amorces sens et anti-sens, et d'autre part sur la détection régulière d'un signal fluorescent émis par une sonde TaqMan®, qui porte à son extrémité 5' un fluorophore, et à son extrémité 3' un quencher. Le quencher absorbe la fluorescence du fluorophore, et aucun signal n'est émis. Un cycle de PCR, ou cycle d'amplification est composé d'une étape de dénaturation de

l'ADN, suivie de l'hybridation des amorces sur leur séquence spécifique et de l'extension de ces amorces par l'ADN polymérase.

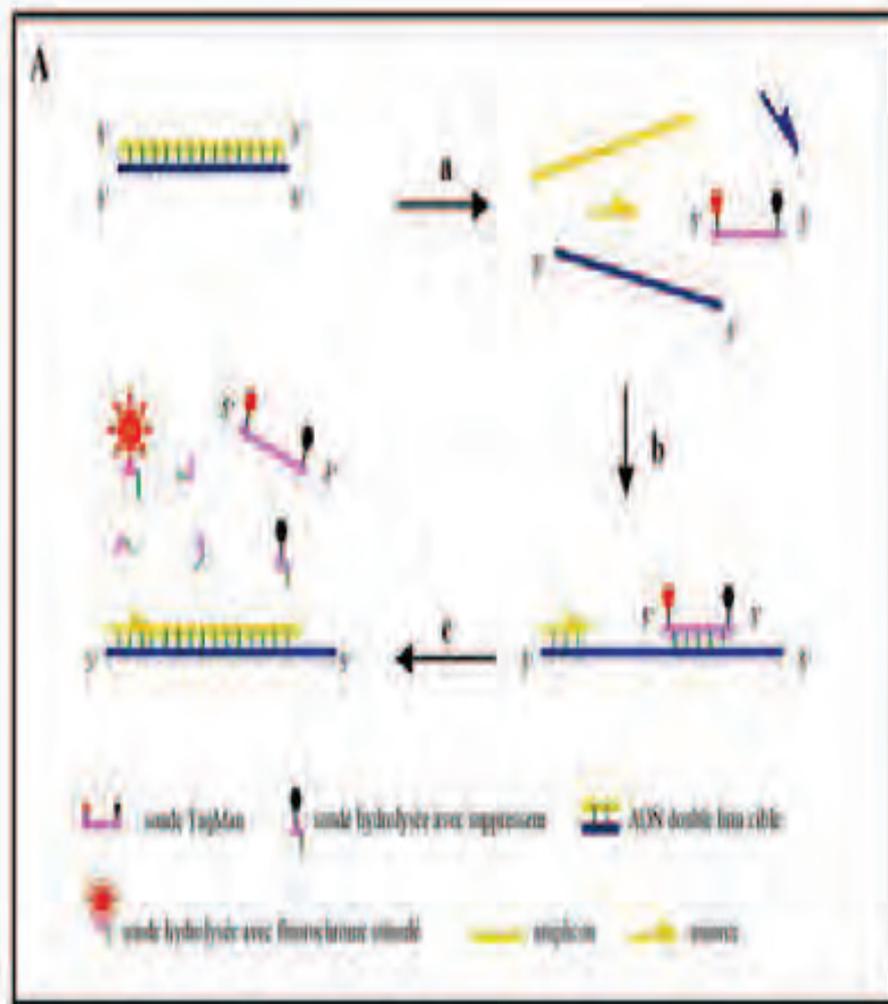
Les étapes d'hybridation et d'élongation peuvent être réalisées à la même température, ce qui permet de réduire considérablement le temps de la PCR en temps réel. Lors de la dénaturation, les deux brins d'ADN sont séparés, puis les amorces se fixent sur leur séquence cible au cours de l'hybridation. Pendant l'élongation la polymérase, qui possède une activité 5'-exonucléase, va cliver la sonde TaqMan®. Le fluorophore va donc s'éloigner du quencher, qui n'absorbera plus la fluorescence émise par le premier, et un signal pourra être détecté (figure 8). L'amplification par PCR, corrélée à un nombre de fluorophores clivés (donc émettant un signal fluorescent) augmentant exponentiellement ce qui va créer une courbe de PCR en temps réel retraçant l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycle PCR (Poitras & Houde, 2002; Mathys *et al.*, 2007). La formation de produits PCR est suivie en temps réel. En effet, il n'y plus besoin de l'analyser par électrophorèse.

### ***B- Réalisation du test***

- ***Extraction de l'ADN***

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit Qiagen : mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les conditions spécifiées par les fournisseurs.

20 µl de protéase QIAGEN (ou protéinase K) sont prélevés et mis dans un tube à eppendorf de 1,5 ml auxquels on ajoute 200 µl d'échantillon (suspension bactérienne) et 200 µl de tampon AL. Le mélange est vortexé pendant 15 sec (afin d'assurer une lyse efficace, il est essentiel que l'échantillon et le tampon soient bien mélangés pour obtenir une solution homogène) puis incubé pendant 30 min à 70°C. Ensuite, après centrifugation de 13000 rpm pendant 1min, 200 µl d'éthanol (96-100%) sont ajoutés. Après avoir mélangé à nouveau en vortexant pendant 15 sec, le mélange est centrifugé de nouveau pendant 1min à 13000 rpm puis transvasé soigneusement du tube eppendorf dans la colonne QIAamp Mini (la colonne contient un tube avec filtre qui est placé dans un autre tube collecteur à 2 ml, le filtre permet de fixer l'ADN, les protéines et autres impuretés sont éliminées grâce à deux lavages).



**Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: TaqMan® assay)**

- (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution,
- (b) A la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute.
- (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

**Figure 8.** Principe de la PCR en temps réel utilisant une sonde Taqman (Poitras & Houde, 2002)

La colonne est centrifugée à 13000 rpm pendant 1 min. Après avoir jeté le contenu du tube collecteur, 500 µl de solution tampon AW1 sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 13000 rpm pendant 1 min, le contenu du tube collecteur contenant le filtrat est jeté et 500 µl du tampon AW2 sont ajoutés dans la colonne QIAamp Mini et le mélange est centrifugé à 14000 rpm pendant 3 min.

L'ADN est ensuite récupéré par centrifugation, grâce à un tampon d'élution AE de pH basique et de faible concentration ionique, dans un tube stérile (la colonne QIAamp Mini spin est placée dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 ml en jetant le tube contenant le filtrat). 200 µl de tampon sont ajoutés et le mélange est incubé à température ambiante (15-25°C) pendant 1 min. L'incubation est suivie d'une centrifugation à 13000 rpm pendant 1 min et le contenu de l'eppendorf est récupéré, c'est l'ADN extrait.

- ***Préparation des mélanges réactionnels pour chaque gène***

- Un mélange réactionnel de 20µl pour un seul échantillon est représenté dans le tableau 5
- Pour le mix, nous avons utilisé le Quantitect Probe PCR Master Mix (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany contenant : Taq DNA polymérase (5 U/µl), dNTP (10 mM), Mg Cl<sub>2</sub> (25 mM), Tampon (100 mM Tris/HCl, pH 8,3 ; 500 mM KCl), (dNTPs : nucléotides, mM : millimolaire, U/µl : Unité par microlitre selon les recommandations du fournisseur).
- .
- Désoxynucléotides triphosphates (dNTP : bases G, C, T, A) ;
- Taq polymérase (DNA polymérase) : elle se fixe sur les amorces et ajoute les dNTP afin de synthétiser le brin d'ADN complémentaire;
- Mg Cl<sub>2</sub> : Les cations Mg<sup>++</sup> forment un complexe soluble avec les dNTP, ce qui est essentiel pour leurs incorporation, stimulent l'activité de la Taq polymérase et neutralisent les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN en stabilisant ainsi les hybrides ADN/ADN.
- Tampon KCL-Mg Cl<sub>2</sub> : sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase.

- Pour la RT-PCR, le thermocycleur utilisé est de type Light Cycler (Roche Diagnostics, Meylan, France).

**Tableau 5.** Composition des mélanges réactionnels pour les PCR en temps réel

Mix RT-PCR pour une réaction	Quantité PCR en temps réel
Quantitect Probe PCR Master Mix	10 $\mu$ l
Amorce Forward	0,5 $\mu$ l
Amorce Reverse	0,5 $\mu$ l
Sonde 0,1nmol/ $\mu$ l puis 1/16ème	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O ultrapure	2 $\mu$ l
ADN à amplifier	5 $\mu$ l
Volume total	20 $\mu$ l

- Pour un jeu d'amorces donné, il faut toujours prévoir la quantité de Mix nécessaire au nombre d'échantillons testés + 1 témoin négatif (H<sub>2</sub>O) + 1 témoin positif.
- On remplit les capillaires numérotés (15 $\mu$ l de Mix/capillaire) et 5  $\mu$ l d'ADN sont ajoutés dans chaque capillaire (tableau 5). Les capillaires sont disposés dans l'ordre de numérotation dans le carrousel du Light Cycler, centrifugés à 3000 rpm pendant 15 sec, remis dans le Light Cycler et le programme Light Cycler 3.5 est lancé.

- **Conditions de la PCR** (Diene *et al.*, 2011):

Une étape de dénaturation à 95° pendant 15mn, est suivie d'une étape d'amplification et de quantification répétée 35 fois (95 °C pendant 30 sec, 60 °C pendant 1 min) (tableau 6).

**Tableau 6.** Programme de l'amplification de la PCR en temps réel

Température	95°C	95°C	60°C
temps	15 min	30 sec	1min

### ***C- Lecture des résultats***

L'interprétation des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Lightcycler Software. Une courbe d'amplification est tracée avec en ordonnée l'intensité de fluorescence et en abscisse le nombre de cycles. Pendant les cycles précoces de l'amplification, les valeurs sont situées au niveau de la ligne de base. Quand suffisamment de sondes ont été dégradées par l'activité exonucléasique de la polymérase, l'intensité de fluorescence augmente. Les résultats de l'amplification sont collectés et analysés lors des phases précoces de l'amplification (phase exponentielle) en assignant un seuil arbitraire (ligne seuil qui correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle). Le point d'intersection entre la courbe d'amplification et la ligne seuil est défini comme le Ct (*cycle threshold* ou cycle seuil) c'est-à-dire que le paramètre Ct est défini comme le nombre de cycles auxquels la fluorescence passe la ligne de seuil (nombre de cycle d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport à la valeur seuil). La quantité de cibles dans l'échantillon à analyser est ensuite déduite du Ct en se reportant sur cette courbe d'étalonnage. Le Ct est par conséquent une valeur prédictive de la quantité d'amplicons.

La PCR est considérée négative s'il n'y a pas de Ct ou si le nombre de Ct est  $\geq 35$  (Diene *et al.*, 2011). Les séquences des amorces et des sondes de chaque gène sont présentées dans le tableau 7.

### ***6.3.2 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) standard pour le produit de 740 pb du gène rpoB (beta subunit of RNA polymerase) et séquençage***

#### ***A- Principe***

La PCR consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action d'une ADN polymérase thermostable. L'amplification s'effectue sur un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligo-nucléotidiques s'appariant spécifiquement aux extrémités des deux brins complémentaires qui délimitent la partie d'ADN à amplifier et les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés (Koeck *et al.*, 2001). Les séquences sont comparées à celles déposées dans une banque de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Cette technique comprend les cycles répétitifs suivants

- Dénaturation de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire;
- Hybridation à l'ADN cible de deux oligonucléotides utilisés comme amorces;
- Elongation de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions  $Mg^{+2}$ .

**Tableau 7.** Amorces et sondes utilisées

Gène	Amorce Forward	Amorce Reverse	Sonde	Ref
plyN	5'- GCGATAGCTTTC TCCAAGTGG-3'	5'- TTAGCCAACAA ATCGTTTACCG- 3'	5'- CCCAGCAATTCAAG TGTTTCGCCGA -3'	Notre étude
lytA	5'- CCTGTAGCCATT TCGCCTGA-3'	5'- GACCGCTGGAG GAAGCACA-3'	5'- AGACGGCAACTGGT ACTGGTTCGACAA 3''	Notre étude
rpoB	5'- AARYTIGGMCCT GAAGAAAT-3'	5'- TGIARTTTRTCA TCAACCATGTG- 3'		(Drancourt <i>et al.</i> , 2004) et notre étude

**B- Réalisation du test**

Le test est effectué selon la méthode de Drancourt *et al.* (2004). L'extraction de l'ADN est effectuée comme pour la RT-PCR.

- **Préparation du mix de PCR**

- Dans une plaque d'amplification (Bio Rad), sont déposés, 25 µl du mélange réactionnel dans chaque puits (tableau 8). Pour la PCR, nous avons utilisé le thermocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

**Tableau 8.** Composition des mélanges réactionnels pour la PCR standard

Mix PCR standard pour une réaction	Quantité PCR standard
Quantitect Probe PCR Master Mix	12,5 µl
Amorce Forward	0,5 µl
Amorce Reverse	0,5 µl
H2O Ultra Pure	6,5 µl
ADN à amplifier	5 µl
Volume total	25 µl

- **Conditions de la PCR**

La réaction de la PCR comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN pendant 5 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN avec 30 sec à 95°C (dénaturations), 30 sec à 46°C (appariement des amorces) et 1 min à 72°C (élongation). Une étape finale de 7 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

- **Electrophorèse sur gel d'agarose**

Pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène ciblé, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1,5% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE [Tris- Borate- EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic)] à 0,5X.

**Protocole de préparation du gel d'agarose**

- Après avoir pesé 6 g de poudre d'agarose, 400 ml de tampon TBE (tampon d'électrophorèse) [Acide Borique 90Mm (5,5g) + Tris-HCL (tris-hydroxyméthyl-

aminométhane) 90Mm (10,78g) + EDTA 2Mm (0,58g) dans 1 litre d'eau distillée, 1X] à 0,5X sont ajoutés: un gel à 1,5% est obtenu. Le mélange est chauffé au four micro-ondes (environ 3min en agitant au moins une fois) puis laissé refroidir.

- Lorsque le gel atteint une température d'environ 60 °C à 65 °C, est ajoutée une solution de bromure d'Ethidium BET (3 fois 31,5 µl pour 50ml) sous une hotte à extraction chimique (port de gants nitrile obligatoire). La préparation du gel est mélangée puis coulée, en déposant les peignes pour creuser les puits.

- ***Electrophorèse des produits d'amplification***

Après 30 mn de polymérisation, les peignes sont retirés et le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse. La migration est réalisée dans du tampon TBE 0,5X avec un voltage de 135V pendant 30 mn environ.

On dépose 4µl du marqueur d'ADN dans le premier puits et on mélange 4 µl de chaque produit amplifié (ADN) avec une goutte de colorant bleu (Blue joice gel loading buffer à 1 ml) (tampon de chargement) qu'on dépose dans les autres puits (avec le témoin positif et le témoin négatif).

L'alimentation est mise sous tension et la durée de migration est réglée. Une fois la migration finie, le gel est placé dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié est comparée avec le marqueur utilisé comme témoin [Marqueur d'ADN de poids moléculaire (Bench Top PGEM<sup>R</sup> DNA markers 100 pb Promega, USA)]

- ***Séquençage***

Le séquençage est réalisé selon la méthode de Sanger *et al* modifiée (1977)

Le séquenceur utilisé est de type Automate ABI 3730 (Applied Biosystems).

Avant le séquençage, le produit de PCR subit une première purification, une deuxième amplification dite PCR de séquençage et une deuxième purification.

- ***Purification***

Après électrophorèse et vérification de la présence des bandes d'ADN, on purifie le produit PCR en ajoutant 100µl d'eau ultra pure, et on transfère le tout dans une plaque à filtre (Millipore) qu'on dépose sur une pompe sous vide pendant 20 min (filtration sous vide). Ensuite on ajoute 50 µl d'eau ultra pure et on agite pendant 20 min sur un agitateur (homogénéisation), on obtient un produit purifié et prêt pour la PCR de séquençage.

- **PCR de séquençage**

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. Pour le réactif BigDye, nous avons utilisé le kit ABI Prism<sup>R</sup> BigDye<sup>R</sup> Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), selon les recommandations du fournisseur. Ce réactif contient le Ready mix reaction [mélange contenant tous les réactifs (Taq polymérase, tampon KCl-MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> et les nucléotides) nécessaires pour effectuer une réaction de PCR standard et le BigDye sequencing buffer (tampon utilisé pour l'optimisation de la réaction de la PCR).

• **Préparation des mélanges réactionnels**

- Un mélange (mix) pour chaque amorce forward et reverse et pour le nombre n d'échantillons est préparé. Chaque mélange, d'un volume de 16 µl, pour chaque échantillon contient : 10 µl eau ultra pure, 3 µl solution tampon (Buffer), 2 µl réactif BigDye et 1 µl de l'amorce (F ou R). On ajoute dans chaque tube 4 µl du produit de PCR purifié (tableau 9).

**Tableau 9.** Composition du mélange réactionnel pour la PCR de séquençage

<b>Composants pour l'amorce Forward</b>	<b>Composants pour l'amorce Reverse</b>	<b>Quantité PCR</b>
Buffer	Buffer	3 µl
Mix Big Dye	Mix Big Dye	2 µl
Amorce F	Amorce R	1 µl
ADN à amplifier	ADN à amplifier	4 µl
H <sub>2</sub> O ultrapure	H <sub>2</sub> O ultrapure	10 µl
Volume total	Volume total	20 µl

• **Conditions de la PCR de séquençage**

Dans une plaque de thermocycleur, on dépose 20µl du mélange réactionnel dans chaque puits. Le programme de l'amplification est mentionné sur le tableau 10 (96°C pendant 2 min puis pendant 25 cycles (96°C pendant 10 sec, 50°C pendant 5 sec) puis à 60°C pendant 4 mn).

**Tableau 10.** Programme de l'amplification (PCR de séquençage)

<b>Température</b>	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
<b>Temps</b>	2 min	10 sec	5 sec	4 min	∞

- *Purification par séphadex*

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par séphadex, on met la poudre de séphadex (séphadex<sup>R</sup> 50G Sigma) dans les puits de la plaque de purification à laquelle on ajoute 300µl d'eau ultra pure en laissant agir pendant 3 heures. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min à 10°C, et après avoir récupéré l'eau, les produits de la PCR de séquençage sont mis dans la plaque à filtre. Une nouvelle plaque (plaque de séquençage) est placée sous la plaque à filtre pour récupérer les produits de PCR purifiés et l'ensemble est centrifugé à 12000 rpm pendant 10 min à 10°C. Les produits purifiés sont introduits dans le séquenceur.

*C- Analyse des séquences*

Les séquences brutes obtenues après séquençage sont analysées et corrigées par le logiciel Codon Code Aligner. Les séquences obtenues sont comparées à d'autres séquences, à l'aide du Blast (Basic Local Alignment Search Tool) sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.*, 1997) dans le site web de GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Afin de déterminer leur affiliation phylogénétique, un arbre phylogénétique est construit avec le programme Mega 4.1 selon la Méthode du « Neighbor-joining » (Saitou & Nei, 1987).

Dans notre étude, la PCR standard pour le gène *rpoB* et le séquençage sont effectués pour 41 souches de pneumocoques et 9 souches de streptocoques. L'arbre phylogénétique est construit avec les séquences de 28 souches de pneumocoques, 9 souches de streptocoques et 4 souches de référence prises sur GenBank (*S.mitis* SK667, *S.sanguinis* ATCC10556, *S.oralis* SK153 et *S.pneumoniae* cip102911).

## **7- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques**

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques est fondée sur la recherche des diamètres d'inhibition et sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Ces deux techniques sont réalisées pour les 100 souches de *S.pneumoniae* qui ont fait l'objet de notre étude selon les techniques de standardisation de l'antibiogramme, (2005).

### **7.1 Antibiogramme standard**

L'antibiogramme standard utilise la technique de la diffusion en milieu gélosé. Il permet d'apprécier la modification de la croissance d'une souche bactérienne en présence de l'antibiotique testé.

#### **A- Méthode de réalisation**

##### **- Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture de 18-24 H sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton (annexe 1), préparer une suspension en bouillon Mueller-Hinton équivalente au standard Mc Farland 0,5.

##### **- Inoculation**

L'inoculation des souches est effectuée à l'aide des écouvillons alors que les disques d'antibiotiques sont appliqués sur la gélose à l'aide d'une pince en appuyant légèrement [disques d'antibiotiques (Bio-discs bioMérieux<sup>R</sup> SA, BioRad Marne-la coquette France)]

#### **B- Lecture**

Réalisée après 18-24 h d'incubation à 35-37 °C sous CO<sub>2</sub>. La lecture de l'antibiogramme est effectuée à partir des mesures à l'aide d'un pied à coulisse. Ces valeurs sont comparées aux valeurs critiques de l'antibiotique correspondant.

Le germe est qualifié de sensible (S), d'intermédiaire (I) ou de résistant (R) selon le degré de sensibilité des souches, évalué par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition. Les critères d'interprétation sont présentés dans le tableau 11.

### **7.2 Détection de la résistance aux bêta-lactamines**

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

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

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

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

Un disque d'oxacilline chargé à 1  $\mu$ g peut également être utilisé, le diamètre seuil étant alors de 19 mm. Si le diamètre autour du disque est inférieur à 26 mm pour le disque chargé à 5  $\mu$ g ou à 19 mm pour le disque chargé à 1  $\mu$ g, la mesure de la CMI à plusieurs bêta-lactamines devra être effectuée : en pratique, la pénicilline pour le classement en PSDP et l'amoxicilline, le céfotaxime ou la céftriaxone et l'imipenème en fonction de la molécule utilisée en thérapeutique.

### ***7.3 Détection des souches de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones***

Le dépistage des pneumocoques de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones est réalisé par la mesure de la sensibilité à la norfloxacine. Si le diamètre autour du disque de norfloxacine (charge à 5  $\mu$ g) est inférieur à 10 mm, il existe un risque de sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones [CA-SFM (Chardon, 2008)].

### ***7.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)***

La détermination de la CMI est effectuée par E-test<sup>®</sup> pour les 100 souches. Les

antibiotiques testés sont la pénicilline, l'amoxicilline, le céfotaxime, l'imipenème et l'érythromycine [Bandes E-test® ( BioMérieux , AB Bio-discs, selon les recommandations du fournisseur)]

**Tableau 11.** Antibiotiques testés et critères d'interprétation des diamètres d'inhibition pour *Streptococcus pneumoniae* selon les normes du CLSI 2007

Antibiotique	Charge du disque (µg)	Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (mm)		
		Sensible	Intermédiaire	Résistant
<b>Pénicilline G</b>	10	-	-	-
<b>Oxacilline( screening)</b>	5	≥26	-	≤26
<b>Amoxicilline</b>	25	-	-	-
<b>Céfotaxime</b>	30	-	-	-
<b>Imipenème</b>	10	-	-	-
<b>Erythromycine</b>	15	≥21	16-20	≤15
<b>Spiramycine</b>	15	≥24		≤19
<b>Télithromycine</b>	15	≥19	16-18	≤15
<b>Lincomycine/Clindamycine</b>	15	≥19	16-18	≤15
<b>Pristinamycine</b>	15	≥19	16-18	≤15
<b>Linézolide</b>	30	≥21	-	-
<b>Cotrimoxazole</b>	1.25/23.75	≥19	16-18	≤15
<b>Tétracycline</b>	30	≥23	19-22	≤18
<b>Chloramphénicol</b>	30	≥21	-	≤20
<b>Vancomycine</b>	30	≥17	-	-
<b>Rifampicine</b>	5	≥19	17-18	≤16
<b>Lévofloxacine</b>	5	≥17	14-16	≤13
<b>Ciprofloxacine</b>	5	≥19	16-18	≤15
<b>Norfloxacine( screening)</b>	5			<10
<b>Gentamycine</b>	500	≥14		<10
<b>Kanamycine</b>	1000	≥14		<10

### ***A- Principe***

Le système E-test<sup>®</sup> utilise une bande en plastique non poreuse calibrée par un gradient pré-établi de concentrations d'antibiotiques couvrant plusieurs dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé (Joly-Guillou, 2006).

Le gradient couvre une rangée de concentrations allant de 0,015 ou 0,016 à 256 µg/ml ou 0,002 à 32 µg/ml selon l'antibiotique (tableau 12).

### ***B- Réalisation du test***

#### ***- Préparation de l'inoculum***

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

#### ***- Ensemencement***

La gélose au sang utilisée est soit déjà préparée, soit coulée avec une épaisseur de 4,5 à 5 mm (une fois la gélose solidifiée, la boîte est mise à l'étuve pour avoir une surface bien sèche). L'ensemencement est effectué par écouvillonnage qui consiste à imbiber un écouvillon stérile de la suspension bactérienne, essorer sur le rebord du tube et effectuer un passage de l'écouvillon sur toute la surface de la gélose par simple rotation de 120° tout en s'assurant que toute la boîte est bien ensemencée, ensuite appliquer les bandes E-test<sup>®</sup> et incuber immédiatement les boîtes à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 20 à 24 heures.

#### ***• Remarque***

Ne pas déplacer une bande E-test<sup>®</sup> une fois déposée sur la gélose car la diffusion de l'antibiotique est instantanée. L'utilisation de bandelettes bien conservées est fondamentale : absence d'humidité, suivi très strict de la température de conservation recommandée, respect de la mise en température. Si ces conditions ne sont pas respectées, des erreurs dues à des bandelettes déchargées conduisent à des surévaluations de la CMI.

### ***C- Lecture de la valeur de la CMI***

L'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse. La valeur de la CMI correspond au point d'intersection entre la limite de la zone d'inhibition et la bande d'E-test<sup>®</sup>. Les valeurs obtenues sont comparées aux normes du CLSI 2007 (tableau 13) et CLSI 2011 (tableau 14).

**Tableau 12.** Bandes E-Test et gradients de concentration

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

**Tableau 13.** Critères d'interprétation des CMI de *Streptococcus pneumoniae* selon les normes du CLSI 2007 (CLSI, 2007)

Antibiotique \ Intreprétation	Intreprétation			ATCC 49619 Contrôle de qualité
	Sensible	Intermédiaire	Résistant	
Pénicilline	$\leq 0,06$	0,12 - 1	$\geq 2$	0,25-1
Amoxicilline (autre que méningite)	$\leq 2$	4	$\geq 8$	0,03 – 0,12
Céfotaxime				
Méningite	$\leq 0,5$	1	$\geq 2$	0,03 – 0,12
Autre	$\leq 1$	2	$\geq 4$	
Imipenème	$\leq 0,12$	0,25 – 0,5	$\geq 1$	0,03 – 0,12
Erythromycine	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$	

**Tableau 14.** Critères d'interprétation des CMI de *Streptococcus pneumoniae* selon les normes du CLSI 2011 (CLSI, 2011)

Interprétation Antibiotique	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Pénicilline			
Méningites	$\leq 0,06$	-	$\geq 0,1$
Autre	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Amoxicilline			
(autre que méningite)	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Céfotaxime			
Méningite	$\leq 0,5$	1	$\geq 2$
Autre	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Imipenème	$\leq 0,12$	0,25-0,5	$\geq 1$
Erythromycine	$\leq 0,25$		$\geq 1$

- **Remarque :** Les macrolides sont moins actifs en milieu acide : d'où la recommandation de ne pas incuber les antibiogrammes de *S. pneumoniae* dans une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Cet effet est particulièrement marqué pour la télithromycine. L'atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> sera réservée aux souches qui ne poussent pas en atmosphère normale.

### 8- Détermination des gènes de résistance aux macrolides

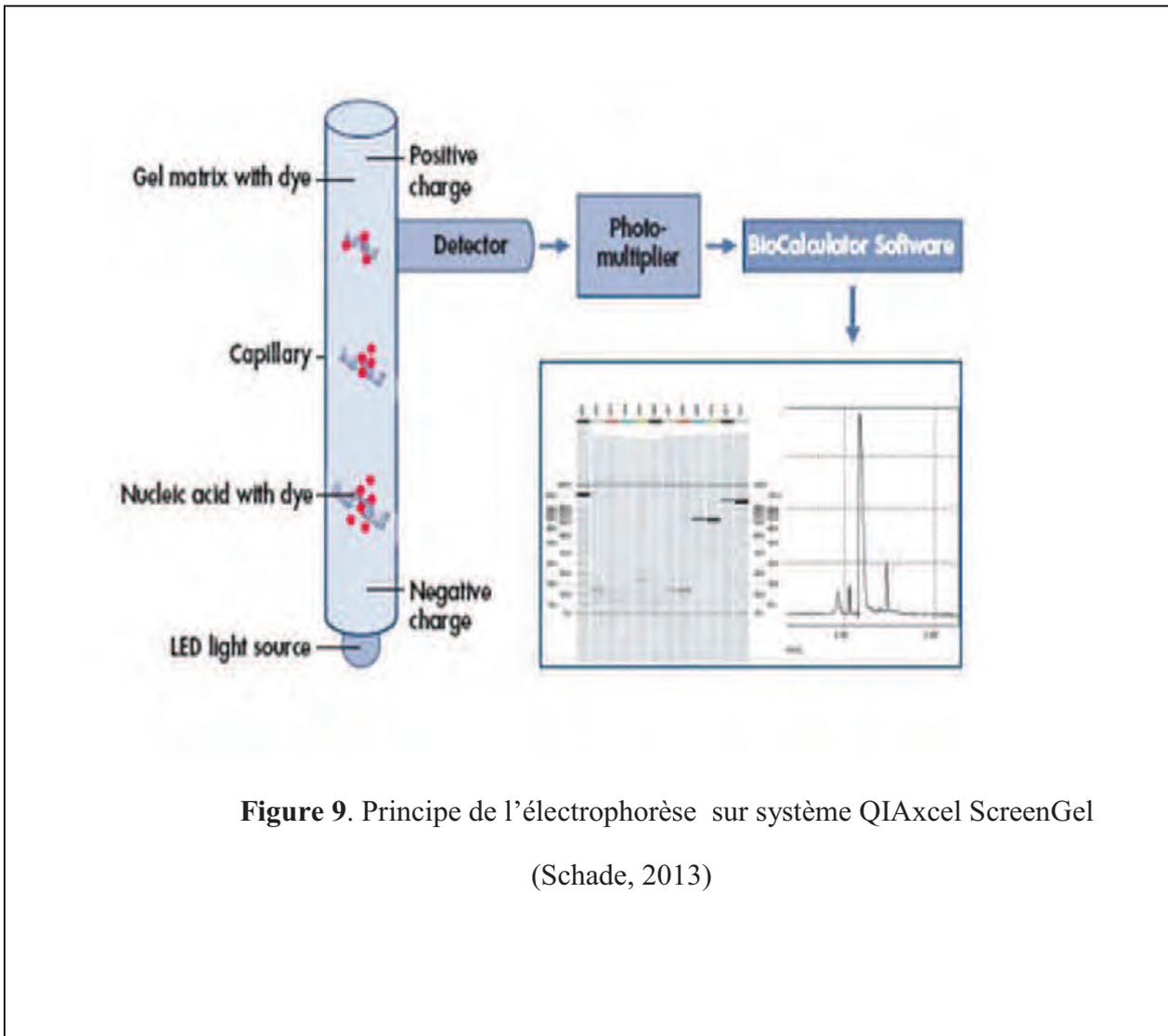
Effectuée pour les deux gènes ermB et mefA par PCR standard (la même technique utilisée pour le gène rpoB pour l'amplification). L'amplification des deux gènes de résistance est réalisée pour 21 souches résistantes à l'érythromycine. Le séquençage n'est effectué que pour 12 souches pour le gène ermB. Pour le gène mefA, le séquençage n'a pas été effectué et nos résultats sont basés uniquement sur la taille de la PCR.

Pour la visualisation des bandes d'ADN, pour le gène mefA, l'électrophorèse capillaire à haute résolution est réalisée en utilisant un système QIAxcel (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), selon les instructions du fabricant. Le système QIAxcel regroupe l'automate

QIAxcel, le QIAxcel Kit (contenant le QIAxcel gel et les tampons) et un ordinateur doté d'un logiciel QIAxcel ScreenGel® Software.

Les échantillons étant placés dans une plaque PCR, une plateforme automatisée va tout d'abord amener la plaque PCR au niveau d'une tête à 12 capillaires. Ces derniers sont disposés en parallèle et ont été préalablement injectés avec un gel pré-coulé contenant un intercalant fluorescent (BET) et des solutions tampon. Grâce à l'application d'un champ électrique via des électrodes disposées côte à côte de chacun des capillaires, les acides nucléiques vont ensuite entrer dans les capillaires par une injection dite électrocinétique. L'appareil est conçu pour la détection de la fluorescence et comprend un réseau de diodes électrolumineuses et de capteurs micro-optiques qui s'accrochent sur les capillaires à l'intérieur des cartouches de gel. Les fragments qui migrent à travers la matrice de gel et les signaux sont lus en utilisant un ordinateur et un logiciel approprié. Les molécules d'acide nucléique sont séparées par taille. Un détecteur dans l'appareil détecte les molécules d'acide nucléique lors de leur migration vers l'extrémité chargée positivement du capillaire. Ces données sont transmises par l'intermédiaire d'un photomultiplicateur avant d'être converties en un électrophérogramme et une image numérique du gel par QIAxcel ScreenGel Software 1.0.1.0. Un marqueur de taille intégré de 15pb à 5Kb permet de comparer la taille des échantillons.

96 échantillons sont traités en environ 25 minutes. Cette technique utilise des voltages élevés (15 -30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides. Le logiciel dispose d'une fonction d'import des noms des échantillons et les données peuvent être exportées aisément sous différents formats: xls, pdf, ... (figure 9).



**Figure 9.** Principe de l'électrophorèse sur système QIAxcel ScreenGel  
(Schade, 2013)

Les conditions de PCR pour les deux gènes sont mentionnées dans les tableaux 15 et 16. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau 17.

**Tableau 15.** Programme de l'amplification du gène ermB (30 cycles) (Amezaga *et al*, 2002)

Température	94°C	94°C	57°C	72°C	72°C	4°C
Temps	4mn	30s	30s	1mn	7mn	∞

**Tableau 16.** Programme de l'amplification du gène *mefA* (35 cycles) (Amezaga *et al.*, 2002 modifié)

Température	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
Temps	4mn	30s	30s	30s	5mn	∞

**Tableau 17.** Séquences des amorces utilisées

Gène	Amorce	séquences	Taille Amplicon	Ref
ermB	ermB-F	5'ATTGGAACAGGTAAAGGGC3'	419pb	(Amezaga <i>et al.</i> , 2002)
	ermB-R	5' GAACATCTGTGGTATGGCG3'		
mefA	mefA-F	5'CTATGCGATTTTGGGACCTG3'	801pb	(Marchandin <i>et al.</i> , 2001)
	mefA-R	5'GAAAGCCCCATTATTGCACA3'		

## 9. Sérotypage

### *A- Principe*

Le sérotypage des souches est réalisé par la méthode d'agglutination au latex. Le principe du sérotypage est basé sur les réactions antigènes-anticorps. Les sérums utilisés sont ceux du Statens Serum Institut Copenhague, Danemark, selon les recommandations du fournisseur. Dans notre étude, 83 souches seulement sont sérotypées pour des problèmes de conservation. Nous donnons le nom de sérotypes à l'ensemble des sérotypes et sérogroupes

### *B- Réalisation de la technique d'agglutination au latex*

La technique utilisée est celle de Slotved *et al.*(2004), visualisée par une agglutination qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène-anticorps. Une suspension bactérienne riche (2 Mc Farland dans de l'eau physiologique) est préparée. Sur une plaque d'agglutination, 10µl de la suspension bactérienne à tester sont mélangés avec 10µl de l'antisérum (commencer par les pools de A à I) (tableau 18). La lame est secouée dans un mouvement rotatoire manuellement pendant 5 à 8 secondes.

### ***C- Lecture des résultats***

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

### **10. Etude statistique**

Le traitement et l'analyse des données sont effectués par le logiciel MS Excel (version 2010).

La sensibilité et la spécificité des tests d'identification sont calculées en pourcentages.

- La sensibilité est la probabilité que le test soit positif chez les pneumocoques seulement [calculée par le rapport vrais positifs/ (vrais positifs + faux négatifs)].
- La spécificité est la probabilité d'obtenir un test négatif chez les non-pneumocoques [calculée par le rapport vrais négatifs / (vrais négatifs + faux positifs)].

L'analyse factorielle des correspondances AFC qui emploie la métrique du chi-deux ( $\chi^2$ ) est utilisée pour analyser l'association entre deux variables qualitatives (âge- type d'infection)

Le test  $\chi^2$  (avec correction de Yates si un effectif est < 5) et le test exact de Fisher sont utilisés pour l'analyse des variables qualitatives avec le logiciel MATLAB version 7.10.0.

Ces tests sont utilisés pour les variables :

- Sexe- âge, sexe- type d'infection.
- Résistance aux bêta-lactamines (pénicilline, amoxicilline, céfotaxime) – âge.
- Résistance aux autres antibiotiques - âge.
- Multirésistance- âge.
- Résistance à la pénicilline- type d'infection.
- Résistance aux autres antibiotiques- type d'infection.
- Multirésistance – type d'infection.
- Sérotypes vaccinaux- résistance – résistance à la pénicilline.
- Sérotypes vaccinaux- multirésistance.....
- Une valeur de  $P < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

### **11. Recherche bibliographique**

La recherche bibliographique est effectuée sur Bibliovie, PubMed et Sciences Direct.

La saisie des références bibliographiques est effectuée par le logiciel Reference Manager 12.

**Tableau 18.** Distribution en échiquier de 90 sérotypes de *S.pneumoniae* selon les pools (A-I) et les pools (P-T) (Sorensen, 1993)

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

Sérotypes en gras ceux contenus dans le vaccin 23-valent

- Sérums poolés “ A ” à “ I ” et “ P ” à “ T ”: chacun des 14 pools d’antisérum se compose d’un mélange de 7 à 11 anticorps. L’ensemble des 14 pools couvre les 90 sérogroupes et sérotypes connus.

## TROISIEME PARTIE : RESULTATS

### 1. Identification

Les souches sont numérotées de la manière suivante :

- 41 souches de pneumocoques : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 22, 23, 26, 29, 34, 36, 37, 40, 44, 45, 46, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62,63.
- 9 souches de streptocoques : 14, 18, 19, 28, 30, 31, 33, 38, 39.

#### *1.1 Résultats de l'identification par méthodes phénotypiques*

100 souches de pneumocoques sont soumises au test de sensibilité à l'optochine, Pour les autres tests y compris les tests moléculaires, nous avons testé 41 souches de *S.pneumoniae* et 9 souches cliniques de streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques.

Concernant les 100 souches de *S.pneumoniae*, elles sont toutes sensibles à l'optochine avec un diamètre  $> 14$  mm (annexe 3, figure 10). Pour les 9 souches de streptocoques, elles sont toutes résistantes à l'optochine. Ce test présente une sensibilité de 100% (41/41) et une spécificité de 100% (9/9).

Comme le montre le tableau 19, pour le test de solubilité dans les sels biliaires, 38 souches de pneumocoques sont solubles dans la bile, 3 souches présentant une solubilité partielle, sont considérées négatives (souches 7, 26 et 34). Pour les 9 souches de streptocoques, le bouillon reste trouble pour 8 souches, pour lesquelles le test est négatif (vrais négatifs). Une souche (souche 14) présente un résultat positif (faux positif). Ce test présente une sensibilité de 93% (38/41) et une spécificité de 89% (8/9).

40 souches de pneumocoques agglutinent au latex polyvalent (réaction positive), une souche ne présentant pas d'agglutination est considérée négative (souche 7), cette souche est sensible à l'optochine mais non soluble dans la bile. Pour les 9 souches de streptocoques, le test est négatif. Ce test présente une sensibilité de 98% (40/41) et une spécificité de 100% (9/9).

**Tableau 19.** Résultats de l'identification par les méthodes conventionnelles (50 souches)

Test	Résultat	Nbre de souches 50 (100%)
Résistance à l'optochine	Sensible	41(82%)
	Résistant	9(18%)
Solubilité dans la bile	Positive	39(78%)
	Négative	11(22%)
Agglutination au latex	Positive	40(80%)
	Négative	10(20%)

**Tableau 20.** Résultats de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS

Espèce	nombre de souches	n(%) identification/score			n(%) identification/score		
		correcte			incorrecte		
		≥2	1,9<x<2	≤1,9	>2	1,9<x<2	≤1,9
<i>S. pneumoniae</i>	41	25(61%)	10(24,39%)	6(14,63%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Streptocoques α-hémolytiques	9				9(100%)		

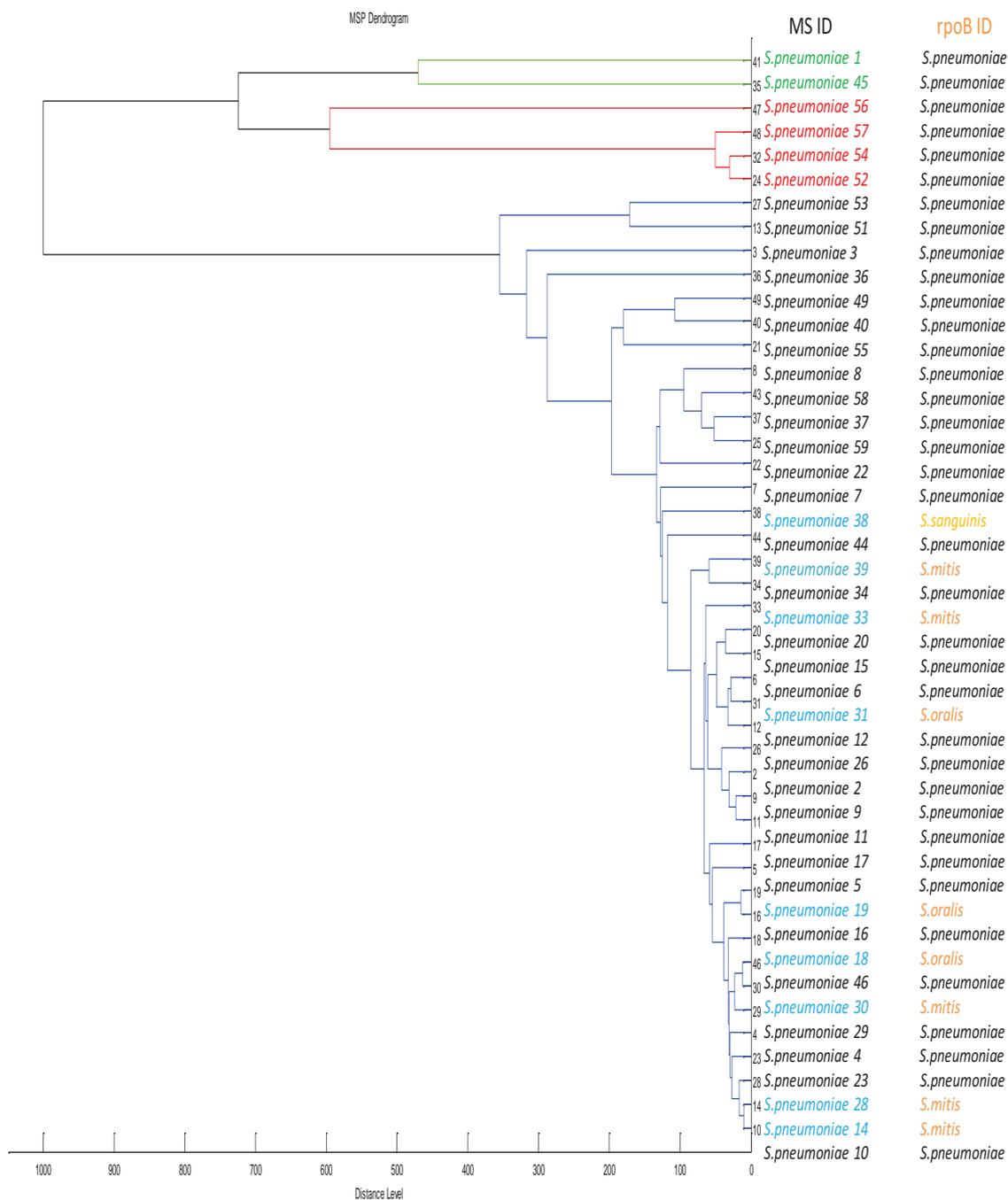
### ***1.2 Résultats de l'identification par spectrométrie de masse***

Les résultats de l'identification des souches par la méthode de spectrométrie de masse (annexe 4) présentés dans les tableaux 20,21,22 et 23 montrent que :

- pour les 41 souches de *S.pneumoniae* :
  - 35 souches sont bien identifiées (*S.pneumoniae*) mais avec des scores différents (vrais positifs) :
    - 25 souches sont identifiées avec des scores > 2.
    - 10 souches avec des scores compris entre 2 et 1,9.
      - 6 souches sont identifiées avec des scores < 1,9 (souches 1, 45, 52, 54, 56 et 57). Le test est considéré négatif pour ces 6 souches (faux négatifs).

pour les 9 souches de streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques, elles sont toutes mal identifiées (*S.pneumoniae*) avec des scores > 2 (faux positifs) (tableau 20). Ce test présente une sensibilité de 85% (35/41) et une spécificité de 0% (0/9) puisqu'il n'y a pas de vrais négatifs.

Sur le dendrogramme construit par le logiciel Bruker MSP, deux clusters sont mis en évidence: le premier cluster regroupe 6 souches de *S.pneumoniae* mal-identifiées (score <1,9) (souches 1, 45, 52, 54, 56, et 57), le deuxième cluster, par contre regroupe 40 souches bien identifiées (scores > 1,9), regroupant 31 souches de *S.pneumoniae* et les 9 souches de Streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques identifiées comme *S.pneumoniae* (scores > 2) (Figure 11). Certaines souches de streptocoques sont enracinées avec des souches de pneumocoques comme la souche 31 avec la souche 6, la souche 19 avec la souche 16 et la souche 30 avec la souche 46. Ces résultats diminuent la performance de cette technique d'identification quant à son pouvoir discriminatoire entre pneumocoques et autres streptocoques du groupe *mitis*.



**Figure 11.** Dendrogramme à partir des résultats de la spectrométrie de masse MALDI-TOF MS : 46 souches testées (37 souches de *S.pneumoniae* et 9 souches de Streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques autres que *S.pneumoniae*). Sur le dendrogramme, MSID : identification par spectrométrie de masse, rpoB ID : identification par la recherche du gène rpoB).

### **1.3 Résultats de l'identification par PCR en temps réel (gènes *plyN* et *lytA*)**

Concernant la méthode d'identification par PCR en temps réel [tableaux 21, 22, 23 et annexe 5 (figures 12-19)], nous observons :

- ***pour le gène *plyN**** :
  - pour les 41 souches de *S.pneumoniae*
  - 39 souches sont de vrais positifs.
    - 2 souches sont considérées négatives : 1 souche présentant un nombre de cycles > 36 est considérée comme faux négatif (souche 57), et une souche négative (faux négatif, souche 45). Les deux souches sont sensibles à l'optochine et présentent un résultat positif quant à la solubilité dans les sels biliaires.
  - pour les 9 souches de streptocoques : les 9 souches sont de vrais négatifs (2 souches présentant un nombre de cycles > 35 sont considérées négatives (vrais négatifs) (souches 18 et 19).
- ***pour le gène *LytA**** :
  - pour les 41 souches de *S.pneumoniae* :
    - 39 souches sont de vrais positifs.
    - 2 souches sont considérées négatives (faux négatifs, souches 45 et 63), les deux souches sont sensibles à l'optochine et positives dans les sels biliaires.
  - pour les 9 souches de Streptocoques :
    - 8 souches présentent des résultats négatifs (vrai négatifs) et 1 souche présentant un nombre de cycles > 35, est considérée négative (vrai négatif souche 39).

Ce test présente 95% de sensibilité (39/41) et 100% de spécificité (9/9) pour les deux gènes.

**Tableau 21.** Résultats des tests d'agglutination et des PCR pour les gènes ply et lyt en fonction de la sensibilité à l'optochine et la solubilité dans les sels biliaires

Groupe	N	Agglutination-latex		Ply- PCR				Lyt- PCR			
		Positif	Négatif	vp	fp	vn	fn	vp	fp	vn	fn
<b>Optochine S</b> <b>Bile soluble p</b>	38	38	0	36	0	0	2	36	0	0	2
<b>Optochine S</b> <b>Bile soluble N</b>	3	2	1	3	0	0	0	3	0	0	0
<b>Optochine R</b> <b>Bile soluble P</b>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
<b>Optochine R</b> <b>Bile soluble N</b>	8	0	8	0	0	8	0	0	0	8	0

R: Résistant, S: Sensible, N: Négatif, P: Positif, vp: Vrai positif, fp: Faux positif, vn: Vrai négatif, fn: Faux négatif

### **1.4 Résultats de l'identification par PCR (gène *rpoB*)**

Les bandes d'ADN des 50 souches ont migré dans la région 740 paires de bases du gel d'agarose à 1,5 % (annexe 6, figure 20).

Le logiciel blast N a permis la comparaison des 50 séquences obtenues par séquençage (annexe 7) à l'ensemble des séquences existantes sur GenBank : les résultats du blast sont représentés dans les deux tableaux 24 et 25 (annexe 8). Ils représentent des scores traduits en pourcentages d'identité correspondant aux nombres de nucléotides identiques entre l'espèce étudiée et l'espèce de GenBank avec des valeurs de E value égales à zéro (l'identité n'est pas faite au hasard). D'Après le tableau 24, les 41 souches de *S.pneumoniae* présentent des pourcentages d'identité de 98% (souches 34, 40 et 46) , de 99% (souches 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 20, 22, 36, 37, 44, 45, 49, 53 et 61) et 100% (souches 1, 2, 17, 23, 26, 29, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62 et 63) avec différentes souches sur GenBank *S.pneumoniae* (CP000920, CP006844, CP000919, CP001845, FQ 312044, FQ312041, KC 589337, KC 589336).

D'après le tableau 25, les 9 souches de streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques présentent des pourcentages d'identité de 97% (souches 33, 30 et 38), de 98% (souches 31 et 28) et 99% (souches 14, 18, 19 et 39) avec des souches de GenBank, comme par exemple *S.mitis* KC 589314, *S.oralis* KC589327 et *S.sanguinis* CP000387.

L'arbre phylogénique permet mieux de visualiser les affiliations des souches (figure 21). Les alignements des séquences d'ADN sont réalisés par Clustal X et l'arbre est construit à partir de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) en utilisant le test de « bootstrap ».

L'arbre optimal avec les pourcentages d'arbres répliqués dans lequel les taxons associés regroupés dans le test de bootstrap (1000 répliqués) sont affichées à côté des branches.

Les 37 souches (28 souches de pneumocoques et 9 souches de streptocoques) alignées, sont classées en deux groupes :

- Le premier groupe représente 2 clades
- Le 1<sup>er</sup> clade regroupe les 2 espèces *S.pneumoniae* et *S.mitis* avec un bootstrap de 79%, lui-même divisé en 2 clades regroupant dans le premier, les 28 souches de *S.pneumoniae* avec un bootstrap de 99% ce qui dénote une forte relation phylogénique

**Tableau 22.** Caractéristiques phénotypiques et génotypiques de 10 souches de *S.pneumoniae* présentant des résultats non concordants

N° isolat	Sensibilité à l'optochine	Solubilité dans la bile	Résultats des tests:					
			plyN	lytA	Maldi-tof MS		rpoB ID	% ID
					ID	Score		
1	S	+	+	+	<i>S.pneumoniae</i>	1,877	<i>S.pneumoniae</i>	100
7	S	-	+	+	<i>S.pneumoniae</i>	1,963	<i>S.pneumoniae</i>	99
26	S	-	+	+	<i>S.pneumoniae</i>	1,96	<i>S.pneumoniae</i>	100
34	S	-	+	+	<i>S.pneumoniae</i>	2,124	<i>S.pneumoniae</i>	98
45	S	+	-(fn)	-(fn)	<i>S.pneumoniae</i>	1,893	<i>S.pneumoniae</i>	99
52	S	+	+	+	<i>S.pneumoniae</i>	1,8	<i>S.pneumoniae</i>	100
54	S	+	+	+	<i>S.pneumoniae</i>	1,823	<i>S.pneumoniae</i>	100
56	S	+	+	+	<i>S.pneumoniae</i>	1,8	<i>S.pneumoniae</i>	100
57	S	+	-(fn)	+	<i>S.pneumoniae</i>	1812	<i>S.pneumoniae</i>	100
63	S	+	+	-(fn)	<i>S.pneumoniae</i>	2,35	<i>S.pneumoniae</i>	100

R: Résistant, S: Sensible, fn: Faux négatif, ID: Identification

- entre ces souches (nous remarquons aussi que les 28 souches de *S.pneumoniae* sont alignées avec la souche de référence *S.pneumoniae* CIP102911), et regroupant dans le deuxième, les 5 souches de *S. mitis* avec un bootstrap de 94%. Les 5 souches de *S.mitis* étudiées sont alignées avec la souche de référence *S.mitis* SK 667.
- le 2ème clade regroupe les 3 souches de *S. oralis*, alignées avec la souche de référence *S.oralis* SK153.
- Le 2<sup>ème</sup> groupe représente l'espèce *S.sanguinis* : 1 souche de *S.sanguinis* est alignée avec la souche de référence *S.sanguinis* ATCC10556.

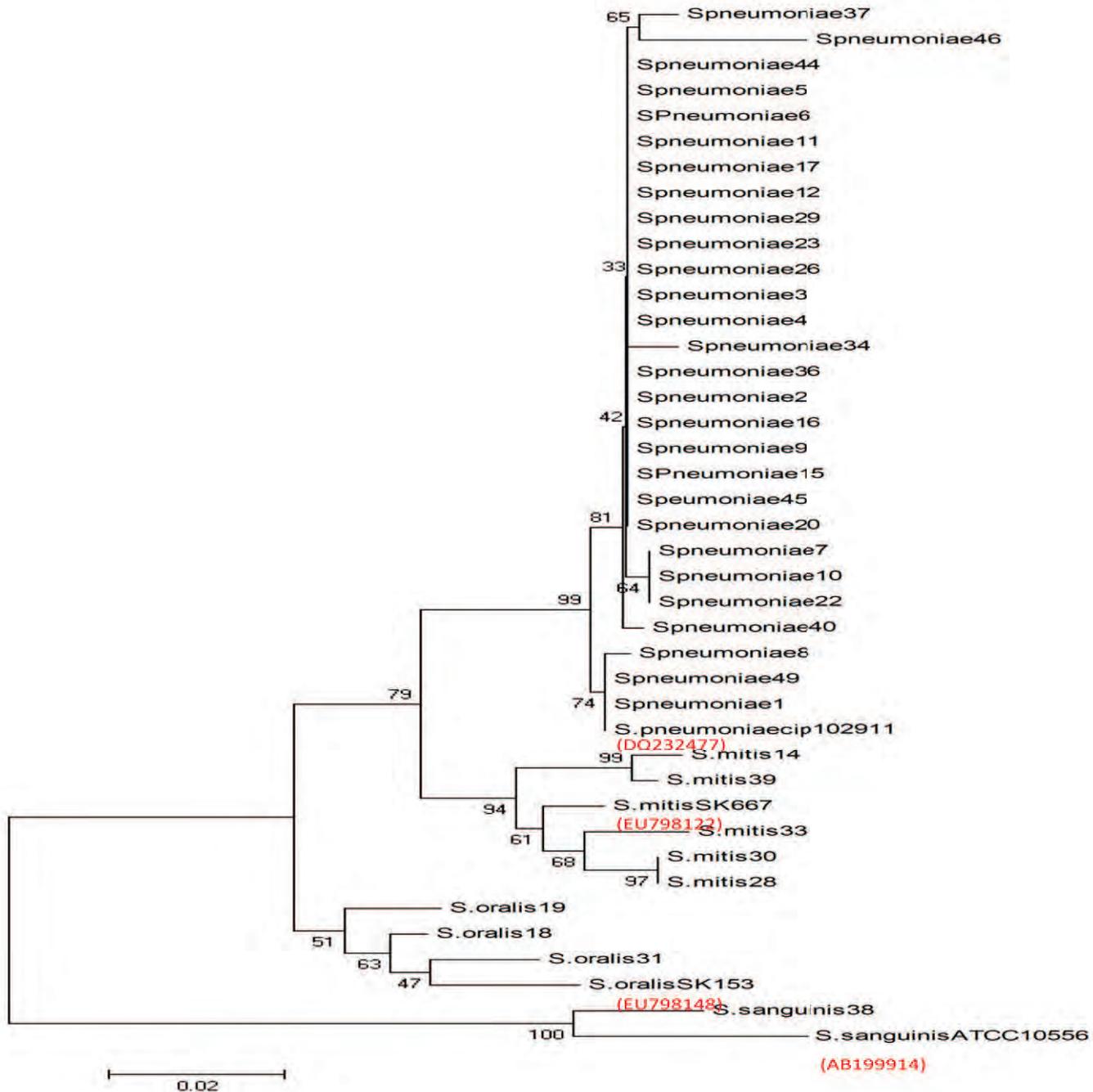
L'arbre phylogénique nous permet d'observer que les deux espèces *S.oralis* et *S. mitis*, espèces très proches de *S.pneumoniae* surtout *S. mitis*, sont séparées dans des clades différents. Ce qui prouve la performance du test.

Ce test présente une sensibilité de 100% (41/41) et une spécificité de 100% (9/9).

**Tableau 23.** Caractéristiques phénotypiques et génotypiques de 9 souches de Streptocoques présentant des résultats non concordants.

N° isolat	Sensibilité à l'optochine	Solubilité dans la bile	Résultats des tests:					
			plyN	lytA	Maldi-tof MS		rpoB ID	% ID
					ID	Score		
14	R	+	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,271	<i>S.mitis</i>	99
18	R	-	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,111	<i>S.oralis</i>	99
19	R	-	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,25	<i>S.oralis</i>	99
28	R	-	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,089	<i>S.mitis</i>	98
30	R	-	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,168	<i>S.mitis</i>	97
31	R	-	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,067	<i>S.oralis</i>	98
33	R	-	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,07	<i>S.mitis</i>	97
38	R	-	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,02	<i>S.sanguinis</i>	97
39	R	-	-	-	<i>S.pneumoniae</i>	2,276	<i>S.mitis</i>	99

ID : Identification, R: Résistant, ID: Identification



**Figure 21.** Arbre phylogénique basé sur un fragment du gène *rpoB* codant l'ARN polymérase montrant la position des souches étudiées [28 souches de *S.pneumoniae*, 9 souches de streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques et 4 souches de référence (*S.mitis* SK667, *S.sanguinis* ATCC10556, *S.oralis* SK153 et *S.pneumoniae* cip102911)]. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides. Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les probabilités calculées par bootstrap. Les numéros d'accèsion dans la base de données GenBank sont reportés sous chaque souche de référence utilisée.

## 2. Caractéristiques épidémiologiques

### *2.1 Fréquence des infections invasives à pneumocoque en fonction de la nature de l'infection et de l'âge*

Cent cas d'infections invasives à pneumocoques sont diagnostiqués au C.H.U Benbadis de Constantine entre 2005 et 2011. Ils se répartissent en 75 méningites, 13 pneumopathies et 12 bactériémies. Les souches sont isolées de LCR dans 61% des cas, de LCR et de sang dans 14% des cas, d'hémocultures dans 22% des cas, 3% des souches sont isolées de liquides pleuraux.

Le taux des méningites est le plus élevé dans notre étude. Pour les pneumopathies, le recrutement des prélèvements est limité.

D'après le tableau 26 et la figure 22, nous remarquons que le taux des infections invasives à pneumocoques est élevé chez l'enfant dont l'âge est égale ou inférieur à 5 ans, il représente 31% des cas (31/100) dont 64,51% (20/31) sont observés chez l'enfant âgé de moins de 2 ans, ceci est dû à l'absence d'anticorps spécifiques chez le jeune enfant et à sa faible réponse immunitaire en anticorps.

Les infections invasives atteignent aussi l'adulte dont la tranche d'âge est comprise entre 18 et 40 ans (33%).

La tranche d'âge allant de 41 à 78 ans est atteinte dans 21% des cas, ceci est dû à notre recrutement limité surtout pour les pneumopathies.

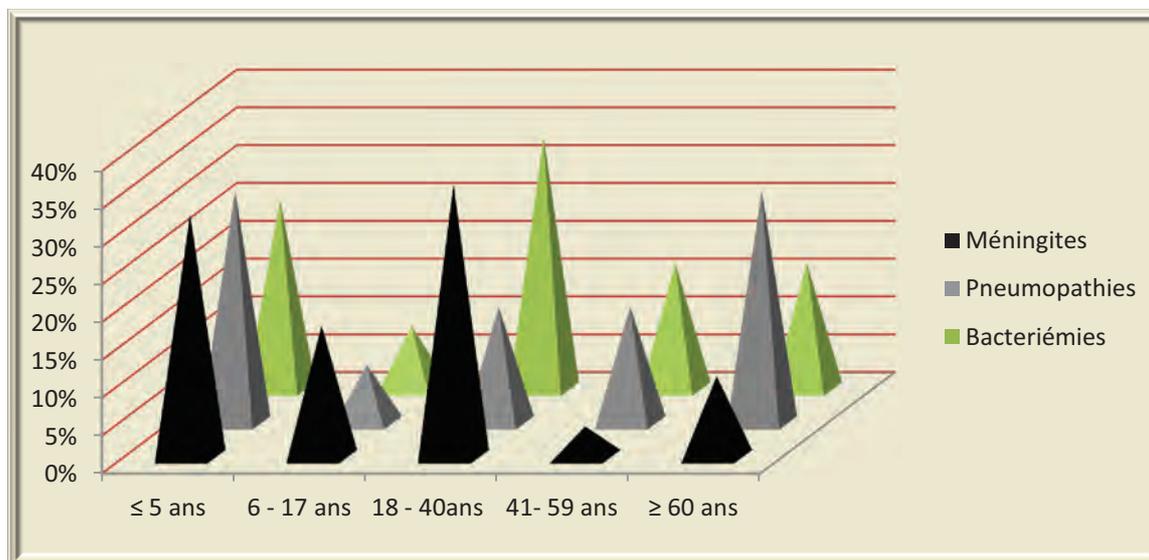
L'atteinte pneumococcique du nourrisson existe dans notre étude mais rare, 2 cas d'infections invasives sont observées, ils sont répartis en une bactériémie et une méningite chez deux nourrissons âgés de 1 mois chacun.

Parmi les 100 cas d'infections invasives à pneumocoques observés dans notre étude, nous remarquons d'après l'analyse factorielle des correspondances qu'il existe une association entre l'âge et le type de l'infection (annexe 9, figure 23) : l'association des méningites avec les deux classes d'âge  $\leq 5$  ans et 6 - 17 ans, association des pneumopathies avec les plus de 60ans,, et enfin, association des bactériémies avec la classe d'âge 41 - 59 ans.

## RESULTATS

**Tableau 26.** Distribution des 100 souches de *S. pneumoniae* en fonction de la nature du prélèvement et de l'âge

Nature du prélèvement	Tranche d'âge					Total
	≤ 5 ans	6 -17 ans	18 - 40 ans	41-59 ans	≥ 60ans	
LCR	24	10	19	2	6	61
LCR +Hémoculture	0	3	8	1	2	14
Hémoculture	7	2	6	2	5	22
Liquide pleural	0	0	0	2	1	3
Total	31	15	33	7	14	100



**Figure 22.** Distribution des 100 souches de *S. pneumoniae* en fonction de la pathologie et de l'âge

### ***2.2 Répartition saisonnière des infections invasives à pneumocoque par année***

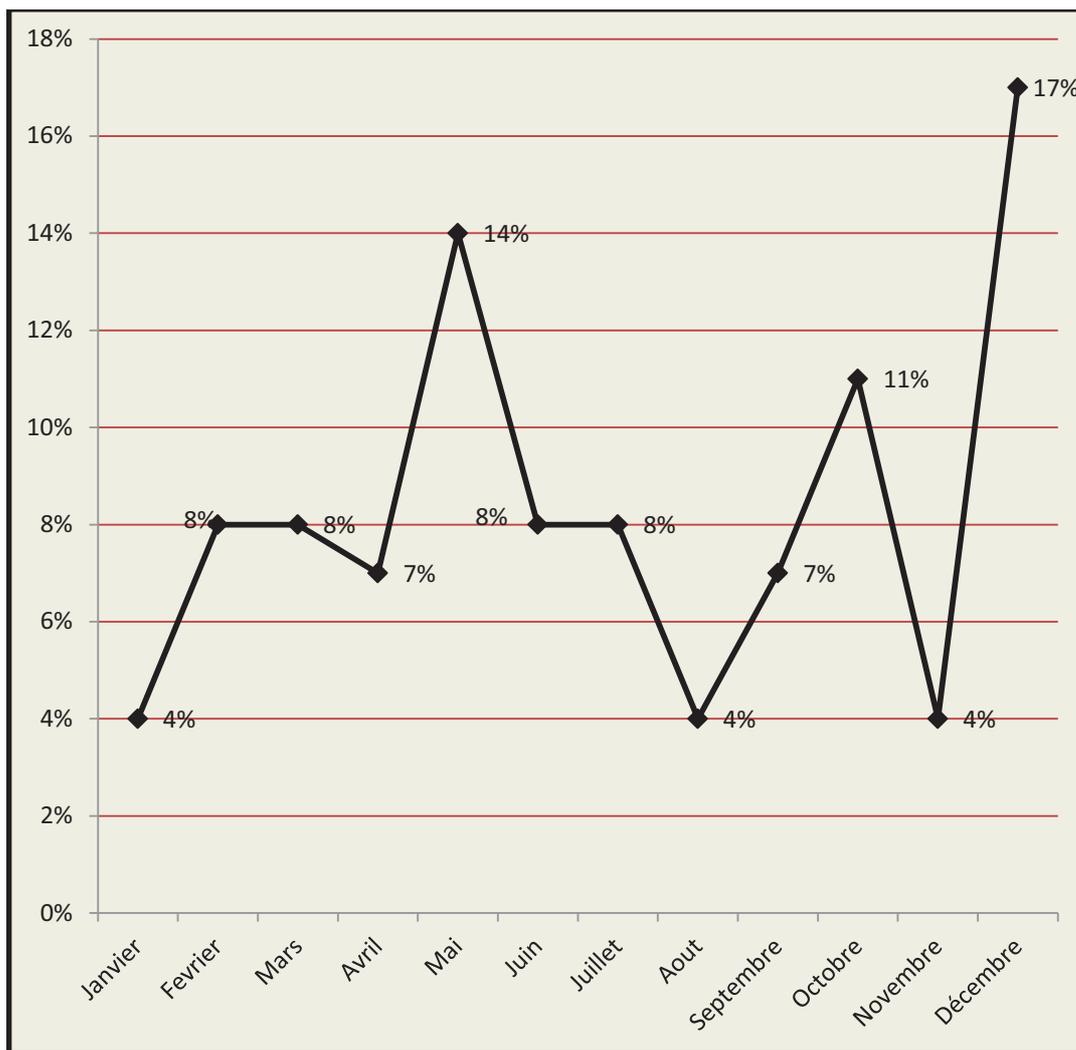
Durant les 7 années d'étude, sous nos climats, il apparait globalement que les infections invasives à pneumocoques surviennent tout au long de l'année avec un pic en Décembre avec 17 cas sur 100 et un minimum est observé en Janvier, Août et Novembre avec 4 cas sur 100 pour chaque mois. Nous notons aussi qu'au mois de Mai le taux des infections invasives à pneumocoques atteint 14%. La répartition saisonnière des infections montre que 29% des cas sont observés en hiver (Décembre, Janvier et Février) et 29% au printemps (Mars, Avril et Mai). Le reste de l'année, le nombre de souches fluctue entre 7 et 8 souches en Février, Mars, Avril, Juin, Juillet et Septembre (figure 24).

### ***2.3 Fréquence des infections invasives à pneumocoque en fonction du sexe***

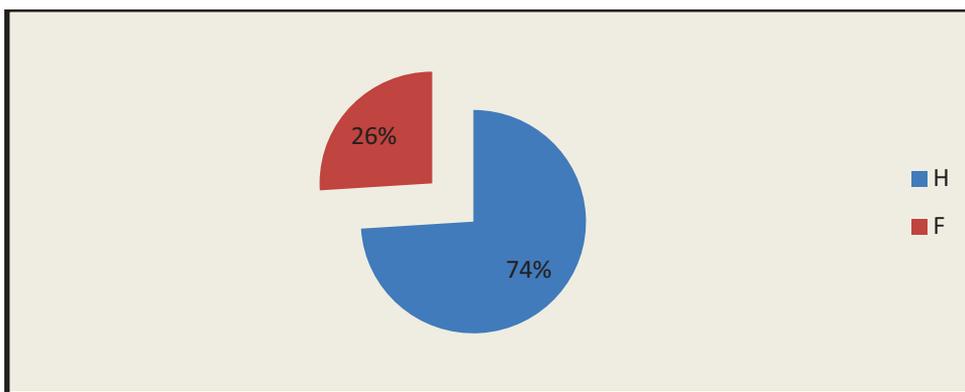
Nous constatons d'après la figure 25 une prédominance globale masculine. Parmi 100 patients ayant une infection invasive à pneumocoque, le sex ratio global est de 2,8 (74 hommes et 26 femmes).

Le sex ratio chez l'enfant est de 3,1 (35 garçons et 11 filles) alors qu'il est de 2,6 (39 hommes et 15 femmes) chez l'adulte. La prédominance masculine est observée chez l'enfant et l'adulte (figure 26), la différence entre l'adulte et l'enfant en fonction du sexe n'est pas significative (valeur du  $\chi^2 = 0,17 < 3,84$  donc  $p > 0,05$ , valeur de P par le test exact de Fisher =  $0,8194 > 0,05$ ).

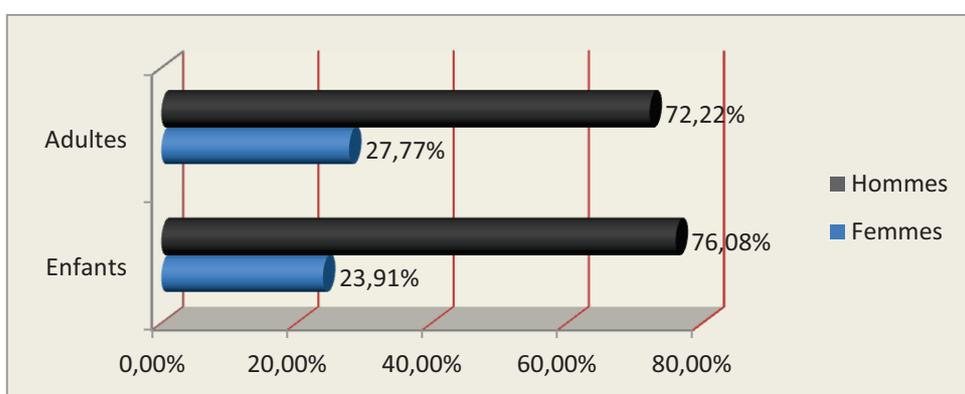
Le sex ratio par pathologie est de 2,75 (55 hommes et 20 femmes) dans les méningites, de 3 (9 hommes et 3 femmes) dans les bactériémies et de 3,3 (10 hommes et 3 femmes) dans les pneumopathies. La prédominance masculine est observée dans les méningites, les pneumopathies et les bactériémies (figure 27). La différence entre les trois types d'infections en fonction du sexe n'est pas significative (valeur du  $\chi^2 = 0,12 < 3,84$  donc  $P > 0,05$ ).



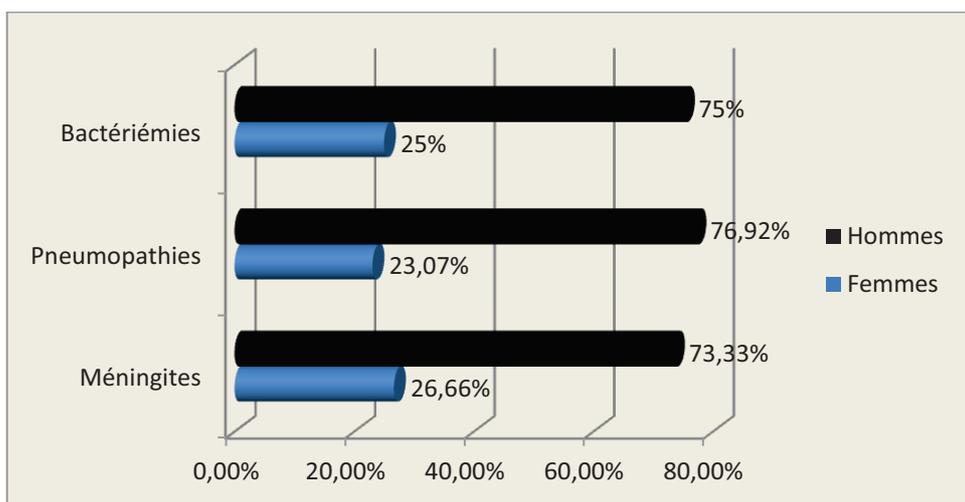
**Figure 24.** Répartition saisonnière des infections invasives à pneumocoques



**Figure 25.** Répartition des infections invasives à pneumocoque en fonction du sexe



**Figure 26.** Répartition des infections invasives à pneumocoque en fonction du sexe et de l'âge



**Figure 27.** Répartition des infections invasives à pneumocoque en fonction du sexe et de la nature de l'infection

### **2.4 Fréquence du pneumocoque dans les méningites purulentes**

Nous souhaitons identifier la place du pneumocoque dans cette pathologie grave.

Durant notre période d'étude, nous avons consulté les résultats bactériologiques de tous les LCR provenant de malades hospitalisés.

Le service de Microbiologie a reçu un total de 271 LCR à culture positive.

La figure 28 nous indique que *S.pneumoniae* est le principal responsable de méningites purulentes puisqu'il est incriminé dans 27,67 % (75 cas/271).

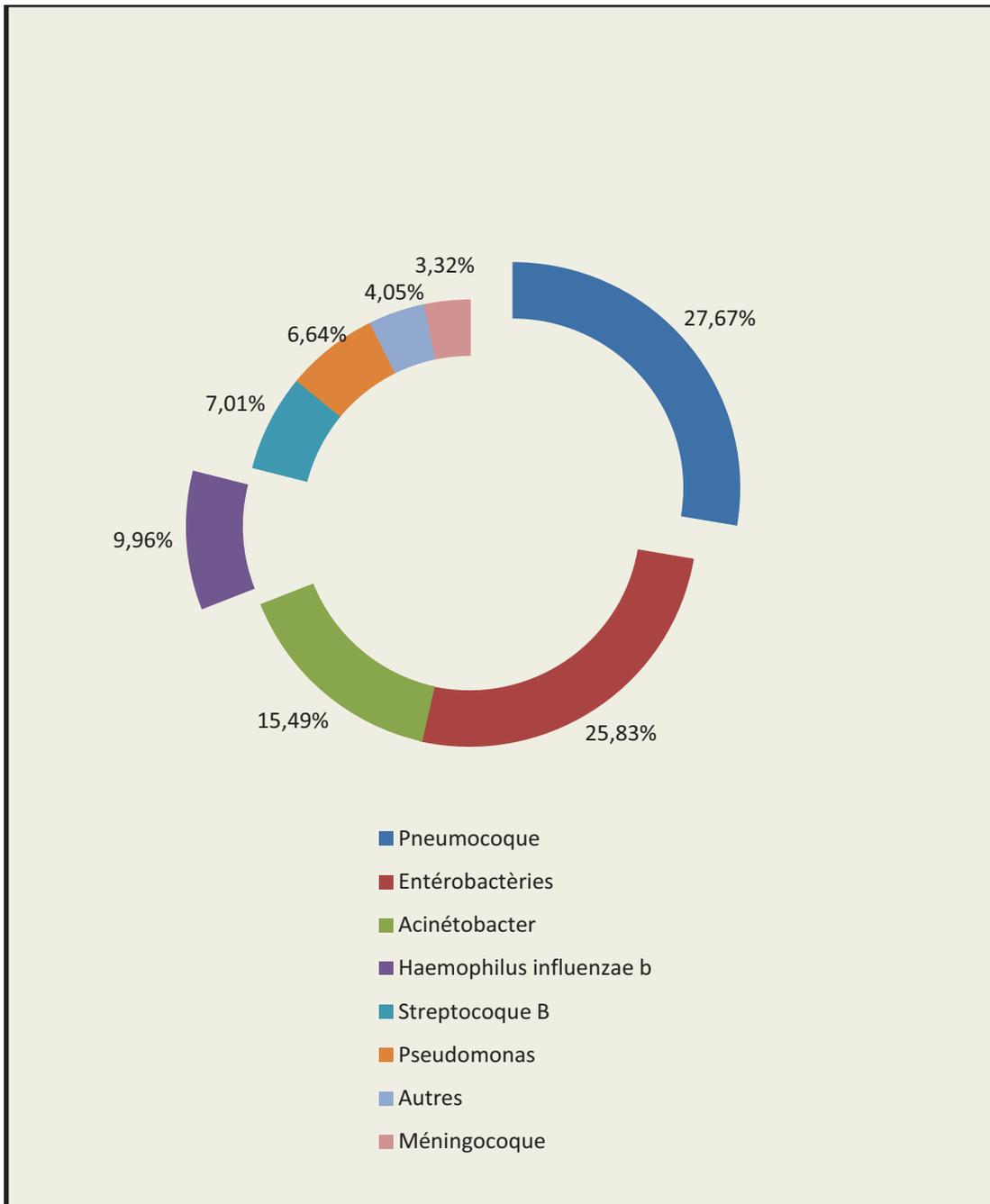
Nous observons la place importante occupée par les Entérobactéries (2<sup>ème</sup> rang, 25,83%, 70/271) et *Acinetobacter* incriminé dans 15,49 % des cas (42/271).

Les méningites à *Haemophilus influenzae* b sont rares (9,96 %, 27/271) surtout après que le calendrier national de vaccination ait été élargi avec l'introduction du nouveau vaccin contre *Haemophilus influenzae* b en 2008.

Le méningocoque, classé au dernier rang, n'est responsable que de 3,32 % (9/271) des méningites purulentes.

La fréquence des méningites à Streptocoques du groupe B est de 7,01 % (19/271) observées souvent chez le nourrisson.

D'autres bactéries telles que *Pseudomonas* et autres (Staphylocoque, Enterocoque et *Listeria*), isolées de façon occasionnelle sont responsables de méningites dans notre étude.



**Figure 28.** Place du pneumocoque dans les méningites

### 3. Résistance de *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques

Les 100 souches de pneumocoques isolées, sont testées vis-à-vis des antibiotiques.

#### 3.1 Résistance aux bêta-lactamines

La détection de la sensibilité diminuée à la pénicilline (screening) est effectuée grâce à un disque d'oxacilline chargé à 5 µg. Toutes les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline présentent un diamètre autour du disque d'oxacilline < 26 mm (annexe 10, figure 29).

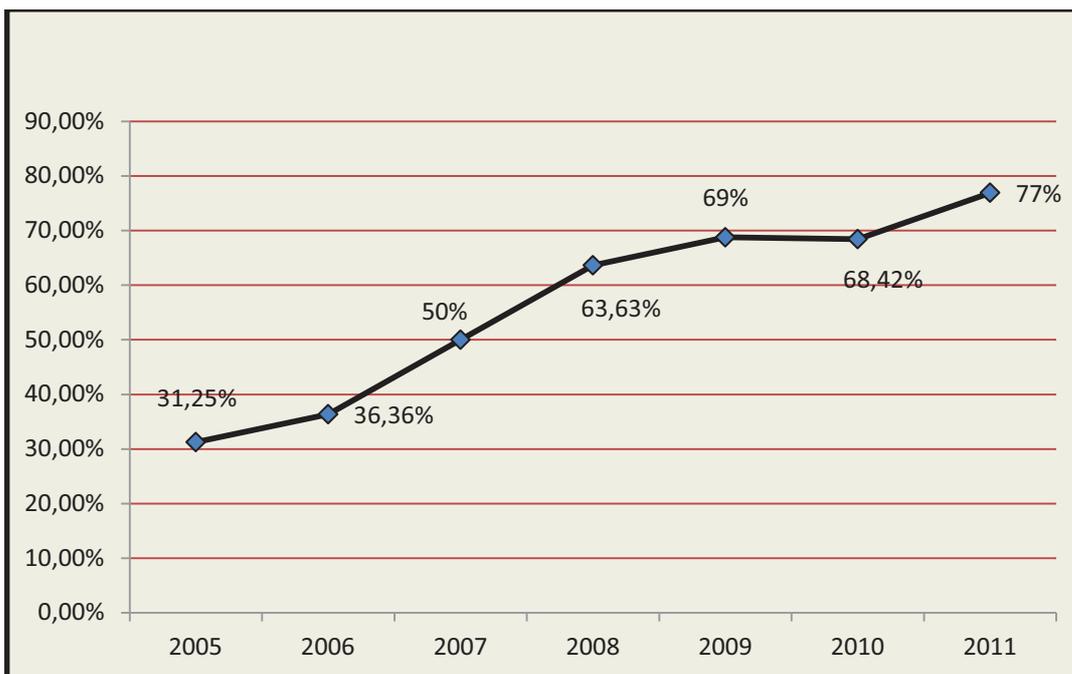
##### 3.1.1 Résistance à la pénicilline

Nous notons que le taux de PSDP évolue dans le temps, il est de 31,25% en 2005-2006 (parmi 16 souches isolées, 5 sont de sensibilité diminuée à la pénicilline) et atteint 77% en 2011-2012 (10/13) (figure 30).

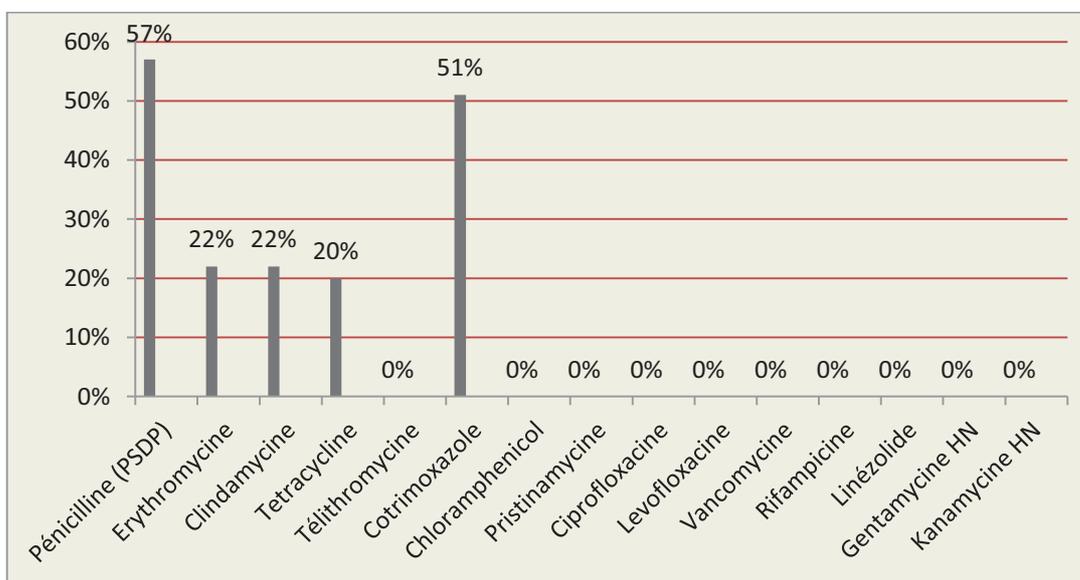
La figure 31 nous montre la fréquence élevée de 57% des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP), parmi ces souches, 46 sont de résistance intermédiaire et 11 sont résistantes (figure 32). Les CMI à la pénicilline des 100 souches de pneumocoques s'échelonnent de 0,016 à 4 µg/ml (annexe 10, figure 34). Parmi les souches sensibles, 28% ont une CMI de 0,016 µg/ml et parmi les souches de sensibilité diminuée, 20% des souches ont une CMI de 0,5 µg/ml (figure 33).

Si on se réfère aux normes du CLSI 2007 (CMI < 0,06 µg/ml sensible, CMI entre 0,1 et 1 µg/ml : intermédiaire et CMI > 2 µg/ml : résistant), parmi les 11 souches résistantes les valeurs des CMI fluctuent entre 2 et 4 µg/ml (9 souches avec des CMI égales à 2 µg/ml et 2 souches avec des CMI égales à 4 µg/ml (figures 32 et 33).

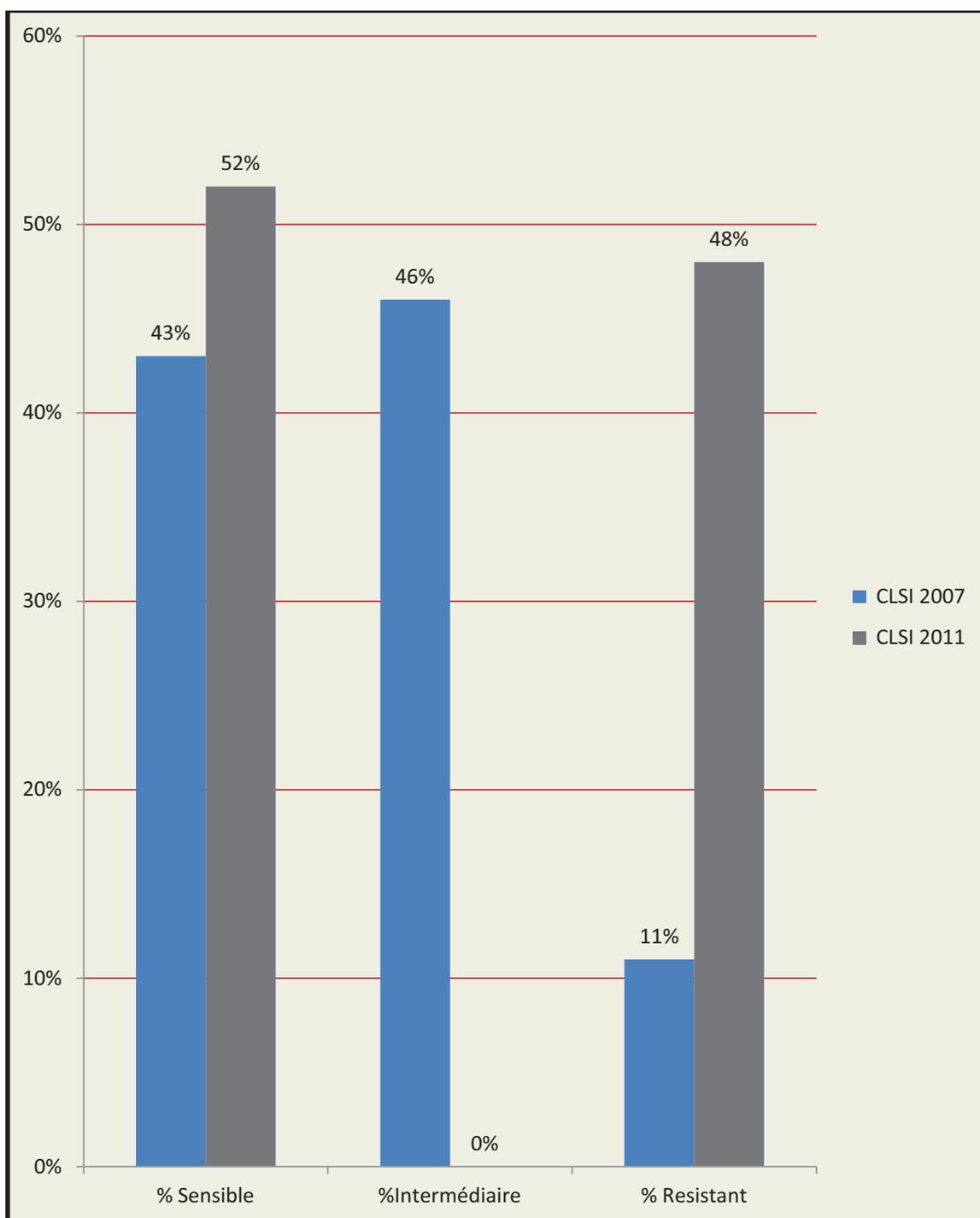
Alors que selon les normes de CLSI 2011 (CMI < 0,06 µg/ml sensible et CMI > 0,1 µg/ml résistant dans les méningites), la fréquence des souches résistantes à la pénicilline s'élève à 48% (rappelons que dans notre étude le recrutement des souches responsables de méningites est élevé) et aucune souche ne présente de résistance intermédiaire à la pénicilline, les autres souches (9 souches responsables de pneumopathies et de bactériémies) deviennent sensibles à la pénicilline alors qu'elles exprimaient une résistance intermédiaire (figure 32).



**Figure 30.** Evolution du nombre des PSDP en fonction de l'année



**Figure 31.** Répartition de la résistance de 100 souches de *S.pneumoniae* à 15 antibiotiques



**Figure 32.** Fréquence de la résistance à la pénicilline selon les normes du CLSI

- ***Fréquence des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline en fonction de l'âge***

En fonction de l'âge, globalement la fréquence des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline est plus élevée chez l'enfant et atteint 80,43% (37/46) : 65,21% (30/46) des souches présentent une résistance intermédiaire et 15,21% (7/46) des souches sont résistantes.

Sur 54 souches isolées chez l'adulte, 37,03% sont de sensibilité diminuée à la pénicilline (20/54), 29,62% (16/54) sont intermédiaires et 7,4% (4/54) sont résistantes (tableau 27).

Si on se réfère aux normes du CLSI 2011, le taux global de résistance à la pénicilline est de 48% dont 69,56% (32/46) chez l'enfant et 29,62% (16/54) chez l'adulte.

La différence de la résistance à la pénicilline entre les deux groupes d'âge est significative, plus élevée chez l'enfant (CLSI 2007, valeur du  $\chi^2 = 19,07 > 3,84$  donc  $P < 0,001$ , valeur de P par le test exact de Fisher =  $0,003 < 0,05$ ; CLSI 2011, valeur du  $\chi^2 = 15,92 > 3,84$  donc  $P < 0,001$ , valeur de P par le test exact de Fisher =  $0,0001 < 0,05$ )

### ***3.1.2 Résistance aux autres bêta-lactamines***

Pour l'amoxicilline et le céfotaxime, les souches de sensibilité diminuée (CMI  $> 0,5$   $\mu\text{g/ml}$ ) représentent respectivement 9% et 8%. Les souches résistantes (CMI  $> 2$   $\mu\text{g/ml}$ ) sont peu fréquentes : 2 souches pour l'amoxicilline (2%) et aucune souche (0%) pour le céfotaxime [figure 33, annexe 10 (figures 35, 36, 37, 38)].

En fonction de l'âge, la fréquence de sensibilité diminuée à l'amoxicilline est de 7,4% chez l'adulte (4/54 résistance intermédiaire) et de 10,86% chez l'enfant (5/46) avec 4,34% de résistance (2/46). Pour le céfotaxime, le taux de sensibilité diminuée est de 5,55% pour l'adulte (3/54) et de 10,86% chez l'enfant (5/46) (tableau 27). La différence de la résistance à l'amoxicilline et au céfotaxime entre adultes et enfants n'est pas significative (valeurs de P par le test exact de Fisher  $P = 0,7287 > 0,05$ ,  $P = 0,4647 > 0,05$ ).

Dans notre étude, aucune souche ne présente une sensibilité diminuée à l'imipénème (annexe 10, figure 39).

## RESULTATS

**Tableau 27.** Profil de résistance et CMI de 100 souches de *S.pneumoniae* à 5 antibiotiques

Antibiotique	Age	Valeurs CMI	CMI( $\mu\text{g/ml}$ )			P	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			P	
			CLSI 2007				CLSI 2011				
			%S	%I	%R				%S	%I	%R
Pénicilline	Adulte	0,016-2	62,96	29,62	7,4	<0,001 <sup>e</sup>	70,37	/	29,62	<0,001 <sup>e</sup>	
	Enfant	0,064-4	19,56	65,21	15,21		30,43	/	69,56		
Amoxicilline	Adulte	0,016-1,5	92,59	7,4	0	0,7287 <sup>f</sup>					
	Enfant	0,064-4	89,13	6,52	4,34						
Cefotaxime	Adulte	0,016-1,5	94,44	5,55	0	0,4647 <sup>f</sup>					
	Enfant	0,064-1,5	89,13	10,86	0						
Imipenème	Adulte	0,016-0,125	100	0	0						
	Enfant	0,016-0,125	100	0	0						
Erythromycine	Adulte	0,016- >256	79,62	0	20,37	0,8093 <sup>f</sup>					
	Enfant	0,064- >256	76,08	0	23,91						

e: test  $\chi^2$ , f: test exact de Fisher (différence de la résistance aux antibiotiques entre les deux groupes d'âge)

CMI: concentration minimale inhibitrice

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

Nous présentons dans le tableau 28 la description des souches résistantes aux bêta-lactamines. Nous remarquons que toutes les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline sont les mêmes présentant une sensibilité diminuée à l'amoxicilline et au céfotaxime. Aucune souche ne présente de valeurs de CMI à l'amoxicilline et au céfotaxime plus élevées que celles de la pénicilline.

Les souches pour lesquelles la CMI d'amoxicilline dépasse la CMI de pénicilline ne sont pas observées dans notre étude mais de rares souches (10%) isolées de méningites moins sensibles aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération qu'aux pénicillines sont décrites dans le tableau 29.

- ***Fréquence de la résistance aux bêta-lactamines en fonction de la pathologie et de l'âge***

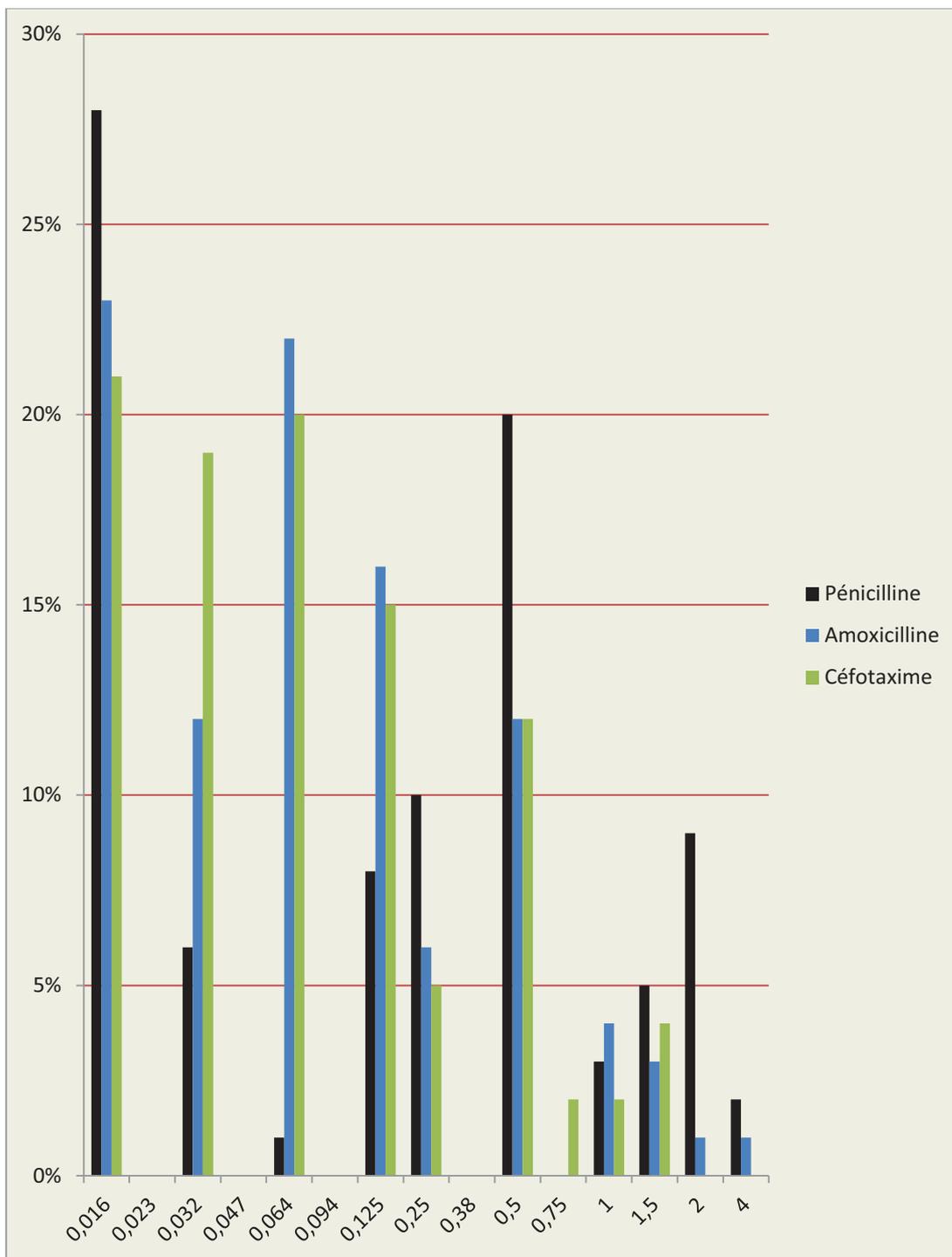
Dans les méningites dont le taux global est de 75% (75/100). Le taux de sensibilité diminuée à la pénicilline est de 64% (48/75), il est de 86,48% (32/37) chez l'enfant et de 42,10% (16/38) chez l'adulte (tableau 30).

Dans les pneumopathies, parmi 13 cas, le taux global de sensibilité diminuée à la pénicilline est de 46,15% (6/13), 60% (3/5) chez l'enfant et 37,5% (3/8) chez l'adulte.

Parmi 12 cas de bactériémies, le taux de sensibilité diminuée à la pénicilline est de 25% (3/12), 50% (2/4) chez l'enfant et 12,5% (1/8) chez l'adulte.

La différence de résistance à la pénicilline en fonction du type de l'infection est significative (valeur du  $\chi^2 = 7,10 > 5,99$  donc  $P < 0,05$ ).

Concernant les souches de sensibilité diminuée aux autres bêta-lactamines, toutes les souches de sensibilité diminuée à l'amoxicilline (9 souches) et toutes les souches de sensibilité diminuée au céfotaxime (8 souches) sont responsables de méningites. Les taux de sensibilité diminuée à l'amoxicilline sont de 13,51% (5/37) chez l'enfant et de 10,52% (4/38) chez l'adulte et les taux de sensibilité diminuée au céfotaxime sont de 13,51% (5/37) chez l'enfant et de 7,89% (3/38) chez l'adulte.



**Figure 33.** Distribution des souches de pneumocoques en fonction de leur CMI de pénicilline, amoxicilline et céfotaxime (n=100).

**Tableau 28.** Description des souches résistantes aux bêta-lactamines (n= 11)

N°	Age	Site d'isolement	CMI (µg/ml)		
			Pénicilline	Amoxicilline	Céfotaxime
1	10 mois	LCR	2	2	0,75
2	2 ans	LCR	4	4	1,5
3	6 mois	LCR	4	1	1
4	6 mois	LCR	2	1,5	0,5
5	18 mois	LCR	2	0,5	0,5
6	33 ans	LCR	2	0,25	1
7	4 ans	LCR	2	1,5	1,5
8	6 ans	LCR	2	1	1,5
9	37 ans	LCR	2	1	0,75
10	29 ans	LCR	2	1	1,5
11	23 ans	LCR	2	1,5	0,5

## RESULTATS

**Tableau 29.** Description des souches moins sensibles au céfotaxime (CMI > 0,016 µg/ml) qu'aux pénicillines isolées de méningites (n=10)

N°	Age	Site d'isolement	CMI (µg/ml)		
			Pénicilline	Amoxicilline	Céfotaxime
1	07 mois	LCR	0,016	0,032	0,25
2	09 mois	LCR	0,016	0,016	0,125
3	2 ans	LCR	0,032	0,032	0,125
4	2 ans	LCR	0,032	0,064	0,25
5	23 ans	LCR	0,016	0,032	0,125
6	20 ans	LCR	0,032	0,032	0,125
7	25 ans	LCR	0,064	0,032	0,25
8	38 ans	LCR	0,016	0,032	0,125
9	62 ans	LCR	0,016	0,032	0,125
10	30 ans	LCR	0,016	0,032	0,125

**Tableau 30.** Résistance de *S. pneumoniae* aux bêta-lactamines en fonction de la pathologie et de l'âge

% I+R	Méningites (n=75)		Pneumopathies (n=13)		Bactériémies (n=12)		P <sup>e</sup>
	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	
	(n= 37)	(n=38)	(n= 5)	(n= 8)	(n= 4)	(n= 8)	
Pénicilline	86,48% (32/37)	42,1% (16/38)	60% (3/5)	37,5% (3/8)	50% (2/4)	12,5% (1/8)	< 0,05
Amoxicilline	13,51% (5/37)	10,52% (4/38)	0	0	0	0	
Céfotaxime	13,51% (5/37)	7,89% (3/38)	0	0	0	0	
Imipenème	0	0	0	0	0	0	

I : intermédiaires, R : résistants, e: test  $\chi^2$  : différence de la résistance à la pénicilline en fonction du type de l'infection

### ***3.2 Résistance aux macrolides et apparentés***

Le taux de résistance des pneumocoques aux macrolides s'établit à 22%. Il s'agit pour toutes les souches de résistance de type MLS<sub>B</sub> (qui touche l'ensemble des Macrolides, Lincosamides et Streptogramine B) mais la résistance par efflux (phénotype M, qui n'affecte que les macrolides en C<sub>14</sub> et C<sub>15</sub>) ne concerne aucune des souches résistantes à l'érythromycine (annexe 10, figure 40 et 41). Parmi les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline (57 souches), 26,31% (15/57) seulement sont résistantes aux macrolides. Généralement, la résistance aux macrolides est la résistance le plus souvent associée à la résistance aux bêta-lactamines

Aucune souche résistante à la pristinamycine n'est isolée dans notre étude. La sensibilité à la télichromycine est étudiée et aucune souche ne présente une sensibilité diminuée à cet antibiotique (figure 31).

### ***3.3 Résistance aux autres antibiotiques***

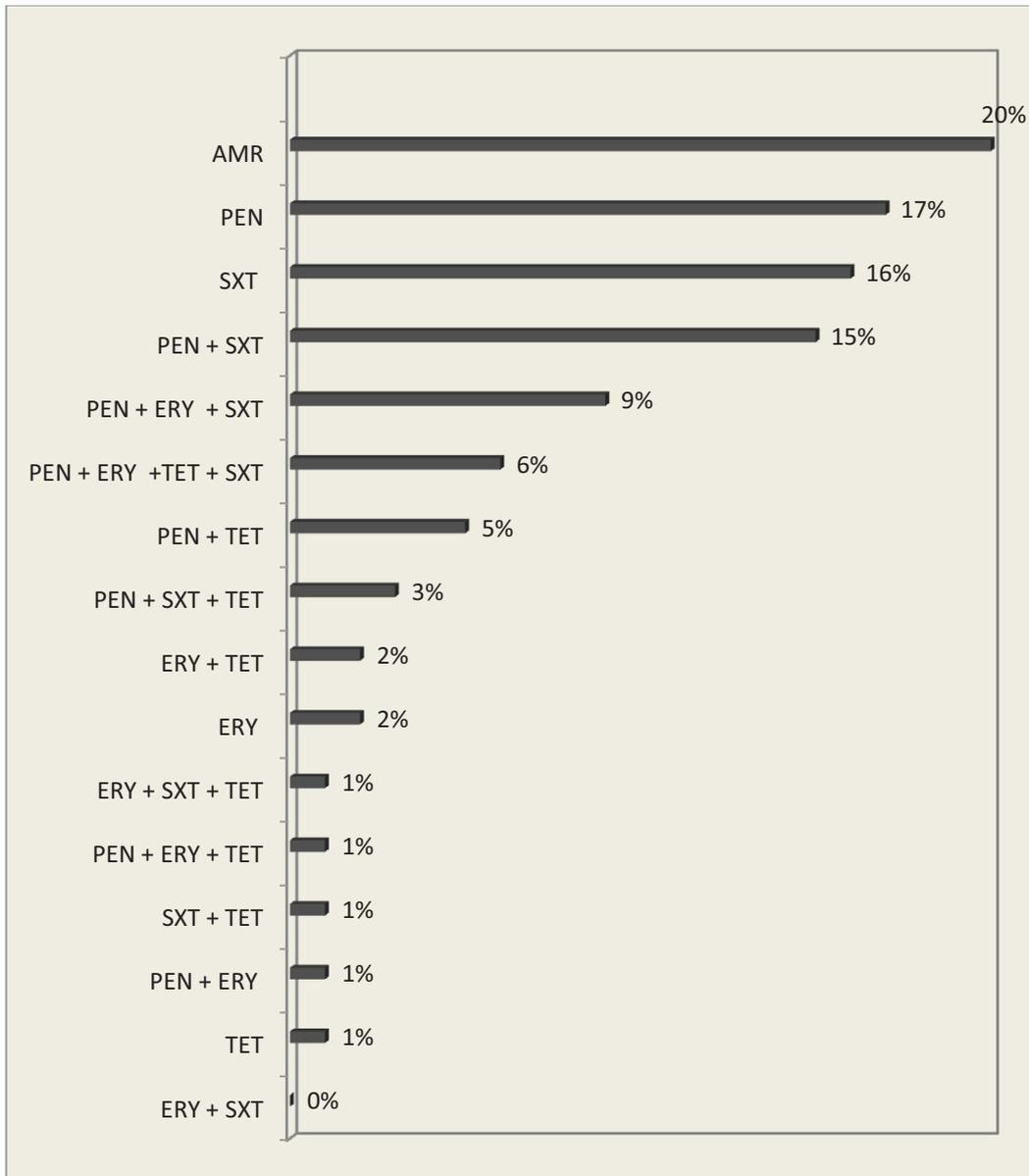
D'après la figure 31, la fréquence de la résistance aux autres antibiotiques est de 20% pour la tétracycline et de 51% pour le cotrimoxazole.

Dans notre étude, nous remarquons que la fréquence des souches résistantes au chloramphénicol, à la vancomycine, à la rifampicine, à la lévofloxacine, à la ciprofloxacine et au linézolide est nulle.

Par ailleurs, aucune souche, présentant un haut niveau de résistance aux aminosides n'est isolée dans notre série.

### ***3.4 Résistances associées et multirésistance***

La fréquence des souches cumulant la résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques est indiquée sur la figure 42, sur les 100 souches étudiées 20% n'ont aucun marqueur de résistance (AMR).



PEN: pénicilline, ERY: érythromycine, TET: tétracycline, SXT: cotrimoxazole, AMR : aucun marqueur de résistance

**Figure 42.-** Résistance isolées et résistances associées

## RESULTATS

---

Les souches ayant un seul marqueur de résistance représentent 36% de l'ensemble (36/100) et 45% des souches non sensibles (36/80).

- 17 souches présentent une sensibilité diminuée à la pénicilline isolée.
- 16 souches présentent une résistance isolée au cotrimoxazole.
- 2 souches présentent une résistance isolée à l'érythromycine.
- 1 souche présente une résistance isolée à la tétracycline.

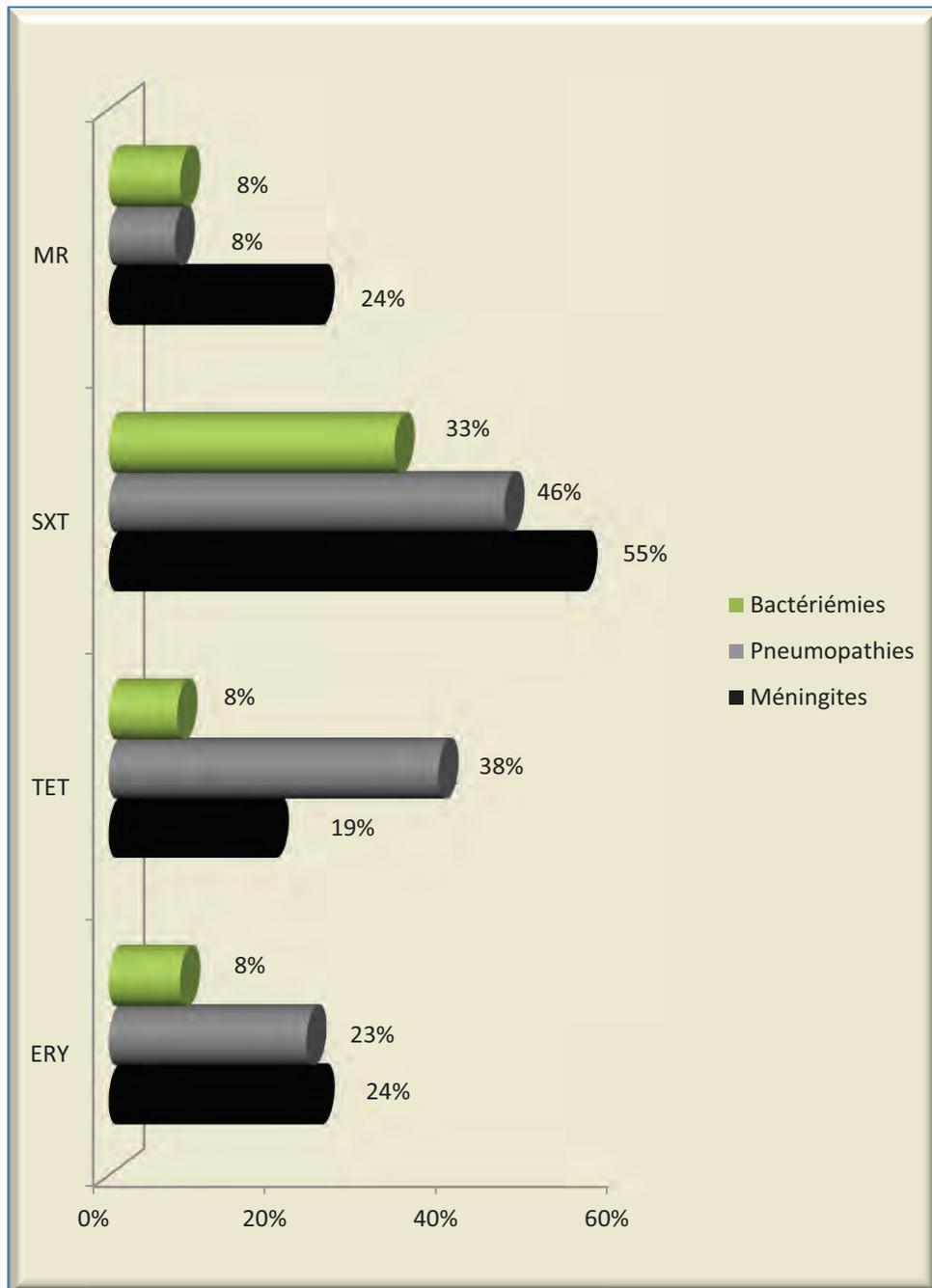
Par ailleurs, la résistance est associée à 2 marqueurs de résistance dans 24% des souches.

- Pénicilline + cotrimoxazole : 15 fois.
- Pénicilline + tétracycline : 5 fois.
- Erythromycine + tétracycline : 2 fois.
- Cotrimoxazole + tétracycline : 1 fois.
- Pénicilline + Erythromycine : 1 fois.

La résistance, associée isolément le plus souvent à une diminution de sensibilité à la pénicilline, est la résistance au cotrimoxazole (phénotype PEN-SXT: 15%).

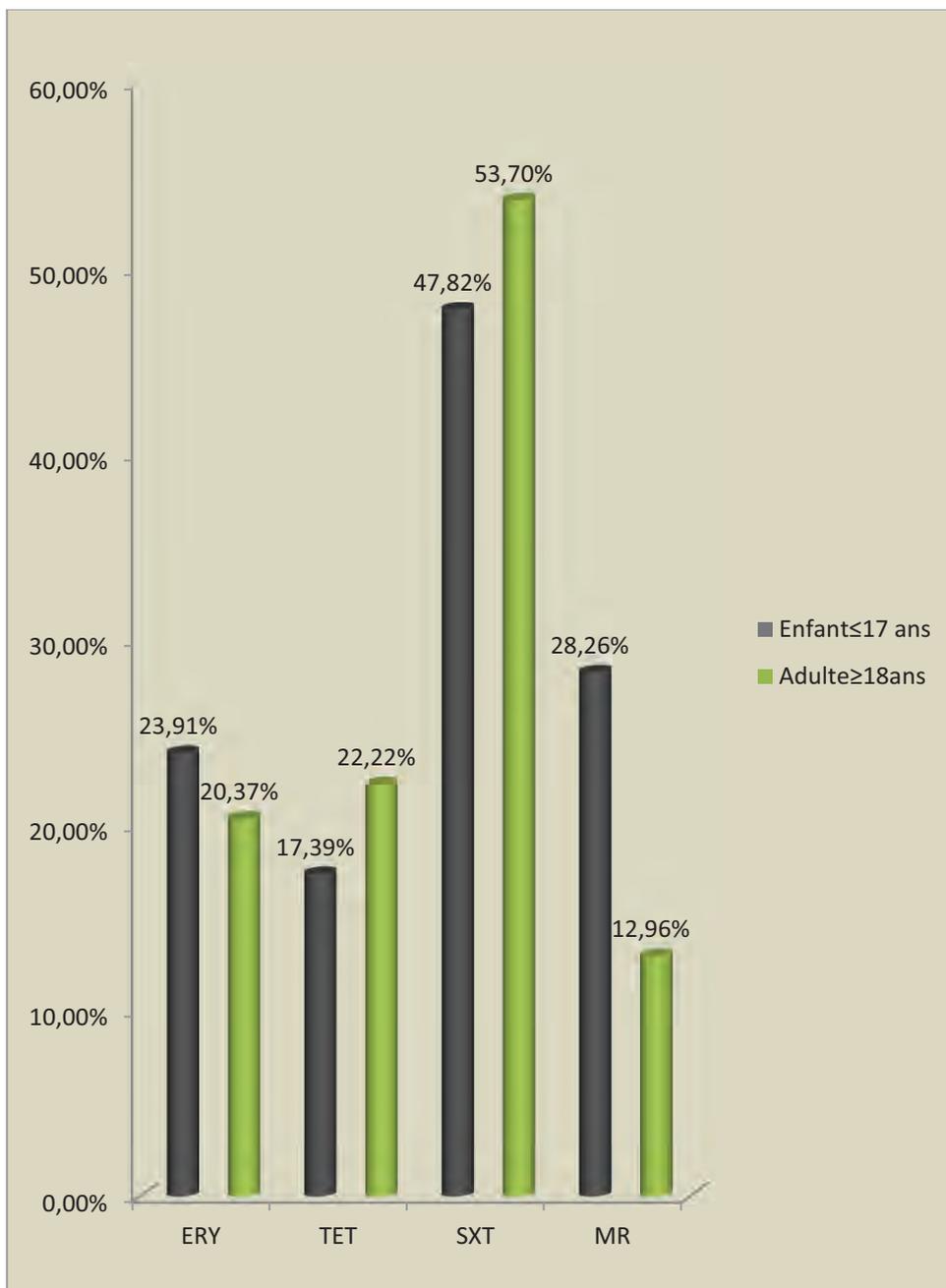
La multirésistance, définie chez le pneumocoque par la résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques concerne 20% de l'ensemble des souches étudiées (20/100) et 25% (20/80) des souches non sauvages.

Presque la quasi-totalité des souches multirésistantes sont de sensibilité diminuée à la pénicilline [95%, (19/20)] et 85% (17/20) sont résistantes aux macrolides. Alors que parmi les PSDP, 33,33% (19/57) des souches présentent une multirésistance.



MR : multirésistance, ERY: érythromycine, TET: tétracycline, SXT: cotrimoxazole

**Figure 43.** Résistance aux autres antibiotiques et nature de l'infection



MR : multirésistance, ERY: érythromycine, TET: tétracycline, SXT: cotrimoxazole

**Figure 44.** Résistance aux autres antibiotiques en fonction de l'âge

- **Résistance aux autres antibiotiques et nature de l'infection**

Dans l'ensemble des prélèvements, 80% des souches présentent un ou plusieurs caractères de résistance.

- Dans les méningites le taux de résistance est de 85,33%, parmi 75 de méningites, 64 souches présentent un ou plusieurs caractères de résistances.
- Dans les pneumopathies, le taux de résistance étant plus élevé, il atteint 92,3% parmi 13 cas de pneumopathies, 12 souches présentent un ou plusieurs caractères de résistance.
- Parmi 12 cas de bactériémies, 4 souches sont résistantes et le taux de résistance dans cette pathologie est de 33,33%.
- Dans les méningites, les taux de résistance à l'érythromycine, à la tétracycline et au cotrimoxazole sont respectivement de 24% (18/75), 18,66% (14/75) et 54,66% (41/75). Ces taux sont de 23,07% (3/13), 38,46% (5/13) et de 46,15% (6/13) dans les pneumopathies et de 8,33% (1/12), 8,33% (1/12) et de 33,33% (4/12) dans les bactériémies. Les pourcentages de résistance aux trois antibiotiques ne diffèrent pas significativement en fonction de la nature de l'infection (valeurs du  $\chi^2 = 0,75 ; 2,15 ; 1,41$ , ces valeurs sont  $< 5,99$  donc  $P > 0,05$  pour les trois antibiotiques).
- Notons que le taux de multirésistance est de 24% dans les méningites (18/75), de 7,69% dans les pneumopathies (1/13) et de 8,33% dans les bactériémies (1/12) (figure 43). Le pourcentage de multirésistance ne diffère pas significativement en fonction de la nature de l'infection (valeur du  $\chi^2 = 1,49 < 5,99$  donc  $P > 0,05$ )

- **Résistance aux autres antibiotiques en fonction de l'âge**

Les taux de résistance chez l'enfant et l'adulte sont respectivement de 23,91% (11/46) et de 20,37% (11/54) pour l'érythromycine, de 17,39% (8/46) et de 22,22% (12/54) pour la tétracycline, de 47,82% (22/46) et 53,7% (29/54) pour le cotrimoxazole. La différence de la résistance aux trois antibiotiques n'est pas significative entre l'enfant et l'adulte (valeurs du  $\chi^2 = 0,15, 0,35, 0,46$ , les 3 valeurs sont  $< 3,84$  donc  $p > 0,05$  pour chaque antibiotique, valeurs de P par le test exact de Fisher = 0,8093, 0,6212, 0,6884, les trois valeurs sont  $> 0,05$ ).

Notons que le taux de multirésistance est de 28,26%(13/46) chez l'enfant et de 12,96% (7/54) chez l'adulte, la différence de la multirésistance entre les deux groupes d'âge n'est pas significative (valeur du  $\chi^2 = 3,61 < 3,84$  donc  $p > 0,05$ , valeur de P par le test exact de Fisher =  $0,0789 > 0,05$ ) (figure 44).

### **4. Pneumocoques et serotypes**

#### ***4.1 Distribution globale des sérotypes***

83 souches de pneumocoques, parmi les 100 isolées dans notre étude, sont sérotypées (44 souches chez l'enfant dont 30 chez l'enfant dont l'âge est  $\leq$  à 5 ans et 39 souches chez l'adulte), responsables de 68 cas de méningites, 9 cas de pneumopathies et 6 cas de bactériémies. Parmi les 83 souches sérotypées, 51 souches sont des PSDP, et 20 souches sont résistantes aux macrolides).

La distribution des sérotypes est présentée dans la figure 45.

Les sérotypes les plus fréquemment rencontrés sont par ordre de croissance les 14, 19F, 23F et 6B présentant ensemble un taux de 50,6% (42/83) suivis des sérotypes 1, 19A, 35B, 11, 10A, 7F, 18C et 3 dans 3,61% des cas chacun (3/83). Les sérotypes 9A et 4 sont retrouvés 2 fois chacun dans notre étude (2,4%). Les sérotypes 6A, 9N et 19C sont plus rares, retrouvés une seule fois (1,2%)

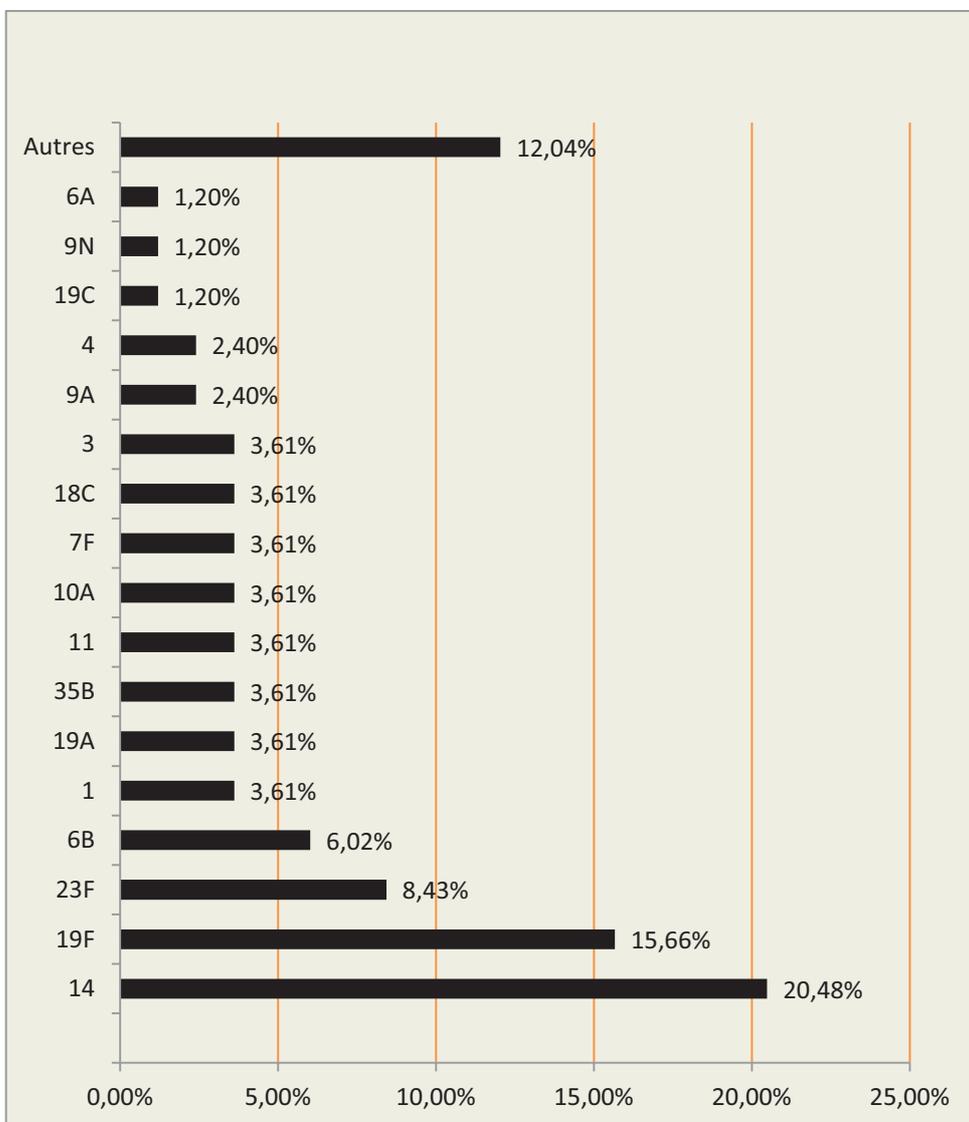
D'autres sérotypes sont rencontrés dans notre étude au nombre de 10 tels que les 21 et 48 et une souche n'ayant agglutiné avec aucun antisérum et catégorisée non typable. Ils sont retrouvés 1 seule fois chacun (1,2%).

#### ***4.2 Fréquence des sérotypes de pneumocoque et leur répartition en fonction de l'infection***

Les 83 souches sérotypées dans notre étude sont responsables de 68 méningites, 9 pneumopathies et 6 bactériémies.

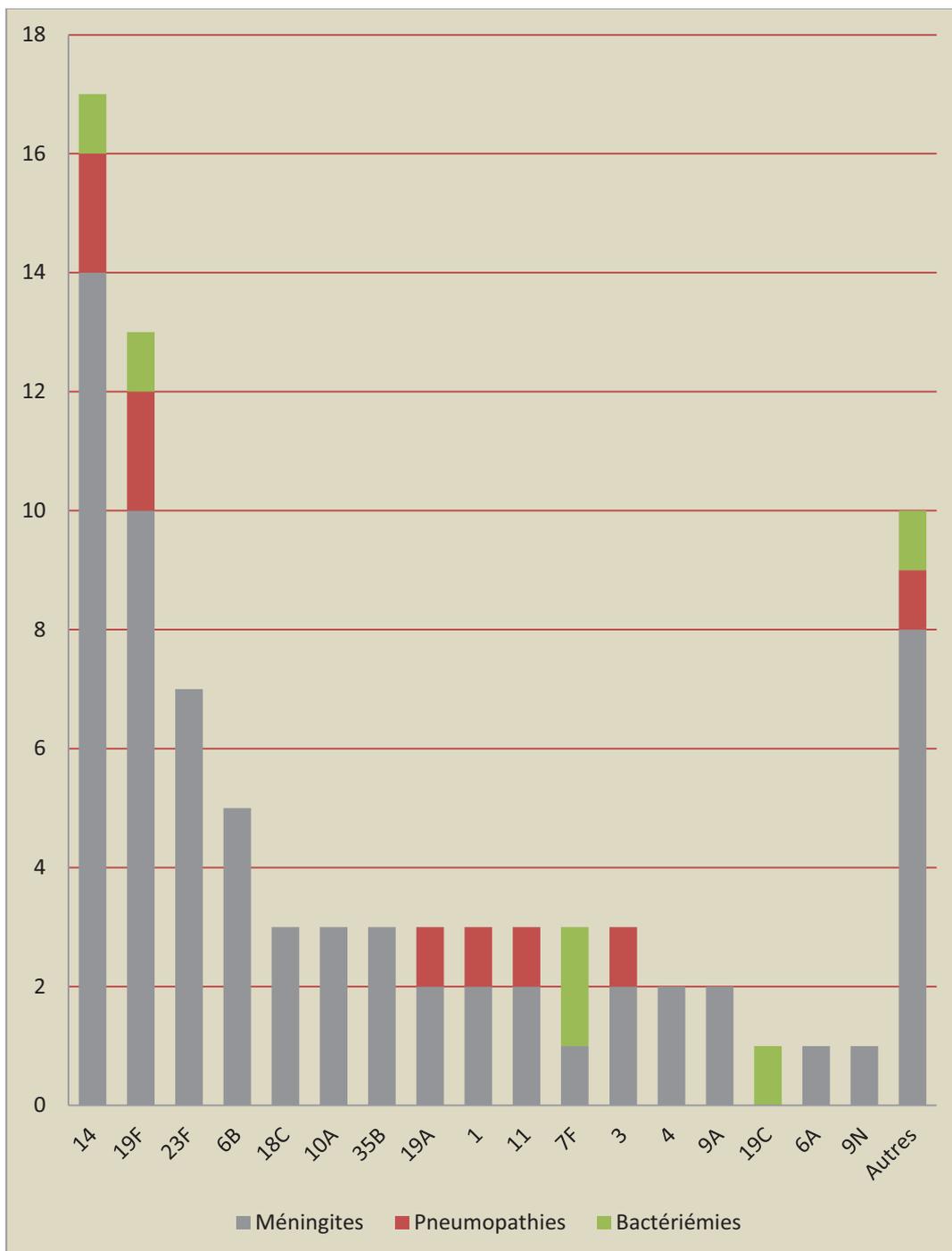
D'après la figure 46, on observe que le sérotype 14, le plus fréquemment rencontré dans notre étude est responsable de 14 cas de méningites, 2 cas de pneumopathies et 1 cas de bactériémie.

Le sérotype 19, est responsable de 10 cas de méningites, 2 cas de pneumopathies et 1 cas de bactériémie quant aux sérotypes 23F, 6B, 18C, 10A et 35B, ils ne sont observés que dans les méningites.



Autres: 10 sérotypes 12A, 16, 24F, 47F, 33F, 39, 29, 21, 48 et une souche non-typable.

**Figure 45.** Distribution des sérotypes de 83 souches de pneumocoques



Autres: 10 sérotypes 12A, 16, 24F, 47F, 33F, 39, 29, 21, 48 et une souche non-typable.

**Figure 46.** Distribution des sérotypes dans les infections invasives quelque soit l'âge en fonction de la nature de l'infection.

Les sérotypes 4, 9A, 6A et 9N retrouvés dans de faibles proportions ne sont observés que dans les méningites.

Les sérotypes 19A, 1 et 11 sont retrouvés 2 fois chacun dans les méningites et 1 fois dans les pneumopathies.

Nous constatons que parmi les 27 sérotypes identifiés dans notre série, tous sont représentés dans les méningites sauf les sérotypes 19C, 48 et 16, ceci est probablement dû à leur faible fréquence et à notre recrutement limité dans les pneumopathies.

Concernant la fréquence des sérotypes en fonction de la pathologie (tableau 31) nous remarquons que :

- Dans les méningites presque tous les sérotypes sont identifiés. Les sérotypes les plus fréquemment rencontrés sont par ordre de croissance, les sérotypes 14, 19F, 23F et 6B présentant un taux de 52,94% (36/68). Les sérotypes 18C, 10A et 35B représentent une fréquence de 4,41% (3/68) chacun. Les autres sérotypes sont représentés dans de faibles proportions.
- Dans les pneumopathies, 7 sérotypes sont identifiés, les sérotypes 14 et 19F sont les plus fréquemment rencontrés présentant le même taux de 22,22% chacun, suivis des sérotypes 19A, 1, 11, 7F et 3 fréquents dans 11,11% des cas chacun.
- Dans les bactériémies, 5 sérotypes sont identifiés, le sérotype 7F est le plus fréquent (33,33%).

Concernant la fréquence de chaque sérotype par rapport au type d'infection, nous remarquons que pour les sérotypes les plus fréquents, la répartition des sérotypes 14 et 19F n'est pas très différente. Quant aux sérotypes 23F et 6B, ils ne sont rencontrés que dans les méningites.

**Tableau 31.** Fréquence des sérotypes dans les infections invasives quelque soit l'âge en fonction de la nature de l'infection

Sérotype	Méningites	Pneumopathies	Bactériémies	Total
14	14 (20,58%)	2 (22,22%)	1 (16,66%)	17
19F	10 (14,7%)	2 (22,22%)	1 (16,66%)	13
23F	7 (10,29%)	0%	0%	7
6B	5 (7,35%)	0%	0%	5
18C	3 (4,41%)	0%	0%	3
10A	3 (4,41%)	0%	0%	3
35B	3 (4,41%)	0%	0%	3
19A	2 (2,94%)	1 (11,11%)	0%	3
1	2 (2,94%)	1 (11,11%)	0%	3
11	2 (2,94%)	1 (11,11%)	0%	3
7F	1 (1,47%)	0%	2 (33,33%)	3
3	2 (2,94%)	1 (11,11%)	0%	3
4	2 (2,94%)	0%	0%	2
9A	2 (2,94%)	0%	0%	2
19C	0%	0%	1 (16,66%)	1
6A	1 (1,47%)	0%	0%	1
9N	1 (1,47%)	0%	0%	1
Autres	8 (11,76%)	1 (11,11%)	1 (16,66%)	10
Total	68(81,92%)	9 (10,84%)	6 (7,22%)	83

Autres: 10 sérotypes 12A, 16, 24F, 47F, 33F, 39, 29, 21, 48 et une souche non-typable.

### ***4.3 Fréquence des sérotypes en fonction de l'âge***

D'après le tableau 32, nous observons que chez l'enfant, les sérotypes 14, 19F, 23F, 6B et 10A sont les plus fréquemment rencontrés représentant 65,9% des cas (29/44), suivis des sérotypes 19A, 18C et 7F représentant 4,5% des cas chacun (2/44).

La fréquence des autres sérotypes (1, 35B, 11, 3 et 9A) est plus faible, alors que les sérotypes 9N, 19C et 6A ne sont pas identifiés chez l'enfant.

Chez l'adulte les sérotypes 14 et 19F sont les plus fréquents retrouvés dans 15,38% chacun, suivis des sérotypes 23F, 6B, 1, 35B, 11, 3 et 4 identifiés chacun avec un taux de 5,12%.

La fréquence des sérotypes 19A, 18C, 7F et 9A est plus faible, le sérotype 10A n'est pas identifié chez l'adulte.

Concernant la fréquence des sérotypes chez l'enfant par rapport à l'adulte, nous remarquons que pour les sérotypes les plus fréquents, la répartition des sérotypes 14 et 23F est plus élevée chez l'enfant. Les sérotypes 19F et 6B sont rencontrés autant chez l'enfant que chez l'adulte.

Pour les autres sérotypes, ils sont retrouvés en faibles proportions sauf peut être pour le sérotype 10A qui n'est retrouvé que chez l'enfant et le sérotype 4 qui est retrouvé 2 fois dans notre étude chez l'adulte.

### ***4.4 Relation sérotype – résistance (annexe 11, tableau 33)***

Dans notre étude, les sérotypes ou sérogroupes résistants sont au nombre de 25 sur les 27 identifiés (tableau 34), la fréquence des sérotypes ou sérogroupes présentant 1 ou plusieurs marqueurs de résistance étant de 84,33% (70/83), ces sérotypes sont les 14(n=15), 19F(n=11), 23F(n=6), 6B(n=5), 10A(n=3), 18C(n=3), 11(n=3), 3(n=3), 19A(n=3), 1(n=2), 7F(n=1), 35B(n=1), 4(n=1), 9A(n=2), 19C(n=1), 6A(n=1), 9N(n=1) et 8 autres (n=1 pour chaque sérotype).

Le sérotype le plus fréquemment résistant est le sérotype 14 : sur 70 souches présentant 1 ou plusieurs marqueurs de résistance, le sérotype 14 est retrouvé 15 fois (21,42%), c'est aussi le sérotype le plus fréquent.

**Tableau 32.** Fréquence (%) des sérotypes en fonction de l'âge (Enfant ≤17 ans, Adulte ≥18 ans).

Sérotype	Enfant + Adulte	Enfant	Adulte
	n (%)	n (%)	n (%)
14	17 (20,48)	11 (25)	6 (15,38)
19F	13 (15,66)	7 (15,9)	6 (15,38)
23F	7 (8,43)	5 (11,36)	2 (5,12)
6B	5 (6,02)	3 (6,81)	2 (5,12)
19A	3 (3,61)	2 (4,54)	1 (2,56)
1	3 (3,61)	1 (2,27)	2 (5,12)
35B	3 (3,61)	1 (2,27)	2 (5,12)
11	3 (3,61)	1(2,27)	2 (5,12)
18C	3 (3,61)	2 (4,54)	1 (2,56)
10A	3 (3,61)	3 (6,81)	0
7F	3 (3,61)	2 (4,54)	1 (2,56)
3	3 (3,61)	1 (2,27)	2 (5,12)
4	2 (2,4)	0	2 (5,12)
9A	2 (2,4)	1(2,27)	1 (2,56)
19C	1 (1,2)	0	1 (2,56)
6A	1 (1,2)	0	1 (2,56)
9N	1 (1,2)	0	1 (2,56)
Autres	10 (12,04)	4 (9,09)	6 (15,38)
Total	83 (100)	44 (53,01)	39 (46,98)

Autres: 10 sérotypes (enfants : 12A, 24F, 33F et 47F ; adultes 16, 21, 29, 39, 48 et une souche non-typable.

Le sérotype 19F, rencontré 13 fois dans notre série est résistant dans 11 cas (15,71%), suivi du sérotype 23F résistant dans 8,57% (6/70) et le sérotype 6B dans 7,14% (5/70). Alors que les sérotypes 10A, 18C, 11, 3 et 19A retrouvés 3 fois chacun sont résistants dans les 3 cas (4,28% chacun).

Le sérotype 1, retrouvé 3 fois est résistant dans 2 cas (2,85%), quant aux autres sérotypes, ils sont résistants 1 fois chacun (1,42%).

### ***4.4.1 Relation sérotype – résistance aux bêta-lactamines***

Parmi les 83 souches sérotypées, 51 souches présentent une sensibilité diminuée à la pénicilline (61,44%, 51/83) dont 11 souches résistantes. D'après la figure 47, nous constatons que 19 sérotypes présentent une sensibilité diminuée à la pénicilline, il s'agit des sérotypes 14, 19F, 23F, 6B, 19A, 1, 11, 18C, 10A, 7F, 3, 4, 9A et 6 autres. Nous remarquons par ailleurs, que le sérotype 35B, retrouvé 3 fois dans notre étude est sensible à la pénicilline dans les trois cas.

Les sérotypes résistants à la pénicilline ( $CMI \geq 2\mu\text{g/ml}$ ) sont le 14 dans 6 cas, le 19F dans 3 cas, le 6B et le 7F dans 1 cas chacun.

D'après le tableau 35, parmi les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline, le sérotype 14 est le plus fréquent dans 27,45% des cas (14/51), suivi du sérotype 19F dans 15,68% des cas (8/51) et des sérotypes 23F et 6B dans 7,84% (4/51) des cas chacun.

Les sérotypes 18C et 11, retrouvés 3 fois chacun, présentent une sensibilité diminuée à la pénicilline dans les trois cas.

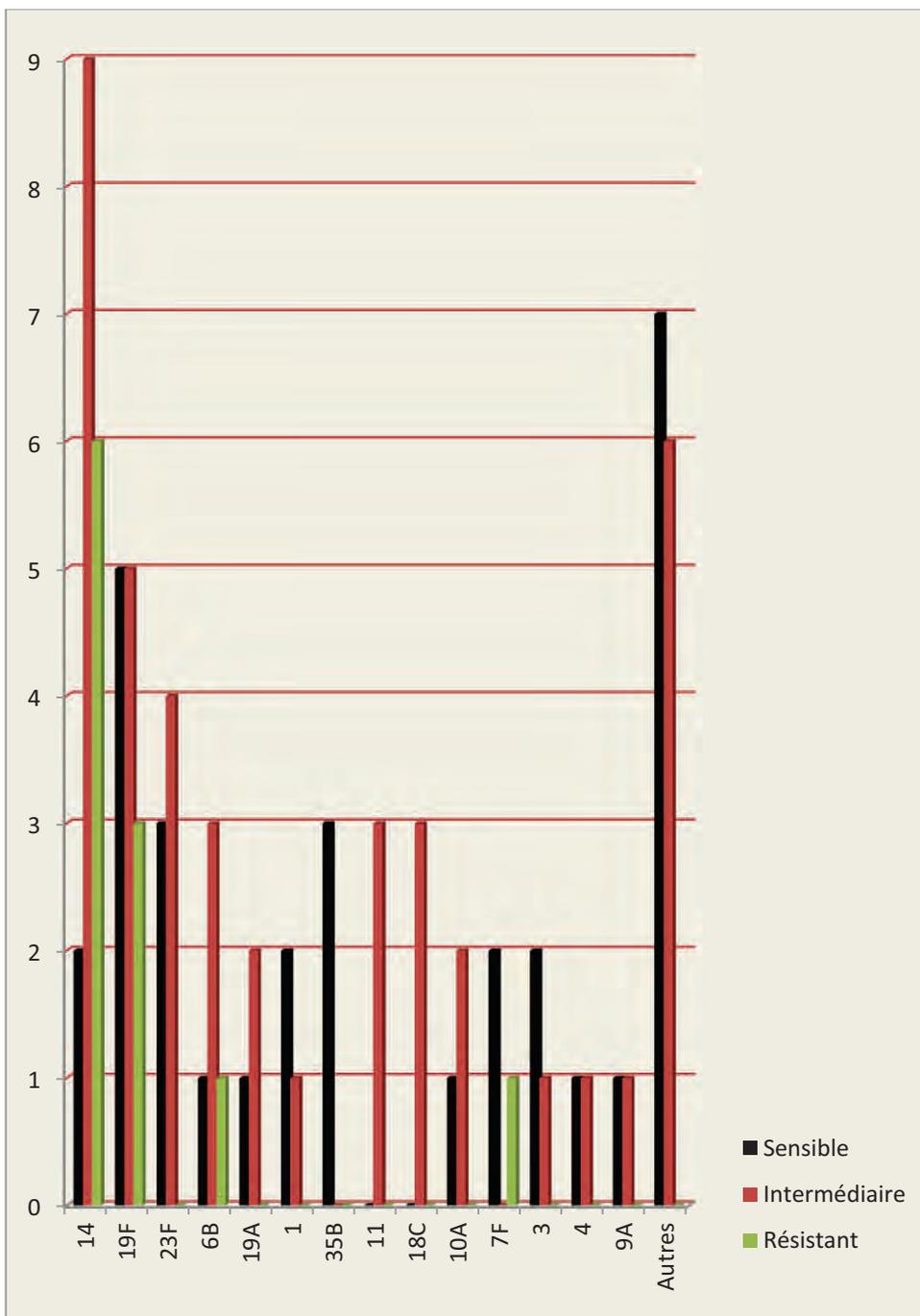
Les sérotypes 19A, et 10A, retrouvés 3 fois chacun sont de sensibilité diminuée dans 2 cas (3,92%, 2/51, chacun).

Les sérotypes 1, 3 et 7F, retrouvés 3 fois chacun dans notre étude et 1 souche sur 3 pour chaque sérotype, est de sensibilité diminuée à la pénicilline (1,96%, 1/51).

**Tableau 34.** Relation sérotype-résistance

Sérotype	n (%) de souches	n (%) de souches
	résistantes	sensibles
14	15 (21,42)	2 (15,38)
19F	11 (15,71)	2 (15,38)
23F	6 (8,57)	1 (7,69)
6B	5 (7,14)	0
1	2 (2,85)	1 (7,69)
19A	3 (4,28)	0
35B	1 (1,42)	2 (15,38)
11	3 (4,28)	0
10A	3 (4,28)	0
7F	1 (1,42)	2 (15,38)
18C	3 (4,34)	0
3	3 (4,28)	0
9A	2 (2,85)	0
4	1 (1,42)	1 (7,69)
19C	1 (1,42)	0
9N	1 (1,42)	0
6A	1 (1,42)	0
Autres	8 (11,42)	2 (15,38)
Total	70	13

Autres:10 Sérotypes [12A, 16, 24F, 47F, 33F, 29, 21, et une souche non-typable (résistants). Sérotypes 39 et 48(sensibles)]



Autres : sérotypes PSDP, 9N, 12A, 16, 24F, 47F, 29, sérotypes sensibles 33F, 39, 21, 48, 6A, 19C et une souche non-typable

**Figure 47.** Répartition des sérotypes des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline

**Tableau 35.** Fréquence des sérotypes des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline

---

Sérotypes	Souches sensibles	Souches PSDP
	n (%)	n (%)
14	3 (9,37)	14 (27,45)
19F	5 (15,62)	8 (15,68)
23F	3 (9,37)	4 (7,84)
6B	1 (3,12)	4 (7,84)
19A	1 (3,12)	2 (3,92)
1	2 (6,25)	1 (1,96)
35B	3 (9,37)	0
11	0	3 (5,88)
18C	0	3 (5,88)
10A	1 (3,12)	2 (3,92)
7F	2 (6,25)	1 (1,96)
3	2 (6,25)	1 (1,96)
4	1 (3,12)	1 (1,96)
9A	1 (3,12)	1 (1,96)
Autres	7 (21,87)	6 (11,76)
Total	32	51

---

Autres : sérotypes PSDP, 9N, 12A, 16, 24F, 47F, 29, sérotypes sensibles 33F, 39, 21, 48, 6A, 19C et une souche non-typable

### **4.4.2 Relation sérotype – résistance aux macrolides**

Parmi les 22 souches résistantes à l'érythromycine, 20 souches sont sérotypées (figure 48). Parmi ces 20 souches, on identifie 8 sérotypes : 19F, 14, 6B, 19A, 10A, 7F, 9N et 6A.

Nous remarquons que le sérotype 19F est le plus fréquemment résistant dans 35% (7/20) des cas suivi du sérotype 14 dans 25% (5/20) des cas.

Les sérotypes 6B et 19A présentent un taux de résistance de 10% (2/20) chacun.

Les sérotypes 10A, 7F, 9N et 6A sont responsables de 5% (1/20) de résistance.

### **4.4.3 Sérotype et multirésistance**

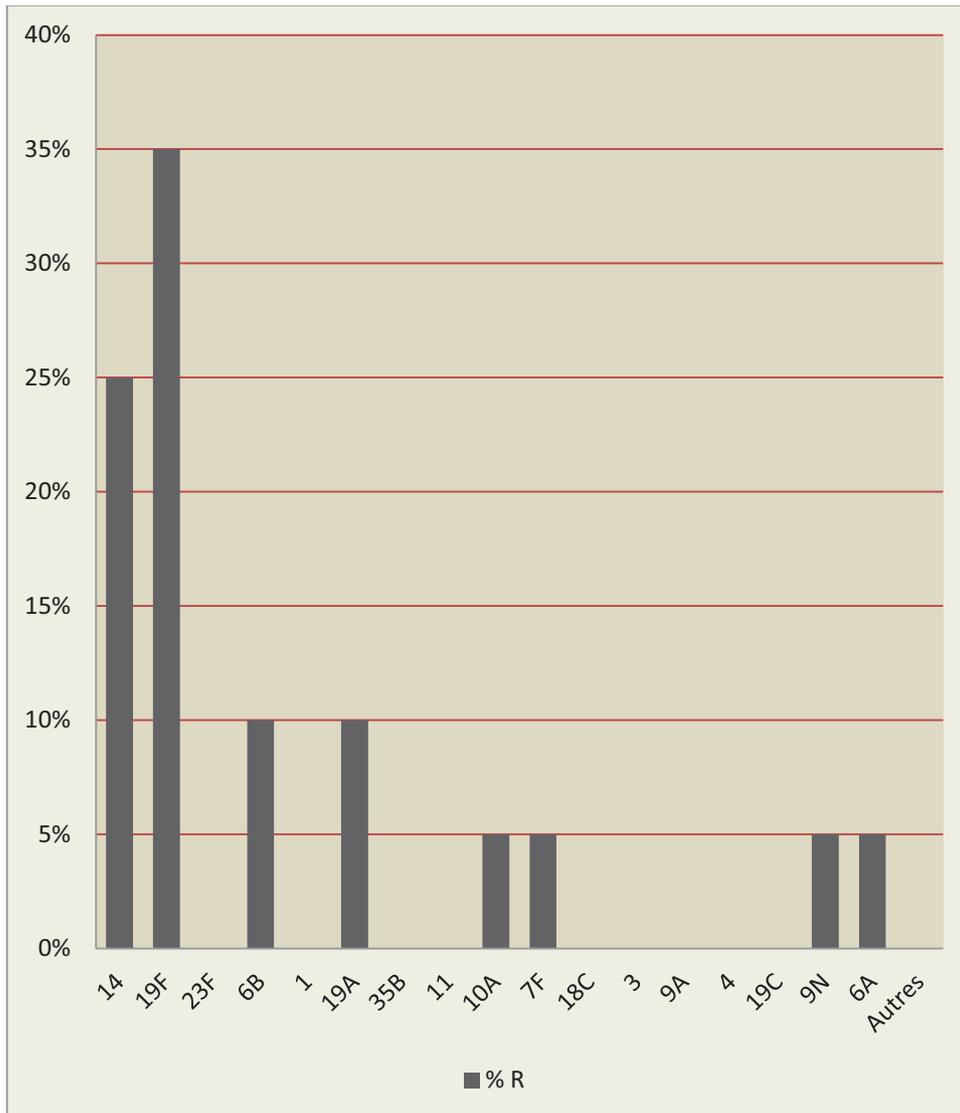
Les 20 souches multirésistantes sont sérotypées (figure 49), 8 sérotypes sont observés : 14, 19F, 19A, 6B, 10A, 3, 7F et 9N, les sérotypes 14 et 19F représentent les taux les plus élevés des souches multirésistantes (30%, 6/20 chacun). Les sérotypes 19A et 6B représentent 10% des souches multirésistantes (2/20). Quant aux sérotypes 10A, 3, 7F et 9N, ils sont responsables de 5% de multirésistance chacun (1/20).

## **5. Génotypes de résistance aux macrolides**

Parmi les 22 souches résistantes aux macrolides, la détermination des mécanismes de résistance aux macrolides est effectuée pour 21 souches.

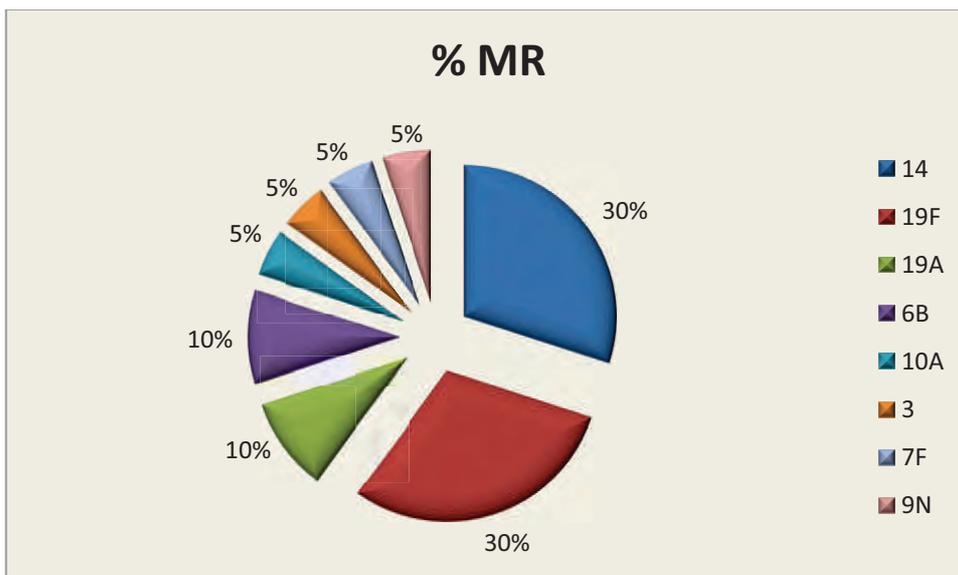
L'amplification par PCR du gène *ermB* est positive pour les 21 souches résistantes à l'érythromycine testées. L'amplification par PCR du gène *mefA* est positive pour 20 souches et négative pour une souche. Donc, parmi les 21 souches testées, 20 souches (95,23%, 20/21) portent les deux gènes *ermB* et *mefA* en même temps exprimant le phénotype  $MLS_B$  avec des CMI élevées ( $> 256 \mu\text{g/ml}$ ) et une souche porte le gène *ermB* seul, exprimant également le phénotype  $MLS_B$  avec une CMI élevée ( $> 256 \mu\text{g/ml}$ ). Aucune souche ne porte le gène *mefA* seul, donc aucune souche n'exprime le phénotype M, ce qui explique l'absence de bas niveaux de résistance (CMI de 2-64  $\mu\text{g/ml}$ ) (annexes 12, figure 50 et 51).

Nous remarquons dans le tableau 36 une corrélation entre les gènes de résistance et le phénotype de résistance.



Autres: sérotypes 12A, 16, 24F, 47F, 33F, 39, 29, 21, 48 et une souche non-typable

**Figure 48.** Distribution des sérotypes en fonction de la résistance aux macrolides



% MR : pourcentage de multirésistance

**Figure 49.** Sérotype et multirésistance

**Tableau 36.** Corrélations entre phénotypes et génotypes de résistance aux macrolides

Nombre de souches (%)	Phénotype	Génotype	CMI (µg/ml)
20 (95,23)	MLS <sub>B</sub>	ermB+ mefA	> 256
1 (4,76)	MLS <sub>B</sub>	ermB	> 256
0 (0)	M	mefA	

Les résultats du séquençage du gène *ermB* pour 12 souches, nous ont permis, après blast, d'obtenir 99% (9 souches) et 100% (3 souches) d'identité avec 2 souches de référence sur GenBank (*S. pneumoniae* CP006844 et *S. pneumoniae* AM 410044) (annexe 13).

### 6. Sérotypes et vaccins

#### 6.1. Couverture vaccinale théorique

La couverture vaccinale est calculée par rapport aux souches sérotypées (83 souches) et non pas par rapport au nombre total de souches (100 souches).

Parmi les 83 sérotypes identifiés dans notre étude, nous remarquons d'après le tableau 37 que, globalement, la couverture vaccinale théorique par le vaccin 23-valent est la plus élevée chez l'enfant et l'adulte, il couvre plus de sérotypes que les autres vaccins. La couverture sérotypique du vaccin polysaccharidique est plus élevée pour les enfants (86,36%), mais il est peu immunogène chez le jeune enfant.

Chez l'enfant dont l'âge est égal ou inférieur à 5 ans (figure 52), la couverture vaccinale théorique par le PCV7 est de 63,33% (19/30), le PCV13 semble plus efficace dans notre population infantile, la couverture vaccinale théorique par ce vaccin est de 76,66% (23/30).

#### 6.2. Relation entre sérotypes vaccinaux et résistance (résistance à la pénicilline (PSDP) et multirésistance)

D'après le tableau 38, le taux des PSDP dans les sérotypes inclus dans le PCV7 est plus élevé que dans les sérotypes non inclus (valeur du  $\chi^2 = 5,52 > 3,84$  donc  $P < 0,01$ , valeur de  $P$  avec le test exact de Fisher =  $0,0243 < 0,05$ ). La situation n'est pas la même pour le PCV13 (valeur du  $\chi^2 = 1,15 < 3,84$  donc  $P > 0,05$ , valeur de  $P$  avec le test exact de Fisher =  $0,3202 > 0,05$  où la différence n'est pas significative). Pour la multirésistance, la différence n'est pas significative entre les sérotypes inclus dans le PCV7 et les sérotypes non inclus (valeur du  $\chi^2 = 1,9 < 3,84$  donc  $P > 0,05$ , valeur de  $P$  avec le test exact de Fisher =  $0,2016 > 0,05$ ). Inversement, pour les sérotypes inclus dans le PCV13 et les sérotypes non inclus, la différence de la multirésistance est significative (valeur du  $\chi^2 = 4,12 > 3,84$  donc  $P < 0,05$ , valeur de  $P$  avec le test exact de Fisher =  $0,048 < 0,05$ ).

**Tableau 37.** Couverture sérotypique (%) théorique des vaccins conjugués 7-valent (PCV7), 10-valent (PCV10) et 13-valent (PCV13) et du vaccin polysaccharidique 23-valent (Pn-23v) en fonction de l'âge.

Vaccin*	Enfant+Adulte	Enfant	Adulte
		≤ 17 ans	≥ 18 ans
	n= 83	n= 44	n=39
PCV7	47(56,62%)	28 (63,63%)	19 (48,71%)
PCV10	53(63,85%)	31 (70,45%)	22 (56,41%)
PCV13	60(72,28%)	34 (77,27%)	26 (66,66%)
Pn-23v	68(81,92%)	38 (86,36%)	30(76,92%)

\*Sérotypes contenus dans chacun des vaccins conjugués :

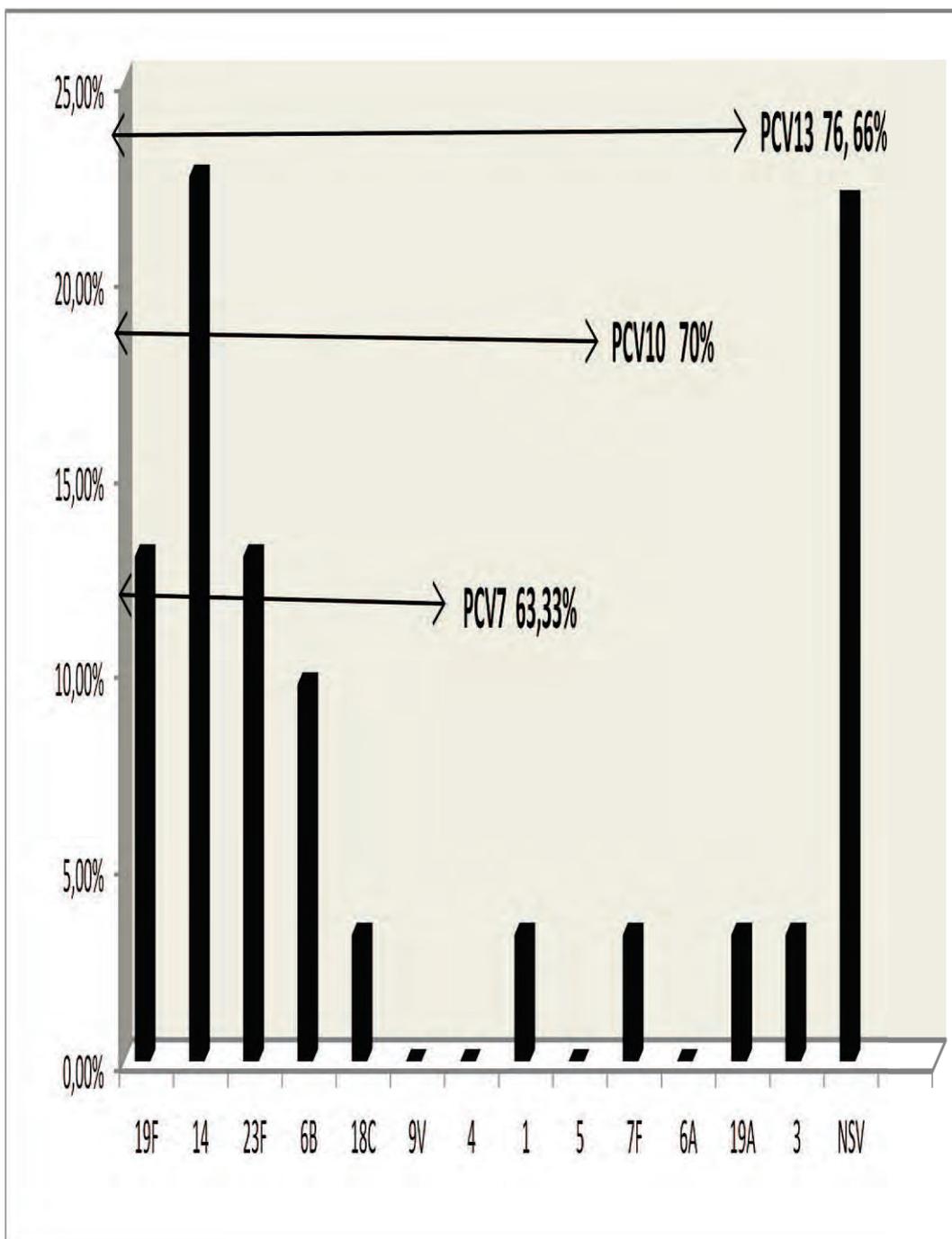
**PCV7 : 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F**

**PCV10 : 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F + 1, 5, 7F**

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

Sérotypes contenus dans le vaccin polysaccharidique :

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



NSV: Serotypse non-vaccinaux

**Figure 52.** Distribution des sérotypes chez l'enfant dont l'âge est  $\leq$  à 5 ans (n=30) et couverture vaccinale théorique par le vaccin conjugué

**Tableau 38.** Relation entre sérotypes vaccinaux et résistance (résistance à la pénicilline (PSDP) et multirésistance)

Vaccin	Nombre de souches n=83	PSDP n=51	MR n=20
PCV7	47	72,34% (34/47)	29,78%(14/47)
NON-PCV7	36	47,22% (17/36)	16,66% (6/36)
<b>Valeur de P</b>		<b>P &lt; 0,01</b>	<b>P &gt; 0,05</b>
PCV13	60	65% (39/60)	30% (18/60)
NON-PCV13	23	52,17% (12/23)	8,69% (2/23)
<b>Valeur de P</b>		<b>P &gt; 0,05</b>	<b>P &lt; 0,05</b>

PSDP : pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline, MR : multirésistance, Valeur de P : test du  $\chi^2$  avec correction de Yates: différences entre les PSDP et les souches multirésistances entre les sérotypes inclus dans le PCV7 et les sérotypes non inclus (NON-PCV7), les sérotypes inclus dans le PCV13 et les sérotypes non inclus (NON-PCV13).

## 7. Evolution des infections invasives à pneumocoques

La mortalité est le paramètre le plus objectif pour évaluer la gravité des infections invasives à *S.pneumoniae*. Dans notre étude, parmi les 100 cas d'infections invasives et d'après le tableau 39, l'évolution se fait dans 15 cas vers le décès (15%), observée dans les pneumopathies (23,07%, 3/13), les méningites (14,66%, 11/75), et les bactériémies (8,33%, 1/12), autant chez l'adulte (8/54, 14,81%) que chez l'enfant (7/46, 15,21%). Le taux de décès n'est pas significativement différent en fonction du type d'infection (valeur du  $\chi^2 = 0,44 < 5,99$  donc  $P > 0,05$ ) et n'est pas significativement différent en fonction de l'âge (valeur du  $\chi^2 = 0,06 < 3,84$  donc  $P > 0,05$ , valeur de P avec le test exact de Fisher = 1 > 0,05).

- Parmi les cas de décès observés chez l'adulte, 62,5% (5/8) sont observés chez les plus de 60 ans.
- Chez l'enfant, parmi les 7 cas de décès observés, 71,42% (5/7) sont observés chez l'enfant dont l'âge est égal ou inférieur à 5 ans.
- Parmi les 15 souches responsables de décès, 2 souches ne sont pas sérotypées, le sérotype 14 est retrouvé 6 fois, le 19F, 2 fois et les sérotypes 6B, 19A, 18C, 1 et 4 sont retrouvés une fois chacun.

Presque la moitié des souches est de sensibilité diminuée à la pénicilline (7/15, 46,6%) dont 2 souches résistantes :

- L'une avec une CMI à la pénicilline égale à 2µg/ml observée chez un enfant âgé de 10 mois atteint de méningite.
- L'autre avec une CMI égale à 4µg/ml observée chez un enfant âgé de 6 mois, isolée d'un LCR.

Notons, par ailleurs, que la notion de séquelles est difficilement analysable. En effet notre travail n'inclut pas le suivi des patients. En plus, pour certains enfants, il faut assez de recul pour pouvoir parler de séquelles.

**Tableau 39.** Caractéristiques des souches causant le décès

	Sexe	Age	Type d'infection	Sérotype	Profil de résistance
01	H	20ans	Méningite	19F	SXT
02	F	73ans	Méningite	6B	ERY
03	H	25ans	Méningite	14	/
04	H	10mois	Méningite	14	PEN
05	F	66ans	Bactériémie	NS	SXT
06	H	13ans	Pneumopathie	19F	ERY+ SXT
07	F	74ans	Pneumopathie	19A	SXT
08	F	6mois	Méningite	14	PEN
09	H	13mois	Méningite	18C	PEN+SXT
10	F	5ans	Méningite	1	SXT
11	H	12ans	Méningite	14	PEN+SXT
12	H	78ans	Méningite	4	/
13	H	70ans	Méningite	NS	PEN
14	F	23ans	Méningite	14	PEN+ERY+TET+SXT
15	H	5ans	Pneumopathie	14	PEN+TET

H: homme, F: femme, NS: souche non sérotypée, PEN: pénicilline, ERY: érythromycine, TET: tétracycline, SXT: cotrimoxazole.

## DISCUSSION

### 1. Identification

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

Compte tenu de la pertinence clinique et épidémiologique de *S. pneumoniae*, l'identification précise est indispensable pour le diagnostic correct et le choix approprié des antibiotiques car l'identification incorrecte de *S. pneumoniae* peut provoquer une surestimation du fardeau de la maladie ainsi que le traitement inapproprié.

Il est intéressant de noter que les taux de résistance de *S. pneumoniae* sont réduits pour certains antibiotiques tels que la pénicilline, la ceftriaxone et la ciprofloxacine si l'on exclut les isolats non - pneumococciques mal identifiés (Song *et al.*, 2009).

Parmi les méthodes conventionnelles, le test de sensibilité à l'optochine est le plus souvent utilisé pour identifier le pneumocoque dans les laboratoires de microbiologie clinique, mais l'existence de souches de pneumocoques atypiques résistantes à l'optochine même dans les infections invasives (Richter *et al.*, 2008 ; Ing *et al.*, 2012 ), a rendu difficile la différenciation avec précision du pneumocoque d'autres streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques (Kaijalainen *et al.*, 2002, 2005 ; Arbique *et al.*, 2004).

Plusieurs autres tests conventionnels biochimiques et phénotypiques, comme la coloration de Gram, la morphologie des colonies et l'hémolyse alpha sur gélose au sang de mouton sont actuellement appliqués dans le cadre de procédures de routine dans les laboratoires de microbiologie clinique. *S. pneumoniae* appartient au groupe *mitis*, et plusieurs analyses moléculaires sont appliquées dans le but de le discriminer des autres streptocoques.

Récemment, la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) est également proposée comme un outil pour l'identification rapide des streptocoques du groupe *mitis* (Ferroni *et al.*, 2010).

Notre étude donne un aperçu sur la performance des différentes méthodes phénotypiques et génotypiques pour l'identification de *S. pneumoniae*. Les 100 souches de pneumocoques sont identifiées comme *S. pneumoniae* sur la base de tests de routine (alpha- hémolyse, les

caractéristiques des colonies et la coloration de Gram). La sensibilité à l'optochine, l'agglutination au latex, la solubilité dans les sels biliaires et la PCR en temps réel ciblant les gènes *plyN* et *lytA* ainsi qu'une approche moderne comme la MALDI-TOF MS ou l'analyse du gène *rpoB* sont appliquées pour la caractérisation plus précise de nos isolats. Les résultats des différentes approches semblent être plutôt discordants. Ainsi, concernant le test de sensibilité à l'optochine, les 100 souches de pneumocoque présentent un diamètre supérieur à 14mm alors que les neuf souches de streptocoques sont résistantes à l'optochine ne présentant aucune zone d'inhibition. Dans de nombreux laboratoires cliniques, le test de sensibilité à l'optochine est le test le plus couramment utilisé pour la discrimination entre les pneumocoques et les autres streptocoques du groupe *viridans*. En général, ces derniers sont généralement résistants à cet agent, ainsi, quand il n'y a pas de zone d'inhibition autour du disque d'optochine, la souche est régulièrement identifiée comme un streptocoque. Un streptocoque  $\alpha$ -hémolytiques optochine-sensible est un pneumocoque. Toutefois, des souches de pneumocoques résistants à l'optochine (Kellogg *et al.*, 2001 ; Pikiš *et al.*, 2001 ; Kaijalainen *et al.*, 2002 ) et des souches de streptocoques optochine-sensibles sont décrites (Borek *et al.*, 1997). Ainsi 4 souches de pneumocoques présentant une résistance à l'optochine sont observées aux Etats-Unis (Pikiš *et al.*, 2001). Le test de sensibilité à l'optochine, utilisé seul, a donné lieu à des taux élevés de souches mal identifiées (Richter *et al.*, 2008).

Il est rapporté aussi que la conservation des isolats de *S. pneumoniae* dans un bouillon contenant 15 % de glycérol à -70 ° C plusieurs années peut entraîner une résistance à l'optochine (Robson *et al.*, 2007). Le test de sensibilité à l'optochine reste un test de dépistage utile dans notre étude, puisque toutes les souches de *S.pneumoniae* y sont sensibles.

Le test de solubilité dans la bile a été jugé comme une méthode simple et fiable pour l'identification de *S. pneumoniae* (Arbique *et al.*, 2004 ; Richter *et al.*, 2008). Ce test peut être utilisé comme un test supplémentaire si le résultat n'est pas concluant mais des souches de pneumocoque sensibles à l'optochine et non solubles dans la bile ont déjà été décrites (Kellogg *et al.*, 2001) et l'identification de *Streptococcus sp* fondée sur ce test peut souvent conduire à des résultats erronés.

Dans notre étude, parmi les 41 souches de pneumocoques testées, 3 sont partiellement

solubles, alors que le test est négatif pour 8 souches et positif pour une souche de streptocoques. Par conséquent, le test de solubilité dans la bile ne peut pas être utilisé seul pour l'identification du pneumocoque.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS est la plus rapide de toutes les techniques pour l'identification bactérienne (Bizzini & Greub, 2010), mais cette technique a donné plusieurs résultats faussement positifs ou ambigus : *S. pneumoniae* est correctement identifié mais pas les autres streptocoques du groupe *mitis* (Friedrichs *et al.*, 2007 ; Kok *et al.*, 2011). Risch *et al.* (2010) font état d'une mauvaise performance de la MALDI-TOF MS dans l'identification de *S. oralis/mitis* comme *S. pneumoniae* [6 échantillons ont montré une concordance avec *S.pneumoniae* (MALDI) et *Streptococcus mitis / oralis* (identification conventionnelle)].

Dans l'étude de Stevenson *et al.* (2010), 8 isolats de *S.mitis* avec des scores de 1,9 sont identifiés à tort comme étant des isolats de *S.pneumoniae* alors que cinq autres isolats de *S. pneumoniae* sont correctement identifiés.

L'incapacité du logiciel Biotyper d'identifier correctement *S. mitis* est reconnue par d'autres auteurs. Dans l'étude de La Scola & Raoult (2009), seuls quatre échantillons sur 17 souches de streptocoques sont correctement identifiés et huit isolats de *S.mitis* sont mal identifiés comme étant des isolats de *S.pneumoniae*. L'identification de six isolats de *S. mitis* en *S.pneumoniae* est facilement reconnue comme incorrecte, en raison de l'absence de l'aspect des colonies typique des pneumocoques et la résistance à l'optochine dans l'étude de Neville *et al.* (2011).

Ferroni *et al.* (2010) estiment que les profils spectraux de *S.mitis* et *S.pneumoniae* sont souvent indiscernables. Dans l'étude de Prod'hom *et al.* (2010), la plupart des streptocoques sont identifiés comme *S. pneumoniae*, même les pneumocoques sont mal identifiés : huit isolats de *S. pneumoniae* n'ont pas été identifiés, deux autres isolats de *S. pneumoniae* sont identifiés correctement, mais avec un score faible de 1,7. Dans la présente étude, parmi les 41 souches de *S.pneumoniae*, 35 souches sont bien identifiées avec un score > 1,9, et 6 souches sont mal identifiées (score < 1,9). Alors que les neuf souches de streptocoques, autres que pneumocoques, sont toutes identifiées comme *S. pneumoniae* (score > 2).

L'identification des autolysines et / ou des gènes de virulence (pneumolysine) a été considérée initialement comme des tests prometteurs pour l'identification des pneumocoques (Kearns *et al.*, 2000 ; Prere & Fayet, 2011 ; Greve & Moller, 2012). Cependant, bien que ces gènes soient présents dans toutes les souches de pneumocoques, un certain nombre d'auteurs ont également signalé leur présence dans le groupe *viridans* autres que *S.pneumoniae* (Arbique *et al.*, 2004 ; Carvalho *et al.*, 2007 ; El Aila *et al.*, 2010; Ing *et al.*, 2012).

Arbique *et al.* (2004) ont pu démontrer que des produits de PCR de la taille du gène de virulence codant pour la pneumolysine (ply) sont retrouvés dans 4 des 16 souches de *S.mitis* et un produit d'amplification de la taille du gène *lytA* est également retrouvé dans une des 16 souches de *S.mitis* étudiées.

L'étude de Selva *et al.* (2010), utilisant le gène de la pneumolysine comme cible pour la détection de *S.pneumoniae*, a montré que 1 souche de *S.mitis*, a eu un résultat positif. Selon Carvalho *et al.* (2007), la présence du gène *plyN* chez d'autres streptocoques en particulier *S.mitis*, devrait limiter l'utilisation de ce test. Par contre, la détection de *S.pneumoniae* par PCR, utilisant le gène de l'autolysine (*lytA*), pourrait avoir une meilleure spécificité (Selva *et al.*, 2010).

La PCR en temps réel ciblant le gène *PlyN* a donné, dans la présente étude, dans deux cas, des résultats faussement négatifs. Les mêmes résultats sont observés avec le gène *lytA*. Dans notre étude, aucune souche de streptocoque, autre que pneumocoque, n'est positif dans les tests *ply* et *lyt*-PCR.

Certains auteurs, malgré l'observation de l'incidence élevée de faux négatifs produits par la PCR en temps réel ciblant le gène *lytA*, trouvent que ce test permet l'identification rapide de vraies souches de *S. pneumoniae* et représente un outil de diagnostic amélioré pour l'étude des pneumocoques (McAvin *et al.*, 2001 ; Liull *et al.*, 2006 ; Greve & Moller, 2012).

Drancourt *et al.* (2004) ont développé un nouvel outil moléculaire fondé sur le séquençage d'un fragment de 740 paires de base du gène *rpoB* (codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase) pour l'identification des streptocoques. Les auteurs constatent que ce test moléculaire possède un pouvoir discriminant raisonnable pour les trois espèces

du groupe *mitis* (*S.pneumoniae* - *S.oralis* - *S.mitis*). Dans notre étude, ce test s'avère fiable. Les 41 souches de pneumocoques sont bien identifiées. Les souches qui sont mal-identifiées comme étant des pneumocoques par d'autres analyses ont été attribuées au groupe *mitis*, autres que *S.pneumoniae*, par la recherche du gène *rpoB*. Notons aussi que les résultats obtenus par la recherche du gène *rpoB* sont concordants avec le test de sensibilité à l'optochine.

Notons le fait que plusieurs autres tests moléculaires sont proposés pour lever l'ambiguïté entre les espèces du groupe *mitis*, parmi lesquels le système AccuProbe n'est pas systématiquement utilisé en raison de son coût, en dépit de sa fiabilité pour les souches typiques (Richter *et al.*, 2008). Mais la spécificité de ce test a été discutée car il pourrait conduire à des erreurs d'identification des streptocoques et surtout la discrimination entre *S.pneumoniae* et la nouvelle espèce *S. pseudopneumoniae* (Arbique *et al.*, 2004 ; El Aila *etal.*, 2010).

D'autres tests moléculaires (PCR) ciblant des gènes supposés être spécifiques à *S.pneumoniae* sont utilisés tels que les gènes codant pour des facteurs de virulence comme, l'antigène de surface pneumococcique A (*psaA*), et la superoxyde dismutase (*sodA*). L'identification du gène *psaA* s'est avérée utile dans la distinction entre pneumocoques et autres streptocoques, mais pas l'espèce *S.pseudopneumoniae*, identifiée comme *S.pneumoniae* (El Aila *et al.*, 2010). Alors que l'analyse de la séquence partielle du gène *sodA* a montré un pouvoir discriminant entre *S. pneumoniae* et les autres streptocoques du groupe *mitis* ((El Aila *et al.*, 2010). Mais, une souche, identifiée comme *S.pneumoniae* par l'analyse de la séquence nucléotidique de *sodA* (100% d'identité nucléotidique), et identifiée comme *S.mitis* par d'autres tests conventionnels et moléculaires a remis en cause la fiabilité de cette méthode (Ikryannikova *et al.*, 2011).

Le séquençage du gène ARNr 16S a une utilité limitée pour l'identification de *S. pneumoniae* en raison de la similarité génétique entre les espèces du groupe *mitis*. Le pneumocoque est très proche phylogénétiquement des autres espèces et le test ARN 16S présente 99% d'analogie (Kawamura *et al.*, 1999).

Un test nouvellement développé la SPNE-PCR, qui consiste en l'amplification d'un produit de 217 paires de bases du gène de l'ARN 16S de *S. pneumoniae*, est décrit et s'avère performant par rapport à d'autres tests génotypiques et phénotypiques. Ce nouveau test s'avère être spécifique à *S.pneumoniae*, mais pas à *S.pseudopneumoniae* (El Aila *et al.*,

2010). La différenciation de *S. pneumoniae* à partir de *S.pseudopneumoniae* est importante car le potentiel pathogène de *S. pneumoniae* est de loin supérieur.

La technique MLST (multilocus sequence typing), utilisant 7 panels de gènes, s'est avérée utile pour la distinction entre les pneumocoques même atypiques et les autres espèces de streptocoques, cette technique présente de faibles taux de mutation mais elle est très coûteuse (Ing *et al.*, 2012).

Selon les auteurs, il devrait être proposé que l'identification correcte des streptocoques du groupe *viridans*, en particulier *S.mitis* et *S.pneumoniae*, par méthodes moléculaires, pourrai-être seulement possible, en se basant sur la comparaison du génome entier. Les auteurs concluent que la combinaison de plusieurs méthodes est nécessaire pour la détection de pneumococcies invasives et qu'aucune méthode ne peut être utilisée seule pour fournir une identification précise de l'espèce. L'introduction universelle des méthodes d'identification moléculaire dans les laboratoires de microbiologie clinique est essentielle pour prescrire le traitement antibiotique approprié.

Dans notre étude, le test de sensibilité à l'optochine est le gold standard comme méthode conventionnelle, puisqu'il présente 100% d'efficacité. Il est simple d'utilisation, d'interprétation mais demande 24 heures.

### **2. Epidémiologie des infections invasives à *S.pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* constitue le pathogène le plus fréquent à l'origine des pneumopathies communautaires (plus de 50 % des cas) (Niederman *et al.*, 2001 ; Tremolieres, 2006). Au cours des méningites, le pneumocoque est généralement au 3<sup>ème</sup> rang après le méningocoque et *Haemophilus influenzae* b.

Les infections à pneumocoque représentent aujourd'hui un problème de santé publique. Le pneumocoque est une cause majeure des infections communautaires invasives de l'enfant et de l'adulte (Chen *et al.*, 2011). Les infections invasives notamment les méningites, restent graves, avec un taux de mortalité élevé et un risque de séquelles important.

Généralement, le pneumocoque est souvent responsable de pneumopathies. Dans l'étude de O'Brien *et al.* (2009), les infections invasives à pneumocoques atteignent 14,5 millions

de cas dans le monde chez l'enfant dont 95,6% sont des pneumopathies. Verhaegen *et al.* (1990) trouvent que le pneumocoque est incriminé dans 73 % des cas de pneumopathies et dans 10 % des cas de méningites.

En Asie, la présentation des infections invasives à pneumocoque est de 63,3% pour les pneumopathies, de 17% pour les bactériémies et de 15,6% pour les méningites chez l'enfant âgé de moins de 5 ans (Yao & Yang 2008).

Dans les infections invasives, la répartition par âge de l'atteinte pneumococcique met en évidence une prédominance aux deux extrémités de la vie : le pneumocoque est un germe de l'enfant jeune de moins de 2 ans (Gray & Dillon, 1988), les infections invasives à pneumocoques sont également fréquentes chez le sujet âgé (Forrester *et al.*, 1987).

Gray *et al.* (1979) notent que les infections à pneumocoques en général touchent le plus la tranche d'âge inférieure à 2 ans surtout dans les méningites : 88 % des enfants atteints ont moins de 2 ans. Helferty *et al.* (2013) étudient l'épidémiologie des infections invasives à pneumocoques au Canada entre 1999 et 2010 et trouvent que la majorité des infections est observée chez l'enfant de moins de deux ans et les plus de 65 ans.

Dans la littérature, la fréquence des pneumopathies est plus élevée chez l'adulte. Dans l'étude d'Ardanuy *et al.* (2012) entre 2007 et 2009, sur 335 infections invasives à pneumocoques observées chez les personnes âgées, 80,3% sont des pneumonies. Au Canada (Helferty *et al.*, 2013) et en Espagne (Perez-Rodriguez *et al.*, 2013), les taux de pneumopathies atteignent 70% et elles sont observées dans tous les groupes d'âge alors que les méningites sont fréquemment rencontrées chez les moins de deux ans.

Certains auteurs, cependant, rapportent le rôle important du pneumocoque dans les pneumopathies chez l'enfant. En Italie, l'étude d'Esposito *et al.* (2012) durant la période 2008-2011, chez l'enfant âgé de moins de 5 ans montre un pourcentage de pneumopathies à pneumocoques égal à 14,3%. Alors que dans l'étude de de Sevilla *et al.*, 2012, entre 2007 et 2009, le taux des pneumonies atteint 79,6%. Dans notre étude, le pneumocoque est responsable de méningites dans 75 % des cas, ceci est dû à notre recrutement limité en pneumopathies. La fréquence des méningites est autant élevée chez l'enfant que chez l'adulte, 32 % de méningites sont observées chez l'enfant âgé de moins de 5 ans. La fréquence des pneumopathies est de 61,5 % chez l'adulte.

En Afrique, les infections invasives à pneumocoques dont les méningites ne sont pas très documentées. Mais l'aspect épidémique fait que le taux des méningites est plus élevé surtout chez l'enfant. Au Ghana, dans une étude effectuée de janvier 2002 à avril 2005, 140 cas d'infections invasives à pneumocoques sont répertoriées dont 79 % sont des méningites (Holliman *et al.*, 2007).

Dans une étude tunisienne, 210 souches de pneumocoques sont isolées entre 1998 et 2004 et 50% des souches invasives sont isolées chez des enfants dont l'âge est inférieur à 2 ans. Ces souches provenaient essentiellement de LCR (49.5%) (Smaoui *et al.*, 2009).

Ramdani-Bougoussa & Rahal (2003) en Algérie, présentent les résultats d'une étude multicentrique de 240 cas d'infections à pneumocoques chez les enfants âgés de 0 à 16 ans entre 1995 et 2000 dont 31,25% sont invasives avec 61,13% de méningites dont 90% observées chez l'enfant de moins de cinq ans.

Au Bangladesh, parmi les infections invasives observées chez l'enfant âgé de moins de cinq ans, 67% sont des méningites, 23% sont des pneumopathies et 9% des bactériémies (Saha *et al.*, 2009).

Le taux de pneumopathies est faible dans notre étude (13%). L'épidémiologie des pneumopathies aiguës communautaires dues à *S. pneumoniae* est difficile à connaître avec précision. En effet, le diagnostic étiologique des pneumonies aiguës n'est réalisé que dans 20% des cas environ en pratique clinique courante, faute de prélèvements bactériologiques spécifiques positifs. Ainsi, seules 20% sont bactériémiques chez l'adulte, et les prélèvements pulmonaires sont rarement réalisés car invasifs. L'incidence des pneumonies dues au pneumocoque ne peut donc qu'être estimée, à partir de l'incidence des bactériémies à pneumocoques et celle des pneumonies aiguës communautaires toutes étiologies confondues. Aux Etats unis, une méta-analyse de 127 études de cohortes sur les pneumonies aiguës communautaires retrouve *S.pneumoniae* comme agent étiologique dans environ un quart des cas, mais dans 67,3% des cas où l'agent étiologique a été identifié. Dans cette méta-analyse, l'agent étiologique n'a pas été identifié dans plus de 60% des épisodes (File, 2004).

En France, dans une enquête monocentrique qui évalue la fréquence du pneumocoque parmi les pneumonies communautaires aiguës chez les enfants hospitalisés âgés de 3 mois

à 10 ans, les résultats montrent que les pneumonies sont certainement dues au pneumocoque dans 3% des cas et probablement en rapport avec ce germe dans 57% des cas (Odievre *et al.*, 2007).

Si l'épidémiologie des pneumonies aiguës communautaires à pneumocoque est difficile à connaître avec certitude, on peut néanmoins noter que le pneumocoque touche plus fréquemment les patients âgés et avec des comorbidités telles qu'un tabagisme actif, un éthyliisme chronique, un diabète... ( Drioux, 2010 ; Wintenberger, 2010). On remarque par ailleurs que la proportion de pneumonies dues au pneumocoque est plus importante avec l'âge. Dans une étude de cohorte espagnole, l'incidence parmi les personnes âgées de 75 ans et plus était deux fois plus élevée que celle des 65 à 74 ans (Gutierrez *et al.*, 2006).

Notons aussi que le pneumocoque est responsable de bactériémies dans 12% des cas dans notre étude. Il est en cause dans 5 à 12% des bactériémies communautaires en France. Ces bactériémies font souvent suite à une pneumopathie et elles se compliquent de localisations métastatiques multiples. Au Ghana, parmi 111 infections invasives à pneumocoques, 8% sont des bactériémies (Holliman *et al.*, 2007). La fréquence des bactériémies à pneumocoque est de 7.8% en Espagne (de Sevilla *et al.*, 2012) et atteint 26% chez l'enfant de moins de 12 ans en Chine (Yao & Yang 2008).

Pourtant, en Suisse, une étude sur les infections invasives à pneumocoque chez l'enfant âgé de moins de 5 ans menée à Genève de 1988 à 2004, montre que le taux de bactériémies atteint 50% des cas (Myers & Gervais 2008).

Enfin, les infections à pneumocoques chez le nouveau né ou le jeune nourrisson, retrouvées dans notre étude dans 2 % des cas sont une réalité (Kago *et al.*, 1990 ; Zanelli *et al.*, 2000 ; Ashkenazi *et al.*, 2012). Kago *et al* (1990) étudient les méningites purulentes néonatales et trouvent que 18,75 % sont dues à *S.pneumoniae*. Dans l'étude d'Ashkenazi *et al.*(2012) , parmi 24 cas d'infections à pneumocoques observés chez le nourrisson, 50,5% sont des bactériémies et 25% sont des méningites.

Les publications françaises indiquent que les infections à pneumocoques prédominent à la saison froide, ceci probablement en fonction du recrutement en pneumopathies. Dans l'étude de Levy *et al.* (2009), 65,7 % des méningites à pneumocoques surviennent volontiers en période hivernale et 2,3 % en été.

Dans notre étude, les infections à pneumocoques surviennent tout au long de l'année avec un pic en décembre atteignant 17 %. Ceci est dû à notre recrutement limité en pneumopathies.

Quand à la répartition des infections à pneumocoques en fonction du sexe, nous retrouvons, une prédominance masculine dans beaucoup d'études avec 2 hommes pour 1 femme en général.

Dans l'étude de Bingen *et al.* (2008), étudiant les méningites à pneumocoques chez l'enfant, le sex-ratio garçon fille est de 1,3.

Verhaegen *et al.* (1990), trouvent que 60 % des infections à pneumocoques sont retrouvés chez des patients de sexe masculin.

Dans notre étude le sex-ratio est plus élevé avec 3 hommes pour 1 femme (2,8).

D'après Verhaegen *et al.* (1990), cette prédominance masculine est observée à tout âge, ce qui est le cas dans notre étude, chez l'adulte et chez l'enfant.

### **3. Place du pneumocoque dans les méningites**

Le profil bactériologique des méningites communautaires varie selon les régions, l'âge et en fonction de l'introduction ou non du vaccin anti *haemophilus influenzae* type b (*Hib*). La méningite bactérienne communautaire intéresse toutes les tranches d'âge mais les enfants sont les plus touchés.

Trois agents pathogènes dominant l'étiologie des méningites communautaires : *N.meningitidis*, *H.influenzae* b et *S.pneumoniae*.

L'épidémiologie des méningites bactériennes communautaires s'est modifiée au cours des 20 dernières années, le fait le plus marquant est la quasi disparition des méningites à *Hib* sous l'effet du vaccin conjugué anti *Hib* dans les années 90 aux USA et certains pays européens (Urwin *et al.*, 1994 ; Schuchat *et al.*, 1997). En effet aux USA, la fréquence des méningites à *Haemophilus* est réduite de 82 % chez l'enfant âgé de moins de 5 ans.

Parallèlement à cette décroissance, la fréquence de méningites à *S.pneumoniae* et à *N.meningitidis* a augmenté et a atteint plus de 90 % des cas de méningites communautaires (Dabernat *et al.*, 2000).

Aux USA dans l'étude de Thigpen *et al.* (2011), *S.pneumoniae* prédomine dans 58% des cas des méningites, alors qu'avant l'introduction du vaccin anti Hib, *Haemophilus influenzae* type b est le principal responsable de méningites purulentes, incriminé dans 48,3 % des cas de méningites bactériennes (Schlech *et al.*, 1985).

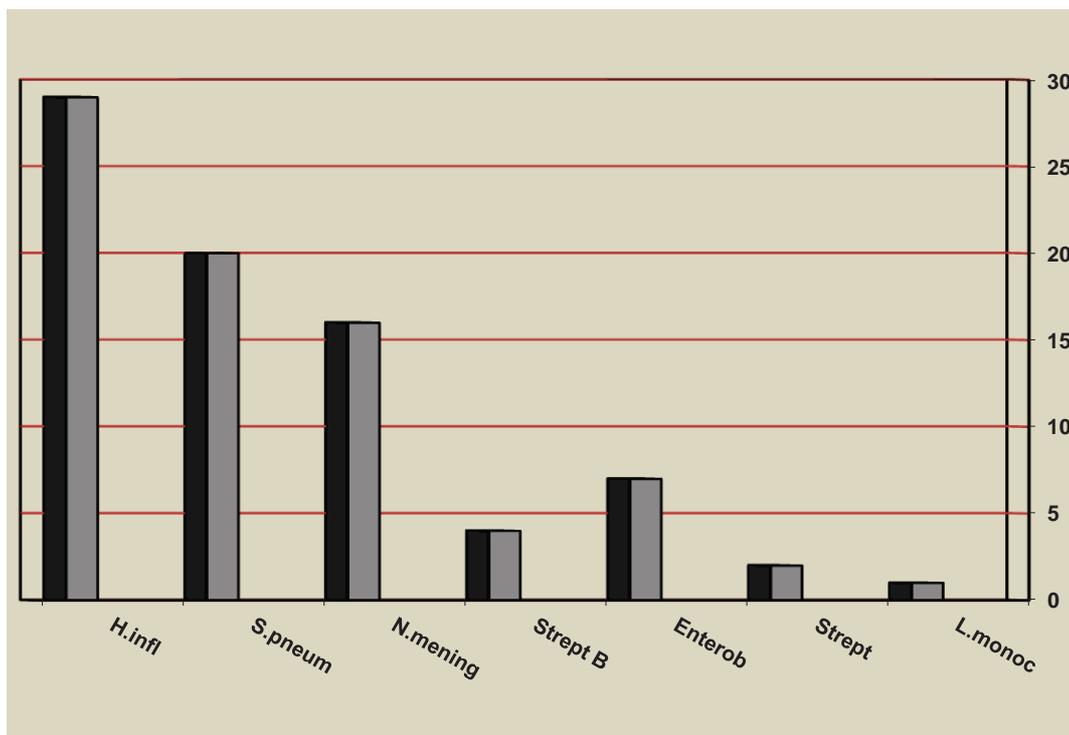
En Algérie, selon la réunion du consensus (RANC, 1998) le pneumocoque est en 2<sup>ème</sup> position chez le nourrisson et le grand enfant après *H.influenzae*. Dans l'étude de Ramdani- Bouguessa (2001) concernant les bactéries isolées dans les méningites chez les enfants de 0 à 16 ans recrutés au CHU de Béni-Messous entre 1995 et 2000, *H.influenzae* b vient en tête, dans 29% des cas suivi de *S.pneumoniae* et *N.meningitidis* dans 20% et 16% des cas respectivement (figure 53). Notons qu'en 2008, le calendrier national de vaccination a été élargi avec l'introduction d'un nouveau vaccin contre *Haemophilus influenzae* b en Algérie.

En Tunisie dans l'étude de Mezghani *et al.* (2006), parmi 224 cas de méningites communautaires de 1993 à 2001, *H.influenzae*, *S.pneumoniae* et *N.meningitidis* sont retrouvés dans respectivement 37,1 %, 32,1 % et 10,7 % des cas.

Au Togo, 258 méningites bactériennes sont diagnostiquées en 5 ans (1994 – 1999) et les principaux germes isolés sont : *S.pneumoniae* (59,7%), *H.influenzae* b (11,2 %) et *N.meningitidis* (9,3 %) (Dagnra *et al.*, 2000).

Au Cameroun aussi parmi 170 cas de méningites purulentes, *S.pneumoniae* est de loin la première cause de méningites bactériennes, responsable de 57,1 % des cas (Gervais *et al.*, 2012).

Alors qu'au Burkina Faso, à cause d'épidémies récurrentes de méningites bactériennes aiguës, *N.meningitidis* est responsable de 50% des cas suivi de *S.pneumoniae* (34%) et *H.influenzae* (15%) (Njanpop-Lafourcade *et al.*, 2005).



**Figure 53.** Place du pneumocoque dans les méningites bactériennes en Algérie (Ramdani-Bouguessa, 2001)

Dans notre étude, le pneumocoque occupe le 1<sup>er</sup> rang dans les méningites (27,67%) retrouvé autant chez l'enfant que chez l'adulte. Quant à *H.influenzae* type b, il est responsable de 9,9 % (27/271 cas dont 77,7 % sont observés avant 2008). Après 2008, on observe une diminution progressive des méningites dues à ce germe. Alors que les méningites à *N.meningitidis* sont rares (3 %) et aucun pic épidémique n'est observé durant notre période d'étude.

En France, une actualisation de l'épidémiologie des méningites bactériennes chez l'enfant et l'adulte est effectuée (Levy *et al.*, 2009 ; Varon, 2009). Chez l'enfant, *N.meningitidis* représente plus de la moitié des cas (53,7 %), suivie par *S.pneumoniae* (32,5 %), Streptocoque du groupe B (5,8 %) et *H.influenzae* b (3,2 %).

Les pathogènes impliqués dans les méningites chez l'adulte sont par ordre de fréquence : *S.pneumoniae*, *N.meningitidis* puis *Listeria*, Streptocoque du groupe B et *H.influenzae* b. Avec la généralisation du vaccin conjugué anti Hib pour les enfants de moins de 2 ans en 1992, les méningites à *H.influenzae* sont devenues peu fréquentes chez l'adulte.

Nous remarquons la place importante des Entérobactéries : la méningite néonatale dans notre étude est dominée par les Entérobactéries (25 %). Dans les pays en voie de développement, les Entérobactéries, dont *E.coli*, sont responsables de plus de 50 % des méningites néonatales (Lahbabi *et al.*, 1997 ; Thabet *et al.*, 2002)

Alors que dans les pays développés, le Streptocoque B suivi par *E.coli* sont les deux germes prédominants, retrouvés dans plus de la moitié des cas (Zanelli *et al.*, 2000 ; Heath *et al.*, 2003).

*Listeria*, responsable de 8 à 9 % des cas de méningites néonatales dans les pays développés (Aujardy, 2001) n'est qu'exceptionnellement en cause dans les pays en développement (Nel, 2000). Dans notre étude, un cas de méningite néonatale à *Listeria* est retrouvé.

Le streptocoque B est responsable de 7,01 % des cas de méningites (19 cas) tous observés chez l'enfant dont 47,36 % chez le nourrisson dans notre étude. En France, dans l'étude de Levy *et al.* (2009), le streptocoque B est incriminé dans 5,8 % des méningites chez l'enfant dont 49,4 % observés chez le nourrisson de moins de 2 mois.

Les méningites à *Acinetobacter* sont peu fréquentes : ce sont des agents fréquents des infections nosocomiales. Cependant ils sont impliqués dans les méningites nosocomiales et sont exceptionnellement source de méningites postopératoires en milieu neurochirurgical surtout *Acinetobacter baumannii*.

Dans notre étude, 15,49 % des cas de méningites sont causés par *Acinetobacter baumannii*. Parmi les 42 cas répertoriés, 45,23 % (19/42) sont observés au service de néonatalogie et 33,33 % au service de neurochirurgie.

### 4. Résistance aux antibiotiques

*S. pneumoniae* est resté uniformément sensible à la pénicilline pendant plus de 25 ans d'utilisation de cet antibiotique. Depuis la découverte des souches de Pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline aucun continent n'a été épargné.

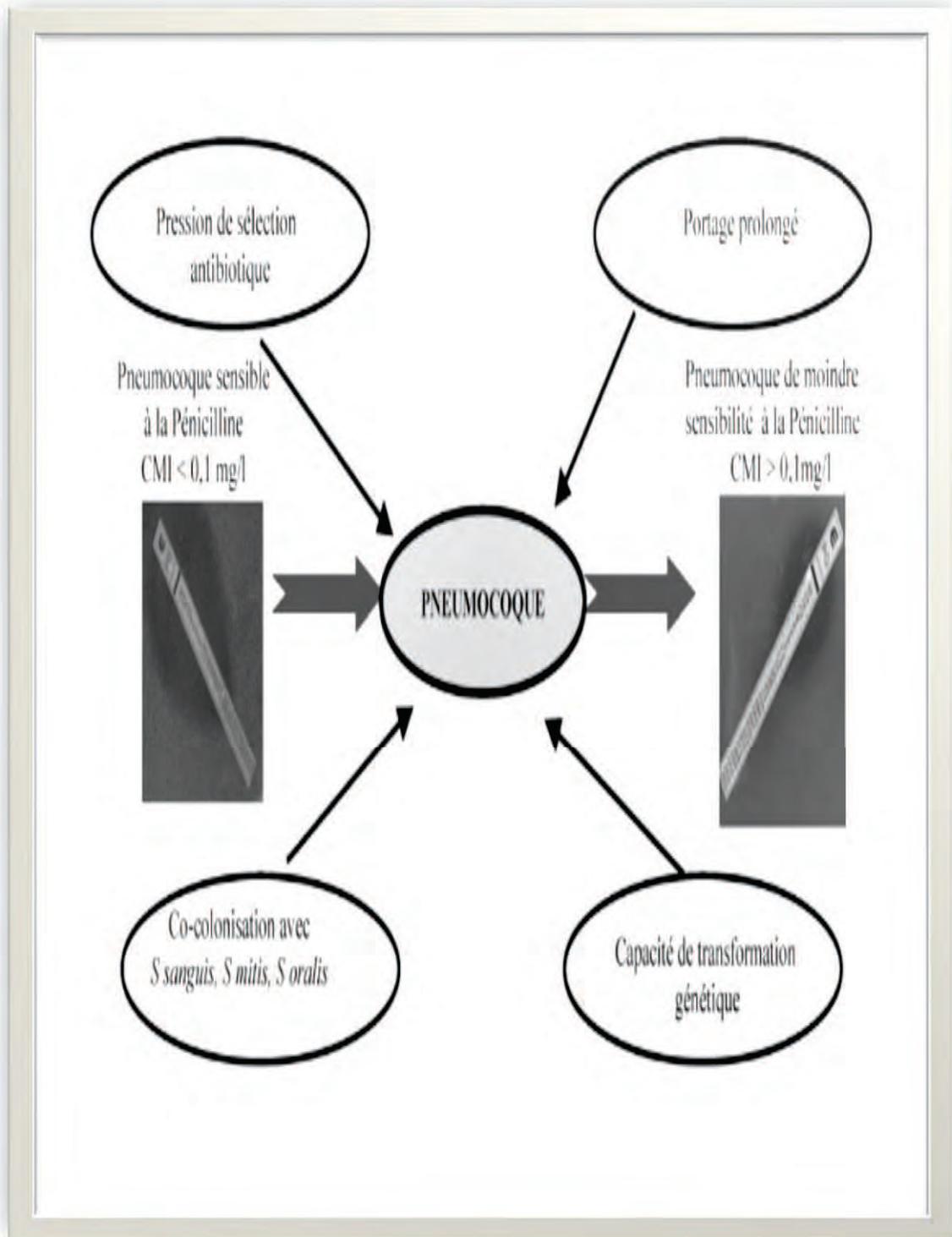
En France comme dans d'autres pays d'Europe et partout dans le monde, le pourcentage de souches de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline a très fortement augmenté en 15 ans. Ceci est en partie dû à la pression de sélection antibiotique ainsi qu'au portage prolongé (figure 54). Cette résistance à la pénicilline est associée à d'autres résistances, érythromycine, cotrimoxazole, tétracycline, ... faisant du pneumocoque une des principales bactéries multirésistante responsable d'infections communautaires (Felmingham *et al.*, 2002).

La résistance du pneumocoque aux antibiotiques varie dans le temps en fonction de plusieurs paramètres : la région, l'âge, la distribution des sérotypes et la source de prélèvement. Toutefois, la diffusion des pneumocoques résistants est une situation préoccupante dans le monde, motivant la réalisation d'enquêtes épidémiologiques aussi bien au niveau régional, qu'au niveau national et international.

L'augmentation des taux de résistance est le plus souvent engendrée par l'utilisation irrationnelle des antibiotiques (Bronzwaer *et al.*, 2002 ; van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008), Malgré cela, peu d'études sont faites en Algérie sur les pneumocoques responsables d'infections invasives, leur résistance aux antibiotiques et la distribution des sérotypes.

Il existe de grandes variations dans la répartition spatiale et temporelle des souches de sensibilité diminuées à la pénicilline dans le monde.

Dans cette présente étude, le taux de PSDP est très élevé, et atteint 57 % quand les normes du CLSI 2007 sont adoptées (CLSI, 2007). Le taux des souches intermédiaires est de 46 % et celui des souches résistantes est de 11 %. Notons que si on se réfère aux nouvelles normes du CLSI 2011, les chiffres concernant la résistance à la pénicilline dans les méningites seront à la hausse (CLSI, 2011). Le taux des souches résistantes est de 48 % et aucune souche ne présente de sensibilité diminuée à cet antibiotique.



**Figure 54.** Facteurs favorisant l'émergence de la résistance à la pénicilline (Bingen, 2002)

L'application du nouveau Break-point augmente les taux de résistance à la pénicilline dans les méningites par rapport aux autres infections. Aux USA, l'adoption du Break-point post 2008 a généré l'augmentation des taux de souches résistantes de 10,7 % à 27,5 % dans les méningites. Toutefois selon les nouvelles normes du Break-point dans les infections autres que les méningites, toutes les souches deviennent sensibles à la pénicilline alors que la majorité exprimait une résistance intermédiaire (CDC, 2008b).

Ce pourcentage de PSDP place l'Algérie, parmi les pays où les taux de résistance à la pénicilline sont les plus élevés. On ne peut pas comparer nos résultats avec ceux retrouvés dans d'autres études algériennes car les critères sont différents. On peut néanmoins observer, qu'en général, le taux de PSDP est en augmentation dans notre pays. Des études rapportent des taux de PSDP inférieurs à ceux retrouvés dans notre étude. Ces taux sont de 12,5 % (toutes infections confondues) en 1994 (Smati *et al.*, 1994) et de 44 % (dans les méningites) en 2007 – 2008 (10ème Rapport d'évaluation du réseau de surveillance de la résistance aux antibiotiques) (tableau 40).

Dans le reste du monde, la fréquence des PSDP varie d'un pays à l'autre (figure 55). Song *et al.* (2004a) démontrent dans leur étude, qu'en Asie, les plus hauts pourcentages de résistance à la pénicilline sont observés. Ils sont de 71,4 % au Vietnam, de 68,8 % en Thaïlande et de 54,8 % en Corée.

Aux Etats-Unis, dans l'étude PROTECT US entre 2001 et 2003 rassemblant 247 centres, le taux de PSDP a atteint 22,5 % (Jenkins *et al.*, 2005).

Le programme de surveillance de la résistance aux antibiotiques SENTRY en 2003, donne des taux de 14,7 %, 12,7 % et 15,9 % de PSDP en Amérique du Nord, Amérique Latine et Europe (Johnson *et al.*, 2006). Alors qu'une étude récente en Amérique Latine présentant le taux de PSDP dans 11 pays le chiffre à 51,6% (Jones *et al.*, 2013). Des taux de PSDP de 25 à 50% sont rapportés en Espagne, France, Grèce, et Israël, 10 à 25% au Portugal, Irlande, Finlande et Turquie, 5 à 10% en Italie, et 1 à 5% en Grande Bretagne, Australie, Norvège et Suède (Reinert, 2009).

En Afrique aussi, la fréquence de PSDP varie d'un pays à l'autre. Des taux très bas (0%) sont observés au Kenya, Ouganda, Tanzanie et Ethiopie (Mudhune & Wamae, 2009), des taux de 0,5 %, 12% et 27,3% sont rapportés en Afrique du Sud (Silberbauer *et al.*, 2011), au Ghana (Holliman *et al.*, 2007) et au Sénégal (Manga *et al.*, 2008).

**Tableau 40.** Evolution de la résistance du pneumocoque à la pénicilline en Algérie

---

Année	1994	1996-2001	2003-2004	2007-2008
	(1)	(2)	(3)	(4)
Age	Enfants et Adultes	Enfants	Enfants et Adultes	Enfants et Adultes
Infection	Invasives	Invasives	Bactériémies	Méningites
% PSDP	12,5%	38%	44%	43,9%

---

(1) Smati *et al.*, 1994, (2) Ramdani-Bouguessa & Rahal, 2003, (3) Borg *et al.*, 2009, (4) 10ème Rapport d'évaluation du réseau de surveillance de la résistance aux antibiotiques (2007-2008)

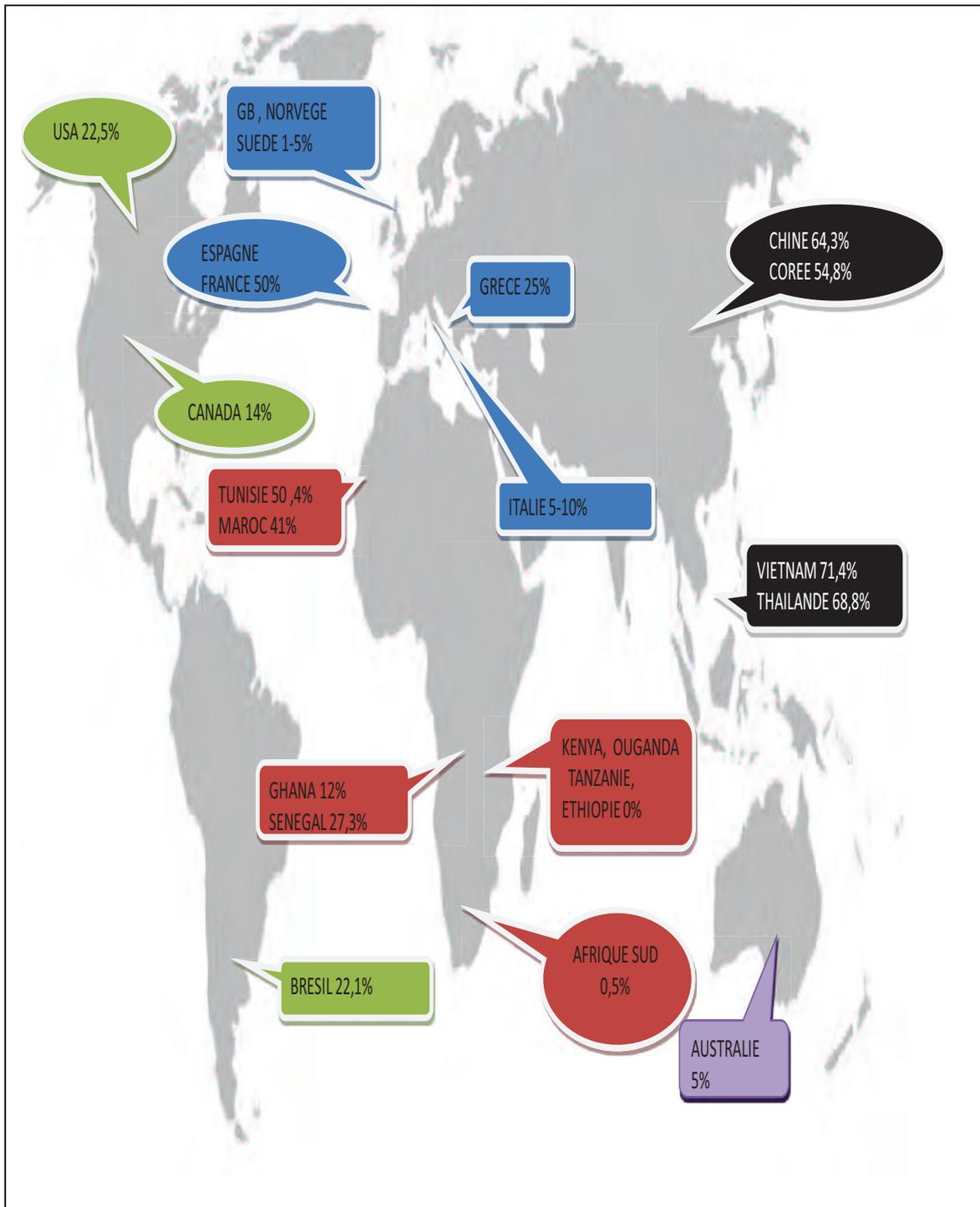
Alors que dans les pays avoisinants comme la Tunisie et le Maroc, les taux de PSDP rejoignent celui retrouvé dans notre étude. D'après les chiffres rapportés par Smaoui *et al.* (2009) dans une étude effectuée en Tunisie durant la période 1998 – 2004, le taux des PSDP atteint 50,4 % dans les infections invasives chez l'enfant. Charfi *et al.* (2012) ainsi que Rachdi *et al.* (2011) rapportent des taux élevés de PSDP de 44,5 % et de 48,5 % respectivement dans les infections invasives à pneumocoques chez l'enfant et l'adulte.

Les taux de PSDP au Maroc sont en nette évolution, dans l'étude d'Elmdaghri *et al.* (2012), le taux de PSDP est de 12,5 % entre 1994 et 1997 et atteint 41 % en 2008. Benbachir et al (2012) rapportent un taux de 15,6 % entre 1998 et 2001. Cette fréquence atteint 24,8 % entre 2006 et 2008. On note l'importance des disparités géographiques qui peuvent exister au sein d'un même pays.

Notons par ailleurs, que malgré l'augmentation des taux de PSDP partout dans le monde, les niveaux de résistance à la pénicilline ne sont pas alarmants. Ainsi, comme dans notre étude, les CMI à la pénicilline ne sont pas supérieures à 4 µg/ml. Les souches ayant des CMI supérieures à 8µg/ml sont exceptionnelles (Chardon, 2008).

Quand à la fréquence des souches de sensibilité diminuée aux autres bêta-lactamines, elle est élevée dans notre étude par rapport aux études antérieures faites en Algérie : elle est de 9 % pour l'amoxicilline (2 % de souches résistantes) et de 8 % pour le céfotaxime sans haut niveau de résistance. Dans deux études algériennes, nous observons l'absence de sensibilité diminuée à l'amoxicilline et au céfotaxime dans la première (Ramdani-Bouguessa & Rahal, 2003). La fréquence de sensibilité diminuée au cefotaxime atteint 4,2 % dans les méningites avec 2,7 % de résistance dans l'étude de Tali-maamar *et al.* (2012).

En Tunisie, dans les infections invasives de l'enfant, 11,4 % et 5,7 % des souches sont respectivement de sensibilité diminuée à l'amoxicilline et au céfotaxime (Smaoui *et al.*, 2009)



**Figure 55.** Fréquence de *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline dans le monde

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *S.pneumoniae* aux antibiotiques dans 8 pays Européens indique que la fréquence de résistance au céfotaxime ne dépasse pas 5,1 % (Reinert *et al.*, 2005a).

En France, on remarque les plus hauts taux de résistance à l'amoxicilline et au céfotaxime. En 2009, malgré l'introduction du PCV7, on compte 16 % de souches de sensibilité diminuée (CMI > 0,5 µg/ml), 0,6 % de souches résistantes (CMI > 2 µg/ml) à l'amoxicilline, et 8 % de souches de sensibilité diminuée au céfotaxime (CMI > 0,5 µg/ml) dont une seule résistante (CMI > 2 µg/ml) (Varon, 2012).

Les CMI des différentes bêta-lactamines augmentent de façon imprévisible. En général certaines bêta-lactamines sont aussi actives ou légèrement plus actives que la pénicilline (l'amoxicilline, le céfotaxime, la ceftriaxone, le cefepime, l'imipenème, ...) (Goldstein, 1997).

L'isolement de souches sensibles à l'amoxicilline et résistantes au céfotaxime est également exceptionnel, une telle souche est rapportée en France (Caen) en 1997 isolée de LCR avec une CMI au céfotaxime égale à 4 µg/ml (Vergnaud *et al.*, 2000). Il faut souligner l'absence d'isolement de souches de haut niveau de résistance à l'amoxicilline ou au céfotaxime d'où le maintien de l'indication du céfotaxime en première intention dans les méningites à pneumocoque. Les CMI doivent être mesurées en cas d'infection sévère ou d'échec clinique.

Notons par ailleurs qu'il y a une différence significative de la résistance à la pénicilline dans les 2 groupes d'âge : enfants et adultes ( $P < 0,001$ , test du  $\chi^2$ ) dans notre étude plus élevée chez l'enfant. La fréquence des PSDP est plus élevée chez l'enfant dans d'autres études (Hoban *et al.*, 2005 ; Kempf *et al.*, 2011 ; Varon, 2011 ; Benbachir *et al.*, 2012) surtout dans les méningites. En France, en 2009, parmi les souches isolées de méningites, la proportion de souches de sensibilité diminuée aux bêta-lactamines est aussi plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte. Parmi les souches isolées chez l'enfant, le pourcentage de sensibilité diminuée atteint 35% pour la pénicilline, il est de 28% chez l'adulte. La prévalence de la résistance est plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte ce qui s'explique par différents facteurs, comme le portage de pneumocoque plus fréquent et prolongé dans l'enfance, une consommation d'antibiotiques plus importante dans cette tranche d'âge (en

moyenne 3 cures d'antibiotiques par an) et la susceptibilité supérieure aux infections virales.

Parmi les bêta-lactamines, l'imipénème reste une molécule très active, aucune souche résistante n'est isolée dans notre étude. Cet antibiotique n'est plus utilisé dans les méningites à cause de ses propriétés proconvulsivantes (Wolff *et al.*, 2009).

La fréquence des souches érythromycine- résistantes est de 22% dans notre étude, elle est plus élevée dans l'étude de Tali-Maamar *et al.* (2012) (33%), ceci est probablement dû aux critères différents et au fait que le taux de résistance aux macrolides est plus élevé dans les infections non-invasives). Le taux de résistance aux macrolides rapporté en 1994 est de 16% (Smati *et al.*, 1994).

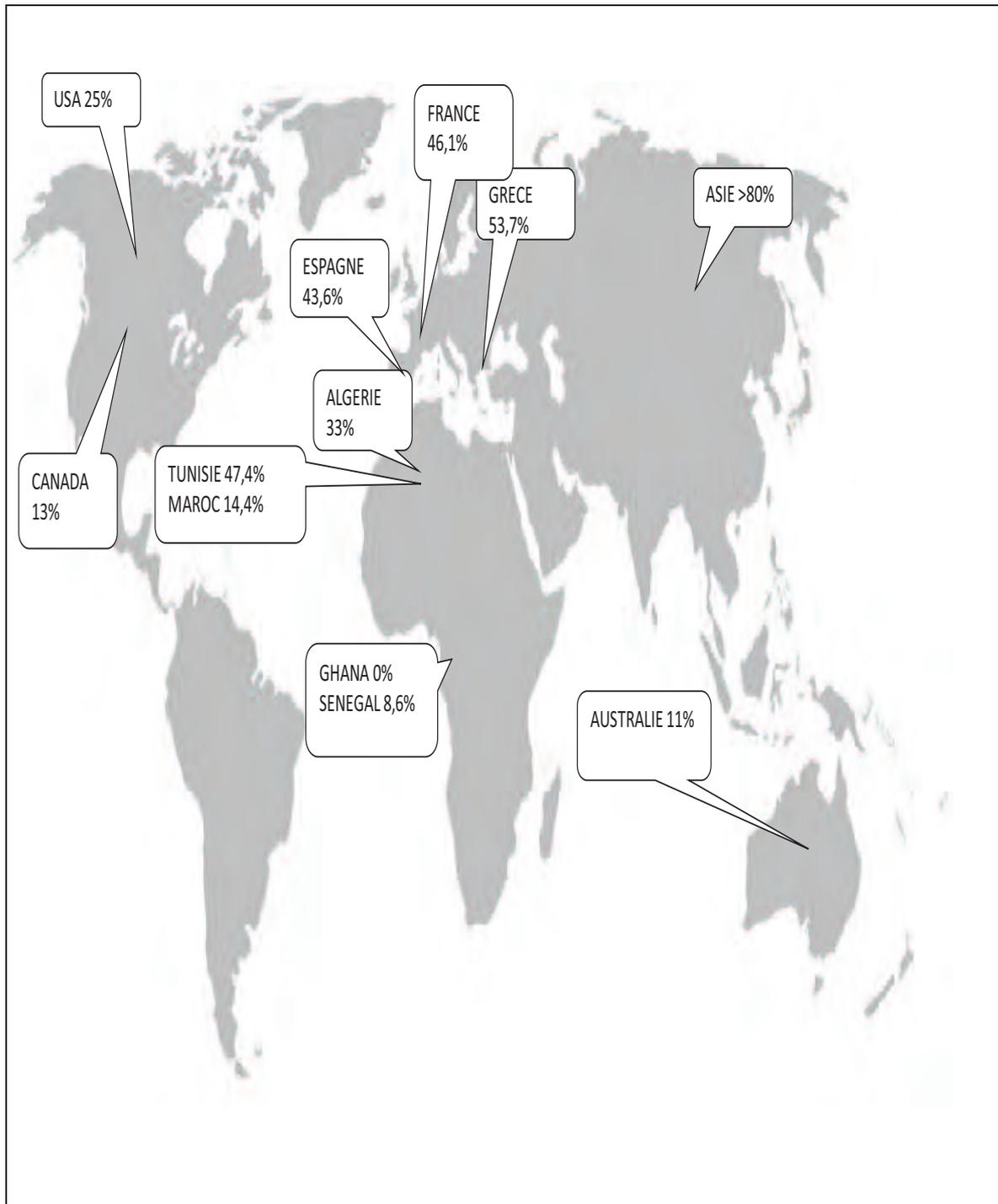
Les taux de résistance aux macrolides ont augmenté dans le monde entier, mais ils varient beaucoup d'un pays à l'autre (figure 56). Cette augmentation est due à la surconsommation de ces molécules dans les infections respiratoires (Hyde *et al.*, 2001; Dias & Canica, 2004).

En Afrique, des taux variables de 0%, 8,6 % et 47,4 % sont rapportés au Ghana, au Sénégal et en Tunisie (Holliman *et al.*, 2007; Ndiaye *et al.*, 2009; Rachdi *et al.*, 2011). Au Maroc également, on note une évolution de la résistance aux macrolides (9.4% en 1998-2001, 12.2% en 2002-2005 et 14.4% en 2006-2008) (Benbachir *et al.*, 2012).

De nombreux pays d'Asie rapportent des taux très élevés de résistance aux macrolides (> 80%) (Song *et al.*, 2004a, 2004b). Cette augmentation est principalement due à l'utilisation répandue de ces molécules, principalement l'azithromycine dans les infections respiratoires.

En Europe, le pourcentage de souches non sensibles à l'érythromycine dans les infections invasives a augmenté pendant la période 2000 – 2005 en Hongrie, Finlande, Pays Bas (Reinert *et al.*, 2005b ; van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008), Belgique (Van Eldere *et al.*, 2007) et Allemagne (Imohl *et al.*, 2010). Les taux les plus élevés sont observés en Espagne, en France et en Grèce (43.6% ,46.1% et 53,7%) (Reinert *et al.*, 2005b , Daikosa *et al.*, 2008) .

En Australie, le taux de résistance aux macrolides augmente de 3,5% en 2000 à 11% en 2008 (Hoenigl *et al.*, 2010).



**Figure 56.** Résistance de *S.pneumoniae* aux macrolides dans le monde

Aux USA, le taux de résistance à l'érythromycine est de 15% en 1998 et atteint 25% en 2000 (Whitney *et al.*, 2000).

Une étude de cohortes au Canada, montre que le taux de résistance aux macrolides augmente de 4,6% à 13,3% (1995-2002) (Van der kooi *et al.*, 2005).

Concernant la résistance aux autres antibiotiques les taux de résistance à la tétracycline et au cotrimoxazole sont respectivement de 20 % et 51 % dans notre étude.

Des taux de 30 % et 43 % sont observés dans une récente étude algérienne (Tali-Maamar *et al.*, 2012) alors que des taux de résistance à ces deux antibiotiques, très bas sont rapportés en 1994 (14 % et 8 %) (Smati *et al.*, 1994). Cependant, des taux très élevés sont rapportés en Afrique et en Asie (Holliman *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2008 ; Zhou *et al.* 2011 ; Charfi *et al.*, 2012 ; Thomas *et al.*, 2013), comme au Ghana (85 %, 63 %) même si ces deux antibiotiques ne sont plus utilisés dans le traitement des infections respiratoires dans ce pays (Holliman *et al.*, 2007). Le taux de résistance au cotrimoxazole est élevé dans notre étude. Pourtant cet antibiotique n'est pas délivré sans ordonnance et est utilisé en 2<sup>ème</sup> intention dans le traitement des pneumopathies bactériennes aiguës après un échec à l'amoxicilline. En Inde, des taux de résistance supérieurs à 85% sont observés, ceci est peut être dû à l'utilisation de cet antibiotique dans le traitement des pneumonies (Thomas *et al.*, 2013).

Dans notre étude, aucune souche n'est résistante au chloramphénicol. Cet antibiotique est rarement utilisé de nos jours. Pourtant des taux de résistance à cet antibiotique de 5,8 %, 8,1 % et 14,4 % sont observés en Algérie, Maroc et Tunisie (Tali-Maamar *et al.*, 2012 ; Elmdaghri *et al.*, 2012 ; Smaoui *et al.*, 2009) pour atteindre 68,2 % au Sénégal où le chloramphénicol est plus fréquemment utilisé (Manga *et al.*, 2008).

La vancomycine et la levofloxacin montrent 100 % d'efficacité dans notre étude. La vancomycine n'est pas recommandée en monothérapie dans les méningites et les fluoroquinolones sont rarement utilisés dans le traitement des pneumopathies communautaires en Algérie. Ces deux molécules peuvent être utilisées comme alternatives dans les infections à pneumocoques multirésistants, mais l'utilisation des fluoroquinolones pourrait causer la sélection de clones résistants à ces antibiotiques dès leur utilisation, situation observée à Hong-Kong (Ho *et al.*, 2004). D'un autre côté, l'utilisation de ces

antibiotiques pourrait entraîner la sélection de bacilles tuberculeux résistants, situation observée en Afrique du sud (Wolter *et al.*, 2009).

La résistance aux fluoroquinolones anti-pneumococciques est inférieure à 5 % en Europe et en Amérique du Nord mais peut être plus élevée (jusqu'à 11,8 %) dans certains pays d'Asie (Pletz *et al.*, 2004 ; Song *et al.*, 2004a ; Reinert *et al.*, 2005a, Adam *et al.*, 2009 ).

Aux USA, Davies *et al.* (2008) rapportent une augmentation constante de la proportion de la résistance aux fluoroquinolones entre 1999 et 2004. Pletz *et al.* (2004) rapportent aussi une augmentation du taux de résistance à la lévofloxacine de 0,1 % en 1998 à 0,6 % en 2001.

En France, la résistance aux fluoroquinolones anti-pneumococciques n'a pas évolué de façon significative. Depuis 2001, le taux reste faible de l'ordre de 1 % en 2009, essentiellement retrouvé parmi les souches isolées chez les adultes (Varon, 2012).

Le taux des souches de pneumocoques multirésistantes est bas dans notre étude (20%) comparé à celui retrouvé en Asie, supérieur à 71,4% (Lee *et al.*, 2010) avec des variations entre les pays.

Au Maroc, le taux de multirésistance étant de 0% en 1998 – 2001 a augmenté à 7,7% en 2006 – 2008 (Benbachir *et al.*, 2012).

Le taux de multirésistance concernant les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline est faible (33,33%) dans notre étude. Alors que la résistance à la pénicilline est un excellent marqueur pour la détection de souches multirésistantes.

En général la résistance à la pénicilline est fortement corrélée à la résistance à d'autres antibiotiques, surtout aux macrolides. Ce qui n'est pas évident dans notre étude, où parmi les PSDP, 57,89% sont résistants au cotrimoxazole, 28,07% à l'érythromycine et 26,31% à la tétracycline.

Dans l'étude de Rachdi *et al* (2011), parmi les PSDP, 17,2% sont résistants au chloramphénicol, 41,4% à la tétracycline, 55,2% au cotrimoxazole et 75,8% à l'érythromycine versus 14,4%, 6,2%, 4,2% et 47,4% respectivement chez les souches sensibles. Dans une étude chinoise, parmi les PSDP, 90% des souches sont résistantes à l'érythromycine et à la tétracycline, et 82,5% au cotrimoxazole (Liu *et al.*, 2008). Ces taux

de résistance sont observés dans l'ensemble des souches invasives et non invasives, les taux de résistance les plus élevés sont observés dans les infections non invasives comme les OMA.

### **5. Répartition des sérotypes**

Les fluctuations des sérotypes responsables d'infections invasives à pneumocoques se produisent au fil du temps. La distribution des sérotypes varie avec l'âge, la région et l'introduction ou non du PCV7 (Karstaedt *et al.*, 2000 ; Weinberger *et al.*, 2011; Mehr & Wood, 2012).

Dans notre étude, les sérotypes les plus fréquemment rencontrés sont les 14, 19F, 23F et 6B. On ne peut pas comparer nos résultats à ceux retrouvés dans de précédentes études algériennes, car les critères sont différents, mais on peut dire que, globalement, il ya un changement dans la répartition des sérotypes entre les deux périodes (1996-2000, 2001-2010). Durant la première période, les sérotypes 1 et 5 sont les plus fréquents chez l'adulte et l'enfant, la rareté des sérotypes 19 et 23 est observée (Ramdani-Bouguessa & Rahal, 2003). Alors que durant la deuxième étude, les sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans l'infection invasive de l'enfant âgé de moins de 5 ans sont les 14, 23F, 19F, 6B et 1. Les taux des sérotypes 19A, 6A et 7F sont très faibles (Tali-Maamar *et al.*, 2012).

Nos résultats rejoignent ceux retrouvés dans la plupart des pays avant l'introduction du vaccin conjugué. Reinert *et al.* (2010) ainsi que Johnson *et al.* (2010) présentent globalement la distribution des sérotypes responsables d'infections invasives dans le monde. Sept sérotypes sont représentés : il s'agit des sérotypes 1, 5, 6A, 6B, 14, 19F et 23F : les sérotypes 1, 5, 6A/B et 14 sont les plus fréquents dans beaucoup de pays particulièrement dans les pays développés (figure 57).

En Tunisie, les sérotypes les plus fréquents dans l'infection invasive dans l'étude de Rachdi *et al.* (2011) sont les 19F, 6B, 23F et 14.

Une étude marocaine décrit l'évolution dans le temps de la distribution des sérotypes responsables d'infections invasives chez l'enfant âgé de moins de 5 ans durant 2 périodes : 1994 – 2001 et 2006 – 2010. Les sérotypes 5, 7, 1, 14, 6, 23 et 19 sont les plus fréquents durant la première période, alors que durant la deuxième période, nous observons la prédominance des sérotypes 19F, 14, 6, 23F, 5 et 1 (Elmdaghri *et al.*, 2012). Alors qu'au

Ghana (Holliman *et al.*, 2007) et au Mozambique (Valles *et al.*, 2006), le sérotype 1 est le plus fréquent chez l'enfant et l'adulte dans les infections invasives.

Au Bangladesh, les sérotypes qui prédominent dans les infections invasives chez l'enfant âgé de moins de 5 ans sont les 2, 1, 14, 5, 7F. Le sérotype 2, représenté dans 25% dans les méningites (Saha *et al.*, 2009). Le sérotype 6B représente 40% des cas de méningites chez l'enfant âgé de moins de 5 ans en Ouganda (Kisakye *et al.*, 2009).

En Afrique du Sud, les sérotypes associés aux infections invasives sont les 1, 2, 3, 4, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F (Karstaedt *et al.*, 2000 ; Hausdorff *et al.*, 2005).

En Europe, dans l'étude danoise de Ingels *et al.* (2012) les infections invasives sont causées par les sérotypes 1, 14, 4, 7F, 6B tout âge confondu, les sérotypes 14 et 6B sont observés le plus chez l'enfant âgé de moins de 5 ans.

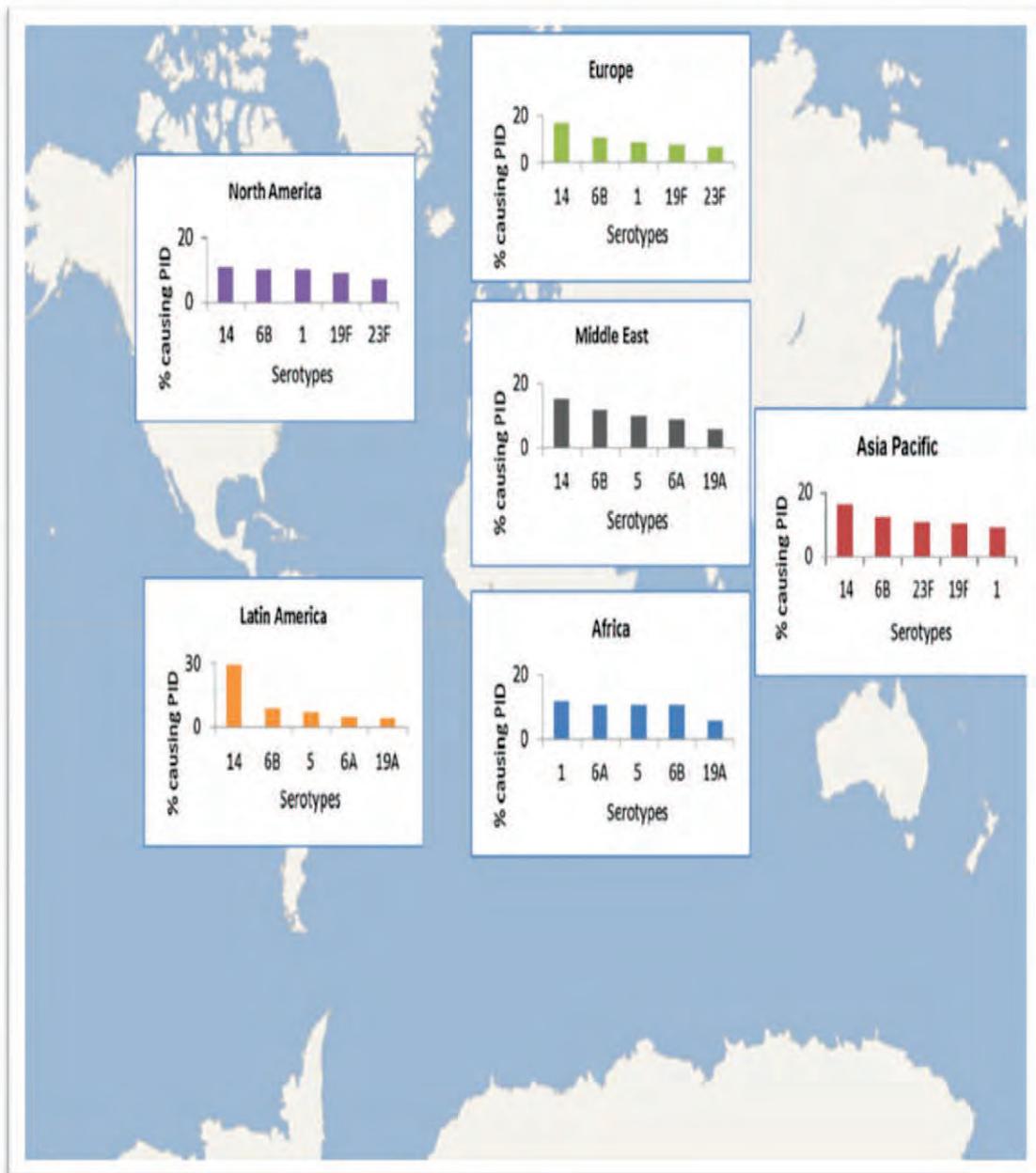
En Belgique, chez les patients atteints de pneumopathies à pneumocoques, tout âge confondu, les sérotypes prédominants sont les 19, 3 et 1 (Lismond *et al.*, 2012).

En Asie le sérotype 19F prédomine dans les infections invasives (méningites et pneumopathies) chez l'enfant et l'adulte (Yang *et al.*, 2008 ; Song *et al.*, 2012).

Au Canada (Tyrrell *et al.*, 2009), au Brésil (de O Menezes *et al.*, 2011) , en Allemagne (Imohl *et al.*, 2009), ainsi qu'en Péninsule arabique et en Egypte (Shibl *et al.*, 2009), le sérotype 14 est le plus fréquemment rencontré.

Le sérotype 6B, comme il est rapporté dans l'étude d'Alanee *et al.* (2007) est associé à l'infection invasive, il est retrouvé en tête en Espagne (Garcia-Suarez *et al.*, 2006).

Alors qu'en Arabie Saoudite, dans les infections invasives chez l'enfant de moins de 5 ans, les sérotypes 23F, 19F, 6B, 5 et 1 prédominent (Shibl *et al.*, 2012).



**Figure 57.** Les cinq sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans les infections invasives par continent (Amérique du Nord et Amérique Latine, Europe, Afrique, Asie, Moyen Orient) (Reinert *et al.*, 2010)

La répartition des sérotypes de pneumocoques varie en fonction de la nature de l'infection et de l'âge. Dans notre étude, le sérotype 14 est, en général, le plus fréquent dans les infections invasives. Le sérotype 14 est le plus fréquent parmi les souches invasives en Tunisie (Smaoui *et al.*, 2009), comme aux Etats-Unis, en France et en Grande Bretagne (Clarke *et al.*, 2004 ; Farrell *et al.*, 2004a ; Foster *et al.*, 2008). Dans notre étude, pour les sérotypes les plus fréquents, le sérotype 14 est retrouvé autant dans les méningites (20,58%) que dans les pneumopathies (22,22%), un peu moins dans les bactériémies (16,66%). Le sérotype 19F est plus fréquent dans les pneumopathies (22,22%) alors que pour les sérotypes 23F et 6B, ils ne sont retrouvés que dans les méningites. Dans l'étude de Kempf *et al.* (2011), le sérotype 19F prédomine dans les pneumopathies. Les sérotypes 1 et 19F sont retrouvés avec une fréquence similaire (23%) dans les bactériémies. Le sérotype 14 prédomine dans les méningites dans l'étude de de O Menezes *et al.* (2011), alors qu'il est plus fréquent dans les bactériémies dans l'étude de Chardon *et al.* (2002) (tableau 41).

En fonction de l'âge, les sérotypes 14 et 23F sont plus fréquents chez l'enfant et il ne semble pas y avoir de différence entre les deux groupes d'âge pour les sérotypes 6B et 19F dans notre étude. Les sérotypes 1 et 3 sont plus fréquents chez l'adulte.

En Europe, la répartition des sérotypes en fonction de l'âge est différente d'un pays à l'autre.

Dans l'étude de Gratten *et al.* (1998) les serotypes 6A/ 6B, 14, 18C, et 19F sont plus fréquents chez l'enfant et les sérotypes 3, 4, 7F, 9V et 23F sont plutôt des sérotypes d'adulte.

Les sérotypes 6B, 23F, 19F et 14 sont associés à l'enfant et les sérotypes 3, 14, 1, 8 et 4 sont plus fréquents chez l'adulte dans une étude portugaise (Serrano *et al.*, 2004)

Au Canada, chez l'enfant et l'adolescent, les serotypes 14, 19, 18, 6,9, et 4, représentent 80,7% des infections invasives. Les serotypes 4, 3, 9, 6, et 8, sont les plus fréquents chez l'adulte (Jette & Lamothe, 1989).

Alors qu'en Asie, le sérotype 1 est le plus fréquemment rencontré dans l'infection invasive et est retrouvé autant chez l'enfant que chez l'adulte, suivi des serotypes 6B et 23F chez l'enfant et le serotype 19F chez l'adulte (Rohani *et al.*, 1999) (tableau 42).

**Tableau 41.** Répartition des sérotypes en fonction de l'infection

	Méningites	Pneumopathies	Bactériémies
<b>Notre étude</b>	14	14	
	6B, 23F	19F	
<b>Algérie</b>	1		
Smati <i>et al.</i> (1994)			
<b>Algérie</b>	14		
Randani-Bouguessa & Rahal (2003)			
<b>Algérie</b>			
Tali.Maamar <i>et al.</i> (2012)	14, 23F		23F
<b>Tunisie</b>	14		14
Smaoui <i>et al.</i> (2009)			
<b>USA</b>	14		14
Farrell <i>et al.</i> (2004a)			
<b>France</b>	14	19F	14
Kempf <i>et al.</i> (2008)			
<b>Grande-Bretagne</b>	14		14
Foster <i>et al.</i> (2008)			
<b>Brésil</b>	14		
de O Menezes <i>et al.</i> (2011)			

**Tableau 42.** Répartition des sérotypes en fonction de l'âge

	Enfant	Adulte
<b>Notre étude</b>	14 et 23F	1 et 3
		19F et 6B
<b>Portugal</b> Serrano <i>et al.</i> (2004)	6B, 23F, 19F, 14	3, 14, 1, 4
<b>Canada</b> Jette & Lalothe (1989)	14, 19F, 6B	4, 3
<b>Malaisie</b> Rohani <i>et al.</i> (1999)	1	1
	6B et 23F	19F

### 5. Sérotype - Résistance

Dans notre étude, une corrélation entre sérotypes et résistance est observée. Les 4 sérotypes les plus fréquemment rencontrés (14, 19F, 23F et 6B) sont les plus résistants et ce sont les sérotypes les plus observés parmi les PSDP. Les taux de résistance les plus élevés ont tendance à se produire dans les sérotypes les plus fréquents, surtout pour la pénicilline.

Concernant la sensibilité diminuée à la pénicilline, en Algérie, dans les infections invasives chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, les sérotypes 14, 23F et 19F sont les plus fréquents parmi les PSDP car les plus fréquemment rencontrés (Tali-Maamar *et al.*, 2012).

En Tunisie, les 5 sérotypes qui prédominent dans les infections invasives sont associés à la sensibilité diminuée à la pénicilline (73,5% de PSDP pour le sérotype 19F et 44,4% de PSDP pour le sérotype 6B) (Rachdi *et al.*, 2011).

En Ouganda, les sérotypes prédominants dans les méningites chez l'enfant de moins de 5 ans sont les 6A et 6B, et le sérotype 6B est fréquent dans les PSDP (Kisakye *et al.*, 2009).

Pourtant au Ghana, le sérotype 1 est le plus fréquemment rencontré dans les infections invasives mais la sensibilité diminuée à la pénicilline semble associée au sérotype 14 (Holliman *et al.*, 2007).

En Asie où le taux de résistance sont les plus élevés, les sérotypes les plus fréquemment rencontrés (23F, 19F, 6B et 14) présentent 71,3% de multi résistance à Taiwan (Lauderdale *et al.*, 2006).

En Chine, les sérotypes 19F, 23F et 14, sérotypes les plus fréquemment rencontrés et responsables de pneumopathies chez l'enfant présentent des taux élevés de multirésistance (96,2%, 92,3% et 15,4% respectivement) (Zhou *et al.*, 2011).

Au Brésil, parmi les sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans les méningites de l'adulte et l'enfant (14, 3, 23F, 19F, 6B), 94,3% sont des PSDP et le sérotype 14 présente 42% de PSDP (de O Menezes *et al.*, 2011).

En Australie, les sérotypes les plus fréquents, rencontrés au cours des infections invasives sont les 14, 19F, 6B et 18C et 40% des PSDP sont observés pour le sérotype 19F (Watson *et al.*, 2007) (tableau 43).

**Tableau 43.** Fréquence des sérotypes parmi les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline

	Sérotypes fréquents	Sérotypes PSDP
<b>Notre étude</b>	14, 19F, 23F et 6B	14, 19F, 23F et 6B (60,78%)
<b>Algérie</b>	14, 19F, 23F et 6B	14, 19F et 23F
Tali-Maamar <i>et al.</i> (2012)		
<b>Tunisie</b>	19F, 19A, 14, 23F et 6B	19F et 6B
Rachdi <i>et al.</i> (2011)		
<b>Ouganda</b>	6A et 6B	6B
Kisakye <i>et al.</i> (2009)		
<b>Ghana</b>	1	14
Holliman <i>et al.</i> (2007)		
<b>Brésil</b>	14, 3, 23F, 19F, 6B	14 ( 42%)
de O Menezes <i>et al.</i> (2011)		
<b>Australie</b>	14, 19F, 6B et 18C	19F (40%)
Watson <i>et al.</i> (2007)		

### **7. Mécanismes de résistance aux macrolides et relation sérotype-résistance aux macrolides**

Les mécanismes de résistance aux macrolides, sont étudiés et parmi 21 souches résistantes, le génotype *ermB* + *mefA* exprimant le phénotype MLS<sub>B</sub> est retrouvé dans 95,23% des souches testées dans notre étude.

Le mécanisme de résistance dû à une modification ribosomale par une méthylase (gène *ermB*) est le plus fréquemment rencontré dans beaucoup de pays européens comme l'Espagne, la France, la Grande Bretagne, la Bulgarie et la Hongrie (Marchandin *et al.*, 2001 ; Farrell *et al.*, 2008; Setchanova *et al.*, 2007 ; Dobay *et al.*, 2005 ; Calatayud *et al.*, 2010 ) sauf en Allemagne en Finlande et en Grèce où le second mécanisme lié à l'efflux codé par le gène *mefA* est dominant (Rantala *et al.*, 2005 ; Reinert *et al.*, 2005b ; Bley *et al.*, 2011).

En Asie, le gène impliqué souvent dans la résistance aux macrolides est le gène *ermB* représentant respectivement 60%, 64% et 95% des souches de sensibilité diminuée à l'érythromycine au Japon, en Corée et en Turquie (Gulay *et al.*, 2008 ; Ikenaga *et al.*, 2008 ; Bae & Leel., 2009).

En Australie aussi, le gène *ermB* est prédominant dans 60% alors que le gène *mef A* n'est retrouvé que dans 30% des cas (Xu *et al.*, 2010).

En Afrique, deux études menées en Afrique du Sud montrent que le gène *ermB* est responsable seul de 57% de résistance aux macrolides (McGee *et al.*, 2001b ; Wolter *et al.*, 2008).

Une étude effectuée par Rachdi *et al.* (2008) en Tunisie montre que parmi 100 souches résistantes à l'érythromycine, le gène *ermB* est impliqué dans 88% des cas alors que le gène *mef A* n'est exprimé que dans 12% des cas.

En Amérique du nord comme en Amérique Latine (Argentine), la situation semble différente. Le mécanisme dû à l'efflux exprimé par le gène *mef A* est le plus répandu (Johnston *et al.*, 1998 ; Shortridge *et al.*, 1999 ; Bonofiglio *et al.*, 2005 ; Rudolph *et al.*, 2013).

Notons que la résistance aux macrolides due à la présence des deux gènes erm B + mef A en même temps est observée dans la plupart des études précédentes, mais avec des taux moins élevés que celui retrouvé dans notre étude, comme l'étude de McGee *et al.* (2001a) menée en Afrique du Sud, présentant un taux assez élevé de 30,5%, alors que dans l'étude tunisienne de Rachdi *et al.* (2008), Ce taux est de 5% (tableau 44).

**Tableau 44.** Fréquence des gènes de résistance aux macrolides selon les données de la littérature

Pays	Ref	ermB	mefA	ermB + mefA
<b>Tunisie</b>	Rachdi <i>et al.</i> (2008)	83%	12%	5%
<b>Afrique du Sud</b>	McGee <i>et al.</i> (2001a)	56,8%	12,7%	30,5%
<b>France</b>	Marchandin <i>et al.</i> (2001)	96,25%	3,1%	0,6%
<b>Espagne</b>	de la Pedrosa <i>et al.</i> (2009)	74,3%	7,7%	17,9%
	Calatayud <i>et al.</i> (2007)	87,2%	12,8%	
<b>Corée</b>	Bae & Lee. (2008)	85,3%	14,7%	
<b>Australie</b>	Xu <i>et al.</i> (2010)	73%	27%	
<b>Allemagne</b>	Bley <i>et al.</i> (2011)	27%	57,7%	4, 1 %
<b>Argentine</b>	Bonofiglio <i>et al.</i> (2005)	21,05%	68,42%	
<b>Alaska</b>	Rudolph <i>et al.</i> (2013)	12%	77%	7%
<b>USA</b>	Shortridge <i>et al.</i> (1999)	32%	61%	

Concernant la relation sérotype – résistance aux macrolides le sérotype 19F est le plus fréquemment rencontré dans notre étude, retrouvé dans 35% des souches érythromycine résistantes, suivi des sérotypes 14, 6B et 19A. La prédominance du sérotype 19F chez les pneumocoques de sensibilité diminuée aux macrolides est observée dans beaucoup d'études menées en Europe, en Australie, en Afrique et en Asie (McGee *et al.*, 2001a ; Setchanova *et al.*, 2007; Bae & lee, 2009 ; Xu *et al.*, 2010).

Cependant dans certaines études, comme l'étude allemande de Bley *et al.* (2011) et l'étude espagnole de de la Pedrosa *et al.* (2009), le sérotype 14 est le plus fréquent.

En fait, la distribution des sérotypes semble dépendre de la distribution des mécanismes de résistance. La résistance aux macrolides de phénotype MLS<sub>B</sub> (gène ermB) est la plus souvent observée chez les pneumocoques de sérotypes 19F ou 14, alors que la résistance de phénotype M (gène mefA) est observée le plus dans le sérotype 14, quand à la résistance regroupant les 2 mécanismes de résistance (ermB + mefA), elle est associée aux sérotypes 19F et 23F.

Le gène mefA, souvent associé au sérotype 14, responsable de la dissémination du phénotype M et est issu de la dissémination du clone Anglais England<sup>15</sup> – 9 (Dias *et al.*, 2004).

La dissémination des souches résistantes aux macrolides portant les 2 gènes est causée par la dissémination des clones internationaux multirésistants Taiwan<sup>19F</sup> – 14, Taiwan<sup>23F</sup> – 15 et Spain<sup>23F</sup> – 1 (Farrell *et al.*, 2004b).

Dans notre étude, le mécanisme de résistance le plus fréquent (ermB+ mefA) est associée aux sérotypes 19F et 14 (sérotypes les plus fréquents), et aucune souche n'appartient au sérotype 23F. Le gène ermB seul, retrouvé 1 fois, est associé au sérotype 19F.

### **IMPACT DU PCV7**

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

### ***Impact du PCV7 sur l'épidémiologie des infections invasives à pneumocoques***

Dans les pays industrialisés comme en Europe et aux USA, l'arrivée des nouveaux vaccins conjugués a changé l'épidémiologie des infections invasives à pneumocoques (Pichon *et al.*, 2013). Avant l'introduction du PCV7, les données de Jefferson *et al.*, (2006) dans les méningites chez l'enfant, rapportent une incidence de 8,7/100 000 habitants des méningites à pneumocoque chez les enfants de moins de deux ans, avec des variations de 3,8 à 14,6/100 000 selon les pays en Europe. Durant la période post-vaccinale, l'incidence des méningites a diminué chez les enfants de moins de deux ans entre 2005 par rapport à la période 1998 à 2002 dite pré-vaccinale, elle ne s'est pas modifiée de façon significative dans les autres tranches d'âge. En France par exemple, chaque année, 400 à 500 méningites à pneumocoque surviennent chez des adultes, le taux d'incidence pour 100 000 habitants est deux fois plus élevé après l'âge de 64 ans en 2006. Chez les enfants de moins de deux ans, l'incidence des méningites à pneumocoque est passée de 8,8/100 000 en 2002 à 5,4/100 000 en 2005 (baisse de 38 %). En 2006, cette diminution ne s'est pas poursuivie et l'incidence est restée stable entre 2005 et 2006 (6,0/100 000). Cette stabilisation chez les moins de deux ans résulterait d'une augmentation des cas dus aux sérotypes non vaccinaux associée à une diminution des cas dus à des souches de sérotypes vaccinaux (Varon & Gutmann, 2006 ; Lepoutre *et al.*, 2008). Les données du Centre National de Référence du Pneumocoque (CNRP) montrent chez les enfants de moins de deux ans, une baisse de 54% d'incidence des méningites à sérotypes vaccinaux. Dans le même temps, l'incidence des méningites à sérotypes non vaccinaux a augmenté de 56% (Varon & Gutmann, 2006).

Aux États-Unis, avec une couverture du PCV7 importante, l'incidence des méningites à pneumocoque a chuté. En effet, chez les enfants de moins de deux ans, entre 2000 et 2004, l'incidence est passée de 9,2/100 000 à 3/100 000 habitants (ABCs , 2007). La diminution drastique des infections invasives à pneumocoque concernait les cas à sérotypes vaccinaux. Parallèlement, une augmentation de 22% de l'incidence des cas à sérotypes non vaccinaux a été observée entre la période pré-vaccinale et la période vaccinale (Hicks *et al.*, 2007). En considérant uniquement les méningites à pneumocoque et non toutes les infections invasives, la diminution observée par Kaplan *et al.* (2004) est de 56%.

Dans l'étude de Van der Poll & Opal (2009), l'incidence des infections invasives à pneumocoque chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, de 98,9/ 100 000 habitants/ année en 1999, a chuté de 75% en 2005 (23,4/ 100 000 habitants/ année) (figure 58)

En Espagne, avec une couverture vaccinale proche de celle de la France (environ 40 %) dans cette tranche d'âge, l'incidence des méningites à pneumocoque est également restée stable : 11,2/100 000 en période prévaccinale (1997–2001) et 10,7/100 000 en période vaccinale (2002–2006) (Munoz-Almagro *et al.* 2008).

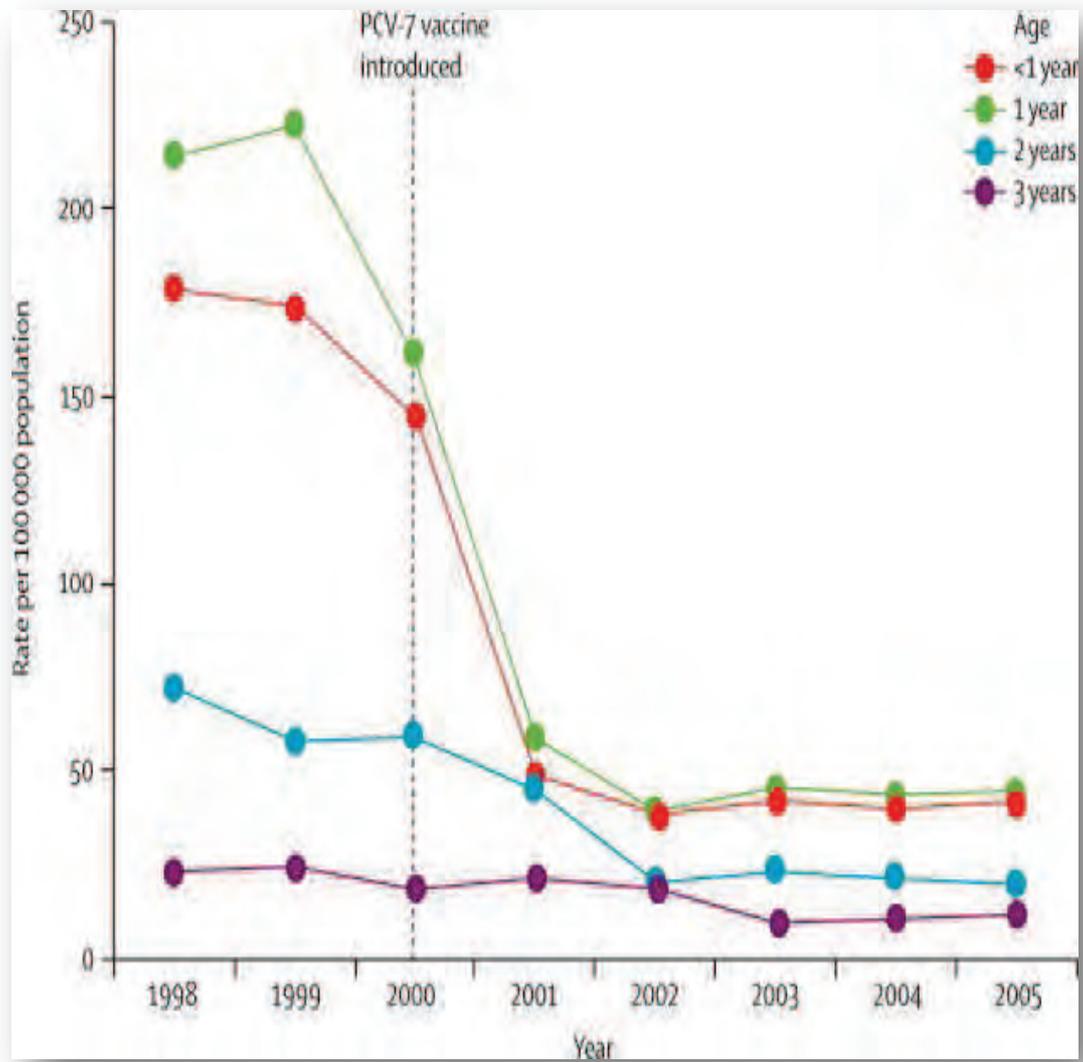
### ***Impact du PCV7 sur l'épidémiologie de la résistance à la pénicilline***

En France, depuis 1984, on assistait à une augmentation régulière de la proportion de pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline qui a atteint plus de 50 % des souches isolées en 2002. A partir de 2003, la tendance s'est inversée et la proportion de PSDP a régulièrement diminué dans les infections invasives. Cette baisse est observée à la fois chez l'adulte et chez l'enfant, surtout chez l'enfant âgé de moins de 2 ans, la proportion de PSDP passant de 52 % en 2001, à 35 % en 2007 et à 32 % en 2009 (Figure 59). Un constat similaire est observé aux Etats-Unis, où une étude nationale a montré une baisse de cette proportion, passant de 26,3% en 2001 à 16,5% en 2004 (Jenkins *et al.*, 2008).

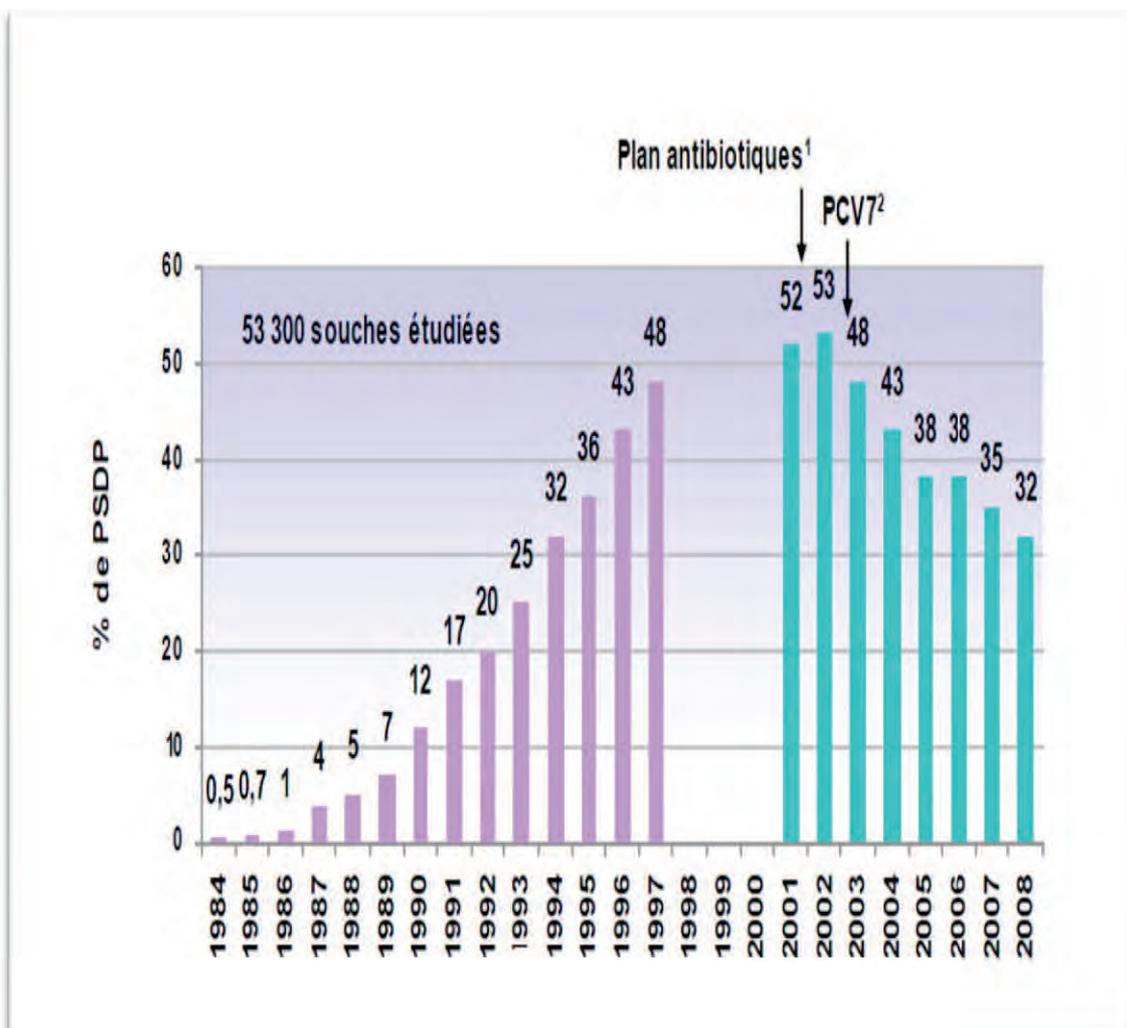
### ***Impact du PCV7 sur l'épidémiologie de la résistance aux macrolides***

La diminution de la résistance aux bêta-lactamines en raison de l'introduction du PCV7 a entraîné la diminution de la résistance aux macrolides dans plusieurs pays (Kyaw *et al.*, 2006 ; Farrell *et al.*, 2008 ; Tyrrell *et al.*, 2009 ; Varon, 2012). En France en 2007, environ 30 % des souches de *S.pneumoniae* isolées sont résistantes aux macrolides par rapport à 50 % en 2001 (Varon, 2012). Malgré cela, les taux de résistance aux macrolides ont commencé à augmenter en Europe (Jenkins & Farrell, 2009). Notons aussi que l'introduction du PCV7 n'a pas entraîné la diminution de la fréquence de la résistance aux macrolides dans certains pays (Horacio *et al.*, 2012).

Une étude de la surveillance de la résistance aux macrolides PROTECT US montre, après l'introduction du PCV7, la diminution de la prévalence du gène *mef A* et l'augmentation significative de la prévalence du gène *ermB* associée à l'augmentation des niveaux de résistance aux macrolides et particulièrement observée chez les pneumocoques de sérotype 19A (Jenkins & Farrell, 2009).



**Figure 58.** Incidence des infections invasives à *S.pneumoniae* chez l'enfant aux USA avant et après introduction du PCV7 ( Van der Poll & Opal, 2009)



**Figure 59.** Pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) en France : évolution de 1984 à 2008.

1: Plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques  
[http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/34\\_01.htm](http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/34_01.htm)

2: Introduction du vaccin anti-pneumococcique conjugué heptavalent Prevenar® (PCV7).  
(Varon, 2012)

### ***Impact du PCV7 sur l'épidémiologie de la multirésistance***

L'introduction du PCV7 a aussi causé la diminution de pneumocoques multirésistants. Aux Etats Unis, le taux global de multirésistance dans les infections invasives a diminué de 59%. Il a diminué de 84% chez l'enfant âgé de moins de 2 ans entre 1999 et 2004. La proportion de souches multirésistantes isolées d'hémocultures a diminuée de 37,9% à 22% entre 2000 et 2004 (Kyaw *et al.*, 2006).

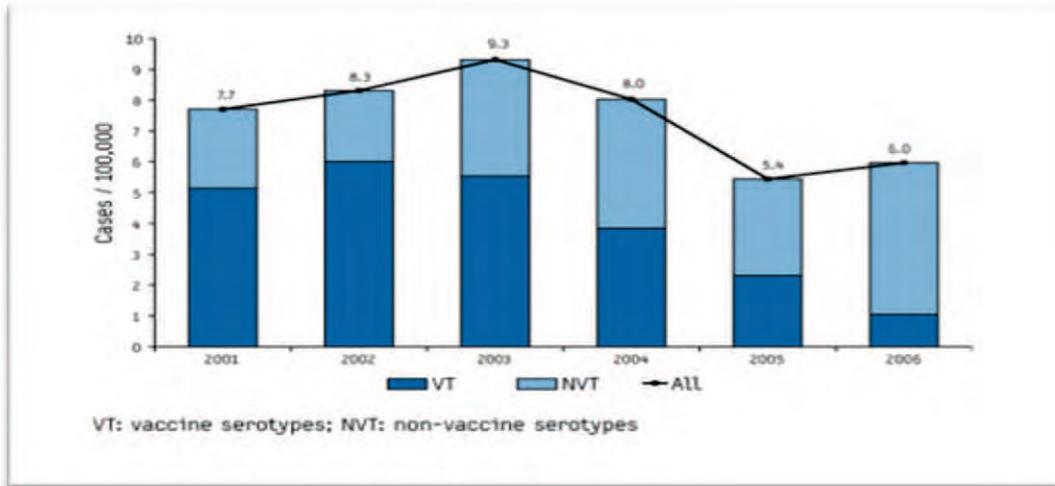
### ***Impact du PCV7 sur la distribution des sérotypes***

La distribution des sérotypes a été fortement influencée par la pression vaccinale du PVC7 et on observe la réduction de la fréquence des sérotypes vaccinaux et l'augmentation de la fréquence des sérotypes non vaccinaux (Myint *et al.*, 2013, Lepoutre *et al.*, 2008) (figures 60 et 61). L'émergence du sérotype 19A est observée dans beaucoup de pays ayant introduit ce vaccin (Lepoutre *et al.*, 2008 ; Munoz-Almagro *et al.*, 2008 ; Tyrrell *et al.*, 2009 ; Rosen *et al.*, 2011 ; Azzari *et al.*, 2012 ; Horacio *et al.*, 2012 ; Ingels *et al.*, 2012 ; Tóthpál *et al.*, 2012 ; Van der Linden *et al.*, 2012). Malgré cela, des variations dans la distribution des serotypes sont observées d'un pays à un autre, et d'une région à une autre dans un même pays.

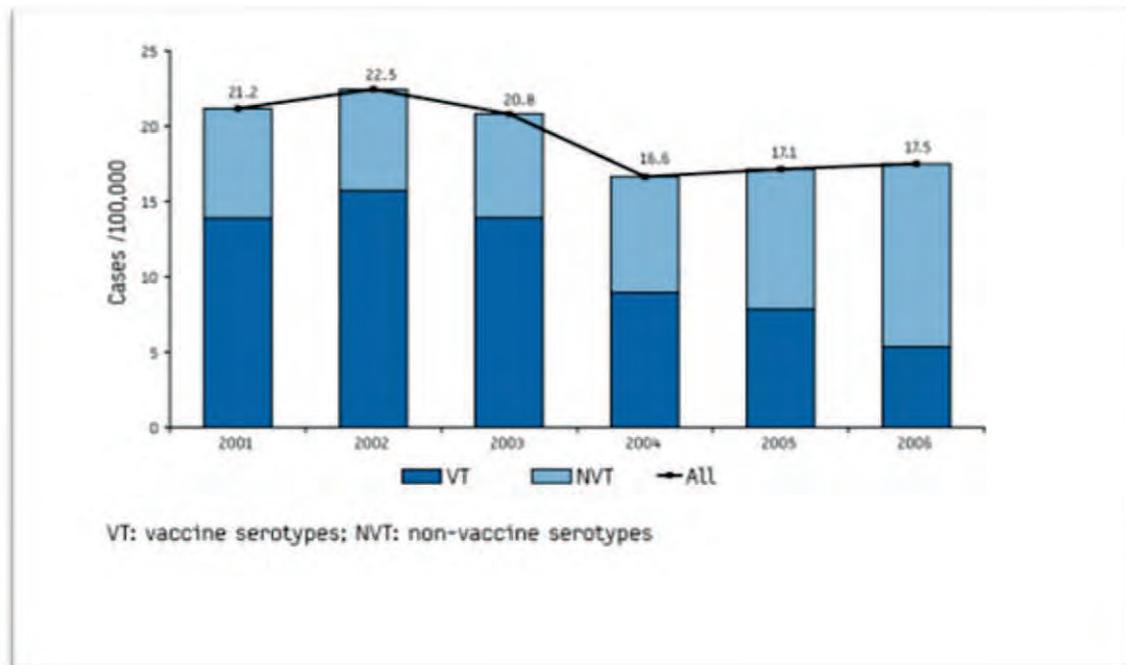
En France, en 2006, les serotypes 19A et 7F représentent 37% des méningites et des bactériémies chez l'enfant agé de moins de 2 ans. De 2001-2002 à 2006, la proportion du sérotype 19A augmente de 8% à 19% dans les méningitis et de 11% à 27% dans les bactériémies (Lepoutre *et al.*, 2008) (figure 62).

En Espagne, dans l'étude de Gant *et al.* (2012), dans les infections invasives à pneumocoque chez l'adulte, les sérotypes 19A (17,9%), 7F (13%), 1 (12,3%) et 3 (9,1%) sont les plus fréquents. Alors que dans l'étude de de Sevilla *et al.* (2012), chez l'enfant agé de moins de 5 ans, les sérotypes les plus fréquemment rencontrés sont les 1 (20,7%), 19A (15,7%) et 3 (12,3%). Les sérotypes 19A (15,1%), 3 (9,6%), 7F (7,5%), 14 (6,9%) et 1 (5,4%) sont les plus fréquents dans l'étude d'Ardanuy *et al.* (2012), chez les personnes âgées.

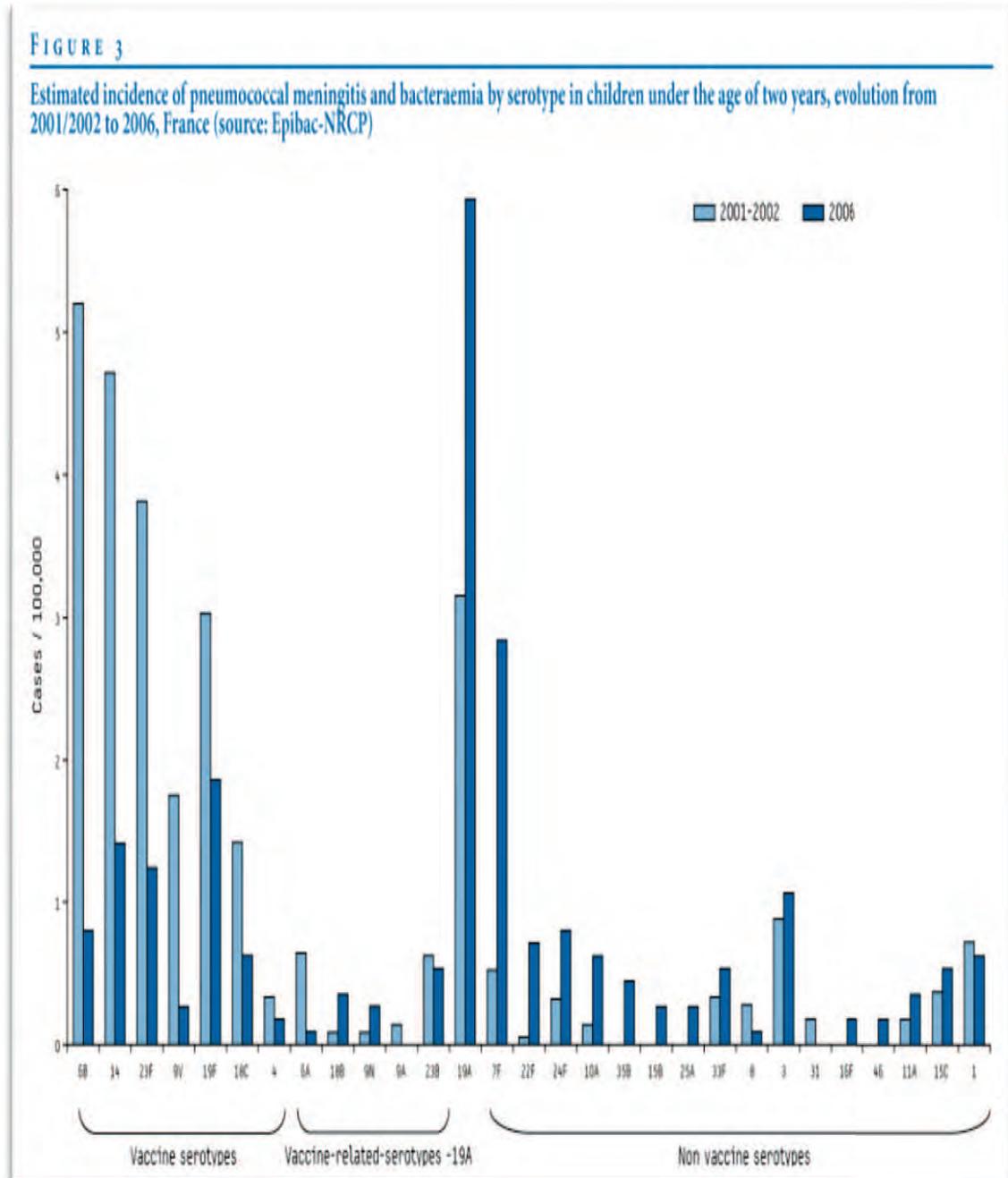
En Italie, dans les pneumopathies à pneumocoques chez l'enfant agé de moins de 5 ans le sérotype 19A est le plus fréquent dans 25,8% des cas, suivi des sérotypes 14, 4 et 3 (Esposito *et al.*, 2012).



**Figure 60.** Incidence des méningites à pneumocoques chez l'enfant âgé de moins de 2 ans en France (2001-2006) (source : Epibac-CNRP) (Lepoutre *et al.*, 2008)



**Figure 61.** Incidence des bactériémies à pneumocoques chez l'enfant âgé de moins de 2 ans en France (2001-2006) (source : Epibac-CNRP) (Lepoutre *et al.*, 2008)



**Figure 62.** Evolution de la distribution des sérotypes dans les infections invasives chez l'enfant âgé de moins de deux ans en France avant et après l'introduction du PCV7 (2001-2002 et 2006) (source : Epibac-CNRP) (Lepoutre *et al.*, 2008)

Alors que dans l'étude d'Azzari *et al.* (2012), parmi 144 enfants atteints de pneumopathies et de méningites à pneumocoques, les sérotypes les plus fréquents sont les 1 (29,9%), 3 (16%), 19A (13,2%) et 7F (8,3%).

Dans l'étude portugaise de Horacio *et al.* (2012), étudiant 1100 souches de *S.pneumoniae* responsables d'infections invasives chez l'adulte âgé > 18 ans, les sérotypes 3 (13%), 1 (12%), 7F (11%), 19A (10%) et 14 (7%) prédominent.

Au Danemark, les sérotypes prédominants sont les 1, 7F, 6A, 19A, 3, 8 et 22F, les sérotypes 1, 7F et 19A représentent 80,4% des cas observés chez l'enfant âgé de moins de 5 ans (Ingels *et al.*, 2012).

Au Mexique, chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, le sérotype 19A représente 31% des cas, suivi des sérotypes 35B (11,9%), 6A et 19F (9,5% chacun) (Bautista-Marquez *et al.*, 2013).

Aux USA, dans l'étude de Sherwin *et al.* (2013), concernant les pneumopathies à pneumocoques de l'adulte âgé de plus de 50 ans, les sérotypes les plus fréquemment rencontrés sont le 19A, 7F, 3 et 5. Le sérotype 5 rarement observé dans les infections invasives occupe la 4<sup>ème</sup> place. L'incidence du sérotype 19A dans les infections invasives chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, étant de 2,6/100 000 habitants en période pré-vaccinale (1998-1999), a atteint 9,3/100 000 habitants en période post-vaccinale (2005) (CDS, 2008). Au Canada, les sérotypes non vaccinaux responsables d'infections invasives sont le 5 et 19A chez l'adulte (Zhanell *et al.*, 2006) et le 19A chez l'enfant (Leal *et al.*, 2012).

Dans une autre étude, parmi 2058 souches responsables d'infections invasives en 2010, les sérotypes 19A, 7F et 3 sont les plus fréquemment rencontrés chez l'enfant et l'adulte. Le sérotype 19A domine dans l'ouest et le centre alors que le serotype 7F est fréquemment rencontré dans l'Est canadien (Demczuk *et al.*, 2012).

Dans certains pays, malgré l'introduction du PCV7, les sérotypes vaccinaux sont toujours les plus fréquents. En Arabie Saoudite, malgré l'introduction du PVC7 en 2008, 108 cas d'infections invasives à pneumocoques sont observés en 2010 chez l'enfant âgé de moins de 5 ans. La fréquence des sérotypes 23F, 19F, 19A, 6B, 7F, 5 et 1 est plus élevée. Le taux du sérotype 19A est de 8% alors qu'il est nul en 2005 – 2006 (Shibl *et al.*, 2012).

Au Koweït, le PVC7 étant introduit en 2006, 395 souches de pneumocoque sont étudiées entre 2006 et 2011. Durant la période post-vaccinale, les sérotypes prédominants chez l'enfant âgé de moins de 5 ans sont les 19F, 19A, 6A, 8 et 35B, chez l'adulte > 50 ans les sérotypes 14, 3, 1, 19F et 8 sont les plus fréquents (Mokaddas & Albert, 2012).

Les changements dans la distribution des sérotypes ne pourraient pas être dus automatiquement à l'introduction du PCV7, parce que des changements temporels dans la distribution des sérotypes sont observés dans certains pays avant l'introduction du vaccin conjugué (Jefferies *et al.*, 2010). Toutefois, l'émergence du sérotype 19A est signalée avant l'introduction ou l'utilisation généralisée du PCV7 dans certains pays (Choi *et al.*, 2008 ; Shin *et al.*, 2011; Elmdaghri *et al.*, 2012). Par exemple en Corée, la proportion du sérotype 19A chez l'enfant a augmenté de 0% à 18% dans les infections invasives dans une étude de 1991 – 2006 (Choi *et al.*, 2008).

Dans l'étude marocaine de Elmdaghri *et al.* (2012), entre 2006 – 2010, les sérotypes 14, 19A, 1, 19F, 6B, 23F, 18C et 8 sont les plus fréquemment rencontrés et le sérotype 19A représente 7,8% des cas.

La distribution par âge des sérotypes est modifiée suite à l'introduction du PCV7. En France, quatre sérotypes représentent à eux seuls 52% des souches invasives ; 19A, 7F, 1 et 3 et 22F. La distribution des sérotypes est différente selon le groupe d'âge. Le sérotype 19A est plus fréquent chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, alors que chez le grand enfant de 5 à 15 ans le sérotype 1 reste prédominant. Chez l'adulte, les sérotypes 19A, 7F, 3 et 22F prédominent. Enfin le sérotype 3 est plus fréquent chez l'adulte que chez l'enfant (Varon *et al.*, 2010).

Chez l'adulte de plus de 64 ans, les sérotypes 19A, 7F et 3 sont devenus les sérotypes prédominants (plus de 10% chacun). Alors que la distribution des sérotypes est différente chez les adultes âgés de 16 à 64 ans, les sérotypes 1, 7F et 19A sont prédominants et représentent chacun près de 15% des sérotypes isolés .

Les mêmes constatations sont faites dans l'étude Portugaise de Horacio *et al* (2012): les sérotypes vaccinaux 4 et 14 ont significativement diminué alors que le sérotype 14 était le sérotype le plus fréquemment en cause des infections invasives de l'adulte avant l'introduction du PVC7 en Europe et aux USA, et les sérotypes 1, 7F et 19A non inclus dans le PVC7 prédominent chez l'adulte.

---

Le sérotype 3 prédomine chez les personnes âgées, le pneumocoque sérotype 3 est décrit comme un germe opportuniste principalement retrouvé chez les personnes âgées souffrant de maladies sous-jacentes. Au contraire, la fréquence du sérotype 1 chez l'adulte diminue avec l'âge. Le sérotype 1 est retrouvé chez la personne ne présentant pas de comorbidités (le grand enfant et le jeune adulte) (Sjöström *et al.*, 2006).

Dans une étude espagnole récente, les sérotypes observés chez les moins de 2 ans sont les 14, 19A et 19F. Alors que le sérotype 1 prédomine chez les 3 – 15 ans, le sérotype 3 est plus fréquent chez les plus de 65 ans (Perez-Rodriguez *et al.*, 2013).

Les sérogroupes 15 et 33, sérotypes émergents, augmentent également dans les infections invasives comme c'est le cas aux USA. Ils sont retrouvés chez des enfants de moins de 3 ans alors qu'ils touchaient les adolescents en période prévacinale (Gonzalez *et al.*, 2006).

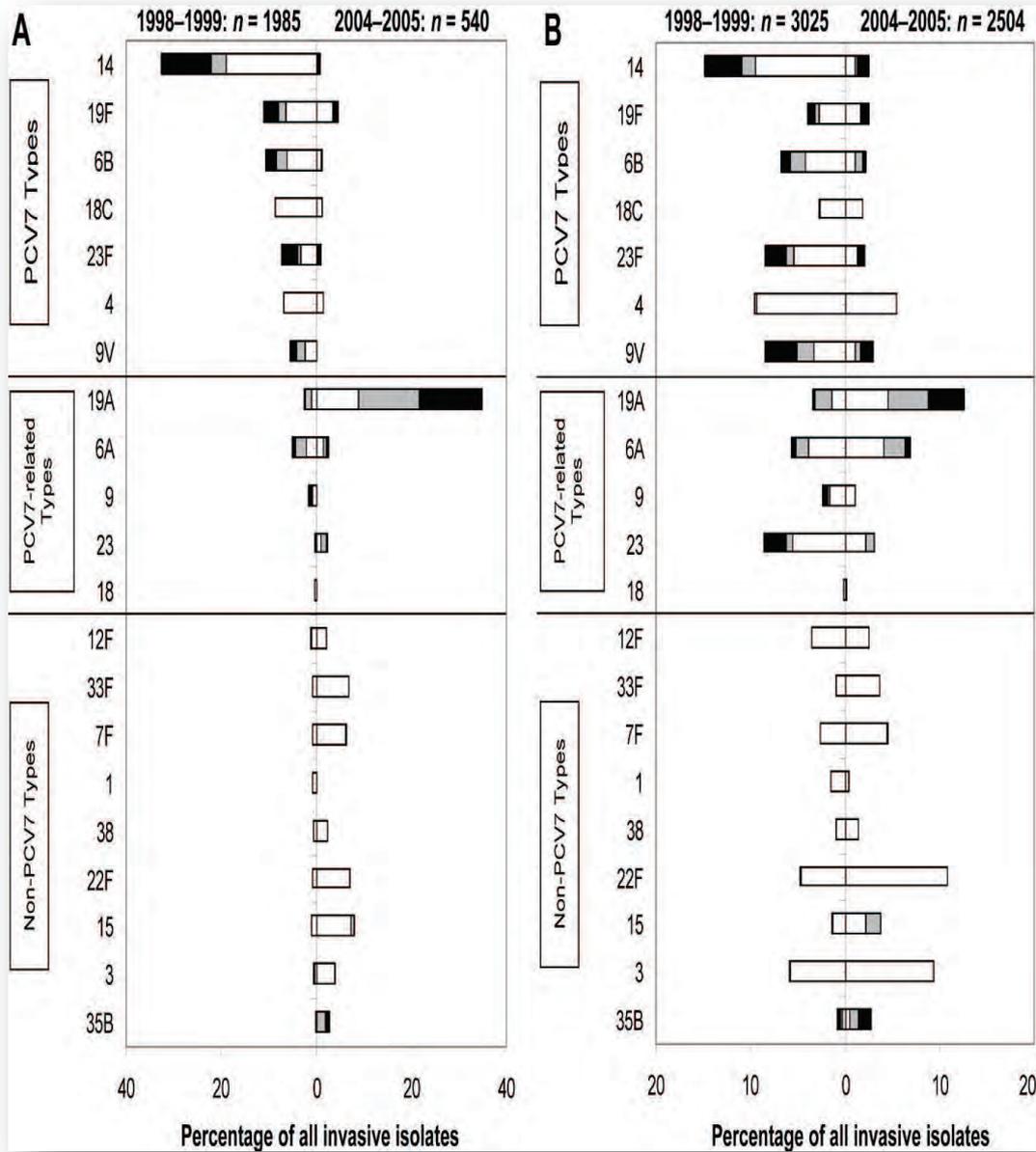
### ***Impact du PCV7 sur la relation sérotype-résistance***

Après l'introduction du PCV7, la réduction de la fréquence des sérotypes vaccinaux et l'augmentation de la fréquence des sérotypes non vaccinaux a également entraîné l'émergence des résistances au sein des sérotypes non vaccinaux les plus fréquents comme le sérotype 19A (Huang *et al.*, 2009).

En Espagne, le sérotype 19A présente 53,6% de PSDP (Fenoll *et al.*, 2010).

Au Canada, le sérotype 19A est le plus fréquent parmi les PSDP et les souches multirésistantes (Pillai *et al.*, 2009).

Aux USA, dans l'étude de Moore *et al.* (2008), durant la période 1998-1999, 1985 cas d'infections invasives à pneumocoque sont observés chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, le taux de PSDP est de 35,9% dont 83,3% sont des sérotypes vaccinaux. En 2004-2005, le taux d'infections invasives à pneumocoque chez l'enfant âgé de moins de 5 ans est réduit à 540 cas, parmi eux, 35% de PSDP dont 70% sont du sérotype 19A. Chez l'adulte aussi, durant cette période, 47% des PSDP sont du sérotype 19A (figure 63)



**Figure 63.** Distribution des sérotypes des souches sensibles (barres blanches), intermédiaires (barres grises) et résistantes (barres noires) à la pénicilline responsables d'infections invasives chez l'enfant âgé de moins de cinq ans (A) et l'adulte âgé de plus de 50 ans (B) durant la période 1998 –1999 et 2004 –2005 (Moore *et al.*, 2008).

L'émergence de nouveaux clones issus de switch capsulaires serait impliquée dans l'expansion de la résistance aux antibiotiques du sérotype 19A (Jefferies *et al.*, 2010) associée le plus souvent à l'expansion des 3 clones de séquence type 320/271, 199 et 695 représentant 87,3% des souches de sérotype 19A (Beall *et al.*, 2011).

Parmi les PSDP, 75,2% sont de séquence type ST-320/271 dont 98%, de hauts niveaux de résistance à la pénicilline.

Dans d'autres pays comme l'Italie, 7 ans après l'introduction du PCV7, l'incidence du sérotype 19A a beaucoup augmenté due essentiellement à l'expansion des clones ST-416 et ST-199 de sensibilité diminuée à la pénicilline (Ansaldi *et al.*, 2011).

En Espagne, durant la période post-vaccinale 2005 – 2007, on remarque l'augmentation de la fréquence des infections invasives à pneumocoques de 19A résistants à la pénicilline et multirésistants. Parmi ces souches 66,66% sont issues de clones multirésistants préexistants, ST-320 et ST-276 (Munoz-Almagro *et al.*, 2008).

Dans notre étude, le sérotype 19A n'est retrouvé que dans 3 cas, et est de sensibilité diminuée à la pénicilline dans deux cas.

L'émergence d'autres sérotypes de sensibilité diminuée aux bêta-lactamines à l'origine d'infections invasives est rapportée : il s'agit des sérotypes 24F en Italie (Pantosti *et al.*, 2002), 35B aux Etats-Unis (Beall *et al.*, 2002), et 15B, 15C, 21, 33F et 35B en Israël (Porat *et al.*, 2004).

### **8. Evolution des infections invasives à pneumocoques et couverture vaccinale**

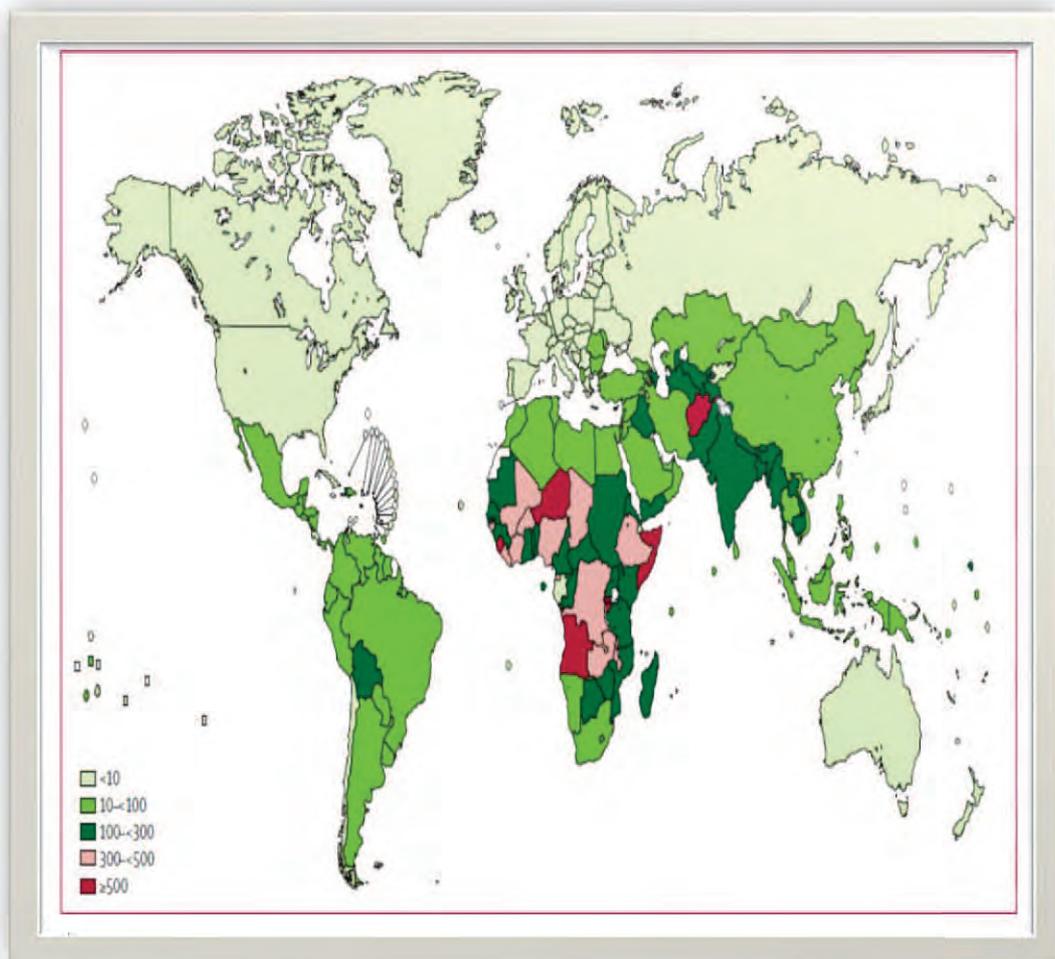
*S.pneumoniae* est responsable, dans notre étude, de 15% de décès, observé autant chez l'enfant que chez l'adulte, 71,42% chez l'enfant dont l'âge est  $\leq$  à 5 ans.

L'infection pneumococcique est la principale cause de mortalité infantile dans le monde qui peut être prévenue par la vaccination. L'OMS estime qu'environ 1,6 million de personnes, dont un maximum d'un million d'enfants âgés de moins de cinq ans, meurent chaque année de pneumonie pneumococcique, de méningite et de bactériémie (WHO, 2003). Dans les populations présentant des taux de mortalité infantile élevés, la pneumonie est la principale cause infectieuse de mortalité et représente environ 20-25 % de tous les décès d'enfants (File, 2004).

En 2000, *S.pneumoniae* est responsable de 14,5 millions de cas d'infections graves dans le monde, 66% sont observés en Afrique et en Asie (Inde 27%, Chine 12%, Nigeria 5%, Pakistan 5%, Bangladesh 4%, Indonésie 3%, Ethiopie 3%, Congo 3%, Kenya 2%, et Philippines 2%).

Le taux de mortalité chez l'enfant de moins de 5 ans est de 11% dont 90% dans les pneumonies et 7% dans les méningites. 61% du taux de mortalité est observé en Afrique sub-saharienne et en Asie du sud (O'Brien *et al.*, 2009) (figure 64).

Le vaccin PCV7 a fait la démonstration de son efficacité après trois années de vaccination universelle aux États-Unis chez le nourrisson et l'enfant en bas-âge (figure 65).



**Figure 64.** Taux de mortalité par infections invasives à pneumocoque chez l'enfant âgé de 1 à 59 mois/100 000 enfants de moins de 5 ans (HIV-négatif) dans le monde (O'Brien *et al.*, 2009)

La couverture théorique du vaccin vis-à-vis des infections pneumococciques invasives en France est d'environ 80 %, ce qui représente une des couvertures les plus élevées en Europe (Black *et al.*, 2004).

La couverture vaccinale théorique des infections invasives chez l'enfant âgé de moins de 5 ans est de 63,3%, 70% et 76,66% pour les vaccins conjugués à 7, 10 et 13 valences respectivement dans notre étude.

Ces taux sont de 61,5%, 69,2% et 76,9% dans une précédente étude algérienne (Tali-Maamar *et al.*, 2012).

Au Maroc et en Tunisie, la couverture vaccinale par les trois vaccins présente des taux de 53,9% et 66,4% pour le PCV7, 71,6% et 73% pour le PCV10 et 82,4% et 76,1% pour le PCV13 (Charfi *et al.*, 2012 ; Elmdaghri *et al.*, 2012). Notons qu'au Maroc, le PCV13 est introduit dans le programme d'immunisation en 2010.

En Arabie Saoudite, la couverture vaccinale par les PCV7, PCV10 et PCV13 chez l'enfant de moins de 5 ans est de 53%, 80% et 91% respectivement. Le PCV7 étant introduit en 2009 et le PCV13 en 2010 (Shibl *et al.*, 2012). Au Koweït, ces taux sont de 42,16%, 47,4% et 63,1%. Les PCV7 et PCV13 sont introduits respectivement en 2006 et 2010 (Mokaddas *et al.*, 2012).

En Asie, dans l'étude de Xue *et al.* (2010) menée en Chine, les vaccins PCV7, 10 et 3 pourraient couvrir 60,3%, 66,7% et 87,8% de toutes les souches isolées chez l'enfant âgé de moins de 5 ans.

En Europe, la couverture vaccinale du PCV7 fluctue entre 37% et 100% avec une augmentation de 7% à 16% pour le PCV13 (Isaacman *et al.*, 2010).

Le PCV7 étant introduit en 2000 aux USA, la fréquence des infections invasives à pneumocoques est réduite de 75% (WHO, 2007). Les vaccins PCV10 et PCV13 sont introduits à leur tour après l'événement du phénomène de remplacement. L'introduction du PCV13 pourrait encore réduire le taux des infections invasives de 7%.

Enfin, le vaccin pneumococcique conjugué exerce une pression de sélection sur les pneumocoques du rhinopharynx. Le résultat est une diminution du portage des sérotypes vaccinaux qui s'accompagne d'une augmentation du portage de sérotypes non contenus

dans le vaccin. En conséquence, la mise en place de la vaccination doit s'accompagner de la surveillance de l'évolution du portage du pneumocoque chez les enfants vaccinés et les non-vaccinés. L'impact attendu de la diminution de la résistance aux antibiotiques, si la vaccination est suffisamment large, peut être minimisé si les antibiotiques continuent à être utilisés aussi massivement qu'actuellement partout dans le monde. Cela signifie qu'une surveillance épidémiologique s'impose parallèlement à une politique d'utilisation plus prudente des antibiotiques.



**Figure 65 :** Couverture sérotypique (%) des vaccins PCV7, PCV10 et PCV13 dans les infections invasives chez l'enfant âgé de moins de 5 ans dans le monde..

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les infections à pneumocoque représentent aujourd'hui un problème de santé publique. Les similitudes entre *Streptococcus pneumoniae* et autres *Streptococcus* du groupe *viridans* peuvent entraîner des erreurs d'identification qui pourraient conduire à une surestimation des taux de résistance du pneumocoque, surtout dans les pneumopathies et les autres infections respiratoires hautes. Le test de sensibilité à l'optochine reste un test de dépistage utile dans notre étude, il est simple, peu coûteux mais demande 24 heures. Les autres tests phénotypiques ne doivent pas être utilisés seuls. La spectrométrie de masse MALDI-TOF s'avère être une technique décevante quant à son pouvoir discriminatoire entre pneumocoques et espèces proches. La recherche des gènes *plyN* et *lytA* (100% de spécificité) peut être utilisée dans le diagnostic rapide des infections à *S.pneumoniae* directement à partir de produits pathologiques (gain de temps). Concernant la recherche du gène *rpoB*, elle pourrait être utilisée en cas d'échec d'identification par les autres techniques.

Dans notre étude, le pneumocoque est classé au premier rang dans les méningites bactériennes surtout après la quasi disparition de *Haemophilus influenzae* type b grâce à l'introduction du vaccin anti-*Hib* en Algérie en 2008.

Dans les infections invasives, *S.pneumoniae* est responsable de 75% de méningites, 13% de pneumopathies et de 12% de bactériémies, le recrutement est limité en pneumopathies dans notre étude. L'épidémiologie des pneumonies aiguës communautaires est difficile à connaître avec certitude, 20% des pneumopathies sont bactériémiques chez l'adulte, et les prélèvements pulmonaires sont rarement effectués.

Le pneumocoque est une cause majeure d'infections invasives de l'enfant et de l'adulte. Les infections invasives, restent graves, avec un taux de mortalité de 15%, surtout dans les pneumopathies et les méningites.

En Algérie, comme dans d'autres pays africains, asiatiques et européens, le pourcentage de souches de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline a très fortement augmenté. Il est de 57% dans notre étude dont 11% de résistance. Le taux de résistance à la pénicilline est plus élevé chez l'enfant. Les taux de résistance à l'amoxicilline et au céfotaxime sont relativement bas et aucune souche n'est résistante à l'imipénème. Il faut

souligner l'absence d'isolement de souches de haut niveau de résistance à la pénicilline, à l'amoxicilline et au céfotaxime. Dans le traitement des infections à PSDP, les bêta-lactamines restent les antibiotiques de choix tant que le niveau de résistance reste compatible avec une efficacité thérapeutique, alors que dans les méningites à pneumocoques, le traitement par amoxicilline ou céphalosporines de troisième génération (céfotaxime ou ceftriaxone) n'est pas remis en cause. Les CM1 doivent être mesurées en cas d'infection sévère, d'échec clinique et de souches suspectes d'être de sensibilité diminuée à la pénicilline. L'augmentation de la fréquence des souches de pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline impose d'adapter la thérapeutique à la pathologie et à l'épidémiologie.

Pour les macrolides, le taux de résistance à l'érythromycine est de 22% et presque toutes les souches portent le gène *ermB* et *mefA*, ce qui explique les niveaux de résistance élevés. Les macrolides constituent une alternative aux bêta-lactamines dans les infections respiratoires en cas de résistance ou d'allergie à ces molécules, et la surveillance de la résistance aux macrolides s'avère importante car la résistance fréquente du pneumocoque à ces antibiotiques et le niveau élevé de celle-ci ne laisseront aucune place à ces molécules dans le cadre d'une antibiothérapie probabiliste. Soulignons le fait que l'utilisation des macrolides vise non seulement les pneumocoques, mais aussi les germes à multiplication intracellulaire comme les mycoplasmes et les chlamydiae.

Les taux de résistance pour la tétracycline et le cotrimoxazole sont de 20% et 51% respectivement. Le chloramphénicol et la vancomycine restent actifs avec les fluoroquinolones. Le chloramphénicol n'est plus utilisé de nos jours et les dernières fluoroquinolones en particulier la lévofloxacine sont une alternative thérapeutique intéressante, néanmoins le risque d'émergence de souches résistantes est réel si leur utilisation est mal contrôlée dans le traitement des infections respiratoires basses.

Les sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans notre étude sont les 14, 19F, 23F et 6B représentant 50,6% des cas. Ce sont les sérotypes le plus souvent responsables de méningites et ce sont les sérotypes les plus fréquents parmi les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline et les plus fréquents chez l'enfant âgé de moins de 5 ans.

La couverture vaccinale est de 63,33% et 70% pour les PCV7 et PCV10 et atteint 76,66% pour le PCV13 chez l'enfant dont l'âge est  $\leq$  à cinq ans. L'intérêt de la connaissance des

sérotypes est d'ordre épidémiologique, il est important pour le choix de la composition d'un vaccin utilisable chez les sujets à risque dont le jeune enfant, en raison de la gravité de l'atteinte pneumococcique. Le vaccin antipneumococcique conjugué n'est pas introduit dans le Programme Elargi de Vaccination National en Algérie et la fréquence, la gravité des infections à pneumocoque et la résistance des pneumocoques aux antibiotiques dans notre étude, justifient la vaccination

Une surveillance locale et nationale permettra en outre d'émettre des recommandations en matière de traitement probabiliste et de vaccination. L'adaptation des traitements probabilistes repose également sur la promotion du bon usage des antibiotiques surtout l'usage intempestif des antibiotiques dans les infections d'origine virale.

### **Perspectives**

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

Au vu des résultats acquis au cours de cette étude, il serait particulièrement intéressant de poursuivre la surveillance de *S.pneumoniae* et, dans la continuation directe de ce travail :

1. La création d'un réseau de surveillance de *Streptococcus pneumoniae* par le biais d'un recrutement maximal de produits pathologiques émanant de services hospitaliers, de traitements ambulatoires et de laboratoires périphériques hospitaliers, publics ou privés couvrant les régions de l'Est algérien. Notre recueil de souches concernera les infections communautaires et les infections graves de patients hospitalisés.

2. La mise en place d'un programme de surveillance de la résistance aux antibiotiques de *S. pneumoniae* et les sérotypes circulants: la réussite d'un tel programme aura un impact scientifique en améliorant nos connaissances sur l'épidémiologie des pneumocoques et leurs résistances, elle permet l'étude des sérotypes et des profils de résistance aux antibiotiques utiles pour l'élaboration de guides thérapeutiques. Une meilleure connaissance des pneumocoques, des sérotypes et de la résistance aux antibiotiques nous permettra d'agir sur :

- le contrôle de la maladie par une bonne gestion des antibiotiques, l'orientation du traitement de première intention par une meilleure prise en charge du traitement rapide des infections graves
  - la vaccination : participer à une éventuelle mise en place d'une politique de vaccination.
3. la mise en place de techniques de biologie moléculaire est importante actuellement, pour étudier les gènes bactériens impliqués dans l'identification, la résistance aux antibiotiques et le pouvoir pathogène.
4. L'émergence de pneumocoques de sensibilité diminuée aux antibiotiques est généralement attribuée à la pression de sélection antibiotique sur les bactéries de la flore nasopharyngée. La surveillance du portage nasopharyngé pourrait ainsi produire des informations utiles. L'évaluation du taux de portage chez l'enfant et le recensement des sérotypes reflètent les souches de pneumocoque en circulation et potentiellement pathogènes.
5. Devant la diffusion mondiale de certains clones associés à la résistance aux antibiotiques, une investigation épidémiologique complète du pneumocoque par des techniques moléculaires (MLST) permettra de surveiller les souches en circulation, d'identifier les clones résistants et d'évaluer l'impact des nouvelles politiques vaccinales.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Active Bacterial Core Surveillance (ABCs). *Report Emerging Infections Program Network, Streptococcus pneumoniae, 2006- provisionnal*. <http://www.cdc.gov>2007; **2007**.
- Adam HJ, Hoban DJ, Gin AS, Zhanel GG. Association between fluoroquinolone usage and a dramatic rise in ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 1997-2006. *Int J Antimicrob Agents* **2009**; 34: 82–5.
- Alanee SR, McGee L, Jackson D, *et al*. Association of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with disease severity and outcome in adults: an international study. *Clin Infect Dis* **2007**; 45: 46-51.
- Alonso DeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, *et al*. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* **1995**; 59: 591- 603.
- Albert B, William JH, Kenneth LH, *et al* . *Manual of clinical microbiology*. 5<sup>th</sup> edition, ASM **1991**; 243- 4.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **1997**; 25: 3389- 402.
- Amezaga MR, Carter PE, Cash P, *et al*. Molecular epidemiology of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from blood and noninvasive sites. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 3313- 318.
- Aniansson G, Alm B, Andersson B, *et al*. Nasopharyngeal colonization during the first year of life. *J Infect Dis* **1992**; 165(1): 38- 42.
- Ansaldi F, Canepa P, de Florentiis D, *et al*. Increasing incidence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A and emergence of two vaccine escape recombinant ST695 strains in Liguria, Italy, 7 years after implementation of the 7-valent conjugated vaccine. *Clin Vaccine Immunol* **2011**;18: 343-5.
- Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, *et al*. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 4686- 96.
- Ardanuy C, Marimon JM, Calatayud L, *et al*. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in older people in Spain (2007-2009): implications for future vaccination strategies. *PLoS One* **2012**; 7: e43619.
- Arditi M, Mason EO Jr., Bradley JS, *et al*. Three-year multicenter surveillance of pneumococcal meningitis in children: clinical characteristics, and outcome related to penicillin susceptibility and dexamethasone use. *Pediatrics* **1998**; 102: 1087- 97.

- Ashkenazi L, Bar-Meir M, Schlesinger Y, *et al.* Invasive pneumococcal disease in infants younger than 60 days. *Clin Pediatr (Phila)* **2012**; 51: 478- 82.
- Aujardy Y. *Antibiothérapie des méningites néonatales.* In: Edouard B, editor. *Méningites bactériennes communautaires.* Elsevier **2001** : 95-104.
- Azzari C, Moriondo M, Cortimiglia M, *et al.* Potential serotype coverage of three pneumococcal conjugate vaccines against invasive pneumococcal infection in Italian children. *Vaccine* **2012**; 30: 2701- 5.
- Bae S, Lee K. Distribution of capsular serotypes and macrolide resistance mechanisms among macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Korea. *Diag Microbiol Infect Dis* **2009**; 63(2): 213- 6.
- Bautista-Marquez A, Richardson V, Ortiz-Orozco O, *et al.* Prevalence of pneumococcal disease, serotype distribution, and antimicrobial susceptibility in Mexican children younger than 5 years of age. *Arch Med Res* **2013**; 44: 142- 50.
- Beall BW, McEllistrem MC, Gertz RE Jr, *et al.* Emergence of a novel penicillin-nonsusceptible invasive serotype 35B clone of *Streptococcus pneumoniae* within the United States. *J Infect Dis* **2002**; 186(1): 118- 22.
- Beall BW, Gertz RE, Hulkower RL, *et al.* Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J Infect Dis* **2011**; 203: 1360- 8.
- Bedos JP, Rolin O, Bouanchaud DH, *et al.* Relationship between virulence and resistance to antibiotics in pneumococci. Contribution of experimental data obtained in an animal model. *Pathol Biol* **1991**; 39: 984- 90.
- Bedos JP, Bruneel F. Antibiotic therapy for community acquired *Streptococcus pneumoniae* pneumonia: clinical relevance of antibiotic resistance. *Med Mal Infect* **2006**; 36: 667-79.
- Bell LM, Alpert G, Campos JM, *et al.* Routine quantitative blood cultures in children with *Haemophilus influenzae* or *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Pediatrics* **1985**; 76: 901- 4.
- Benbachir M, Benredjeb S, Boye CS, *et al.* Two-year surveillance of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in four African cities. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 627- 9.
- Benbachir M , Elmadaghri N, Belabbes H, *et al.* Eleven-year surveillance of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Casablanca (Morocco). *Microbiol Drug Resist* **2012**; 18(2): 157- 60.
- Bingen E. Place du pneumocoque en pathologie infectieuse pédiatrique. *Pathol Biol* **2002** ; 50: 374-379.
- Bingen E, Levy C, De La Rocque F, *et al.* Pneumococcal meningitis in France: age and medical risk factors in children. *Arch Pediatr* **2005**; 12: 1187- 9.

- Bingen E, Levy C, Varon E, *et al.* Pneumococcal meningitis in the era of pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2008**; 27: 191-9.
- Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* **2010**; 16: 1614-9.
- Black S, Shinefield H, Cohen R, *et al.* Clinical effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine (Prevenar) against invasive pneumococcal diseases: prospects for children in France. *Arch Pediatr* **2004**; 11: 843- 53.
- Bley C, van der Linden M, Reinert RR. *mef(A)* is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. *Int J Antimicrob Agents* **2011**; 37: 425- 31.
- Bolan G, Broome CV, Facklam RR, *et al.* Pneumococcal vaccine efficacy in selected populations in the United States. *Ann Intern Med* **1986**; 104: 1- 6.
- Bonofiglio L, Ojeda MI, de MC, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from adult patients with community-acquired pneumonia in an Argentinian teaching hospital. *Int J Antimicrob Agents* **2005**; 25: 260- 3.
- Borek AP, Dressel DC, Hussong J, *et al.* Evolving clinical problems with *Streptococcus pneumoniae*: increasing resistance to antimicrobial agents, and failure of traditional optochin identification in Chicago, Illinois, between 1993 and 1996. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1997**; 29: 209-14.
- Borg MA, Tiemersma E, Scicluna E, *et al.* Prevalence of penicillin and erythromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates reported by laboratories in the southern and eastern Mediterranean region. *Clin Microbiol Infect* **2009**; 15: 232-7.
- Bouskraoui M, Soraa N, Zahlane K, *et al.* Study of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* and its antibiotics resistance in healthy children less than 2 years of age in the Marrakech region (Morocco). *Arch Pediatr* **2011**; 18: 1265-70.
- Brisou P, Chamouilli JM, Gaillard J, Muzellec Y. *Pneumococcal infections*. EMC-Pédiatrie **2004**; 1: 410- 31.
- Bronzwaer SL, Cars O, Buchholz U, *et al.* A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* **2002**; 8: 278- 82.
- Calatayud L, Ardanuy C, Tubau F, *et al.* Serotype and genotype replacement among macrolide-resistant invasive Pneumococci in adults: mechanisms of resistance and association with different transposons. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 1310- 6.

- Calix JJ, Dagan R, Pelton SI, *et al.* Differential occurrence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 11E between asymptomatic carriage and invasive pneumococcal disease isolates reflects a unique model of pathogen microevolution. *Clin Infect Dis* **2012**; 54: 794- 9.
- Canu A, Malbruny B, Coquemont M, *et al.* Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 125- 31.
- Carbonnelle E, Nassif X. Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. *Med Sci (Paris)* **2011**; 27: 882- 8.
- Carvalho MG, Tondella ML, McCaustland K, *et al.* Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol* **2007**; 45: 2460- 6.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction—eight states, 1998-2005*. MMWR - Morb Mortal Wkly Rep **2008a**; 57: 144- 8.
- Centers for Diseases Control and Prevention (CDC): *Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for Streptococcus pneumoniae- United States 2006-2007*. MMWR- Morb Mortal Wkly Rep **2008b**; 57: 1353- 5.
- Centers for Diseases Control and Prevention (CDC): *Progress in Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine Worldwide, 2000-2008*. MMWR- Morb Mortal Wkly Rep **2008c**; 57(42): 1148- 51.
- Chardon H, Varon E, Bensaid T, Bellon O, *et al.* Epidémiologie de la résistance du pneumocoque aux antibiotiques. *Med Mal Infect* **2002** : 32(2): 21- 31.
- Chardon H. L'antibiogramme du pneumocoque. *Revue Francophone des laboratoires* **2008**; 407: 45- 58.
- Charfi F, Smaoui H, Kechrid A. Non-susceptibility trends and serotype coverage by conjugate pneumococcal vaccines in a Tunisian pediatric population: A 10-year study. *Vaccine* **2012**; 30:18- 24.
- Charpentier E, Tuomanen E. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes Infect* **2000**; 2: 1855- 64.
- Charveriat MA, Chomarar M, Watson M, *et al.* Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children, 2 to 24 months of age, in New-Caledonia. *Med Mal Infect* **2005**; 35: 500-6.
- Chavanet P, Atale A, Mahy S, *et al.* Nasopharyngeal carriage, antibiotic susceptibility and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children attending day care centers. *Med Mal Infect* **2011**; 41: 307-17.

- Chen Y, Deng W, Wang SM, *et al.* Burden of pneumonia and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in China among children under 5 years of age: a systematic literature review. *PLoS One* **2011**; 6: e27333.
- Choi EH, Kim SH, Eun BW, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children. South Korea. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14: 275- 81.
- Clarke SC, Scott KJ, McChlery SM. Serotypes and sequence types of pneumococci causing invasive disease in Scotland prior to the introduction of pneumococcal conjugate polysaccharide vaccines. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 4449- 52.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing In: Sixteen informational supplement CLSI* **2007**; M100-S16.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing In: Twenty-first informational supplement CLSI* **2011**; M100-S21.
- Coffey TJ, Enright MC, Daniels M, *et al.* Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **1998**; 27: 73–83.
- Cohen R, Levy C, Bonnet E, *et al.* Dynamic of pneumococcal nasopharyngeal carriage in children with acute otitis media following PCV7 introduction in France. *Vaccine* **2010** ; 28: 6114- 21.
- Dabernat H, Stahl JP, Goulet V, et le groupe d'étude de la ligue française pour la prévention des maladies infectieuses. Méningites bactériennes en France. Étude dans six départements métropolitains en 1995–1997. *Med Mal Infect* **2000**; 30: 588- 94.
- Dagnra AY, Tigossou S, Prince-David M. Prévalence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des méningites. *Med Mal Infect* **2000**; 30: 206.
- Daikosa GL, Koutsolioutsoub A, Tsiodrasc S. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. *Diag Microbiol and Infect Dis* **2008**; 60: 393- 398.
- Dang-Van A, Tiraby G, Acar JF, *et al.* Chloramphenicol resistance in *Streptococcus pneumoniae*: enzymatic acetylation and possible plasmid linkage. *Antimicrob Agents Chemother* **1978**; 13: 577- 83.
- Daporta MT, Munoz Bellido JL, Guirao GY *et al.* In vitro activity of older and newer fluoroquinolones against efflux-mediated high-level ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* **2004**; 24: 185- 7.
- Davies TA, Yee YC, Bush K, *et al.* Effects of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on US. levofloxacin- resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **2008**; 14: 187- 96.

- de la Pedrosa EG, Baquero F, Loza E, *et al.* High clonal diversity in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain (2000-07). *J Antimicrob Chemother* **2009**; 64: 1165- 9.
- de O Menezes AP, Campos LC, dos Santos MS, *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. *Vaccine* **2011**; 29(6): 1139- 44.
- de Sevilla MF, Garcia-Garcia JJ, Esteva C, *et al.* Clinical presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* **2012**; 31: 124- 8.
- Demczuk WH, Martin I, Griffith A, *et al.* Serotype distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Canada during the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, 2010. *Can J Microbiol* **2012**; 58: 1008-17.
- Dias R, Canica M. Emergence of invasive erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains in Portugal: contribution and phylogenetic relatedness of serotype 14. *J Antimicrob Chemother* **2004**; 54: 1035- 1039.
- Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM. Real-time PCR allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) encoding gene in France. *Int J Antimicrob Agents* **2011**; 37: 544- 6.
- Dobay O, Rozgonyi F, Amyes SG. Molecular characterisation of Hungarian macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates, including three highly resistant strains with the *mef* gene. *Int J Antimicrob Agents* **2005**; 25: 488- 95.
- Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, *et al.* Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999--2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 1721-9.
- Doit C, Bingen E. Mechanisms of pneumococcal beta-lactamine resistance. *Arch Pediatr* **1996**; 3(1): 99-100.
- Dowson CG, Coffey TJ, Kell C, *et al.* Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol* **1993**; 9: 635- 43.
- Drancourt M, Roux V, Fournier PE, *et al.* *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 497- 504.
- Drieux L. Characteristics of lower respiratory tract infections in the elderly. *Antibiotics* **2010**; 12:190- 96.

- Duchet-Niedziolka P, Hanslik T, Aouba A, *et al.* Pneumococcal infections and vaccination in patients with systemic autoimmune and/or inflammatory diseases. *Presse Med* **2009**; 38: 243-50.
- Dunais B, Laurans C, Bruno P, *et al.* Portage de pneumocoques dans les établissements d'accueil du jeune enfant des Alpes-Maritimes et du Nord: 1999-2006. *Med Mal Infect* **2008**; 38: 30- 4.
- El Aila NA, Emler S, Kaijalainen T, *et al.* The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. *BMC Infect Dis* **2010**; 10: 104.
- Elmdaghri N, Benbachir M, Belabbes H, *et al.* Changing epidemiology of pediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates before vaccine introduction in Casablanca (Morocco). *Vaccine* **2012**; 30: 46- 50.
- Enquête Nationale Santé (ENS). *Projet TAHINA INSP-AL Contrat N° ICA3-CT-2002-10011* **2005**.
- Esposito S, Marchese A, Tozzi AE, *et al.* Bacteremic pneumococcal community-acquired pneumonia in children less than 5 years of age in Italy. *Pediatr Infect Dis J* **2012**; 31: 705-10.
- Farrell DJ, Jenkins SG, Reinert RR. Global distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes isolated from paediatric patients during 1999-2000 and the in vitro efficacy of telithromycin and comparators. *J Med Microbiol* **2004a**; 53: 1109- 17.
- Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, *et al.* Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *erm(B)*- and *mef(A)*-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol* **2004b**; 42: 764- 68.
- Farrell DJ, Couturier C, Hryniewicz W. Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT Year 5 (2003-2004). *Int J Antimicrob Agents* **2008**; 31: 245- 9.
- Felmingham D, Reinert RR, Hirakata Y, Rodloff A. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother* **2002**; 50(1): 25- 37.
- Fenoll A, Aguilar L, Giménez MJ, *et al.* Susceptibility of recently collected Spanish pneumococci nonsusceptible to oral penicillin from serotypes not included in the 7-valent conjugate vaccine. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54: 2696- 8.
- Ferre P, Daoud P, Zemouri N. Emergence of invasive nonvaccine pneumococcal serotypes: 2 cases involving 19A and 10A serotypes. *Arch Pediatr* **2009**; 16: 1350-2.

- Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, *et al.* Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 1542- 8.
- File Jr TM. *Streptococcus pneumoniae* and community-acquired pneumonia: a cause for concern. *Am J Med* **2004**; 117(3): 39- 50.
- Floret D. Les décès par infection bactérienne communautaire : Enquete dans les services de réanimation pédiatrique. *Arch Pediatr* **2001**; 8: 705- 11.
- Forrester HL, Jahnigen DW, LaForce FM. Inefficacy of pneumococcal vaccine in a high-risk population. *Am J Med* **1987**; 83: 425- 30.
- Foster D, Knox K, Walker AS, *et al.* Invasive pneumococcal disease: epidemiology in children and adults prior to implementation of the conjugate vaccine in the Oxfordshire region, England. *J Med Microbiol* **2008**; 57: 480-7.
- Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, *et al.* Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol* **2007**; 45: 2392- 7.
- Gaillat J, Zmirou D, Mallaret M. Essai Clinique du vaccin antipneumococcique chez des personnes âgées vivant en institution. *Rev Epidemiol et Santé Publ* **1985**; 33: 437-444.
- Gaillat J. Epidémiologie des infections systémiques à *Streptococcus pneumoniae*. *Presse Med* **1998**; 27: 9- 16.
- Gant CM, Rosingh AW, López-Hontangas JL, *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal disease strains in the Comunidad Valenciana, Spain, during the winter of 2009-2010: low PCV7 coverage and high levofloxacin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56(9): 4988- 9.
- Garcia-Suarez MM, Villaverde R, Caldevilla AF, *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive and non-invasive pneumococcal isolates in Asturias, Spain. *Jpn J Infect Dis* **2006**; 59: 299- 05.
- Gay K, Stephens DS. Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **2001**; 184: 56- 65.
- Geri G, Dupeux S, Pouchot J. Pneumococcal purulent pericarditis. *Rev Med Interne* **2008**; 29: 568-72.
- Gervaix A, Taguebue J, Bescher BN, *et al.* Bacterial meningitis and pneumococcal serotype distribution in children in cameroon. *Pediatr Infect Dis J* **2012**; 31: 1084-7.

- Gidenne S. Identification bactérienne par la technologie MALDI-TOF. *Revue Technique Luxembourgeoise* **2011**; 1: 38- 43.
- Goldstein FW. Résistance du pneumocoque aux bêta-lactamines : de la microbiologie à la clinique. *Bull Soc Fr Microbiol* **1997**; 12:141- 8.
- Gonzalez BE, Hulten KG, Lamberth L, *et al.* *Streptococcus Pneumoniae* serogroups 15 and 33: an increasing cause of pneumococcal infections in children in the United States after the introduction of the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* **2006**; 25: 301- 5.
- Gratten M, Carlisle J, Hanna J, *et al.* Seroepidemiology of invasive pneumococcal disease in Queensland, 1990 to 1997. *Commun Dis Intell* **1998**; 22: 265- 9.
- Gray BM, Converse GM, III, Dillon HC, Jr. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J Infect Dis* **1979**; 140: 979- 83.
- Gray BM, Dillon HC, Jr. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody to types 3, 6, 14, and 23 in the first two years of life. *J Infect Dis* **1988**; 158: 948- 55.
- Greve T, Moller JK. Accuracy of using the *lytA* gene to distinguish *Streptococcus pneumoniae* from related species. *J Med Microbiol* **2012**; 61: 478- 82.
- Guerin JM, Djoko-Tamnou J, Segrestaa JM. Péritonite purulente primitive à pneumocoque chez l'adulte. *Med Mal Infec* **1983**; 13 (2): 59- 61.
- Gulay Z, Ozbek OA, Bicmen M, *et al.* Macrolide resistance determinants in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* **2008**; 61: 490- 3.
- Gutierrez F, Masia M, Mirete C, *et al.* The influence of age and gender on the population-based incidence of community-acquired pneumonia caused by different microbial pathogens. *J Infect* **2006**; 53: 166- 74.
- Gutmann L, Varon E. Résistance de *Streptococcus pneumoniae* et du groupe viridans aux fluoroquinolones. *Med Mal Infec* **2001**; 31 (5): 632- 6.
- Hanquet G, Kissling E, Fenoll A. Pneumococcal serotypes in children in 4 European countries. *Emerg Infect Dis* **2010**; 16 (9): 1428-1439.
- Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* **2005**; 5: 83- 93.
- Heath PT, Nik Yusoff NK, Baker CJ. Neonatal meningitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **2003**; 88:173- 178.
- Helferty M, Rotondo JL, Martin I, *et al.* The epidemiology of invasive pneumococcal disease in the Canadian North from 1999 to 2010. *Int J Circumpolar Health* **2013**; 72.

- Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **1995**; 33(10): 2759- 62.
- Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, *et al.* Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. *J Infect Dis* **2007**;196 :1346- 54.
- Ho PL, Tse WS, Tsang KWT, *et al.* Risk factors for acquisition of levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: a case-control study. *Clin Infect Dis* **2001**; 32: 701-707.
- Ho PL, Que TL, Chiu SS, *et al.* Fluoroquinolone and other antimicrobial resistance in invasive pneumococci, Hong Kong, 1995-2001. *Emerg Infect Dis* **2004**;10(7): 1250-7.
- Ho PL. *Emerging antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae*. Doctor of Medicine thesis. The University of Hong Kong **2008**.
- Hoban D, Baquero F, Reed V, Felmingham D. Demographic analysis of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae*: worldwide results from PROTEKT 1999-2000. *Int J Infect Dis* **2005**; 9(5): 262-73.
- Hoenigl M, Fussi P, Feierl G, *et al.* Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Southeast Austria, 1997-2008. *Int J Antimicrob Agents* **2010**; 36: 24- 7.
- Holliman RE, Liddy H, Johnson JD, Adjei O. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in Kumasi, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2007**; 101(4): 405- 13
- Horacio AN, Diamantino-Miranda J, Aguiar SI, *et al.* Serotype changes in adult invasive pneumococcal infections in Portugal did not reduce the high fraction of potentially vaccine preventable infections. *Vaccine* **2012**; 30: 218-24.
- Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, *et al.* Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med* **2009**; 360: 244- 56.
- Huang SS, Henrichsen VL, Stevenson AE, *et al.* Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. *Pediatrics* **2009**; 124: 1- 11.
- Hyde TB, Gay K, Stephens DS, *et al.* Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates. *JAMA* **2001**; 286: 1857- 62.
- Ikenaga M, Kosowska-Shick K, Gotoh K, *et al.* Genotypes of macrolide-resistant pneumococci from children in southwestern Japan: raised incidence of strains that have both erm(B) and mef(A) with serotype 6B clones. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2008**; 62: 16- 22.

- Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, *et al.* Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol* **2011**; 11: 1709-15.
- Imohl M, Reinert RR, van der Linden M. Adult invasive pneumococcal disease between 2003 and 2006 in North-Rhine Westphalia, Germany: serotype distribution before recommendation for general pneumococcal conjugate vaccination for children <2 years of age. *Clin Microbiol Infect* **2009**; 15: 1008-12.
- Imohl M, Reinert RR, Mutscher C, van der Linden M. Macrolide susceptibility and serotype specific macrolide resistance of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Germany from 1992 to 2008. *BMC Microbiol* **2010**; 10: 299.
- Ing J, Mason EO, Kaplan SL, *et al.* Characterization of nontypeable and atypical *Streptococcus pneumoniae* pediatric isolates from 1994 to 2010. *J Clin Microbiol* **2012**; 50: 1326- 30.
- Ingels H, Rasmussen J, Andersen PH, *et al.* Impact of pneumococcal vaccination in Denmark during the first 3 years after PCV introduction in the childhood immunization programme. *Vaccine* **2012**; 30: 3944- 50.
- Ip M, Lyon DJ, Yung RW, *et al.* Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 1578- 80.
- Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* **2010**; 14(3): 197-209.
- Jefferies JM, Smith AJ, Edwards GF, *et al.* Temporal analysis of invasive pneumococcal clones from Scotland illustrates fluctuations in diversity of serotype and genotype in the absence of pneumococcal conjugate vaccine. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 87- 96.
- Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. *Lancet Infect Dis* **2006**; 6: 405- 10.
- Jenkins SG, Farrell DJ, Patel M, *et al.* Trends in anti-bacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA, 2000-2003: PROTEKT US years 1-3. *J Infect* **2005**; 51: 355-63.
- Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **2008**; 7: 1.
- Jenkins SG, Farrell DJ. Increase in pneumococcus macrolide resistance, United States. *Emerg Infect Dis* **2009**; 15: 1260- 4.

- Jette LP, Lamothe F. Surveillance of invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Quebec, Canada, from 1984 to 1986: serotype distribution, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics. *J Clin Microbiol* **1989**; 27: 1- 5.
- Jin P, Kong F, Xiao M, *et al.* First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. *J Infect Dis* **2009**;200: 1375-80.
- Johnson DM, Stilwell MG, Fritsche TR, *et al.* Emergence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1999-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis* **2006**; 56: 69-74.
- Johnson HL, Deloria-Knoll M, Levine OS, *et al.* Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. *PLoS Med* **2010**; 7.
- Johnston NJ, De Azavedo JC, Kellner JD, *et al.* Prevalence and characterization of the mechanisms of macrolide, lincosamide, and streptogramin resistance in isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 2425- 6.
- Joly-Guillou ML. Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation* **2006**; 15: 234- 40.
- Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, *et al.* Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Braz J Infect Dis* **2013**; 17: 672- 81.
- Kago I, Ekoe T, Tchokoteu PF, *et al.* Neonatal purulent meningitis in Yaoundé. Epidemiologic, clinical and prognostic aspects. *Med Mal Infect* **1990**; 20: 507-511.
- Kaijalainen T, Rintamaki S, Herva E, *et al.* Evaluation of gene-technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol methods* **2002**; 51: 111- 8.
- Kaijalainen T, Saukkoriipi A, Bloigu A, *et al.* Real-time pneumolysin polymerase chain reaction with melting curve analysis differentiates pneumococcus from other alpha-hemolytic streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2005**; 53: 293- 9.
- Kaplan SL, Mason Jr EO, Wald ER, *et al.* Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* **2004**; 113: 443- 9.
- Karstaedt AS, Khoosal M, Crewe-Brown HH. Pneumococcal bacteremia during a decade in children in Soweto, South Africa. *Pediatr Infect Dis J* **2000**; 19: 454-7.
- Kawamura Y, Whiley RA, Shu SE, *et al.* Genetic approaches to the identification of the *mitis* group within the genus *Streptococcus*. *Microbiology* **1999**; 145 (9): 2605-13.

- Kearns AM, Wheeler J, Freeman R, *et al.* Pneumolysin detection identifies atypical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 1309-10.
- Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, *et al.* Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3373-5.
- Kempf M, Baraduc R, Bonnabau H, *et al.* Epidemiology and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in France in 2007: data from the pneumococcus surveillance network. *Microb Drug Resist* **2011**; 17: 31-6.
- Kisakye A, Makumbi I, Nansera D, *et al.* Surveillance for *Streptococcus pneumoniae* meningitis in children aged <5 years: implications for immunization in Uganda. *Clin Infect Dis* **2009**; 48(2): 153- 161.
- Koeck JL, Chakour M, Teyssou R. Apport de la biologie moléculaire au diagnostic bactériologique. *Revue Française des Laboratoires* **2001**; 335 : 37- 41.
- Kok J, Thomas LC, Olma T, *et al.* Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. *PLoS One* **2011**; 6: 232-85.
- Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, *et al.* Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* **2006**; 354: 1455- 63.
- La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* **2009**; 4: e8041.
- Lagrange H. Infections par *Streptococcus pneumoniae* : Physiopathologie et réponses immunitaires. *Med Mal Infect* **1994**; 24: 927-39.
- Lahbabi MS, Ben omar S, Bouskraoui M, *et al.* Méningites purulentes néonatales. Étude analytique de 94 observations à Casablanca. *Med Mal Infect* **1997**; 27: 88- 92.
- Lalitha MK, Pai R, John TJ, *et al.* Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by agglutination assays: a cost-effective technique for developing countries. *Bull World Health Organ* **1996**; 74: 387- 90.
- Lauderdale TL, Wagener MM, Lin HM, *et al.* Serotype and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Taiwanese children: comparison of nasopharyngeal and clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2006**; 56: 421- 6.
- Leal J, Vanderkooi OG, Church DL, *et al.* Eradication of invasive pneumococcal disease due to the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in Calgary, Alberta. *Pediatr Infect Dis J* **2012**; 31: 169-175.
- Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 2727-34.

- Lee HJ, Kang JH, Henrichsen W. Immunogenicity and safety of a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in healthy children and in children at increased risk of pneumococcal infection. *Vaccine* **1995**; 13: 1533- 38.
- Lee S, Lee K, Kang Y, Bae S. Prevalence of serotype and multidrug-resistance of *Streptococcus pneumoniae* respiratory tract isolates in 265 adults and 36 children in Korea, 2002-2005. *Microb Drug Resist* **2010**; 16(2):135- 42.
- Lemozy J, Suc C. Actualités sur les streptocoques et entérocoques (Données taxonomiques et identification). *Feuille de Biologie* **1997**; 37 (215):15- 22.
- Lepoutre A, Varon E, Georges S, *et al.* Impact of infant pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal diseases in France, 2001-2006. *Euro Surveill* **2008**; 13(35).
- Levy C, de La Rocque F, Cohen R. Epidemiology of pediatric bacterial meningitis in France. *Med Mal Infect* **2009**; 39: 419- 31.
- Lismond A, Carbonnelle S, Verhaegen J, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from vaccinated and non-vaccinated patients with a clinically confirmed diagnosis of community-acquired pneumonia in Belgium. *Int J Antimicrob Agents* **2012**; 39: 208-16.
- Liu Y, Wang H, Chen M, *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in China younger than 5 years. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2008**; 61(3): 256- 63.
- Liull D, Lopez R, Garcia E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 1250- 6.
- Loeb M, Neupane B, Walter SD, *et al.* Environmental risk factors for community-acquired pneumonia hospitalization in older adults. *J Am Geriatr Soc* **2009**; 57:1036-40.
- Lund E. Diagnosis of pneumococci by the optochin and bile tests. *Acta Path Microbiol Scan* **1959**; 47: 308- 15.
- Manga NM, Ndour CT, Diop SA, *et al.* Adult purulent meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in Dakar, Senegal. *Med Trop* **2008**; 68(6): 625- 8.
- Marchandin H, Jean-Pierre H, Jumas-Bilak E, *et al.* Distribution of macrolide resistance genes *erm(B)* and *mef(A)* among 160 penicillin-intermediate clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated in southern France. *Pathol Biol* **2001**; 49: 522-27.
- Martin P, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Nucleotide sequence of the tet M tetracycline resistance determinant of the streptococcal conjugative shuttle transposon Tn 1545. *Nucleic Acids Res* **1986**; 14: 7047- 58.

- Martin C, Sibold C, Hakenbeck R. Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *EMBO J* **1992**; 11: 3831- 6.
- Mathys V, Lefèvre P, Fontaine V, *et al.* La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. *Antibiotiques* **2007**; 9: 205-11.
- McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, *et al.* Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3446- 51.
- McDougal LK, Tenover FC, Lee LN, *et al.* Detection of Tn917-like sequences within a Tn916-like conjugative transposon (Tn3872) in erythromycin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 2312- 8.
- McGee LL, Klugman KP, Wasas A, *et al.* Serotype 19F multiresistant pneumococcal clone harboring two erythromycin resistance determinants (erm(B) and mef(A)) in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **2001a**; 45: 1595- 8.
- McGee LL, McDougal J, Zhou BG. Nomenclature of major antimicrobial –resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology Network. *J Clin Microbiol* **2001b**; 39 (7): 2565- 2571.
- Mehr S, Wood N. *Streptococcus pneumoniae* – a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatric Respiratory Reviews* **2012**; 13: 258- 264.
- Mezghani Maalej S, Kassis M, Mahjoubi Rhimi F, *et al.* Bacteriology of community acquired meningitis in Sfax, Tunisia (1993-2001). *Med Mal Infect* **2006**; 36: 105-110.
- Mitchell TJ, Andrew PW. Biological properties of pneumolysin. *Microb Drug Resist* **1997**; 3: 19- 26.
- Mokaddas E, Albert MJ. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolates: an overview from Kuwait. *Vaccine* **2012**; 30(6): 37- 40.
- Moore MR, Gertz RE, Woodbury RL, *et al.* Population Snapshot of Emergent *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis* **2008**; 197: 1016-1027.
- Mudhune S, Wamae M. Report on invasive disease and meningitis due to *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* from the Network for Surveillance of Pneumococcal Disease in the East African Region. *Clin Infect Dis* **2009**; 48 (2):147-52.

- Munoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, *et al.* Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* **2008**; 46: 174- 82.
- Myers C, Gervaix A. *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia in children. *Int J Antimicrob Agents* **2007**; 30 (1): 24- 28.
- Myint TT, Madhava H, Balmer P, *et al.* The Impact of 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Invasive Pneumococcal Disease: A Literature Review. *Adv Ther* **2013**; 30: 127- 51.
- Ndiaye AG, Boye CS, Hounkponou E, *et al.* Antimicrobial susceptibility of select respiratory tract pathogens in Dakar, Senegal. *J Infect Dev Ctries* **2009**; 3: 660- 6.
- Nel E. Neonatal meningitis: mortality, cerebrospinal fluid, and microbiological findings. *J Trop Pediatr* **2000**; 46:237- 8.
- Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, *et al.* Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *J Clin Microbiol* **2011**; 49: 2980- 4.
- Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, *et al.* Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 163: 1730- 54.
- Njanpop-Lafourcade BM, Traoré Y, Aguilera JF, *et al.* Contribution de la PCR à la surveillance microbiologique et épidémiologique des méningites bactériennes aiguës en Afrique : à propos de l'expérience d'un transfert de technologie réussi au centre Muraz de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Revue Francophone des Laboratoires* **2005**; 372: 33- 40.
- Obaro S, Lawson L, Essen U, *et al.* Community acquired bacteremia in young children from central Nigeria- a pilot study. *BMC Infect Dis* **2011**; 11: 137.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, *et al.* Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *The Lancet* **2009**; 374: 893- 902.
- Odievre MH, Sanni E, de BF, *et al.* Pneumococcal infection among community-acquired pneumonia. A retrospective study of 230 hospitalized children. *Arch Pediatr* **2007**; 14: 1290- 7.
- Pantosti A, Gherardi G, Conte M, *et al.* A novel, multiple drug-resistant, serotype 24F strain of *Streptococcus pneumoniae* that caused meningitis in patients in Naples, Italy. *Clin Infect Dis* **2002**; 35: 205- 8.
- Park IH, Pritchard DG, Cartee R, *et al.* Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **2007**; 45: 1225- 33.

- Perez-Rodriguez MT, Sopena B, Mendez-Lage S, *et al.* Influence of age on the clinical manifestations of invasive pneumococcal disease and antibiotic resistance rates. *Med Clin (Barc)* **2013**. [Epub ahead of print].
- Picard C. Infections à *Streptococcus pneumoniae* et à *Staphylococcus aureus* : quels sont les déficits immunitaires héréditaires à rechercher?. *Revue francophone des laboratoires* **2008**; 407 : 91- 95.
- Pichon B, Ladhani SN, Slack MP, *et al.* Changes in the molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis following the introduction of pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales. *J Clin Microbiol* **2013**; 51: 820-7.
- Pikis A, Campos JM, Rodriguez WJ, *et al.* Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *J Infect Dis* **2001**; 184: 582- 90.
- Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, *et al.* Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis* **2010**; 201: 32- 41.
- Pillai DR, Shahinas D, Buzina A, *et al.* Genome wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* **2009**; 10: 642.
- Pletz MW, McGee L, Jorgensen J, *et al.* Levofloxacin-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in the United States: evidence for clonal spread and the impact of conjugate pneumococcal vaccine. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48: 3491-7.
- Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol and Biotech* **2002**; 2 : 2-11.
- Porat N, Barkai G, Jacobs MR, *et al.* Four antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones unrelated to the pneumococcal conjugate vaccine serotypes, including 2 new serotypes, causing acute otitis media in southern Israel. *J Infect Dis* **2004**; 189(3): 385- 92.
- Prere MF, Fayet OA. A specific polymerase chain reaction test for the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2011**; 70: 45-53.
- Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 1481-3.
- Rachdi M, Boutiba-Ben B I, Moalla S, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* in Tunisia. *Pathol Biol (Paris)* **2008**; 56: 125- 9.
- Rachdi M, Boutiba-Ben B I, Mahjoubi-Rhimi F, *et al.* Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Tunisia. *J Med Microbiol* **2011**; 60: 391- 3.

- Ramdani-Bougoussa N. *Streptococcus pneumoniae*: résistance à la pénicilline et sérotypes chez l'enfant. *Doctor of Medical Sciences thesis* **2001**. Université de Médecine d'Alger, Algiers, Algeria.
- Ramdani-Bougoussa N, Rahal K. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Algiers, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 824-36.
- Rantala M, Huikko S, Huovinen P, *et al*. Prevalence and molecular genetics of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Finland in 2002. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 4180- 4.
- Rapport de l'Atelier National de Consensus (RANC). *Lutte contre les méningites bactériennes purulentes*. Agence Nationale de Documentation de la Santé **1998**, Algiers, Algeria.
- Raymond J, Cohen R, Moulin F, *et al*. Facteurs influençant le portage de *Streptococcus pneumoniae*. *Med Mal Infect* **2002**; 32(1): 13- 20.
- Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, *et al*. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* by Adults and Children in Community and Family Settings. *Clin Infect Dis* **2004**; 38: 632- 9.
- Reinert P, Guy M, Girier B, *et al*. The safety and immunogenicity of an heptavalent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (Prevenar) administered in association with a whole-cell pertussis-based pediatric combination vaccine (DTP-IPV/PRP-T) to French infants with a two-, three-, and four-month schedule. *Arch Pediatr* **2003**; 10: 1048-55.
- Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, *et al*. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **2005a**; 49: 2903- 13.
- Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, *et al*. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol* **2005b**; 43: 1294-300.
- Reinert RR, van der Linden M, Seegmüller I, *et al*. Molecular epidemiology of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with invasive pneumococcal disease in Germany. *Clin Microbiol Infect* **2007**; 13: 363- 8.
- Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* **2009**; 15(3): 7- 11.
- Reinert RR, Paradiso P, Fritzell B. Advances in pneumococcal vaccines: the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. *Expert Rev Vaccines* **2010**; 9: 229- 36.
- Renou F, Gerber A, Moiton MP, *et al*. Pneumococcal septic arthritis revealing a multiple myeloma. *Rev Med Interne* **2007**; 28: 186- 7.

- Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, *et al.* Accuracy of phenotypic methods for identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates included in surveillance programs. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 2184- 8.
- Rieux V. Les facteurs de virulence de *Streptococcus pneumoniae*. *Med Mal Infect* **2002**; 32 (1) : 1- 12.
- Risch M, Radjenovic D, Han JN, *et al.* Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. *Swiss Med Wkly* **2010**; 140: w13095.
- Robson RL, Essengue S, Reed NA, *et al.* Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* induced by frozen storage in glycerol. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2007**; 58: 185- 90.
- Rodriguez-Barradas MC, Musher DM, LaHart C, *et al.* Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* after vaccination of human immunodeficiency virus-infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine. *J Infect Dis* **1992**; 165: 553- 6.
- Rohani MY, Raudzah A, Ng AJ, *et al.* Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* infection in Malaysia. *Epidemiol Infect* **1999**; 122: 77-82.
- Rosen JB, Thomas AR, Lexau CA, *et al.* Geographic variation in invasive pneumococcal disease following pneumococcal conjugate vaccine introduction in the United States. *Clin Infect Dis* **2011**; 53: 137- 43.
- Rudolph K, Bulkow L, Bruce M, *et al.* Molecular resistance mechanisms of macrolide-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Alaska, 1986 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57: 5415- 22.
- Sa Leao R, Tomasz A, Sanches IS, *et al.* Genetic diversity and clonal patterns among antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children: day care centers as autonomous epidemiological units. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 4137- 44.
- Saha SK, Naheed A, El AS, *et al.* Surveillance for invasive *Streptococcus pneumoniae* disease among hospitalized children in Bangladesh: antimicrobial susceptibility and serotype distribution. *Clin Infect Dis* **2009**; 48(2): 75- 81.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **1987**; 4: 406- 25.
- Sanders LA, Rijkers GT, Kuis W, *et al.* Defective antipneumococcal polysaccharide antibody response in children with recurrent respiratory tract infections. *J Allergy Clin Immunol* **1993**; 91: 110- 9.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR . DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1977**; 74: 5463- 7.

- Schade C. High-Resolution Separation of Nucleic Acid Fragments. American Laboratory. Application note 142596, **2013**.
- Schlech WF, III, Ward JI, Band JD, *et al*. Bacterial meningitis in the United States, 1978 through 1981. The National Bacterial Meningitis Surveillance Study. *JAMA* **1985**; 253: 1749- 54
- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, *et al*. Bacterial meningitis in the United States in 1995. *N Engl J Med* **1997**; 337: 970- 6.
- Selva L, Esteva C, Gene A, *et al*. Direct detection of *Streptococcus pneumoniae* in positive blood cultures by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2010**; 66: 204- 6.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, *et al*. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* **2009**; 49: 543- 51.
- Serrano I, Ramirez M, Melo-Cristino J. Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Portugal: implications for vaccination and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect* **2004**; 10: 652- 6.
- Setchanova LP, Ouzounova-Raykova V, Zhelezova GZ, *et al*. Prevalence and macrolide resistance phenotypes and genotypes among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in Sofia, Bulgaria from 2001 to 2005. *J Chemother* **2007**; 19: 256- 62.
- Sherwin RL, Gray S, Alexander R, *et al*. Distribution of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine *Streptococcus pneumoniae* Serotypes in US Adults Aged  $\geq 50$  Years With Community-Acquired Pneumonia. *J Infect Dis* **2013**; 208: 1813-20.
- Shibl AM, Memish ZA, Pelton S. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in the Arabian Peninsula and Egypt. *Int J Antimicrob Agents* **2009**; 33: 410- 9.
- Shibl AM, Memish ZA, Al-Kattan KM. Antibiotic resistance and serotype distribution of invasive pneumococcal diseases before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the Kingdom of Saudi Arabia (KSA). *Vaccine* **2012**; 30 (6): 32-36.
- Shin J, Baek JY, Kim SH, *et al*. Predominance of ST320 among *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates from 10 Asian countries. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66(5): 1001- 4.
- Shortridge VD, Doern GV, Brueggemann AB, *et al*. Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. *Clin Infect Dis* **1999**; 29: 1186- 8.

- Sicard M, Gasc AM, Giammarinaro P, *et al.* Molecular biology of *Streptococcus pneumoniae*: an everlasting challenge. *Res Microbiol* **2000**; 151: 407- 11.
- Silberbauer EJ, Ismail N, Gottberg AV, *et al.* Serotype and antimicrobial profile distribution of invasive pneumococcal isolates in the pre-vaccine introduction era in Pretoria, South Africa, 2005 through 2009. *Diag Microbiol Infect Dis* **2011**; 71: 309-11.
- Sjöström K, Spindler C, Ortqvist A, *et al.* Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* **2006**; 42(4): 451- 9.
- Slotved HC, Kaltoft M, Skovsted IC, *et al.* Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 2518-22.
- Smaoui H, Amri J, Hajji N, Kechrid A. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *streptococcus pneumoniae* isolates in children in Tunis. *Archives de Pédiatrie* **2009**; 16: 220- 226.
- Smati F, Laouar H, Khalifa F, *et al.* Résistance à la pénicilline G de *Streptococcus pneumoniae* responsable d'infections graves communautaires en Algérie. *Med Mal Infect* **1994**; 24: 1190- 2.
- Song JH, Jung SI, Ko KS, *et al.* High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrob Agents Chemother* **2004a**; 48: 2101-7.
- Song JH, Chang HH, Suh JY, *et al.* Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian network for surveillance of resistant pathogens (ANSORP). *J Antimicrobial Chemother* **2004b**; 53: 457- 63.
- Song JH, Baek JY, Cheong HS, *et al.* Incorrect identification of *Streptococcus pneumoniae* and its effect on antimicrobial resistance rates. *Int J Antimicrob Agents* **2009**; 33: 93-5.
- Song JH, Dagan R, Klugman KP, *et al.* The relationship between pneumococcal serotypes and antibiotic resistance. *Vaccine* **2012**; 30: 2728-37.
- Sorensen U B. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* **1993**; 31:2097-2100.
- Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS **2005**; 4<sup>ème</sup> édition : 33- 45.
- Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 444-7.

- Sung RY, Ling JM, Fung SM, *et al.* Carriage of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in healthy Chinese and Vietnamese children in Hong Kong. *Acta Paediatr* **1995**; 84: 1262- 7.
- Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques : 10<sup>ème</sup> Rapport d'Evaluation (2007-2008), Algérie.
- Tait-Kamradt A, Davies T, Cronan M, *et al.* Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44: 2118- 25.
- Tali-Maamar H, Laliem R, Bentchouala C, *et al.* Reprint of: Serotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Algeria from 2001 to 2010. *Vaccine* **2012**; 30(6): 25- 31.
- Temime L, Dab W. Pneumococcal vaccination: expected benefits in adults. *Rev Med Interne* **2007**; 28: 9-15.
- Thabet L, Bousseta K, Kaabachi O, *et al.* Profil bactériologique des méningites purulentes à l'hôpital d'enfants de Tunis. *Med Mal Infect* **2002**; 32: 1- 7.
- Thabet F, Tilouche S, Tabarki B, *et al.* Pneumococcal meningitis mortality in children. Prognostic factors in a series of 73 cases. *Arch Pediatr* **2007**; 14: 334- 7.
- Thierry J, Perrier-Gros-Claude JD, Masseron T, Ros A. *Streptococcus pneumoniae* in *Précis de bactériologie clinique*. ESKA **2007**; 46: 899 - 909.
- Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, *et al.* Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med* **2011**; 364: 2016- 25.
- Thomas K, Mukkai KL, Veeraraghavan B, *et al.* Invasive pneumococcal disease associated with high case fatality in India. *J Clin Epidemiol* **2013**; 66: 36- 43.
- Tothpal A, Laub K, Kardos S, *et al.* Changes in the serotypes of Hungarian pneumococci isolated mainly from invasive infections: a review of all available data between 1988 and 2011. *Acta Microbiol Immunol Hung* **2012**. 59(3): 423- 33.
- Tremolieres F. Current epidemiology of microbial low respiratory tract infections. *Med Mal Infect* **2006**; 36: 546- 54.
- Trieu-Cuot P, Poyart-Salmeron C, Carlier C, *et al.* Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn1545. *Nucleic Acids Res* **1990**; 18: 3660.
- Trzcinski K, Thompson CM, Lipsitch M. Single-step capsular transformation and acquisition of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **2004**; 186: 3447-52.

- Tyrrell GJ, Lovgren M, Chui N, *et al.* Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* pre- and post-seven valent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Alberta, Canada, 2000-2006. *Vaccine* **2009**; 27: 3553- 60.
- Urwin G, Yuan MF, Feldman RA. Prospective study of bacterial meningitis in North East Thames region, 1991–1993, during introduction of *Haemophilus influenzae* vaccine. *BMJ* **1994**; 309: 1412- 4.
- Valles X, Flannery B, Roca A, *et al.* Serotype distribution and antibiotic susceptibility of invasive and nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* among children in rural Mozambique. *Trop Med Int Health* **2006**; 11: 358- 66.
- Van de Sande-Bruinsma N, Grundmann H, Verloo D, *et al.* Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14: 1722-30.
- Van der kooi OG, Low DE, Green K, *et al.* Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections. *Clin Infect Dis* **2005**; 40:1288- 97.
- Van der Linden M, Weib S, Falkenhorst G, *et al.* Four years of universal pneumococcal conjugate infant vaccination in Germany: impact on incidence of invasive pneumococcal disease and serotype distribution in children. *Vaccine* **2012**; 30 (40): 5880- 5.
- Van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **2009**; 374: 1543-56
- Van Eldere J, Mera RM, Miller LA, *et al.* Risk factors for development of multiple-class resistance to *Streptococcus pneumoniae* strains in Belgium over a 10-year period: antimicrobial consumption, population density, and geographic location. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 3491- 7.
- Varon E. Infections graves à pneumocoques: facteurs de pathogénicité. *Arch Pediatr* **2001**; 8 (4): 752- 6.
- Varon E, Gutmann L. *Centre National de Référence des Pneumocoques*. Rapport d'activité **2006**.  
[http://www.invs.sante.fr/surveillance/cnr/rapport\\_cnrp\\_2006.pdf](http://www.invs.sante.fr/surveillance/cnr/rapport_cnrp_2006.pdf)
- Varon E, Janoir C, Gutmann L. *Centre National de Référence des Pneumocoques*. Rapport d'activité **2010**  
[http://www.invs.sante.fr/surveillance/cnr/rapport\\_cnrp\\_2010.pdf](http://www.invs.sante.fr/surveillance/cnr/rapport_cnrp_2010.pdf).
- Varon E. Actualisation de l'épidémiologie des méningites bactériennes aiguës chez l'adulte en France. *Med Mal Infect* **2009**; 39: 432–444
- Varon E. Infections invasives à pneumocoque en France : Evolution de la résistance aux antibiotiques et de la distribution des sérotypes. *J Anti Infect* **2011**; 13: 201- 8.

- Varon E. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Med Mal Infect* **2012**; 42: 361- 5.
- Vergnaud M, Prevost JN, Malbruny B, *et al.* Isolation in France of clinical strain of *Streptococcus pneumoniae* susceptible to amoxicillin and resistant to cefotaxime. *Clin Microbiol Infect* **2000**; 6: 283- 4.
- Verhaegen J, Glupczynski Y, Verbist L, *et al.* Capsular types and antibiotic sensitivity of pneumococci isolated from patients with serious infections in Belgium 1980 to 1988. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1990**; 9: 390- 5.
- Watson DA, Musher DM, Verhoef J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1995**; 14: 479- 90.
- Watson M, Brett M, Brown M, *et al.* Pneumococci responsible for invasive disease and discharging ears in children in Sydney, Australia. *J Med Microbiol* **2007**; 56: 819-23.
- Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* **2011**; 378: 1962- 73.
- Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39: 577- 85.
- Whitney CG, Farley MM, Hadler J, *et al.* Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* **2000**; 343: 1917-24.
- Whitney CG, Pilishvili T, Farley MM, *et al.* Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. *Lancet* **2006**; 368(9546):1495- 502.
- Wintenberger C. Le pneumocoque en 2010 : de la génomique à la clinique. Compte-rendu de Congrès. *Med mal infect* **2010**; 40: 605- 9.
- Wolff M, Joly-Guillou ML, Pajot O. Comparative review of carbapenems. *Réanimation* **2009** ; 18 : 199-208.
- Wolter N, von Gottberg A, du Plessis M, *et al.* Molecular basis and clonal nature of increasing pneumococcal macrolide resistance in South Africa, 2000-2005. *Int J Antimicrob Agents* **2008**; 32: 62- 7.
- Wolter N, du Plessis M, von Gottberg A, *et al.* Molecular characterization of emerging non-levofloxacin-susceptible pneumococci isolated from children in South Africa. *J Clin Microbiol* **2009**; 47: 1319- 24.
- World Health Organization. Pneumococcal vaccines -*WHO position paper*. *Wkly Epidemiol Rec* **2003**;14 :110-19.

- World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization- *WHO position paper*. *Wkly Epidemiol Rec* **2007**; 82(12): 93-104.
- Xu X, Cai L, Xiao M, *et al*. Distribution of serotypes, genotypes, and resistance determinants among macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54: 1152- 9.
- Xue L, Yao K, Xie G, *et al*. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates that cause invasive disease among Chinese children. *Clin Infect Dis* **2010**; 50(5): 741- 4.
- Yang F, Xu XG, Yang MJ, *et al*. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Shanghai, China. *Int J Antimicrob Agents* **2008**; 32: 386- 91.
- Yao KH, Yang YH. *Streptococcus pneumoniae* diseases in Chinese children: past, present and future. *Vaccine* **2008**; 26: 4425- 33.
- Zanelli S, Gillet Y, Stamm D, *et al*. Méningites bactériennes du nourrisson âgé d'une à huit semaines. *Archives de Pédiatrie* **2000**; 7(3): 565-71.
- Zhanel GG, Wang X, Nichol K, *et al*. Molecular characterisation of Canadian paediatric multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* from 1998-2004. *Int J Antimicrob Agents* **2006**; 28: 465-71.
- Zhou L, Yu SJ, Gao W, *et al*. Serotype distribution and antibiotic resistance of 140 pneumococcal isolates from pediatric patients with upper respiratory infections in Beijing, 2010. *Vaccine* **2011**; 29: 7704- 10.

## ANNEXES

### Annexe 1. Composition des milieux utilisés

#### Milieux solides

- **Gélose Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf :	300,0 ml
Peptone de caséine :	17,5 g/L
Amidon de maïs :	1,5 g/L
Agar :	17,0 g/L
pH	7,4

- **Gélose nutritive**

Extrait de viande :	1,0g/L
Extrait de levure :	2,5g/L
Peptone :	5,0g/L
Chlorure de sodium :	5,0g/L
Agar :	15,0g/L
pH	7,0

- **Gélose Columbia**

Peptones :	20,0 g/L
Amidon de maïs :	1,0 g/L
Chlorure de sodium :	5,0 g/L
Extrait de levure :	3,0 g/L
Agar :	13,5 g/L
pH	7,3

- **Gélose Chocolat PolyVitex**

Peptone de caséine (bovin) :	7,5 g/L
Peptone de viande (bovin ou porcine) :	7,5 g/L
Amidon de maïs :	1 g/L
Phosphate dipotassique :	4 g/L
Chlorure de sodium :	5 g/L
Hémoglobine (bovin) :	10 g/L
Agar :	10 g/L
PolyViteX :	10 ml
pH	7,2

#### Milieux liquides

- **Bouillon Mueller Hinton**

Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
------------------------------	--------

---

ANNEXES

---

Extrait de bœuf	3,0 g
Amidon	1,5
pH	7,2

**Annexe 2. Tableau 4.** Valeurs des scores et description pour l'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF MS

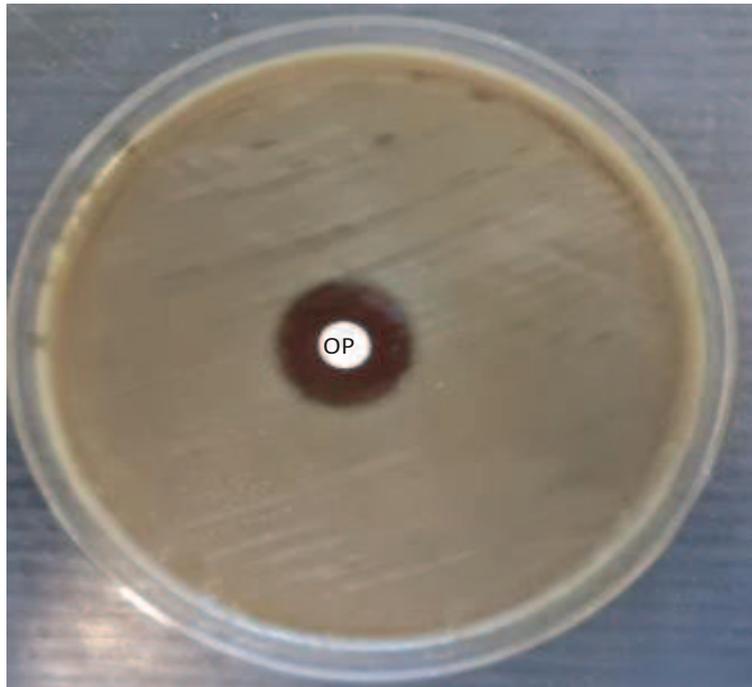
Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
1.900 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.899	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

**Annexe 3.** Sensibilité à l'optochine



**Figure 10.** Souche de *S.pneumoniae* sensible à l'optochine ( $\text{\O} > 14 \text{ mm}$ )

---

ANNEXES

Annexe 4. Résultats de l'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF MS

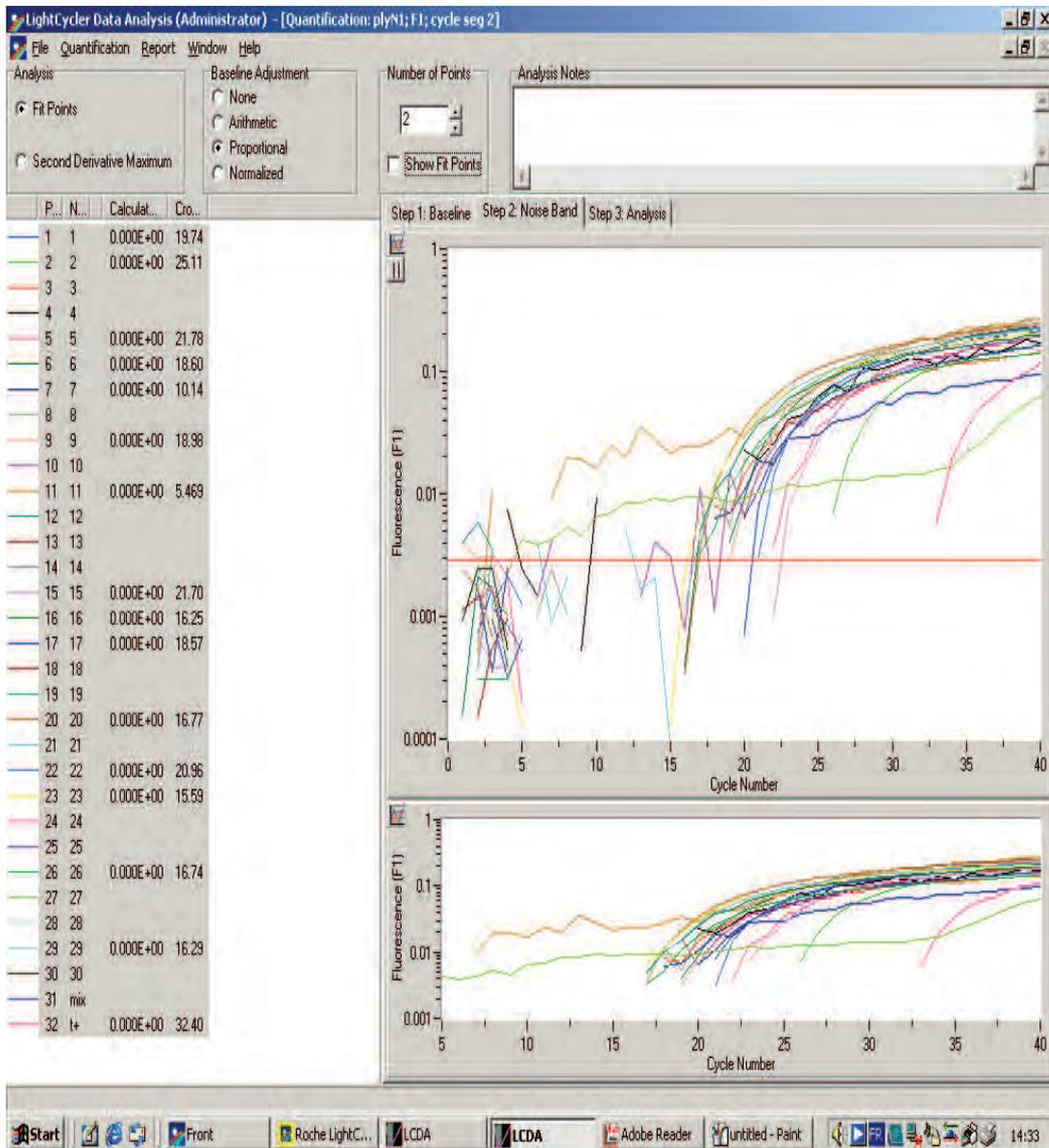
[germe identifié et score pour deux souches de *S.pneumoniae* (58 et 61, et 3 souches de streptocoques (14,18 et 19)].

<u>58</u> (++)(C)	58	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.208</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.13</u>
<u>58</u> (+++)(C)	58	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.33</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.272</u>
<u>58</u> (++)(C)	58	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.204</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.154</u>
<u>58</u> (++)(C)	58	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.052</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.02</u>
<u>61</u> (++)(C)	61	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.117</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.103</u>
<u>61</u> (++)(A)	61	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.968</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.831</u>
<u>61</u> (++)(C)	61	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.073</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.002</u>
<u>61</u> (++)(A)	61	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.951</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.887</u>

<u>18</u> (++)(C)	18	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.072</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.979</u>
<u>18</u> (+)(C)	18	S. pneumoniae	<u>1.771</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.765</u>
<u>18</u> (++)(A)	18	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.03</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.001</u>
<u>18</u> (++)(C)	18	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.111</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.067</u>
<u>19</u> (++)(A)	19	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.971</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.936</u>
<u>19</u> (++)(A)	19	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.25</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.194</u>
<u>19</u> (++)(C)	19	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.054</u>	S. pneumoniae	<u>1.953</u>
<u>19</u> (++)(A)	19	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.231</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.037</u>

<u>14</u> (++)(A)	14	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.271</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.21</u>
<u>14</u> (++)(C)	14	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.155</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>1.979</u>
<u>14</u> (++)(C)	14	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.176</u>	<a href="#">Streptococcus pneumoniae</a>	<u>2.063</u>
<u>14</u> (++)(A)	14	S. pneumoniae	<u>1.955</u>	S. pneumoniae	<u>1.883</u>

## Annexe 5. Résultats de la PCR en temps réel

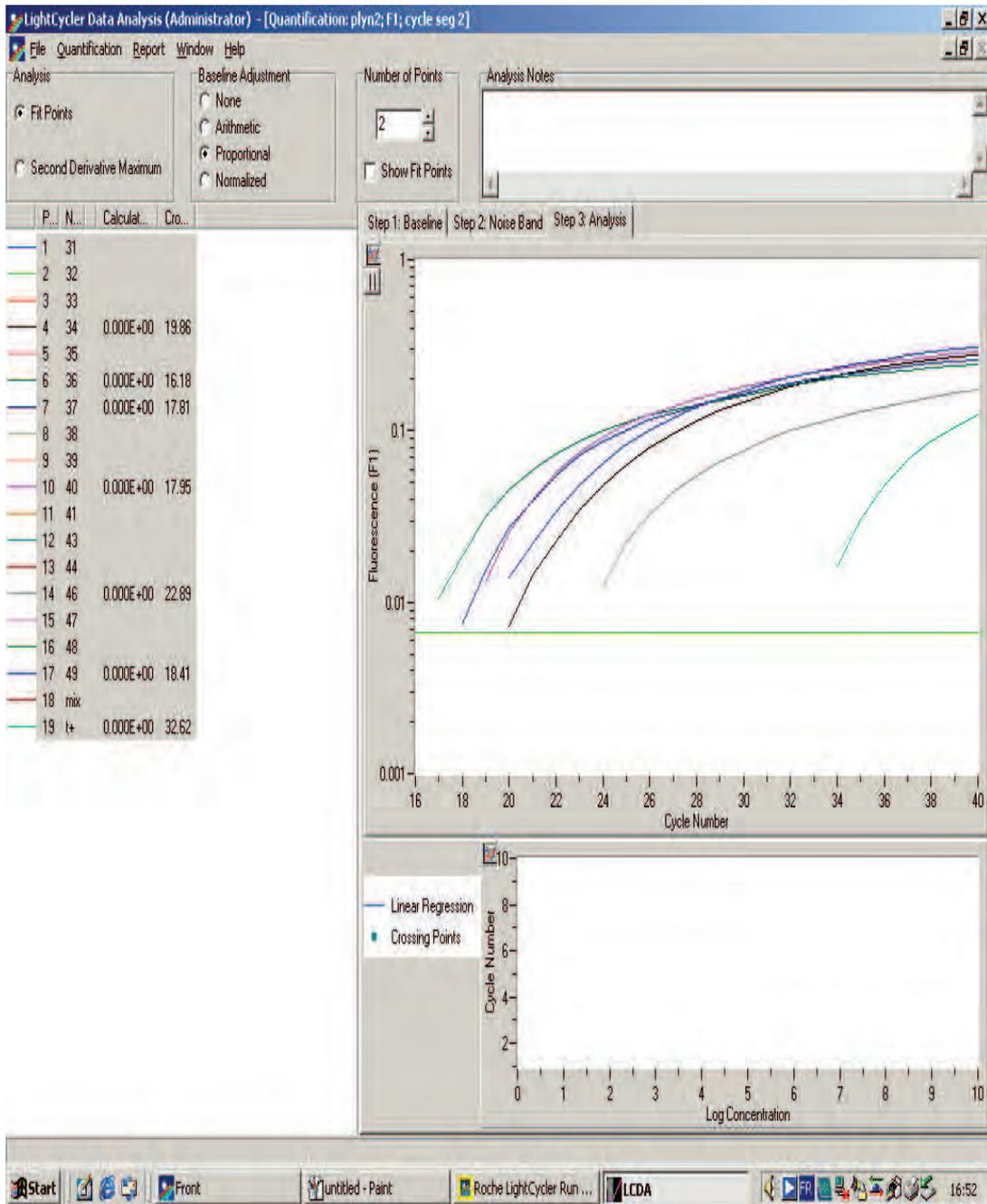


**Figure 12.** Résultats de la PCR en temps réel pour le gène ply N

Résultats positifs de la RT-PCR pour les souches de pneumocoque 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 16, 17, 20, 22, 23, 26 et 29.

Résultat négatif de la RT-PCR pour la souche de pneumocoque 45 notée 25.

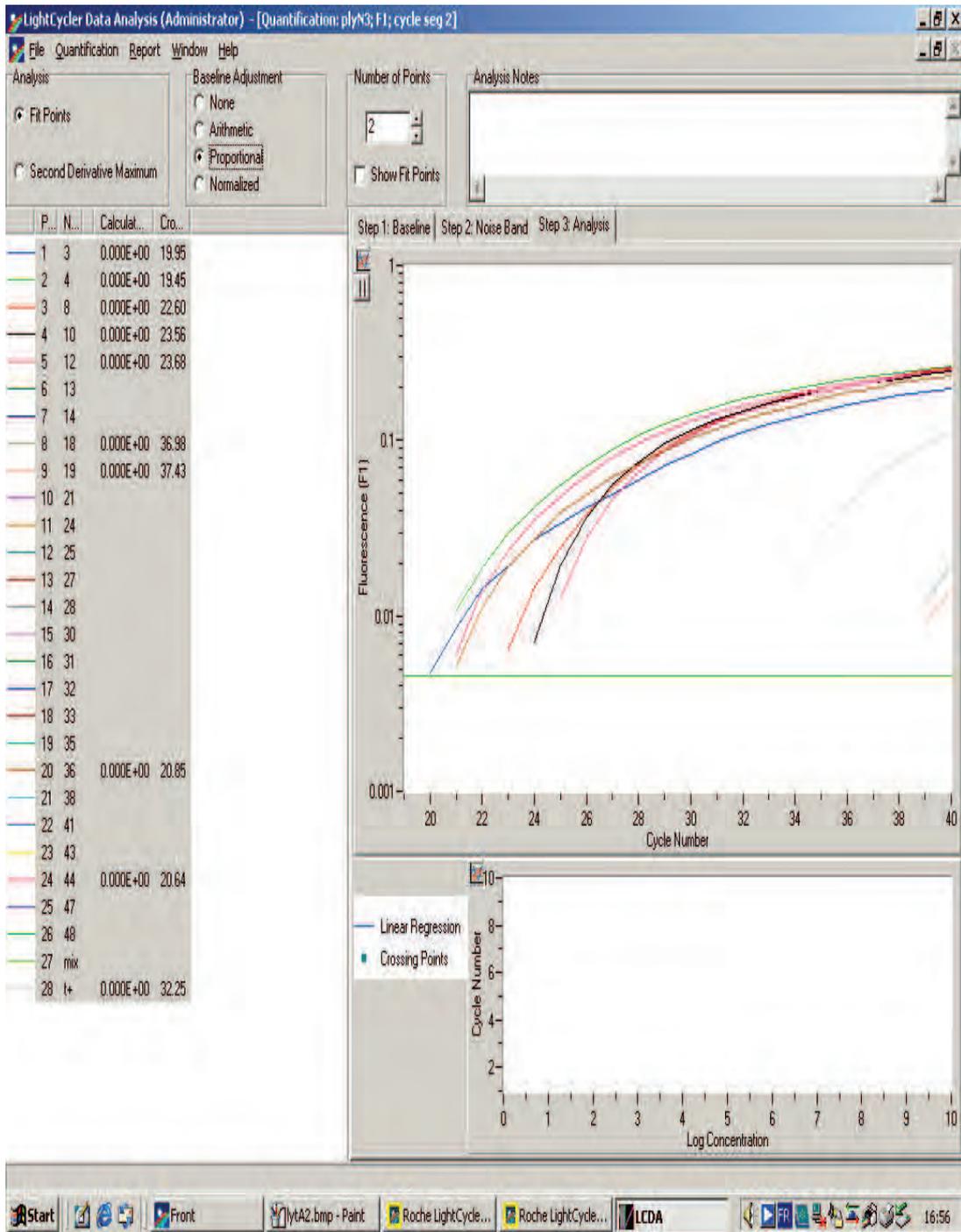
Résultats négatifs de la RT-PCR pour les souches de streptocoques 14, 28 et 30.



**Figure 13.** Résultats de la PCR en temps réel pour le gène ply N

Résultats positifs de la RT- PCR pour les souches de pneumocoques 34, 36, 37, 40, 46 et 49

Résultats négatifs de la RT- PCR pour les souches de streptocoques 31, 33, 38 et 39

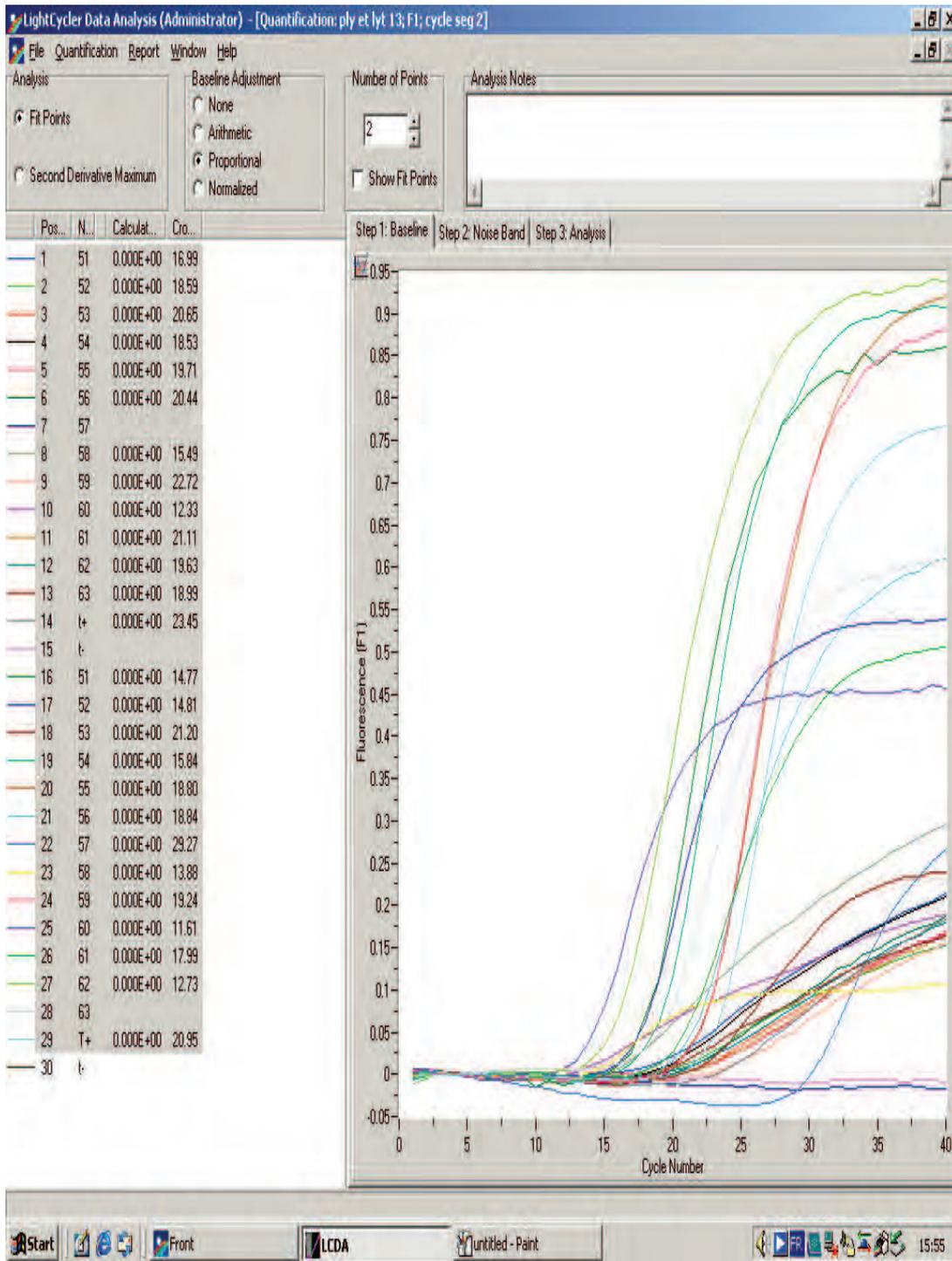


**Figure 14.** Résultats de la PCR en temps réel pour le gène ply N

Résultats positifs de la RT-PCR pour les souches de pneumocoques 3, 4, 8, 10, 12, 36 et 44.

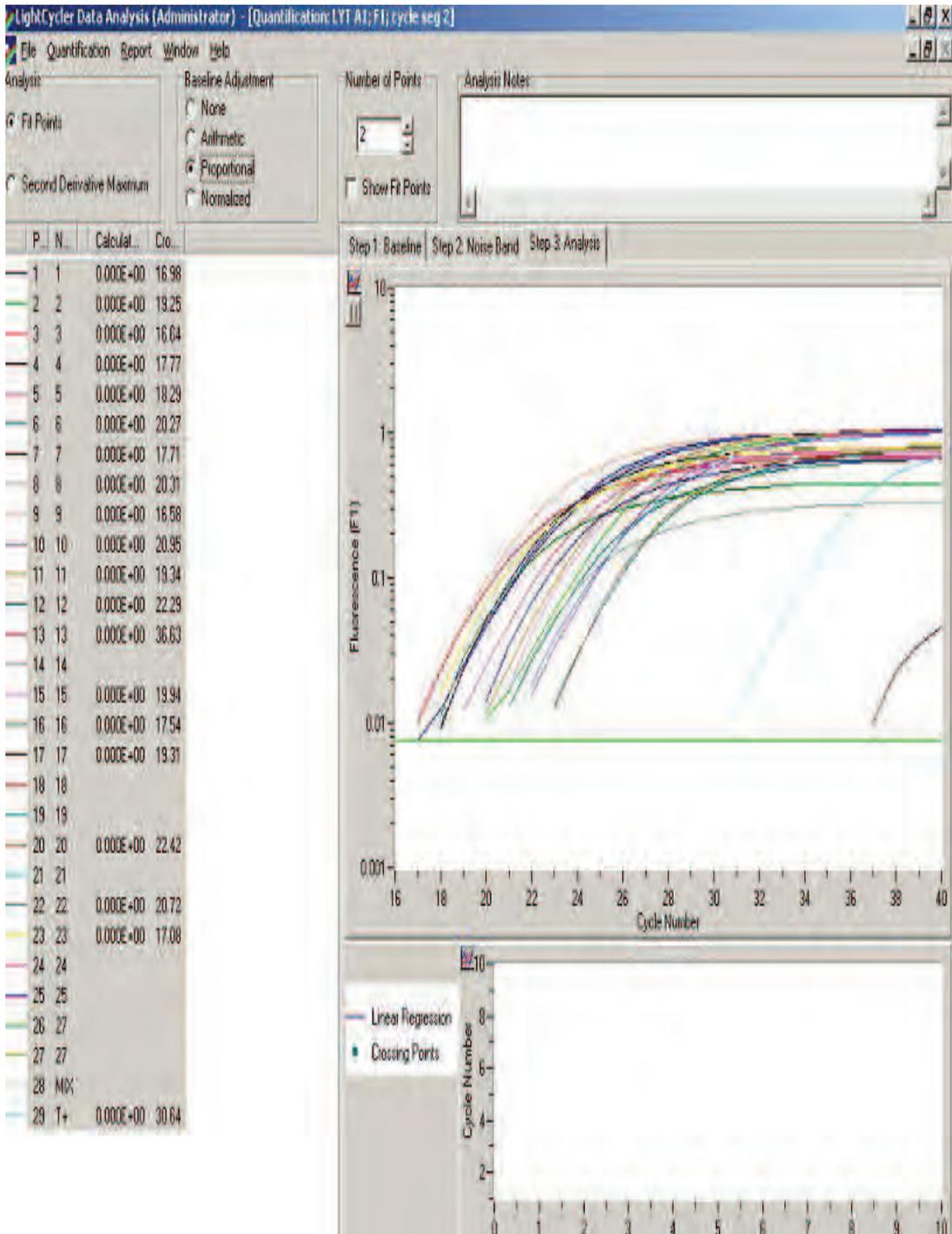
Résultats négatifs de la RT-PCR pour les souches de streptocoques 31, 33, 38 et 39

Résultats négatifs de la RT-PCR pour les souches de streptocoques 18 et 19 (vrais négatifs, nombre de cycles > 36).



**Figure 15.** Résultats de la PCR en temps réel pour le gène ply N

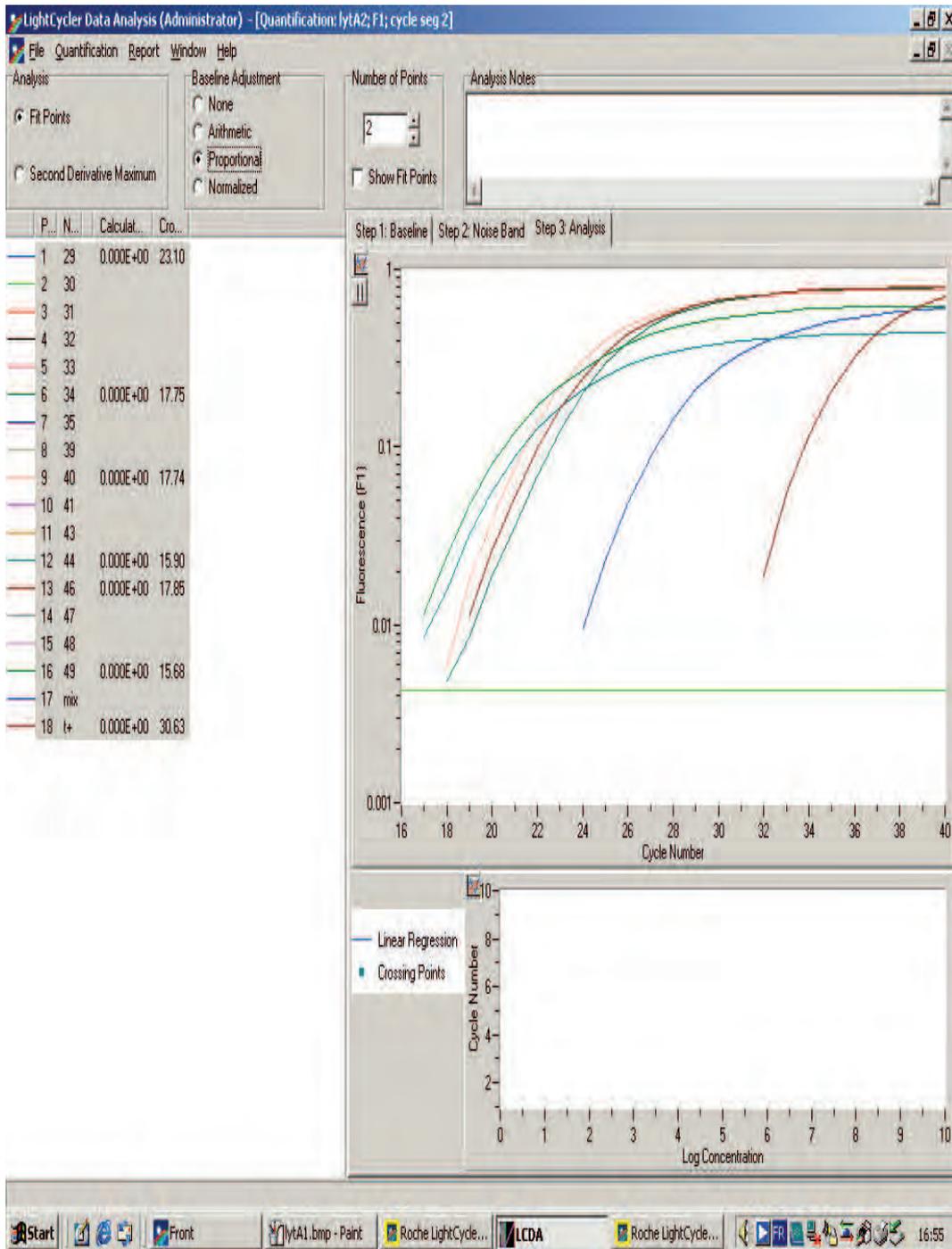
Résultats positifs de la RT-PCR pour les souches de pneumocoques 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 et 63.



**Figure 16.** Résultats de la PCR en temps réel pour le gène lytA

Résultats positifs de la RT-PCR pour les souches de pneumocoques 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 22, et 23.

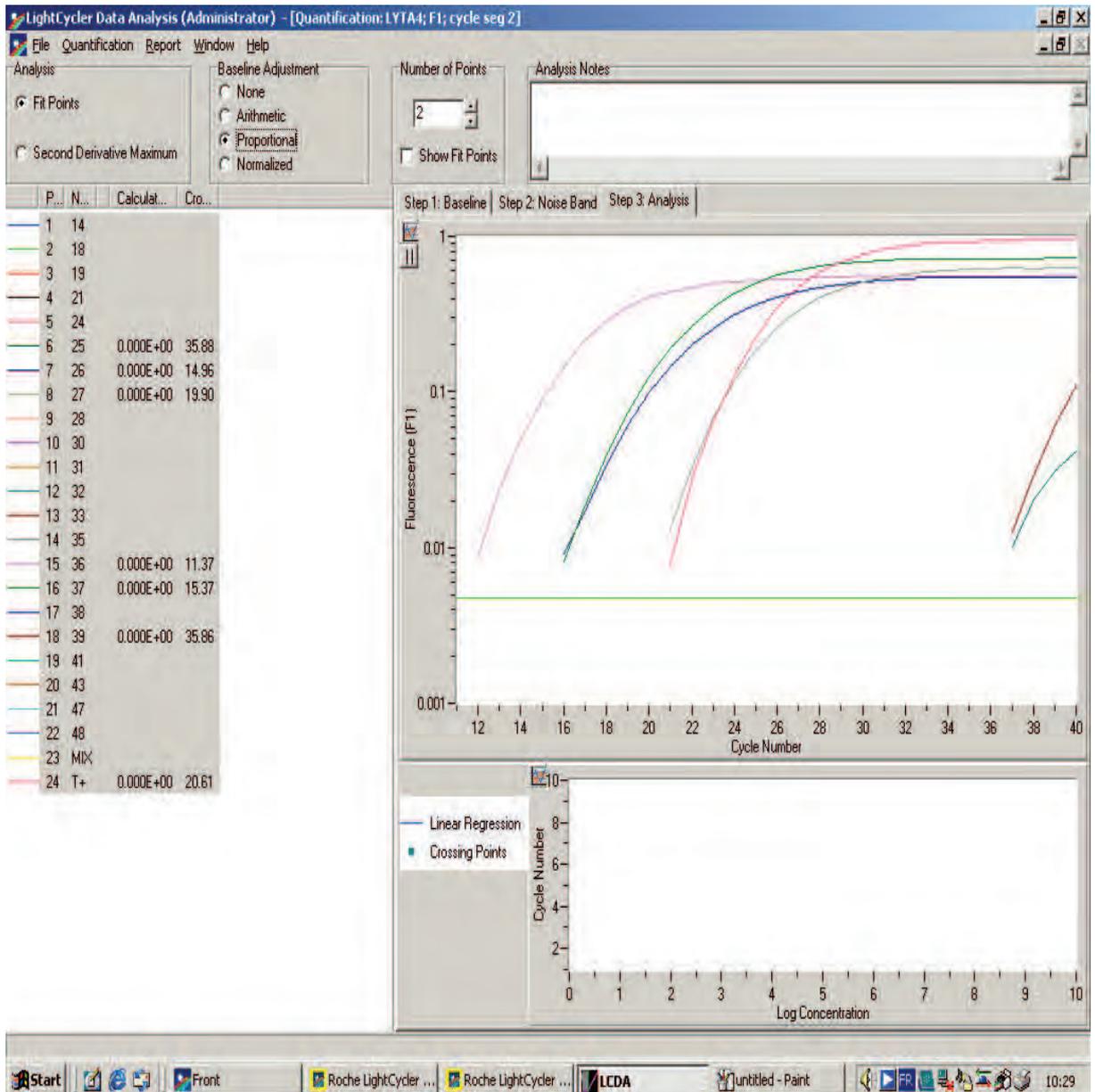
Résultats négatifs de la RT-PCR pour les souches de streptocoques 14, 18, et 19.



**Figure 17.** Résultats de la PCR en temps réel pour le gène lytA

Résultats positifs de la RT-PCR pour les souches de pneumocoques 29, 34, 40, 44, 46 et 49

Résultats négatifs de la RT-PCR pour les souches de streptocoques 30, 31, et 33.



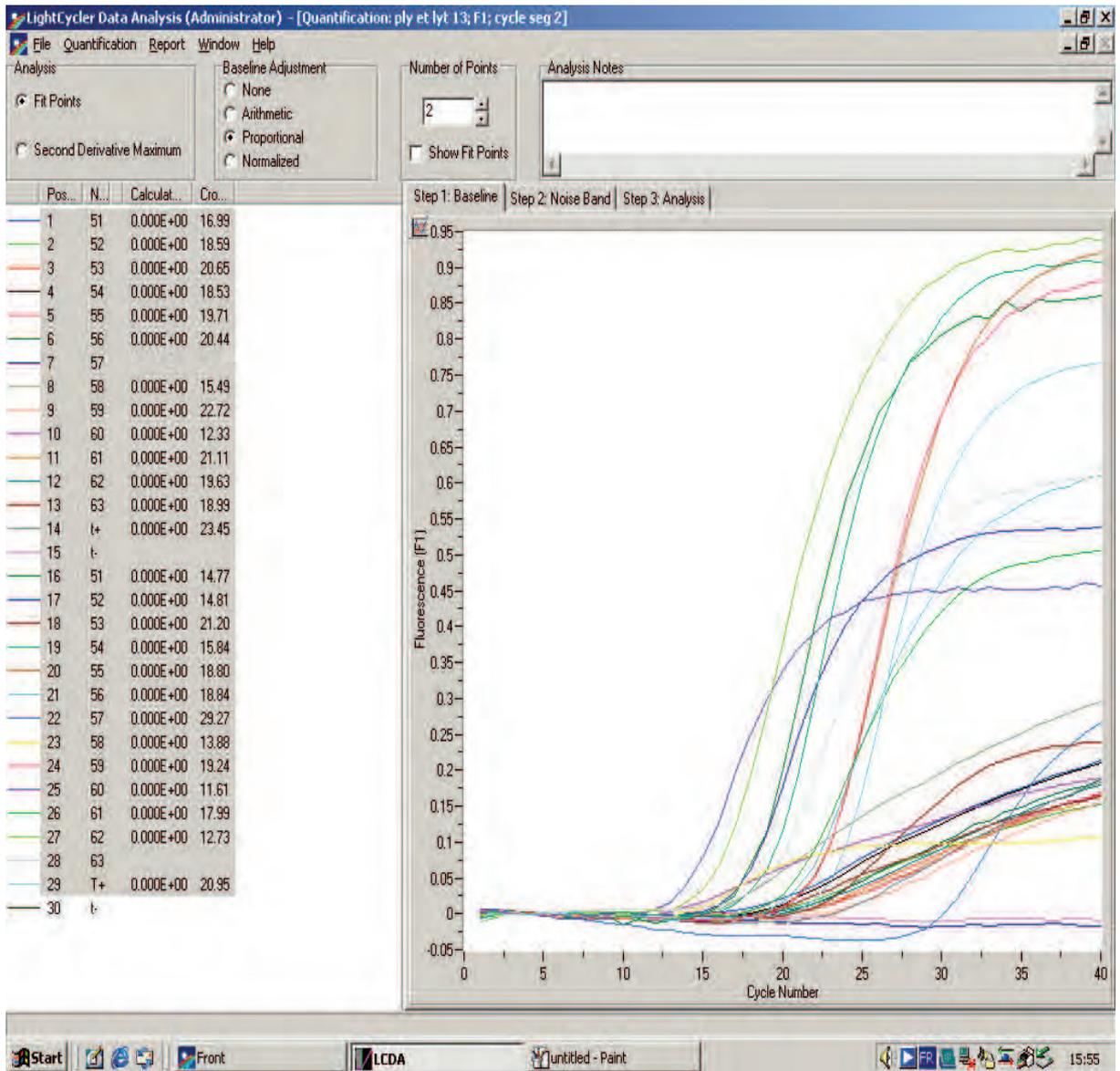
**Figure 18.** Résultats de la PCR en temps réel pour le gène lytA

Résultats positifs de la RT-PCR pour les souches de pneumocoques 26, 36, et 37.

Résultats négatifs de la RT-PCR pour la souche de pneumocoque 45 notée 25 (faux négatif nombre de cycle >35).

Résultats négatifs de la RT-PCR pour les souches de streptocoques 28 et 38.

Résultat négatif de la RT-PCR pour la souche de streptocoque 39 (vrai négatif, nombre de cycle >35)

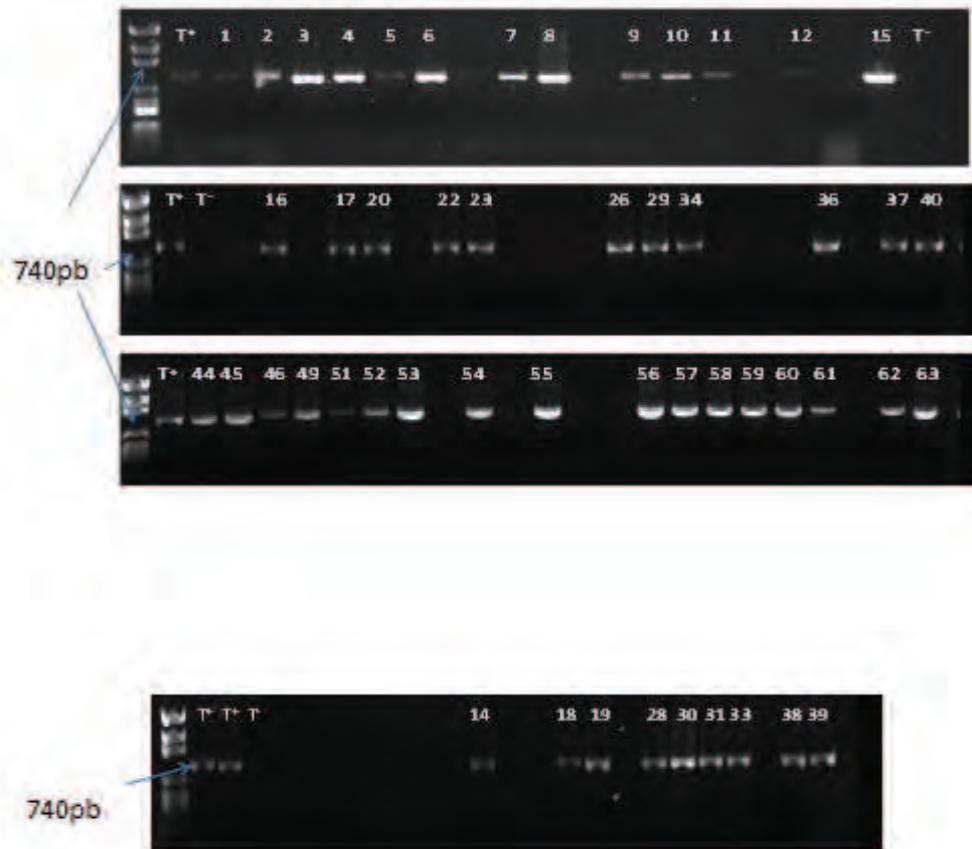


**Figure 19.** Résultats de la PCR en temps réel pour le gène lytA

Résultats positifs de la RT- PCR pour les souches de pneumocoques 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 et 62.

Résultats négatifs de la RT- PCR pour la souche de pneumocoque 63 (faux négatif).

**Annexe 6.** Résultats de l'amplification du gène rpoB



**Figure 20.** Résultats de l'amplification par PCR du gène rpoB : 50 souches (électrophorèse sur gel d'agarose, taille de la PCR : 740 paires de bases)

Les 3 premiers gels représentent l'amplification du gène rpoB pour 41 souches de pneumocoques (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 22, 23, 26, 29, 34, 36, 37, 40, 44, 45, 46, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, et 63).

Le quatrième gel représente l'amplification du gène rpoB pour 9 souches de streptocoques (14, 18, 19, 28, 30, 31, 33, 38 et 39).

## ANNEXES

---

### Annexe 7. Séquences du gène rpoB pour 41 souches de pneumocoques, 9 souches de streptocoques et 4 souches de référence

>Sp1

```
CATGACTCCGACAGAAACACGGTTATCAAACGGTTCACCAGTACGTCCATCGTAAAGGATCGTTTTGGCAT
CGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATCAAAGACTGGTGTCCG
CGATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGT
GATGGTACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTAC
AGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCGACCTTAATCTTACG
TTTTTGAGCGATGTAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAA
GATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGA
GACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACT
TTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTTTCGTCAAGGTCTTTG
AGGGCATCTTACCAACGTTTGGAAATTTTCGCGAGTGATTTCTTCA
```

>Sp2

```
AACATGTGGTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCTGTACG
TCCATCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGA
ACTTGCTCCATCAAAGACTGGTGTGCGAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCT
CCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTCCG
TCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGC
CATTTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGAGCGATGTAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTG
CAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACAC
GAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAA
AGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGG
ATAATCCCCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTACCAACGTTTGGAAATTTTCGCGAGTGATTTCTTCA
GGCCCCAATTTTAA
```

>Sp3

```
CTGGAGTTCGTCTGTACATGACTCCACAGAAACACGGTTATACAATGGTTCCTGTACGTCCATCGTAAAG
GATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATC
AAAGACTGGTGTGCGAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGA
CCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTTCGTCTGGAAGGTA
AGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCC
GACCTTAATCTTACGTTTTTGAGCGATGTAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCC
ATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTAT
CACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCA
CCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATT
TCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTACCAACGTTTGGAAATTTTCGCGAGTGATTTCTT
```

>Sp4

```
TTGTCATCAAACATGTGGTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTACTCAAATGGTT
CACCTGTACGTCCATCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAA
GATCTTCAGAACTTGCTCCATCAAAGACTGGTGTGCGAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCA
AGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGAC
TGGAGTTCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGT
GACGTCCGGCCATTTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGAGCGATGTAACACGAACCAACATGTTAA
CACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCG
TGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTT
TTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGC
ACCAATACGGATAATCCCCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTACCAACGTTTGGAAATTTTCGCGAGT
GATTTCTTCAGCCCCAATTTAAGGTTTCGGGGGGGGCGGGGGCGCTTCCACCCTGTTCTTAAAATAAAAAA
AAATTATGAAAATGCTCCTA
```

---

## ANNEXES

---

>Sp5

TCAAACATGTGGTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCACT  
ACGTCATCGTAAAGGATCGTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTC  
AGAAGTGGTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGA  
AGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGT  
TCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTC  
CGGCCATTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTG  
ATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGT  
ACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAG  
TGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTCCCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACC  
ACGGATAATCCCCATTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGAATTTTCGCGAGTGATTT  
TTCA

>SP6

TGCATCAAACATGTGGTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCA  
CCTGTACGTCCATCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGA  
TCTTCAGAAGTGTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAG  
GTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTG  
GAGTTCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGA  
CGTCCGGCCATTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAAC  
CCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGT  
GGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTC  
AGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACC  
AATACGGATAATCCCCATTTCTGCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGAATTTTCGCGAGTGAT  
TTCTTCAGCCCCGAATCCAAAGGGCAAAGGTTGGGCGGGCTTCGGATCCCACCCGGTTCCTTTAACATTT  
ACCCTGAGTCTCAAACCTTTGTACCATTTCAAACACGGGGCCCGATGGGGAAACCCAAAGAAAACAAAAGTG  
CAAACAGGTGAAACCTGCAAACCCCGCACACATTTCCACATGTTAGCCCCCCCAGGGGGTCCACACGGT  
AATCACACAGGAGTATCTCTGATAGGCTCAGCTGAGTGATGCATGAGTAGCATCTACACGAAGACACA  
ACACCACGTATATATACA

>Sp7

TTGGAGTTTATATGTACATGACTCCACAGAAACACGGTTACTAAATGGTTCCTGTACGTCCATCGTAAAG  
GATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAGCTTGCTCCATC  
AAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTG  
ACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGAAGGT  
AAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTC  
CGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTC  
CATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTA  
TCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTC  
ACCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCAT  
TTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGAATTTTCGCGAGTGATTTCTTCAGGCCCCCCACC  
TA

>Sp8

TTGGAGTTGTATGTACATGACTCCGAAGAACACGGTTATTAACGGTTCACAGTACGTCCATCGTAAAGGA  
TCGTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATCAA  
AGACTGGTGTAGCGATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACC  
GATATTCATACGTGATGGTACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGAAGGTAAG  
GCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCGA  
CCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCAT  
TTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCA  
CGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACC  
CTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTT  
GTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGAATTTTCGCGAGTGATTTCTTCAGGCCCCCCACA  
AACTT

## ANNEXES

---

>Sp9

TCAAACATGTGGTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCTGT  
ACGTCCATCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTC  
AGAAGCTTGGCTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGA  
AGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGT  
TCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTC  
CGGCCATTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTG  
ATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGT  
ACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGT  
TGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAAT  
ACGGATAATCCCCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTTTCGCGAGTGATTC  
TTCAGGTCCCCAGTTTA

>Sp10

TCAAACATGTGGTGGAGTTTAATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCTGT  
ACGTCCATCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTC  
AGAGCTTGGCTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGA  
AGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGT  
TCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTC  
CGGCCTTTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGA  
TTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTA  
CACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCT  
GAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATA  
CGGATAATCCCCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTTTCGCGAGTGATTTCT  
T

>Sp11

ACATGTGGTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCTGTACGT  
CCATCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAA  
CTTGCTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTC  
CATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCCGT  
CTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTTCCGGCC  
ATTTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGC  
AACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACG  
AAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAA  
GATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGA  
TAATCCCCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTTTCAGAGTGATTTCTTCAG  
GTCCCCAGCTTA

>Sp12

TTTTGGAGTTTGTATCAAACATGTGGTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCA  
AATGGTTCACCTGTACGTCCATCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTT  
GACCAAAGATCTTCAGAACTTGTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGC  
CATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGA  
TGTCGACTGGAGTTCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTG  
TTTCCGTGACGTTCCGGCCATTTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACCAAC  
ATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCG  
GCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGA  
GACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAAC  
CTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTTTCGTCAAGTC

>SP15

TGTACATGACTCCACAGAAACACGGTTATCAAACGGTCCCTGTACGTCCATCGTAAAGGATTGTCTTGGC  
ATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGGCTCCATCAAAGACTGGTGT  
CGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATAC

---

## ANNEXES

---

GTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCT  
ACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCGACCTTAATCTTA  
CGTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTAAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTA  
AAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCAC  
GAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTA  
CTTTCCCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTTTCGTCAAGGTCTT  
TGAGGGCATCTTACCAACGTTTGGAAATTTTCGCGAGTGATTTCTTTTCGTAGTGTATATGTAGCGCACGCGAT  
CGTGTTCGTGACT

>Sp16

TTTGGAGTTTTGTCATCAAAACATGTGGTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGGTTA  
TCAAATGGTTCACCTGTACGTCCATCGTAAAGGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAAC  
AGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAG  
CTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAAC  
ATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCC  
TTTGTTCGGTACGTCCGGCCATTTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACC  
AACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAAACATCACGAACGACACC  
ATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCA  
AGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTT  
TAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTACCAACGTTGGAAT  
CCCGA

>sp17

ATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCTGTACGTCCATCGTAAAGGATTGTCTT  
GGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATCAAAGACTGG  
TGTCGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTC  
TACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCT  
TCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCGACCTTAATC  
TTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGT  
GTAAAGATCTTAAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTC  
ACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTG  
TTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTTTCGTCAAGGT  
CTTTGAGGGCATCTTACCAACGTTTGGAAAT

>Sp20

GGTGGAGTTTGGTCATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCTGTACGTCCATCG  
TAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCT  
CCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAA  
CCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGA  
AGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTT  
ATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTC  
ATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAG  
AAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCT  
TTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATC  
CCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTACCAACGTTTGGAAATTCGC

>Sp22

ATCACTCGCGAAATTCCAAACGTTGGTGAAGATGCCCTCAAAGACCTTGACGAAATGGGGATTATCCGTAT  
TGGTGTGAGGTTAAAGAAGGTGATATCTTGTAGGTAAGTAACACCTAAGGGTGAGAAAGATCTTTTCAG  
CTGAAGAACGTCTCTTGCACGCTATCTTTGGAGACAAGTCTCGTGAAGTGCCTGATACTTCTCTTCGTGTAC  
CACACGGTCCCAGTGGTGTCTCGTTCGTGATGTTAAGATCTTTACACGTGTAAATGGAGATGAGTTGCAATCA  
GGTGTTAACATGTTGGTTCGTGTTTACATCGCTCAAAAACGTAAGATTAAGGTTCGGAGATAAAATGGCCGG  
ACGTCACGGAACAAAGGGGTTGTCTCTCGTATCGTTCCTGTAGAAGACATGCCTTACCTTCCAGACGGAA  
CTCCAGTCGACATCATGTTGAACCCACTTGGGGTGCCATCACGATGAATATCGGTCAGGTTATGGAGCTTC  
ACCTGGTATGGCAGCTCGTACTTGGTATTACATTGCGACACCAGTCTTTGATGGAGCAAGCTCTGAAG

## ANNEXES

---

ATCTTTGGTCAACTGTAAAGAAGCAGGTATGGATAGCGATGCCAAGACAATCCTTTACGATGGACGTACA  
GGTGAACCATTTGATAACCGTGTCTTCTGTTGGAGTCATGTACATGATTAAACTC

>Sp23

TTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCTGTACGTCCATCGTA  
AAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCC  
ATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCT  
GACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTTCCGTCTGGAAAG  
TAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCT  
CCGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCT  
CCATTTACACGTGTAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGT  
ATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCT  
CACCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCA  
TTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTCGC

>Sp26

GTGGAGTTTGATCATGTACATGACTCCAACAGAAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCTGTACGTCCATCGT  
AAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTC  
CATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAAC  
CTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTTCCGTCTGGAA  
GGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTAT  
CTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCAT  
CTCCATTTACACGTGTAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAA  
GTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTT  
CTCACCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCC  
CATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTCGC

>Sp29

CTGAAGAAATCACTCGCGAAATTCCAAACGTTGGTGAAGATGCCCTCAAAGACCTTGACGAAATGGGGATT  
ATCCGTATTGGTGTGAGGTTAAAGAAGGTGATATTCTTGTAGGTAAAGTAACACCTAAGGGTGAGAAAGA  
TCTTTCAGCTGAAGAACGCTCTTGCACGCTATCTTTGGAGACAAGTCTCGTGAAGTGCCTGATACTTCTCT  
TCGTGTACCACCGGTGCCGATGGTGTCTCGTTCGTGATGTTAAGATCTTTACACGTGTAATGGAGATGAGTT  
GCAATCAGGTGTTAACATGTTGGTTCGTGTTTACATCGCTCAAAAACGTAAGATTAAGGTCCGGAGATAAAA  
TGGCCGGACGTCACGGAAACAAAGGGGTTGTCTCTCGTATCGTTCCTGTAGAAGACATGCCTTACCTTCCA  
GACGGAACCTCAGTCGACATCATGTTGAACCCACTTGGGGTGCCATCACGTATGAATATCGGTCAGGTTAT  
GGAGCTTACCTTGGTATGGCAGCTCGTACTTGGTATTACATTGCGACACCAGTCTTTGATGGAGCAAG  
TTCTGAAGATCTTTGGTCAACTGTTAAAGAAGCAGGTATGGATAGCGATGCCAAGACAATCCTTTACGATG  
GACGTACAGGTGAACCATTTGATAACCGTGTCTTCTGTTGGAGTCATGTACATGATCAAACCTCCACCACATGT  
TTGA

>Sp34

TGCGGTATTTGTTTGTTCATGACGTCCACAGAAAACACGGTTAATAAATGGTTCACCAGTACGTCCATCGTA  
AAGGATCGTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTC  
CATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAAC  
CTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTTCCGTCTGGAA  
GGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGATAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTAT  
CTCCGACCTTATTCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCAT  
CTCCATTTACACGTGTAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATTGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAA  
GTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTT  
CTCACCTTAGGTGTTACTTTCCCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCC  
CATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTCGCGA

>Sp36

TGGGTTGGCTACATGTACACCACAGCCTCAAAAAGACACAACATGTGTGTTTGTGGCTCCAGTCCGTCCATC  
AAAAGGATAGTTTTAGGCATCCCTACCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTC

---

## ANNEXES

---

TCCATCAAAGACTGGTGTGCGAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAA  
CCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGA  
AGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTT  
ATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTC  
ATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAG  
AAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCT  
TTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTCCCTACAAGAATATCACCTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATC  
CCCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTGGGAATCCGGA

>Sp37

GTGGAGTTTGTTCATGTACATGACCCCCACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCAGTACGTCCATCGT  
AAAGGATCCTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATGTTCAGAACTTGCTC  
CATCAAAGACTGGTGTGCGAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGTTCATAACC  
TGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGAAG  
GTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATC  
TCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATC  
TCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAG  
TATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCT  
CACCCCTTAGGTGTTACTTTCCCTACAAGAATATCACCTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCA  
TTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTCGCG

>Sp40

TTGGAGTTCGTATGTCCATGACTCCACAGAAACCACGGTTAAATTAATGGTTCACCTGACGTCCATCGGG  
GGGTAAAGGATCGTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTT  
GCTCCATCAAAAACCTGGTGTGCGAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGTCCAT  
AACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTG  
GAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATT  
TTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAAC  
TCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAG  
AGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGAT  
CTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTCCCTACAAGAATATCACCTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAA  
TCCCCATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTCGCG

>Sp44

TTGGAGTTTGATAATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATAAAATGGTTCACCTGTACGTCCATCGT  
AAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTC  
CATCAAAGACTGGTGTGCGAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGTCCATAAC  
CTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGAA  
GGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTAT  
CTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCAT  
CTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAA  
GTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTT  
CTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCC  
CATTTTCGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTCGCG

>Sp45

GTTTGAAAATGTACATGACTCCAACAGAAACACGGTTATTAATGGTTCACCAGTACGTCCATCGTAAAGG  
ATCGTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATCA  
AAGACTGGTGTGCGAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGTCCATAACCTGAC  
CGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTGGAAGGTAA  
GGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCG  
ACCTTAATCTTACGTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCA  
TTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATC  
ACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCAC  
CCTTAGGTGTTACTTTCCCTACAAGAATATCACCTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTT  
CGTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAAATTCGCG

---

## ANNEXES

---

>Sp46

GAAACGCGGTTATCAAAAATGGTTTTTTTTTACCAGTTCACCCGTTGTAAATCATCTTAAGGTATAGTTAAG  
CATCCCTTATCCATACCTGTTTTTTAAAAAGTTGACAAAAAATTTTCAGAACTTGCTCCATCAAAAGACTGGT  
GTCGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCAT  
ACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTTCCTGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTT  
CTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCGACCTTAATCT  
TACGTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTAAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTG  
TAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCA  
CGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGTGTT  
ACTTTCCCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTTTCGTC AAGGTCT  
TTGAGGGCATCTTCACCAACGTGTGGAATCCCGA

>Sp49

AGGCTGTTGGGCTTTTTCTTTTGCCTTCCCCCGTGGCCCCCCCCCTTTGGGTTACATCAAACATGTGGTGGAG  
TTTGATCATGTACATGACTCCGACAGAAACACGGTTATCAAACGGTTCACCAGTACGTCCATCGTAAAGGA  
TCGTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATCAA  
AGACTGGTGTGCGGATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACC  
GATATTCATACGTGATGGTACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTTCCTGTCTGGAAGGTAAG  
GCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCGA  
CCTTAATCTTACGTTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTAAACACCTGATTGCAACTCATCTCCAT  
TTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCA  
CGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACC  
CTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTTT  
GTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAATTTTCGCGAGTGATTTCTTCAGGCCCCACCACCTA  
AA

>SP51

TTACCCTTTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCG  
ACCTTAATCTTACGTTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTAAACACCTGATTGCAACTCATCTCCA  
TTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATC  
ACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCAC  
CCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGGA

>SP52

TTTTTCCCcAAAAAACCCAAATTGGGAAATTTGTTTCCCGACTGGAGTTCCTGTCTGGAAGGTAAGGCATGTC  
TTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCGACCTTAAT  
CTTACGTTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTAAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACG  
TGTAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTT  
CACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCCTTAGGT  
GTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGAT

>SP53

CCCGGGGAAAATTTAAAACCCGGGAAAAGGAAAGGACAACCCCTTTGTTTTCCGTGACGTCCGGCCATTT  
TATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTAAACACCTGATTGCAACT  
CATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGA  
GAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATC  
TTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGGA

>SP54

TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGAAAGGTCCGGCACTGTAAACACGAACCAACATGTAAACACCTGATTGCAACT  
CATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGA  
GAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATC  
TTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGGA

---

## ANNEXES

---

>SP55

CGTCCATCGTAAAGGATCGTTTTGgCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCA  
GAACTTGCTCCATCAAAGACTGGTGTAGCGATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAA  
GCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGTACCCCAAGTGGGTTC AACATGATGTCGACTGGGCAG

>SP56

TCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTT  
GCTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCAT  
AACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTC AACATGATGTCGACTGGAGTTCCGTCTG  
GAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCc

>SP57

TCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTT  
GCTCCATCAAAGACTGGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCAT  
AACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTC AACATGATGTCGACTGGAGTTCCGTCTG  
GAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATT  
TTATCTCCGACCTTAATCTTT

>SP58

ATTTTTTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAG  
TATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCT  
CACCTTAGGTGTTACTTTCCCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATACGGA

>SP59

TTTAATCTTACGTTTTTTGAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATT  
TACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCA  
CGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACC  
CTTAGGTGTTACTTTACC

>SP60

CCCCAAAAATCCAATTGGTTTAAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGTAAAGATCTTAACAT  
CACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGACTTGTCTCCA  
AAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGA  
ATATCACCTT

>SP61

TTGGGTTTAAAAAATCCAACGAAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTACACGTGT  
AAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCA  
CGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACCCTTAGGTGTT  
ACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCAATA

>SP62

TTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATCAAAGACT  
GGTGTGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATT  
CATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTC AACATGATGTCGACTGGAGTTCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGT  
CTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTT

## ANNEXES

---

>SP63

TCGTAAAGGATTGTCTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTT  
GCTCCATCAAAGACTGGTGTGCGCAATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCAT  
AACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTCAACATGATGTGCGACTGGAGTTCGGTCTG  
GAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGGAAAACCGGAA

>S.sanguinis38

TGGTGGAGCTTGATCATGTACATGACACCGACAGATACACGGTTGTCAAACGGCTCACCGGTACGTCCGTC  
ATAAAGAATAGTCTTGGCATCACTATCCATACCAGCTTCGCGTACTGTATCCCAGAGATCTTCTGAGCTTGC  
TCCATCAAAGACTGGTGTGCGCAATATGGATGCCCAAGTTACGTGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAA  
CCTGACCGATATTCATACGAGATGGTACCCCGAGTGGGTCAACATGATATCAACTGGTGTTCGGTCTGGA  
AGGTAAGGCATGTCTTCCACAGGAACGATACGGGATACAACCCCTTGTTCGGTGACGACAGCCATCTT  
ATCTCCGACCTTGATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAGACACGAACCAACATATTAACGCCAGATTGCAGTTC  
ATCACCATTAGCACGGGTAAAGATCTTACGTCACGAACCACTCCGTCGGCACCGTGTGGCACACGCAGAG  
AGGTATCGCGGACTTACGAGACTTGTACCAAAGATGGCATGAAGCAGGCGCTTTCAGCAGAAAGGTCT  
TTTTACCCTTAGGAGTGACTTTTTCCGACTAGGATGTGCGCTTCTTGACTTCCGCACCGATGCGGATAATA  
CCCATTTCATCCAGATTGCGCAGGGCAGCTTTCATCTACGTTGGCAATTTTCGCGGG

>S.mitis14

GTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCGTCAAAG  
ACTGGTGTGCGATGTGAATACCAAGAGTAGAGCAGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGAT  
ATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGGTCAACATGATATCGACTGGAGTTCATCTGGAAGATAAGGCA  
TGCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTATTTCCGTGACGTCGGGCCATCTTATCTCCGACCT  
TGATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAGACGCGAACCCAGCATATTAACACCTGATTGCAATTCATCTCCATTG  
CACGTGTAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCAGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACG  
CACTTACGAGATTTATCTCCGAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGGTCTTCTCACCCCT  
AGGTGTTACTTTACCTACAAGGATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCGATACGGATAATACCCATTTGCTC

>S.oralis18

AAACGGCTCACCTGTACGTCCATCGTATAGGATTGTCTTAGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGT  
GTCCCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCATCAAAGACTGGTGTGCGATGTGGATACCAAGAGTACGGGCTG  
CCATACCAAGGTGGAGTTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGTACCCCAAGTGGGTCAACATG  
ATGTCGACTGGAGTTCGGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTT  
GTTCCGTGACGTCGGGCCATCTTATCTCCGACTTTGATCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAGACGCGAACCCAG  
CATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTGCACGTGTAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATC  
GGCACCGTGAGGTACACGGAGAGAAGTGTACGCACTTACGAGACTTGTCTCCGAAGATAGCGTGCAAG  
AGACGTTCTCAGCTGAAAGGTCTTCTCTCCCTTAGGTGTGACTTTACCTACAAGGATATCGCCTTCTTTA  
ACCTCAGCACCGATACGGATAATCCCCATTTGTCGCAAGGTCTTTAAGAGCATC

>S.oralis19

TTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTGTCCCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCGTCAAAGACT  
GGTGTGCGATGTGGATACCAAGAGTACGTGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATT  
CATACGTGATGGTACCCCAAGTGGGTCAACATGATATCAACTGGAGTTCGGTCTGGAAGGTAAGGCATGT  
CTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTGTTCGGTGACGTCGGGCCATCTTATCTCCGACCTTGA  
TCTTACGTTTTTGGAGCGATGTAGACGCGAACCCAGCATGTTAACGCCTGATTGCAACTCATCTCCATTTGCAC  
GTGTAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCAC  
CTCACGAGACTTGTCTCCGAAGATAGCGTGCAAGAGGCGTTCTTCAGCTGAAAGATCTTTTTACCTTTAGG  
CGTACTTTACCTACAAGGATATCGCCTTCTTTAACCTCAGCACCGATACGGAT

>S.mitis39

ACAGAAACACGGTTATCAAATGGTTCACCAGTACGTCCATCGTAAAGGATCGTTTTGGCATCGCTATCCAT  
ACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCGTCAAAGACTGGTGTGCGATGTGAAT  
ACCAAGAGTACGAGCAGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCC  
CAAGTGGGTCAACATGATATCGACTGGAGTTCATCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATA

---

## ANNEXES

---

CGAGAGACAACCCCTTTATTTCCGTGACGTCCGGCCATCTTATCTCCGACCTTGATCTTACGTTTTTGAGCG  
ATGTAGACGCGAACCAAGCATGTTGACACCTGATTGCAATTCATCTCCATTTGCACGTGTAAAGATCTTAAC  
ATCACGAACCACACCATCAGCTCCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGAGATTTATCTC  
CGAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGGTCTTTCTCACCTTAGGTGTTACTTTACCTACAA  
GGATGTCGCCTTCTTAACCTCAGCACCGATACGGATAATACCCATTTTCGTCAA

>S.mitis30

TTTAACAGTTGACCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCGTCAAAGACTGGTGTGCGATGTGAATACCAAGAG  
TACGAGCCGCCATACCAAGGTGGAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCCCAAGTGGG  
TTCAACATGATATCGACTGGAGTTCCGTCTGGAAGGTAAGGCATATCTTCTACAGGAACGATACGAGAGAC  
AACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATCTTATCTCCGACCTTAATCTTACGTTTTTTGAGCGATGTAGACG  
CGAACACAGCATGTTAACACCTGATTGCAGCTCATCTCCATTTGCACGTGTAAAGATTTTAACATCACGAAC  
GACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCACGTGACTGTCTCCAAAGATAG  
CGGGCAAAGAGAACGTTTCTTCAGCTGGAAGGTCTTTCTTAACCCCTTAGGTGGTTACTTTTACCTACA  
AGGATAATCACCCCTCTTTA

>S.mitis28

GTACATGACTCCGACAGAAACACGGTTAAAAAATGGTTCACAGTACGGCCATCGTAAAGGATCGTTTTGG  
CATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCGTCAAAGACTGGT  
TTGCGATGTGAATACCAAGAGTACGAGCAGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATA  
CGTGATGGCACCCCAAGTGGGTTCAACATGATATCGACTGGAGTTCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTC  
TACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATCTTATCTCCGACCTTAATCTT  
ACGTTTTTTGAGCGATGTAGACGCGAACACGATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTGCACGTGT  
AAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCACGCACTTCA  
CGAGATTTATCTCCGAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCAGCTGAAAGGTCTTTCTCACCCCTTAGGTGTT  
ACTTTACCTACAAGGATATCGCCTTCTTTAACCTCAGCACCGATACGGATAATACCCATTTTCGTCAAGGTCT  
TTAAGA

>S.oralis31

TGCATCAAACATGTGTGGAGTTTGATCATGTACATGACACCAACTGATACACGGTTGTCAAACGGCTCACC  
TGTACGTCCATCGTAAAGGATTGTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTGTCCCAAAGGTC  
TTCCGAACCTGCTCCGTCAAAGACTGGTGTGCGATGTGGATACCAAGAGTACGGGCTGCCATACCAAGGT  
GGAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGTACCCCAAGCGGGTTCAACATGATGTGACTGGA  
GTTCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACG  
TCCGGCCATCTTATCTCCGACCTTGATCTTACGTTTTTTGAGCGATGTAGACACGAACCAGCATATTCACACC  
AGATTGCAACTCATCCCCATTTGCACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGAG  
GTACACGAAGAGAAGTGTACGAACCTCACGAGACTTGTCTCCGAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTTCA  
GCTGAAAGGTCTTTTTACCCCTTAGGTGTGACTTTACCTACAAGGATATCACCTTCTTTAACCTCAGCACCG  
ATACGGATAATTCCCATCTCGTCAAGGTCTTTAAGGGCATCTTCACCAACGTTTGGAATTTACGAGTAATT  
TCTTCAGTCCCACACACTTAAAA

>S.mitis33

AagGGGCTCACCCcTGTaACGTCCATtGTAAAGGAaTTGTTTTGGCATCGCTATCCATACCAAGgTTCTTTtAACAG  
gTGACCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCGTCAAAGACTGGTGTGCGATGTGAATACCAAGAGTACGAGCC  
GCCATACCAAGGTGGAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGCGACGGCACCCCAAGTGGGTTCAACAT  
GATGTGACTGGAGTTCCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTT  
TGTTTCCGTGACGTCCGGCCATCTTATCTCCGACCTTGATCTTACGTTTTTTGAGCAATGTAGACGCGAACCA  
GCATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTGCACGTGTAAAGATTTTAACATCACGAACGACACCAT  
CGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTGTACGCACTTCACGAGATTTGTCTCCGAAGATAGCGTGCAAG  
AGACGTTCTTCAGCTGAAAGGTCTTTCTCACCCCTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGGATATCACCTTCTTTA  
ACCTCAGCACCGATACGGATAATACCCATTTTCGTcTtAGGTCTTTAAGGGCATCTTCACCAACGTT

> S.pneumoniaeip102911

TTTGATCATGTACATGACTCCGACAGAAACACGGTTATCAAACGGTTCACCAGTACGTCCATCGTAAAGGA  
TCGTTTTGGCATCGCTATCCATACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGATCTTCAGAACTTGCTCCATCAA

---

## ANNEXES

---

AGACTGGTGTGCGGATGTGAATACCAAGAGTACGAGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACC  
GATATTCATACGTGATGGTACCCCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTTCCGTCTGGAAGGTAAG  
GCATGTCTTCTACAGGAACGATACGAGAGACAACCCCTTTGTTCCGTGACGTCCGGCCATTTTATCTCCGA  
CCTTAATCTTACGTTTTTGTAGCGATGTAAACACGAACCAACATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCAT  
TTACACGTGTAAAGATCTTAACATCACGAACGACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTATCA  
CGCACTTCACGAGACTTGTCTCCAAAGATAGCGTGCAAGAGACGTTCTCAGCTGAAAGATCTTTCTCACC  
CTTAGGTGTTACTTTACCTACAAGAATATCACCTTCTTAACCTCAGCACCAATACGGATAATCCCCATTC  
GTCAAGGTCTTTGAGGGCATCTTCACCAACGTTTGAA

>S.oralisSK153

AAAGAAGGCGATATCCTTGTAGGTAAAGTCACACCTAAGGGAGAGAAAGACCTTTCAGCTGAAGAAGGTC  
TACCTGCTTCTTTAACAGTGTCCCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCGTCAAAGACTGGTGTGCGATGTGGA  
TACCAAGAGTACGGGCTGCCATACCAAGGTGGAGTTCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGTACC  
CCAAGTGGGTTCAACATGATGTCGACTGGAGTTCGTCTGGAAGGTAAGGCATGTCTTCTACAGGGACGAT  
ACGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATCTTATCTCCGACTTTGATCTTACGTTTTTGTGAGC  
GATGTAGACGCGAACCAGCATGTTTACGCCAGATTGCAACTCATCGCCATTTGCACGTGTAAAGATCTTAA  
CATCACGAACAACACCATCGGCACCGTGTGGTACACGAAGAGAAGTGTACGCACTTCACGAGACTTATCT  
CCGAAGATAGCGTGCAAG

>S.mitisSK667

ACCTGCTTCTTTAACAGTTGACCAAAGGTCTTCAGAACTTGCTCCGTCAAAGACTGGTGTGCGATGTGAAT  
ACCAAGAGTACGAGCCGCCATACCAAGGTGGAGCTCCATAACCTGACCGATATTCATACGTGATGGCACCC  
CAAGTGGGTTCAACATGATATCGACTGGAGTTCGTCTGGAAGGTAAGGCATATCTTCTACGGGAACGATA  
CGAGAGACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGTCCGGCCATCTTATCTCCGACCTTGATCTTACGTTTTTGTGAGC  
ATGTAGACGCGAACCAGCATGTTAACACCTGATTGCAACTCATCTCCATTTGCACGTGTAAAGATCTT

>S.sanguinisATCC10556

ACCAGCTTCACGGACAGTATCCCAGAGGTCTTCTGAGCTTGCTCCATCAAAGACCGGTGTCGCAATATGGA  
TGCCCAAGTTACGTGCTGCCATACCAAGGTGAAGCTCCATAACCTGACCAATGTTTCATACGTGATGGTACC  
CCGAGTGGGTTTCAGCATGATATCAACTGGTGTTCGTCTGGCAAATAAGGCATGTCTTCCACAGGAACGAT  
ACGGGATACAACCCCTTTGTTTCCGTGACGACCAGCCATCTTATCTCCGACCTTGATCTTACGTTTTTGTGAGC  
GATGTAGACACGAACCAACATATTAACGCCAGATTGCAACTCATCACCATTAGCACGGGTAAAGATCTTCA  
CGTCACGAACCACTCCATCAGCACCGTGCAGCACAGAGAGGTATCACGGACTTCACGAGACTTGTCT  
CCGAAGATAGCGTGCAAGAGGCGCTCTCAGCAGAAAGATCTTTTTCACCCTTAGGGGTAACCTTACCTAC  
AAGGATATCGCCTTCCTTG

---

## Annexe 8. Pourcentages d'identité et affiliation phylogénique des 50 souches étudiées

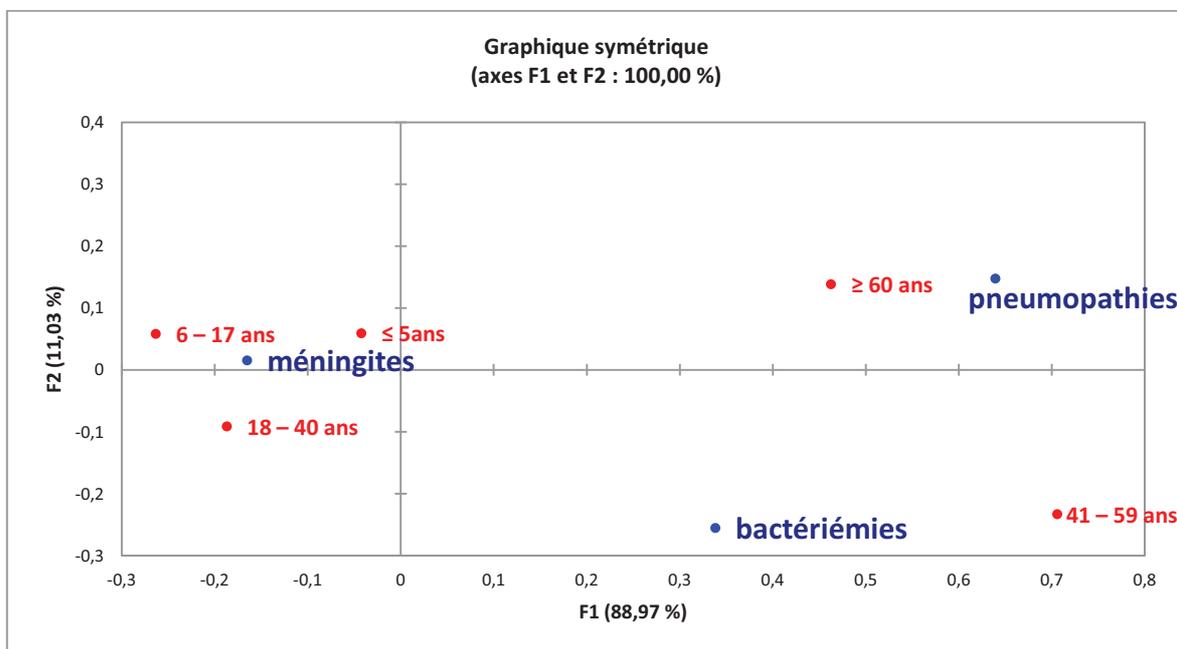
Tableau 24. % d'identité et affiliation phylogénique de 41 souches de *S.pneumoniae*

Souche	% identité	Espèce	Numéro d'accèsion
1	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP000920
2	100	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
3	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
4	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
5	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
6	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
7	99	<i>S.pneumoniae</i>	KC589336
8	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP000919
9	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
10	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
11	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312044
12	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
15	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP001845
16	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
17	100	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
20	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
22	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
23	100	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
26	100	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
29	100	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
34	98	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
36	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
37	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
40	98	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
44	99	<i>S.pneumoniae</i>	FQ312041
45	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
46	98	<i>S.pneumoniae</i>	CP001845
49	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP000920
51	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
52	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
53	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
54	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
55	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP000919
56	100	<i>S.pneumoniae</i>	KC589337
57	100	<i>S.pneumoniae</i>	KC589336
58	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP001845
59	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
60	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
61	99	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
62	100	<i>S.pneumoniae</i>	CP006844
63	100	<i>S.pneumoniae</i>	KC589337

**Tableau 25.** Pourcentage d'identité et affiliation phylogénique de 9 souches de *Streptocoques*

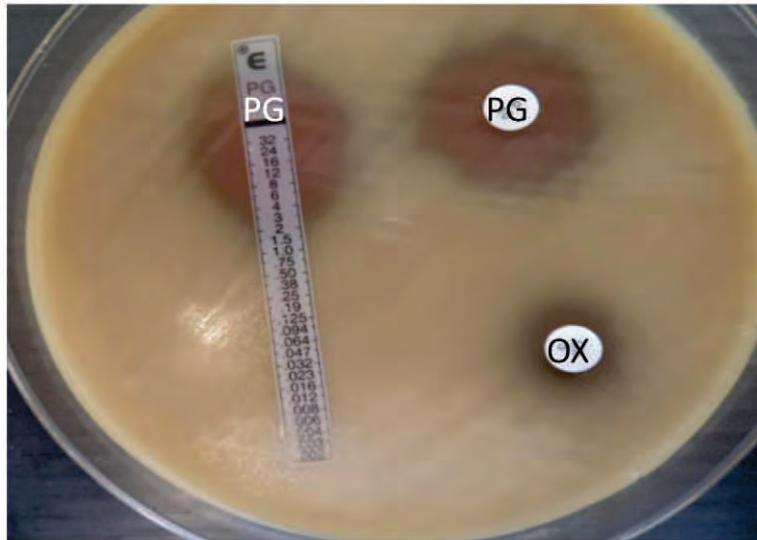
Souche	% identité	Espèce	Numéro d'accèsion
14	99	<i>Streptococcus mitis</i>	KC589313
18	99	<i>Streptococcus oralis</i>	KC589327
19	99	<i>Streptococcus oralis</i>	AB199982
28	98	<i>Streptococcus mitis</i>	FN568063
30	97	<i>Streptococcus mitis</i>	AB199934
31	98	<i>Streptococcus oralis</i>	AF 535168
33	97	<i>Streptococcus mitis</i>	KC 589315
38	97	<i>Streptococcus sanguinis</i>	CP 000387
39	99	<i>Streptococcus mitis</i>	KC 589314

### Annexe 9



**Figure 23.** Résultats de l'analyse factorielle des correspondances étudiant l'association de l'âge et la nature de l'infection

**Annexe 10.** Résultats des concentrations minimales inhibitrices à différents antibiotiques

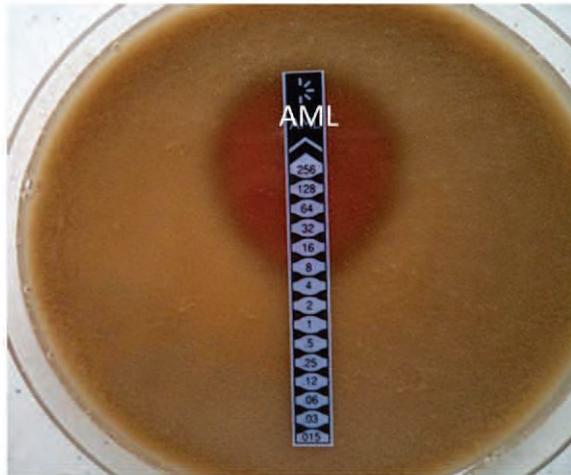


**Figure 29.** Détection de la sensibilité diminuée à la pénicilline (PG) (screening par un disque à l'oxacilline (OX) chargé à 5 $\mu$ g,  $\varnothing$  < 26 mm)

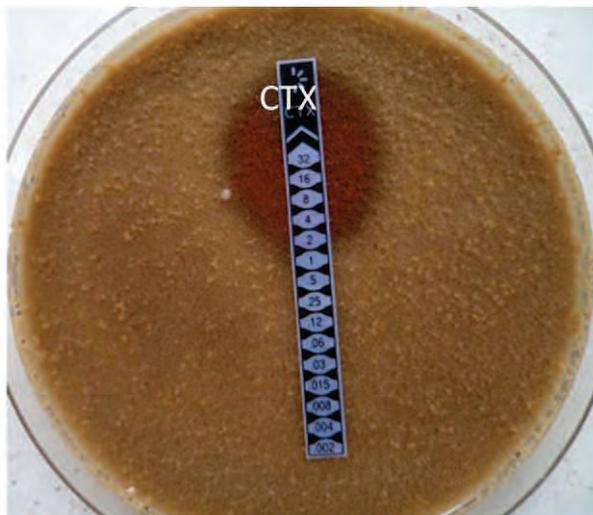


**Figure 34.** Souche de *S.pneumoniae* résistante à la pénicilline (P) isolée d'un LCR (CMI à 4  $\mu$ g/ml)

---

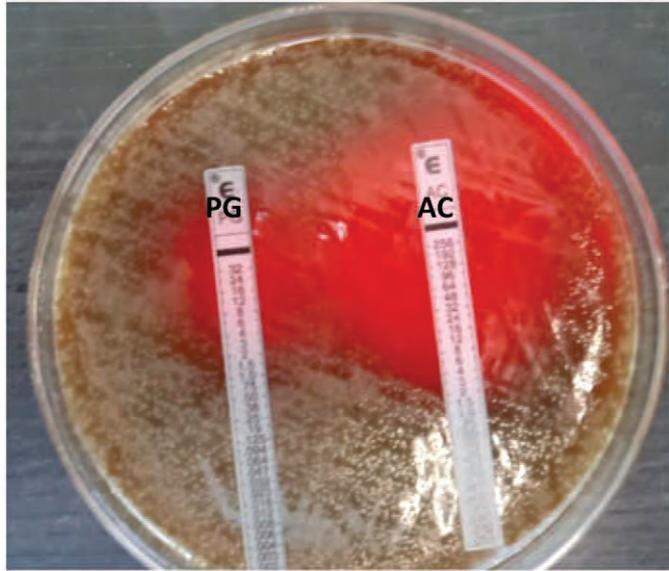


**Figure 35.** Souche de *S.pneumoniae* résistante à l'amoxicilline (AML) isolée d'un LCR (CMI à 4 $\mu$ g/ml)

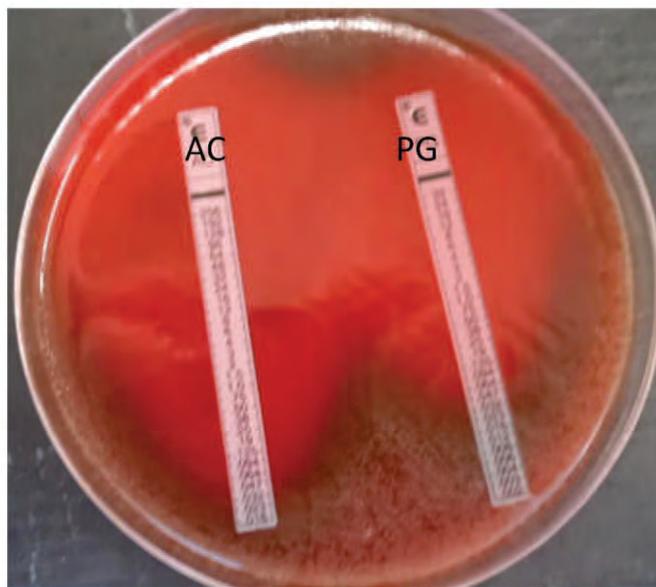


**Figure 36.** Souche de *S.pneumoniae* de sensibilité diminuée au céfotaxime (CTX) isolée d'un LCR (CMI à 1 $\mu$ g/ml)

---

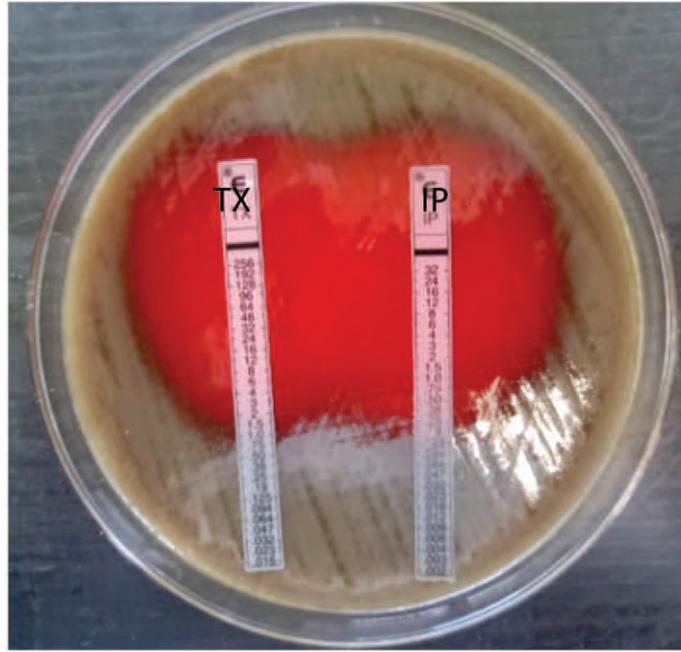


**Figure 37.** Souche de *S.pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline (PG) et à l'amoxicilline (AC) isolée d'un LCR (CMI à 1,5 $\mu$ g/ml pour les deux antibiotiques)

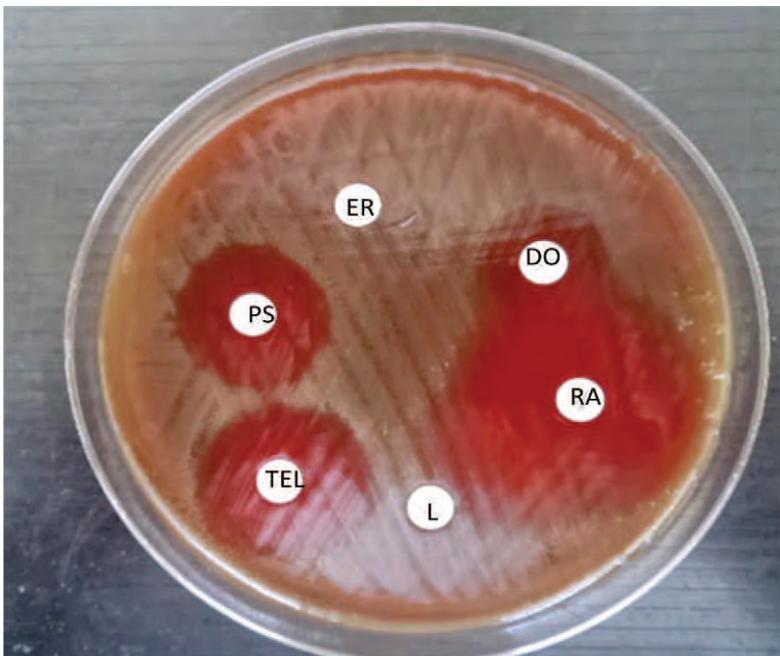


**Figure 38.** Souche de *S.pneumoniae* sensible à la pénicilline (PG: CMI à 0,032  $\mu$ g/ml) et à l'amoxicilline (AC: CMI à 0,016  $\mu$ g/ml) isolée d'un LCR

---

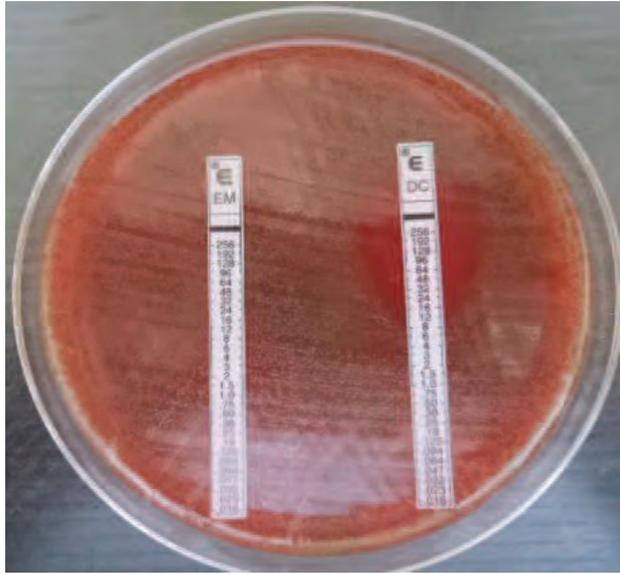


**Figure 39.** Souche de *S.pneumoniae* sensible à l'imipenème (IP: CMI à 0,125 µg/ml)



**Figure 40.** Souche de *S.pneumoniae* résistante aux macrolides (erythromycine : ER phénotype MLS<sub>B</sub>)

---



**Figure 41.** Souche de *S.pneumoniae* résistante à l'érythromycine (EM), CMI > 256µg/ml

---

---

**Annexe 11. Tableau 33. Relation sérotype-résistance**


---

Phénotype de résistance

Sérotypes

---

a- Résistance à 1 ou 2 antibiotiques

Pénicilline	14 (n=3), 19F (n=2), 23F (n=2), 6B (n=1), 11 (n=2), 10A (n=1), 18C (n=2), 4 (n=1), 12A(n=1)
Cotrimoxazole	14 (n=1), 19F (n=1), 23F (n=2), 10A (n=1), 3 (n=2), 1 (n=1), 19C (n=1), 21 (n=1), NT(n=1), 9A (n=1), 33F (n=1)
Tétracycline	19A (n=1)
Erythromycine	6B (n=1)
Pénicilline+ Cotrimoxazole	14 (n=4), 19F (n=1), 11 (n=1), 1 (n=1), 18C (n=1), 9A (n=1), 29 (n=1), 24F (n=1), 6B (n=1)
Pénicilline+ Tétracycline	23F (n=2), 14 (n=1), 47F (n=1), 16 (n=1)
Erythromycine + Tétracycline	19F (n=1), 6A (n=1)
Cotrimoxazole + Tétracycline	35B (n=1)

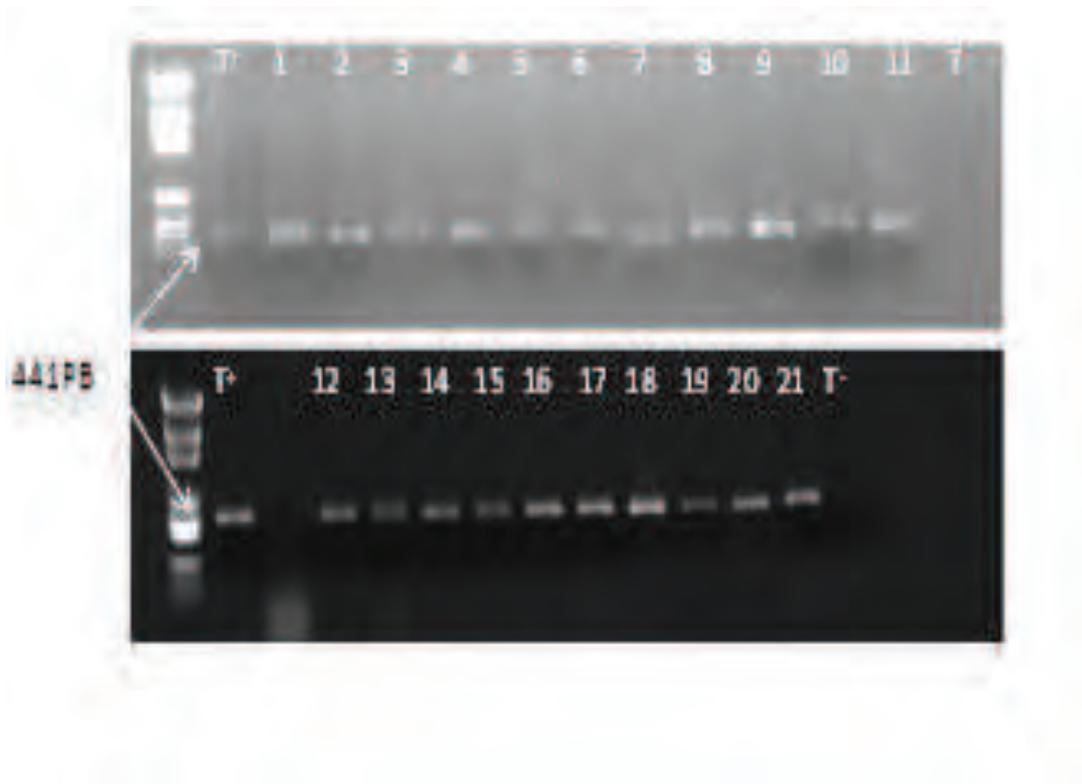
---

b- Multirésistance

Pénicilline+ Erythromycine+ Cotrimoxazole	14 (n=3), 19F (n=3), 19A (n=2), 10A (n=1)
Pénicilline+ Cotrimoxazole+ Tétracycline	14 (n=1), 6B (n=1), 3 (n=1)
Pénicilline+ Erythromycine + Tétracycline	19F (n=1)
Erythromycine + Tétracycline + Cotrimoxazole	19F (n=1)
Pénicilline+ Erythromycine + Tétracycline+ Cotrimoxazole	14 (n=2), 19F (n=1), 6B (n=1), 7F (n=1), 9N (n=1)

---

**Annexe 12.** Résultats de l'amplification par PCR des gènes de résistance aux macrolides



**Figure 50.** Résultats de l'amplification par PCR du gène ermB  
(électrophorèse sur gel d'agarose, taille de la PCR : 441 pb)

## ANNEXES

---

### **Annexe 13.** Séquences du gène ermB pour 12 souches de *S.pneumoniae*

#### ermB 1

AAGTTTTATTAAGAGACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTT  
AAGCAATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAATATC  
CAAGGTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTC  
AAAAACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATCCCAACAATTTT  
ATACCTCTGTTTGTAGGGAATTGAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACG  
AGTATTCAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGA  
CGTTACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCGTTA

#### ermB2

TTGATTAAGAGACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGC  
AATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAATATCCAAG  
GTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTCAAAA  
ACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATCCCAACAATTTTATAC  
CTCTGTTTGTAGGGAATTGAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACGAGTA  
TTCAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTT  
ACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCGTT

#### ermB 3

TTTATTAAGAGACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGC  
AATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAATATCCAAG  
GTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTCAAAA  
ACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATCCCAACAATTTTATAC  
CTCTGTTTGTAGGGAATTGAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACGAGTA  
TTCAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTT  
ACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCGTTA

#### ermB 4

TTTTATTAGACACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGC  
AATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAATATCCAAG  
GTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTCAAAA

---

ANNEXES

---

ACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATTCCCAACAATTTTATAC  
CTCTGTTTGTAGGGAATTGAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACGAGTA  
TTCAGTTTTAATTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTT  
ACCTGTTTACTTATTTTAGCCGAGTTTCGTCTGTTA

ermB 5

TTATTAAGACACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGCA  
ATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAATATCCAAGG  
TACGCTTGTAAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTCAAAA  
CCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATTCCCAACAATTTTATACC  
TCTGTTTGTAGGGAATTGAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACGAGTAT  
TCAGTTTTAATTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTTA  
CCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCTGTTA

ermB 6

CGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGTCTATTGAATTAGACAGTCATCTAT  
TCAACTTATCGTCAGAAAAATTAAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACCAAGATA  
TTCTACAGTTTCAATTCCTAACAACAGAGGTATAAAATTGTTGGGAATATTCCTTACC  
ATTTAAGCACACAAATTATTAATAAAAGTGGTTTTTGAAGCCGTGCGTCTGACATCTATC  
TGATTGTTGAAGAAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGC  
TCTTGCACTCAAGTCTCGATTGCAATTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATC  
CTAAACCAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAACTT

ermB 7

TAAGTTTTATTAAGACACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCT  
TAAGCAATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAATAT  
CCAAGGTACGCTTGTAAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTT  
CAAAAACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATTCCCAACAATTT  
TATACCTCTGTTTGTAGGGAATTGAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACAC  
GAGTATTCAGTTTTAATTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAG  
ACGTTACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCTGTTA

---

## ANNEXES

---

### ermB 8

TTTATTAAGACACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGC  
AATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTTCGGTGAATATCCAAG  
GTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTCAAAA  
ACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATTCCCAACAATTTTATAC  
CTCTGTTTGTAGGGAATTGAAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACGAGTA  
TTCAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTT  
ACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCGTTA

### ermB 9

AAGTTTTATTAAGGCACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTT  
AAGCAATTGCTTAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTTCGGTGAATATC  
CAAGGTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTC  
AAAAACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATACTCCCAACAATTTT  
ATACCTCTGTTTGTAGGGAATTGAAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACG  
AGTATTCAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGA  
CGTTACCTGTTTACTTATTTAGCCAGGACCGGCTGTT

### ermB 10

AAGTTTTATTAAGAGACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTT  
AAGCAATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTTCGGTGAATATC  
CAAGGTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTC  
AAAAACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATTCCCAACAATTTT  
ATACCTCTGTTTGTAGGGAATTGAAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACG  
AGTATTCAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGA  
CGTTACCTGTTTACTTATTTAGCCAGTTTCGTCGTTA

### ermB 11

TTGATTAAGAGACTGTTTACTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGC  
AATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTTCGGTGAATATCCAAG  
GTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTCAAAA  
ACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATTCCCAACAATTTTATAC  
CTCTGTTTGTAGGGAATTGAAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACGAGTA

---

## ANNEXES

---

TTCAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTT  
ACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCGTT

ermB 12

TTTATTAAGAGACTGTTTACTTTTTGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGC  
AATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCCTAGTGTTCCGGTGAATATCCAAG  
GTACGCTTGTAGAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCACGGCTTTCAAAA  
ACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATATCCCAACAATTTTATAC  
CTCTGTTTGTTAGGGAATTGAAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACGAGTA  
TTCAGTTTTAATTTTTCTGACGATAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTCAATAGACGTT  
ACCTGTTTACTTATTTTAGCCAGTTTCGTCGTTA

---

## Résumé

*Streptococcus pneumoniae* représente une cause importante d'infections invasives : méningites, pneumopathies, et bactériémies, qui sont grevées d'une morbidité et d'une mortalité importantes, surtout chez les jeunes enfants et les personnes âgées. En 2005, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que 1,6 millions de personnes meurent chaque année d'infections pneumococciques. L'antibio-résistance, qui est apparue comme phénomène alarmant à la fin des années 70 en Afrique du Sud, est désormais répandue dans le monde entier. Les pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline sont aussi moins sensibles à d'autres familles d'antibiotiques. Un autre point d'intérêt est la répartition des différents sérotypes. La virulence accrue de *S. pneumoniae* est liée essentiellement à la présence d'une capsule dont la variabilité antigénique permet de distinguer plus de 90 sérotypes différents. L'introduction du vaccin heptavalent conjugué dans les pays industrialisés a entraîné une diminution des infections invasives à pneumocoques dans la population cible, mais aussi dans la population non vaccinée. D'autres vaccins, les PCV10 et PCV13 sont commercialisés. Le taux de résistance à la pénicilline qui est le reflet des résistances à toutes les bêta-lactamines est en nette augmentation dans notre pays. Le taux de PSDP est de 12,5% en 1994 et atteint 23,5% dans les méningites en 2010. En Algérie, le vaccin anti-pneumococcique n'est pas obligatoire.

Notre étude porte pour objectifs :

- La confirmation de l'identification des souches de *S.pneumoniae* par des méthodes conventionnelles, moléculaires et autres.
- L'étude des caractéristiques épidémiologiques des souches de *S. pneumoniae* isolées chez l'enfant et l'adulte (âge, nature de l'infection, variations saisonnières...).
- L'étude de la résistance des pneumocoques aux principaux antibiotiques actifs.
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des bêta-lactamines et des macrolides.
- La mise en évidence des gènes responsables de la résistance aux macrolides.
- Le sérotypage des pneumocoques.

Notre travail est une étude monocentrique qui porte sur 100 souches de *S. pneumoniae* responsables d'infections invasives chez l'enfant et l'adulte, isolées de liquides céphalorachidiens, d'hémocultures et de liquides pleuraux de patients hospitalisés ou évacués à l'Hôpital Benbadis de Constantine durant une période de 7 ans (janvier 2005-décembre 2011). Le test de sensibilité à l'optochine semble être le Gold Standard parmi les méthodes phénotypiques et la recherche du gène *rpoB* parmi les méthodes moléculaires.

Parmi les 100 souches étudiées, 57% sont de sensibilité diminuée à la pénicilline dont 11% résistantes (CMI entre 2-4 $\mu$ g/ml). Les taux de résistance aux autres antibiotiques sont de 22%, 20%, et 51% pour l'érythromycine, la tétracycline et le cotrimoxazole respectivement. Toutes les souches sont sensibles au chloramphénicol, à la vancomycine et à la lévofloxacine. Les sérotypes prédominants sont les 14, 19F, 23F, et 6B représentant 50,6% des cas. Ce sont aussi les sérotypes les plus représentés parmi les souches de sensibilité diminuée à la pénicilline et les plus fréquents chez l'enfant dont l'âge est  $\leq$  à 5 ans.

Concernant la résistance aux macrolides, le mécanisme le plus fréquemment rencontré est exprimé par les gènes *ermB+* *mefA*, responsable des hauts niveaux de résistance.

Le vaccin conjugué n'est pas introduit dans le Programme de Vaccination National. La couverture vaccinale théorique par le PCV13 est de 76,66%.

**Mots clés :** *Streptococcus pneumoniae*, infections invasives, résistance aux antibiotiques, mécanismes de résistance aux macrolides, sérotypes, vaccin conjugué.

## Abstract

*Streptococcus pneumoniae* is an important cause of invasive infections: meningitis, pneumonia, and bacteremia, which are burdened with a significant morbidity and mortality, especially in young children and the elderly. In 2005, the World Health Organization estimates that 1.6 million people die each year from pneumococcal infections. The antibiotic resistance, which has emerged as an alarming phenomenon in the late 70s in South Africa, has now spread worldwide. Pneumococci with reduced susceptibility to penicillin are also less susceptible to other antibiotics. Another point of interest is the distribution of different serotypes. Increased virulence of *S. pneumoniae* is essentially related to the presence of a capsule with the antigenic variability to distinguish more than 90 different serotypes. The introduction of the heptavalent conjugate vaccine in industrialized countries has led to a reduction of invasive pneumococcal disease in the target population, but also in the unvaccinated population. Other vaccines, PCV10 and PCV13 are marketed. The rate of penicillin resistance which reflects resistance to all beta-lactam antibiotics is clearly increasing in our country. PNSP rate is 12.5 % in 1994 to 23.5 % in 2010 in meningitis. In Algeria, the pneumococcal vaccine is not mandatory. Our study aims to:

- Confirmation of the identification of strains of *S. pneumoniae* by conventional, molecular methods and others.
- The study of the epidemiological characteristics of *S. pneumoniae* (age, type of infection, seasonality)
- The study of pneumococcal resistance to antibiotics.
- The determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of beta-lactams and macrolides.
- The identification of genes responsible for resistance to macrolides.
- Serotyping of pneumococci.

Our work is a monocentric study that examined 100 strains of *S. pneumoniae* responsible for invasive infections in children and adults, isolated from cerebrospinal fluids, blood cultures and pleural fluids of patients hospitalized or discharged to the Hospital Benbadis from Constantine during a 7 years period (January 2005-december 2011). The sensitivity to optochin seems to be the gold standard among phenotypic methods and research of the *rpoB* gene from molecular methods.

Among the 100 strains studied, 57% were sensitive to penicillin, 11% were resistant (MIC between 2-4 µg/ml). Rates of resistance to other antibiotics are 22%, 20%, and 51% for erythromycin, tetracycline and cotrimoxazole respectively.

All strains were sensitive to chloramphenicol, vancomycin and levofloxacin. The predominant serotypes were 14, 19F, 23F, 6B and representing 50.6 % of cases. These are also the serotypes represented among strains with reduced susceptibility to penicillin and most common in children less than 5 years of age.

For resistance to macrolides, the *ermB*<sup>+</sup> *mefA* mechanism is the most frequently encountered, responsible for high levels of resistance.

The conjugate vaccine is not introduced into the national immunization program. The theoretical coverage by PCV13 is 76.66 %.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, invasive infections, resistance to antibiotics, mechanisms of macrolide resistance, serotypes, conjugate vaccine.

## ملخص

*Streptococcus pneumoniae* أحد أهم أسباب الاوبئة المعدية المداهمة مثل التهاب السحايا والالتهاب الرئوي و تجرثم الدم ، والتي خلفت معدلات عالية من الاعتلال و الوفيات خاصة عند الأطفال الصغار والمسنين. في عام 2005 قدرت منظمة الصحة العالمية أن 1.6 مليون شخص يموتون سنويا من جراء الالتهابات الرئوية . المقاومة للمضادات الحيوية والتي برزت في أواخر السبعينات في جنوب إفريقيا قد انتشرت الآن في جميع أنحاء العالم . إن *S. pneumoniae* المقاوم للبنسلين هو أيضا أقل حساسية للمضادات الحيوية الأخرى. نقطة أخرى ذات أهمية هي توزيع الأنماط المصلية المختلفة. كما ان ازدياد ضراوة *S. pneumoniae* يرتبط أساسا على وجود كبسولة التي سمحت بتمييز أكثر من 90 نمط مصلي مختلف. وقد أدى إدخال لقاح سباعي التكافؤ ضد *S. pneumoniae* في البلدان الصناعية إلى الحد من انتشار هذه الأوبئة عند السكان المستهدفين وغير المطعمين. وقد تم تسويق لقاحات أخرى مثل PCV10 و PCV13. معدل مقاومة البنسلين الذي يعكس مقاومة لجميع البيتا لاكتام في ازدياد واضح في بلدنا. معدل PSDP قدر ب 12.5 ٪ في عام 1994 ثم ب 23.5٪ عام 2010 في التهاب السحايا في الجزائر. لقاح ضد *S. pneumoniae* ليس الزامي في بلادنا.

وتهدف دراستنا إلى:

- التأكد من تحديد سلالات *S. pneumoniae* بالطرق التقليدية والجزيئية وغيرها.
- دراسة الخصائص الوبائية لسلالات *S. pneumoniae* المعزولة عند الأطفال و البالغين (حسب العمر، النوع من العدوى و الاختلافات الموسمية ...).
- دراسة مقاومة *S. pneumoniae* للمضادات الحيوية الرئيسية.
- تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للبيتا لاكتام و الماكروليدات .
- تحديد الجينات المسؤولة عن مقاومة الماكروليدات .
- تحديد الأنماط المصلية.

تمت دراستنا في مركز واحد أين عزلت 100 سلالة من *S. pneumoniae* المسؤولة عن الاوبئة المعدية المداهمة عند الأطفال و البالغين ، معزولة عن السوائل المخية و الدم والسائل الجنبي من المرضى في المستشفيات أو إخلاءها إلى مستشفى ابن باديس بقسنطينة خلال فترة 7 سنوات (جانفي 2005 - ديسمبر 2011). يبدو أن حساسية اختبار ل optochin يعتبر معيار الذهب من بين الأساليب المظهرية وكذا البحث عن الجين *rpoB* من الأساليب الجزيئية. من بين 100 سلالة درست، 57 ٪ كانت ناقصة الحساسية للبنسلين منها 11 ٪ مقاومة (MIC بين 2 و 4 µg/ml). معدلات المقاومة للمضادات الحيوية الأخرى هي 22 ٪ ، 20٪، و 51 ٪ للاريثروميسين، التتراسيكلين والكوتريموكسازول على التوالي. وكانت جميع السلالات حساسة للكلورامفينيكول ،الفانكوميسين و الليفوفلوكساسين. كانت الأنماط المصلية السائدة هي 14، 19 F، 23F، 6B و مثلت 50.6 ٪ من الحالات المدروسة. هذه الأنماط المصلية كانت أيضا ممثلة بين السلالات المنخفضة الحساسية للبنسلين و الأكثر شيوعا عند الأطفال الذين أعمارهم  $\geq 5$  سنوات. بالنسبة لمقاومة الماكروليدات ،آلية المقاومة بالجينين *mefA+ermB* كانت أكثر انتشارا، وكانت مسؤولة عن مستويات عالية من المقاومة. لم يتم إدخال لقاح ضد *S. pneumoniae* في برنامج التحصين الوطني و قد قدرت التغطية النظرية للقاح PCV13 ب 76.66٪ في دراستنا.

**الكلمات المفتاحية:** *S. pneumoniae* ، الأوبئة المعدية المداهمة ، مقاومة المضادات الحيوية ، آليات مقاومة الماكروليدات ، الأنماط المصلية ، لقاح ضد *S. pneumoniae* .

## ACTIVITES SCIENTIFIQUES

- **Communications**

- 1- Participation au congrès de la RICAI 2011 (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse) Paris, France: communication affichée N° poster 444 «*Streptococcus pneumoniae* et résistance aux bêta- lactamines dans l'Est Algérien »
- 2- Participation en 2010 au séminaire de la SAMIC (Société Algérienne de Microbiologie Clinique) "Pneumocoque et résistance aux antibiotiques"
- 3-Participation en 2011 aux journées de Microbiologie de la SAMA (Société Algérienne de Microbiologie Appliquée) « *Streptococcus pneumoniae* dans les infections graves »
- 4- Participation au congrès de la RICAI 2013 (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse) Paris, France : communication affichée N° poster 573 «Serotypes and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from East Algeria».

- **Publications**

- 1-Publication dans la revue Médecine et Maladies Infectieuses : Résistance à la pénicilline G de *Streptococcus pneumoniae* responsable d'infections graves communautaires en Algérie. *Med mal infect* 1994, 24, 1-3
- 2- Publication dans le journal African Journal of Microbiology Research: Serotypes and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from East Algeria (2005-2011). *African Journal of Microbiology Research* 2014; 8(2): 167- 177

- **Projet de Recherché National (PNR)**

Participation au projet de recherche intitulé « *Streptococcus pneumoniae* : Etude et surveillance de la résistance aux antibiotiques dans l'Est Algérien (SPERA) » en tant que chercheur principal. Recherche biologique en santé (PNR santé projet 18/U250/4281)