



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجبلاي بونعامة خميس مليانة-

Université Djilali Bounaama Khemis Miliana

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département de : Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème :

**Etude *in vitro* de la sensibilité des staphylocoques
pathogènes vis-à-vis des antibiotiques et du miel**

Présenté par :

❖ M^{lle} Zakhrouf Nadjat

❖ M^{lle} Zakhrouf Ahlam

Soutenu le 14/12/2020

Devant le jury :

❖ **Présidente** : Mme Saadi F.

UDBKM

❖ **Promoteur** : Mr Ghallal M.

UDBKM

❖ **Examinatrice** : Mme Halfaoui Z.

UDBKM

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Merci à Allah qui nous a donné la volonté, la santé et la patience d'achever ce travail durant toutes les longues années d'études afin que nous puissions arriver là ;

A Dr. Saadi F., nous lui exprimons notre profonde gratitude pour avoir accepté de présider le jury, qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect ;

A Dr. Halfaoui Z., ayant accepté d'examiner notre travail, nous lui exprimons nos sincères remerciements ;

Nos vifs remerciements à notre encadreur : Dr. Ghallal M. qui a proposé le sujet et accepté de le diriger avec beaucoup de rigueur et de patience, aussi bien pour ses conseils précieux, ses encouragements, les corrections et les relectures de ce manuscrit ; c'est un honneur d'avoir travaillé avec lui ;

Nos remerciements également pour tous les membres de notre famille qui se sont consacrés à leurs tâches avec dévouement et patience et ceci tout le long de nos études ; merci pour avoir fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui ;

Nos sincères remerciements également pour tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail ; que tous trouvent ici nos parfaites salutations.



Dédicaces

*A mon très cher papa **Lakhdar**, qui reste toujours mon premier maître, je t'aime très fort ;*

*A la plus belle perle du monde, ma tendre mère **Zohra**, en témoignage de ton affection, tes sacrifices et tes précieux conseils qui m'ont conduit à la réussite dans tout ce que je fais, je t'aime maman ;*

*A ma grand-mère **Fatma** et ma chère tante **Chrifa**, que Dieu vous protège et vous garde pour moi ;*

*A mon très cher oncle **Ahmad** et sa femme, qui m'ont toujours encouragée ;*

*A mes tendres, gentilles et adorables sœurs **Ahlem** et **Soulaf** ;*

*A mes chers frères ; **Djamal**, **Rhida** et **Halim**, aucune dédicace ne serait assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez, je vous souhaite un avenir plein de santé, de bonheur, de réussite et de sérénité ;*

*A mes très chères et merveilleuses amies que j'aime profondément : **Saida**, **Ahlem**, **Lobna**, **Rima**, **Taws**, **Amina**, **Chahra**, **Mahjoba** et **Lamya**, vous n'aviez jamais cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité, je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de prospérité et beaucoup de succès ;*

A tous mes proches ;

A tous ceux qui m'ont aidé afin de réaliser ce travail, et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

NADJAT



Dédicaces

Chaque jour qui passe, je remercie Allah et je le prie tout le temps de me donner la force de suivre le chemin qu'il m'a tracé afin de mener à bien le destin qu'il m'a prévu.

Je dédie ce travail à :

Mon cher papa, je le remercie vraiment pour son dévouement, son amour, son sacrifice et son encouragement ;

Ma chère maman, symbole de tendresse, qui m'a donné la vie, elle m'a donné les chances pour réussir jusqu'au bout ;

Que Dieu leur accorde une longue vie et les protèges pour moi inchaa Allah ;

*Mes chères sœurs **Soulaf** et **Nadjat** ;*

*Mes chers frères **Djamel**, **Ridha** et **Halim** ;*

*Mes oncles, spécialement **Ahmad** et sa femme ;*

Mes tantes ;

*Mes chères amies : **Saida**, **Ahlem**, **Tawas**, **Rima**, **Lobna** et **Mahjouba**,*

Mon promoteur ;

A vous tous, un grand merci.

AHLAM

ملخص

المكورات العنقودية الذهبية هي أكثر الأنواع المسببة للأمراض في جنس المكورات العنقودية. إنها واحدة من الجراثيم الأكثر شيوعاً للأمراض البشرية و البيطرية. بالتوازي مع تطور العلاج بالمضادات الحيوية، ظهرت آليات المقاومة عند المكورات العنقودية الذهبية حتى ظهور المكورات العنقودية الذهبية متعددة المقاومة.

أجريت دراستنا على مستوى مختبر التحاليل الطبية "زبوش" في عين الدفلة على عينات قيحية وبولية، والهدف من هذه الدراسة هو تقييم حساسية سلالات المكورات العنقودية للمضادات الحيوية وكذلك تأثير العسل المضاد للميكروبات على هذه السلالات.

تمكنا من العمل على 8 عينات تم استلامها على مستوى المختبر بما في ذلك 7 عينات بول وعينة من القيح، وتم عزل المكورات العنقودية السلبية المخترة فقط.

إن مشكلة مقاومة البكتيريا العنقودية للمضادات الحيوية في تفاقم مما يستوجب العمل للتصدي لها من خلال وضع إستراتيجية نشطة و فعالة تضمن الأمن الميكروبيولوجي بغية تجنب ظاهرة مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية : المكورات العنقودية الذهبية, المضادات الحيوية, المكورات العنقودية الذهبية متعددة المقاومة.

Résumé

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus*. Il fait partie des germes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine et vétérinaire. Parallèlement au développement de l'antibiothérapie, des mécanismes de résistance ont apparu chez *S. aureus* jusqu'à l'émergence de staphylocoques dorés multi-résistants.

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyses médicales « Zibouche » à Aïn Defla, sur des prélèvements purulents et urinaires, cette étude a pour but d'évaluer la sensibilité des souches de staphylocoques vis-à-vis des antibiotiques et aussi l'effet antimicrobien du miel sur ces souches.

On a pu travailler sur 8 prélèvements reçus au niveau du laboratoire dont 7 échantillons urinaires et un prélèvement de pus, et on a isolé seulement des staphylocoques à coagulase négative.

La multirésistance des staphylocoques est devenue remarquablement répandue dans les prélèvements humains, d'où la nécessité de la mise en œuvre d'une stratégie active et efficace garantissant une sécurité microbiologique afin d'éviter la propagation de cette résistance.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, antibiotiques, multirésistance.

Abstract

Staphylococcus aureus is the most pathogenic species within the genus *Staphylococcus*. It is one of the most frequently encountered germs in human and veterinary pathology. In parallel with the development of antibiotic therapy, resistance mechanisms appeared in *S. aureus* until the emergence of multi-resistant *Staphylococcus aureus*.

Our study was conducted at the medical analysis laboratory of "Dr Zibouche" at "Aïn Defla". The aim of this study was to determine the prevalence of staphylococci in clinical purulent and urinary samples, and to test the sensibility of the selected strains against various antibiotic discs and the antimicrobial effect of honey.

We were able to work on 8 samples received at the laboratory including 7 urine samples and a sample of pus, and only coagulase negative staphylococci were isolated.

The multi-resistant *Staphylococcus* has become extremely widespread in the human infections, hence the need for the accomplishment of an active and effective strategy ensuring microbiological safety to prevent the spread of this resistance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antibiotic, multi-resistance.

Sommaire

Remerciements

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Partie bibliographiques

Chapitre I : Généralités sur les staphylocoques pathogènes..... 3

1-1-Définition..... 3

1-2-Historique..... 3

1-3-Classification..... 3

 1-3-1- Famille des *Staphylococcaceae*..... 4

 1-3-2- Genre *Staphylococcus*..... 4

 1-3-3-Espèce *Staphylococcus aureus*..... 5

1-4-Habitat..... 6

1-5-Caractères bactériologiques..... 6

 1-5-1-Caractères morphologiques..... 6

 1-5-2-Caractères culturels..... 7

 1-5-3-Caractères biochimiques..... 8

Chapitre II : Facteurs de virulence..... 10

2-1-Composants de la paroi..... 10

 2-1-1-Peptidoglycane ou mucopeptide..... 10

 2-1-2-Acide téichoïque (polysaccharideA) 10

 2-1-3-Capsule..... 11

2-2- Composants de la surface..... 11

2-2-1- Protéine A..... 11

2-2-2-Adhésines..... 11

2-3-Composants sécrétés..... 12

2-3-1- Toxines..... 12

2-3-1-1-Alpha-toxine ou alpha-hémolysine.....	12
2-3-1-2-Bêta-hémolysine.....	12
2-3-1-3-Gamma-hémolysine.....	13
2-3-1-4-Delta-hémolysine.....	13
2-3-1-5-Leucocidine de panton valentine (LPV)	13
2-3-1-6-Exfoliatine ou épidermolysine.....	13
2-3-1-7-Entérotoxines staphylococciques.....	14
2-3-1-8-Toxine du syndrome du choc toxique (TSST).....	16
2-3-2- Enzymes.....	16
2-3-2-1-Coagulase libre.....	16
2-3-2-2-Lipase.....	17
2-3-2-3-Phosphatase.....	17
2-3-2-4-Hyaluronidase.....	17
2-3-2-5-Nucléase.....	17
2-3-2-6-Protéolysines.....	17
2-3-2-7-Lysozyme.....	17
2-3-2-8-Fibrinolysine ou staphylokinase.....	18
Chapitre III : Résistance aux antibiotiques.....	19
3-1-Définition d'antibiotique (ATB).....	19
3-2-Principales familles d'ATB.....	19
3-3-Mécanisme d'antibiorésistance.....	20
3-3-1-Résistance à la pénicilline.....	21
3-3-2-Résistance à la méticilline.....	21
3-3-3-Résistance aux aminosides.....	22
3-3-4-Résistance aux glycopeptides.....	23
3-3-5-Autres résistances.....	24
3-3-5-1- Tétracyclines.....	24
3-3-5-2- Sulfamides	24
3-3-5-3- Acide fusidique.....	24
3-4- <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM)	25
Chapitre IV : Généralités sur le miel.....	27
4-1-Définition.....	27
4-2-Origine du miel.....	27
4-2-1-Nectar.....	27

4-2-2-Miellat.....	27
4-2-3-Autres origines du miel.....	28
4-3- Type des miels.....	28
4-3-1- Selon l'origine florale.....	28
4-3-2- Selon l'origine géographique.....	28
4-3-2-1-Miel monofloral.....	28
4-3-2-2-Miel polyfloral.....	28
4-4-Composition chimique du miel.....	28
4-4-1-Composition majeure.....	29
4-4-1-1-Eau.....	29
4-4-1-2-Glucides.....	29
4-4-2-Composants mineurs.....	29
4-5-Propriétés du miel.....	30
4-5-1- Propriétés organoleptiques.....	30
4-5-1-1- Couleur.....	30
4-5-1-2-Odeur.....	30
4-5-1-3- Texture.....	30
4-5-1-4- Cristallisation.....	31
4-5-1-5- Goût.....	31
4-5-1-6- Arômes.....	31
4-5-2- Propriétés physico-chimiques.....	31
4-5-2-1-Viscosité.....	31
4-5-2-2-Densité.....	31
4-5-2-3-Activité de l'eau (AE).....	32
4-5-2-4-Conductivité électrique.....	32
4-5-2-5- pH.....	32
4-5-3- Propriétés biologiques.....	32
4-5-3-1- Qualité nutritionnelle.....	32
4-5-3-2- Valeurs thérapeutiques.....	33
4-5-4-Propriétés antimicrobiennes.....	33
4-5-4-1- Osmolarité.....	34
4-5-4-2- Effet du pH	34
4-5-4-3- Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	34
4-5-4-4- Système non-peroxydique	35

4-5-4-5- Méthylglyoxal (MGO).....	35
4-5-4-6- Défensine-1	35
Chapitre V : Partie expérimentale.....	36
5-1-Objectif du travail.....	36
5-2-Durée et lieu de l'étude.....	36
5-3-Matériel et méthodes.....	36
5-3-1- Matériel.....	36
5-3-2- Méthodes.....	38
5-3-2-1- Techniques de prélèvement.....	38
5-3-2-2- Isolement et identification des staphylocoques.....	39
5-3-2-2-1- Identification des espèces du genre <i>Staphylococcus</i>	41
5-3-2-2-2- Identification biochimique de l'espèce <i>S. aureus</i>	43
5-3-2-3-Antibiogramme	45
5-3-2-4- Sensibilité des souches bactériennes au miel.....	47
5-3-2-5- Conservation des souches.....	51
5-4-Résultats.....	51
5-4-1- Nature et nombre d'échantillons.....	51
5-4-2- Isolement des colonies de staphylocoques.....	51
5-4-2-1- Aspect macroscopique.....	51
5-4-2-2- Aspect microscopique.....	52
5-4-3- Identification biochimique.....	52
5-4-4- Antibiogramme.....	53
Conclusion.....	55
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
01	<i>Staphylococcus aureus</i> avec coloration de Gram au grossissement 10 x 100.	7
02	Colonies caractéristiques de <i>S. aureus</i> sur milieu de Baird Parker.	7
03	Mécanisme d'action de l'entérotoxine staphylococcique (à gauche fonctionnement normal, à droite fonctionnement avec superantigène).	16
04	Résistance du staphylocoque aux bêta-lactamines.	21
05	Mécanismes de résistance liés au mode d'action de l'ATB.	26
06	Organigramme résumant les étapes de la recherche et l'identification des staphylocoques.	40
07	Technique d'antibiogramme.	46
08	Echantillon du miel testé.	48
09	Protocole de la détermination de la CMI.	49
10	Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion par disque.	50
11	Conservation des souches bactériennes isolées au glycérol.	51
12	Test de catalase pour la souche S1.	52
13	Test de coagulase de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	53
14	Résultats de l'antibiogramme des 3 souches testées.	54

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
01	Classification du genre <i>Staphylococcus</i> .	4
02	Caractères distinctifs entre les deux genres de la famille des <i>Micrococcaceae</i> (<i>Staphylococcus</i> et <i>Micrococcus</i>) et les genres <i>Streptococcus</i> et <i>Enterococcus</i> .	5
03	Différentes espèces du genre <i>Staphylococcus</i> .	6
04	Caractères biochimiques de <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	9
05	Caractéristiques des entérotoxines staphylococciques.	15
06	Activité, mécanisme d'action et mode de résistance des principales familles d'ATB.	20
07	principaux mécanismes, supports et phénotypes de résistances acquises aux aminosides.	23
08	Vitamines dans le miel.	30
09	Origine et caractéristique de la souche <i>S. aureus</i> de référence.	38
10	Listes des molécules antibiotiques testées.	47
11	Résultats des tests de catalase et de coagulase.	52
12	Sensibilité des souches S10, S11 et S14 aux antibiotiques testés.	53

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

ARN_t : Acide Ribonucléique de Transport

ATB : Antibiotique

AW : Activity Water

CMH : Complexe Majeure d'Histocompatibilité

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

FAME : Fatty Acide Modifying Enzyme

H₂O : Eau

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IL : Interleukine

K : Kanamycine

Kcal : Kilocalorie

LPV : Leukocidin Panton Valentine

Luk : Leukotoxine

MH : Mueller Hinton

MSCRAMM : Microbial Surface Componentrs Recognizing Adhesive Matrix Molecules

NaCl : Chlorure de Sodium

pH : Potentiel d'Hydrogène

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

PM : Poids Moléculaire

SARM : *Staphylocoques aureus* Résistant à la Méricilline

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SCP : staphylocoques à Coagulase Positive

SE : Staphylococcal Enterotoxin

TCR : Cellule T Réceptrice d'antigène

TIA : Toxi-Infection Alimentaire

TNF α : Facteur de nécrose tumorale

TSST : Toxic Shock Syndrom Toxin

Introduction

Introduction

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus*. Il fait partie des germes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine. On le retrouve aussi bien dans les milieux communautaires que dans les milieux hospitaliers, il est au deuxième rang des infections nosocomiales derrière *Escherichia coli* et au deuxième des intoxications alimentaires après les salmonelles. Il intéresse un très grand nombre de sites infectieux et peut être isolé au laboratoire dans tous les types de prélèvements. On le retrouve dans des infections aussi bien locales qu'invasives dont l'issue clinique varie de la simple colonisation asymptomatique au décès rapide du patient (Vieu, 2014).

Derrière cette variété de tableaux cliniques se cache une grande diversité génotypique et phénotypique des souches isolées au laboratoire. *Staphylococcus aureus* se caractérise des autres staphylocoques par l'expression d'un arsenal de toxines, de molécules d'adhésions, d'enzymes et autres facteurs de virulence qui lui permettent d'envahir son hôte et d'échapper à ses défenses immunitaires (Vieu, 2014).

Staphylococcus aureus est le pathogène étiologique le plus commun de la mammites bovine. Les souches résistantes rendent la maladie difficile à guérir (Srednik *et al.*, 2018).

Dès l'introduction de la pénicilline G en thérapeutique, il a été signalé que des staphylocoques étaient capables de détruire cet antibiotique par production de pénicillinase. En effet, plus de 90 % des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline G et à l'ampicilline. La proportion des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) atteint 40 % dans de nombreux hôpitaux français, particulièrement dans certains secteurs : chirurgie, réanimation, service de brûlés, oncologie, soins de suite et de réadaptation et longs séjours (Pilly, 2008).

Le phénomène de résistance survient dans tous les pays du monde. En Europe, il existe un véritable gradient nord-sud avec des taux plus faibles dans les pays du nord. La propagation de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline varie, par exemple, de moins de 1% en Norvège à plus de 25 % en Espagne (Inserm, 2015). En Algérie, cette surveillance n'est pas encore structurée autour d'un programme national. Au niveau de l'établissement hospitalier et universitaire d'Oran, le système de surveillance des infections nosocomiales aux bactéries multirésistantes est basé sur les données du laboratoire de microbiologie et repose exclusivement

Introduction

sur le mode de surveillance passive. La proportion des souches résistantes au sein de l'espèce est le principal indicateur mesuré (Parker *et al.*, 2008).

En effet, le développement de l'antibiorésistance des bactéries préoccupe les spécialistes en médecine. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes de l'antibiorésistance (Bouazize et Ramdane, 2006).

De nos jours, devant l'essor des médecines naturelles et face à certaines pathologies résistantes aux traitements conventionnels, le miel et la propolis peuvent être des atouts grâce à leurs activités thérapeutiques et surtout antibactériennes. Le miel étant le plus communément utilisé, ce dernier est une substance naturelle sucrée produite par les abeilles *Apis mellifera* à partir du nectar des plantes ou à partir des sécrétions provenant des parties vivantes de plantes ou d'insectes suceurs de sève. C'est l'un des aliments les plus complexes et qui sont produits par la nature (Codex Alimentarius, 2001).

Il a été rapporté que le miel contient jusqu'à 200 substances, il est considéré comme une partie importante de la médecine traditionnelle. La composition du miel est en fonction des espèces végétales, du climat et des conditions (White, 1979).

Plusieurs vertus sont attribuées au miel grâce à ses propriétés thérapeutiques antimicrobienne, cicatrisante et antioxydante, et qui sont utiles pour le traitement des brûlures, des blessures, des troubles gastro-intestinaux, des ulcères et autres (Lobreau-Callen *et al.*, 2000).

L'Algérie possède une flore mellifère extrêmement riche, un climat favorable et un sol fertile, mais la production des miels reste très inférieure par rapport aux potentialités mellifères existantes. En effet, des études et des recherches sur les miels Algériens montrent ses meilleures qualités et ses propriétés antimicrobiennes (Merah *et al.*, 2010).

C'est dans ce contexte que nous présentons cette étude, dont l'objectif est de :

- Isoler des souches de *S. aureus* responsables de pathologies humaines ;
- Evaluer la sensibilité de ces souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques et du miel.

Chapitre I : Généralités sur les staphylocoques pathogènes

1-1- Définition :

Les staphylocoques sont des coques à Gram positif, possèdent une catalase et ayant un métabolisme fermentatif (Leyral et Vierling, 2001).

Ce sont des germes peu exigeants, ils ont un métabolisme aéro-anaérobie facultatif et peuvent être isolés en bouillon ou sur milieux solides simples tels que géloses ordinaires ou géloses au sang, ils fermentent les glucides et le glycérol (François *et al.*, 2007).

1-2- Historique :

Le nom commun « *Staphylococcus* » dérive du grec « *staphulê* » qui signifie grappe de raisin, et « *kokkos* » qui signifie grain, il a été proposé par Ogston en 1883 pour désigner des coques regroupées en amas irréguliers responsables d'infections suppurées chez l'homme. En 1884, Rosenbach a fourni la première description du genre *Staphylococcus* (Kloos *et al.*, 1992).

Le genre *Staphylococcus* appartenait à la famille des *Micrococcaceae* qui comprenait 3 autres genres : *Micrococcus*, *Planococcus* et *Stomatococcus*. Les membres de la famille des *Micrococcaceae* partagent un certain nombre de caractères généraux. Ce sont des coques à Gram positif de 0,5 à 2,5 μm de diamètre, qui se divisent dans des plans différents et de ce fait, forment très souvent des amas cellulaires irréguliers, ils sont non sporulés et immobiles (à l'exception de *Planococcus*) (Schleifer, 1984).

Cependant, le regroupement de ces quatre genres dans une même famille n'est pas justifié. Des études de la composition chimique de la paroi, du pourcentage en guanine et cytosine (G + C %) du génome, de l'homologie génomique et de la comparaison des séquences des gènes codant pour les ARNr 16s montrent que ces 4 genres sont en réalité très éloignés. Le genre *Staphylococcus* appartient à la branche *Clostridium-Bacillus-Streptococcus* qui comprend les bactéries à Gram positif dont le G + C % est inférieur à 55 % (Schleifer, 1984).

1-3- Classification :

Selon la deuxième édition de l'ouvrage « Bergey's manuel of systematic bacteriology », la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est la suivante :

Synthèse bibliographique

Tableau 01 : Classification du genre *Staphylococcus* (Delarras, 2007).

Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>

1-3-1- Famille des *Staphylococcaceae* :

La famille des *Staphylococcaceae* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Bacillales*. Elle comprend 5 genres : *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Salinicoccus* et *Staphylococcus*. Les quatre premiers ne contiennent pas plus de deux espèces alors que le genre *Staphylococcus* en contient plus d'une quarantaine (Wattam *et al.*, 2014).

1-3-2- Genre *Staphylococcus* :

Le genre *Staphylococcus* peut être différencié des 3 autres genres de la famille des *Micrococcaceae* et des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* par des caractéristiques moléculaires (composition de la paroi et G + C %) et des caractères morphologiques et biochimiques qui peuvent être mis en évidence au laboratoire : observation microscopique de la morphologie et des associations cellulaires après coloration de Gram, type respiratoire, test de l'oxydase, test de la catalase, test à la benzidine, fermentation du glucose et résistance à la lysostaphine (Schleifer, 1984).

Synthèse bibliographique

Tableau 02 : Caractères distinctifs entre les deux genres de la famille des *Micrococcaceae* (*Staphylococcus* et *Micrococcus*) et les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* (Schleifer, 1984).

Caractères	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Streptococcus</i> et <i>Enterococcus</i>
Association cellulaire	amas	amas	chaînettes
prédominantes	paires	tétrades	paires
Type respiratoire	AnF	AeS	AnF
Métabolisme	R / F	R	F
Fermentation du glucose	(+)	(-)	(+)
Catalase	(+)	(+)	(-)
Test de l'oxydase	(+)	(+)	(-)
Présence de cytochromes	(+)	(+)	(-)
Mobilité	(-)	(-)	(-)
Résistance à la lysostaphine	Sensible	Résistant	Résistant
Acide téichoïque dans la paroi	(+)	(-)	V
G + C %	30 + 39	64 + 75	34 + 46

(+) : Réaction positive ou présence ; (-) : Réaction négative ou absence ;

AnF : anaérobie facultatif ; AeS : aérobie strict ; R : respiratoire ; F : fermentatif ; V: variable

1-3-3- Espèce *Staphylococcus aureus* :

Le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 34 espèces et 13 sous-espèces qui peuvent être classées en fonction de leur capacité à coaguler le plasma du lapin ; on distingue ainsi les staphylocoques à coagulase positive (SCP) et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Kloos et Schleifer, 1984).

Seuls les staphylocoques à coagulase positive sont considérés comme potentiellement pathogènes, 3 espèces peuvent coaguler le plasma de lapin oxalaté : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Staphylococcus hyicus* (Leyral et Vierling, 2001).

Synthèse bibliographique

Tableau 03 : Différentes espèces du genre *Staphylococcus* (Kloos et Schleifer, 1984).

Espèces à coagulase positive	Espèces à coagulase négative
<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. pasteurii</i>
<i>S. anaerobius</i>	<i>S. lentus</i>

1-4- Habitat :

Les germes appartenant au genre *Staphylococcus* sont des commensaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (François *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus est une espèce adaptée à divers niches écologiques et des biotypes. Elle a été décrite chez les différentes espèces animales. C'est un germe pathogène difficile à éliminer du fait qu'il est un habitant presque commensal, il colonise la surface et les glandes de la peau, ainsi que les muqueuses de ses hôtes. Chez l'homme, il est principalement présent au niveau du tractus respiratoire supérieur, en particulier dans les fausses nasales, au niveau du cuir chevelu et des mains. Il est également présent chez les animaux à sang chaud (réservoir principal), dans l'air, l'eau et le sol (réservoir secondaire) (Watson *et al.*, 2006).

1-5- Caractères bactériologiques :

1-5-1- Caractères morphologiques :

A l'examen microscopique, *S. aureus* se présente sous l'aspect de coques immobiles. Il est regroupé en amas formant des grappes de raisin et est isolé en diplocoque ou en très courte chaîne (3 à 5 éléments). Ce sont des cocci mesurant de 0,8 à 1 μm de diamètre et non sporulés (Le Loir et Gautier, 2010). Après une coloration de Gram, ils se révèlent être des cocci à Gram positif. La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture (Robert, 2013).

Synthèse bibliographique

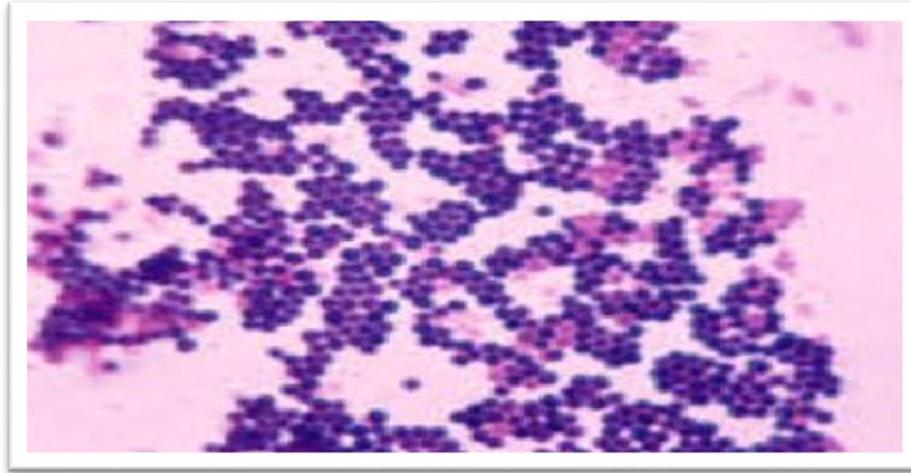


Figure 01 : *Staphylococcus aureus* avec coloration de Gram, au grossissement 10 x 100 (Fernandez et Turner, 2017).

1-5-2- Caractères cultureux :

S. aureus est facilement cultivable sur milieux ordinaires, il a donc une bonne croissance sur milieux usuels à 37 °C pendant 18 à 24 heures et dans un bouillon hypersalé à 7 % et à pH de 7,2. Il est thermosensible, donc il est ralenti par le froid et tué par des températures élevées. Il est détruit à 58 °C pendant 60 minutes. Sur milieu solide, les colonies de *S. aureus* sont lisses, rondes, opaques, colorées en jaune doré ou blanches, leur diamètre est compris entre 1 et 3 mm. Sur milieu liquide, il présente un trouble homogène abondant avec dépôt et voile en surface (Le Minor et Veron, 1982). Il faut préciser que les colonies cultivables sur gélose au sang peuvent être bêta-hémolytiques (Robert, 2013).

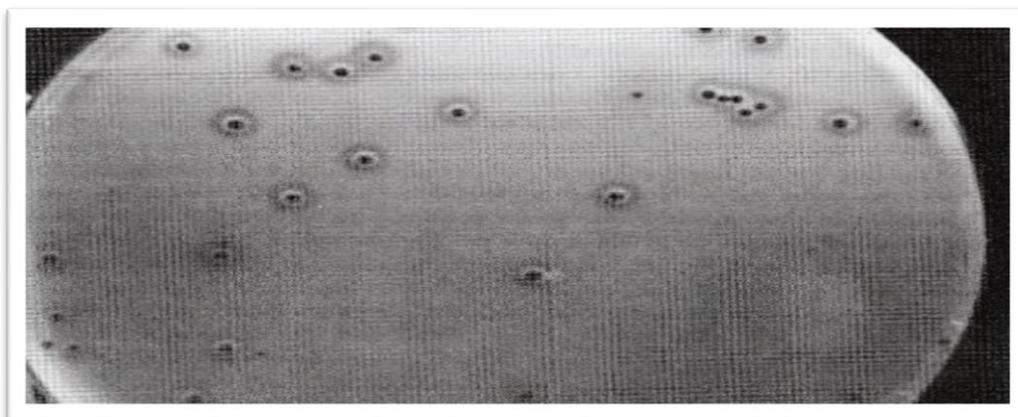


Figure 02 : Colonies caractéristiques de *S. aureus* sur milieu de Baird-Parker (De Buyser et Sutra, 2005).

Synthèse bibliographique

1-5-3- Caractères biochimiques :

S. aureus est un germe aéro-anaérobie facultatif capable de produire la catalase ainsi que l'acétoine, l'ADH (arginine dihydrolase), l'hémolyse et la thermonucléase. En effet, il métabolise plusieurs sucres tels que l'amidon, le glucose, le fructose, le galactose, le ribose, le lactose, ... Le test phosphatase alcaline est positif pour *S. aureus*. Ce germe a la capacité de réduire les nitrates en nitrites (Le Loir et Gautier, 2010).

Synthèse bibliographique

Tableau 04 : Caractères biochimiques de *S. aureus* et *S. epidermidis* (Yves et Michel, 2009 ; Grace et Fetsch, 2018).

Caractères	Clumping factor	Coagulase	Nitrate	Glucose	Mannitol	D-oxylase	phosphatase	ADNase	Saccharose	D-tréhalose	Maltose	hémolyse	uréase	Catalase
Espèces														
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+

Chapitre II : Facteurs de virulence

La virulence des souches de *S. aureus* impliquées dans des infections humaines ou animales est liée à la production d'une grande variété de composés. Ces composés sont soit associés à la paroi de la bactérie (adhésines telles que la protéine A ou le clumping factor, polysides capsulaires, ...), soit excrétés dans l'environnement de la bactérie (toxines, coagulase, enzymes) (Brun et Bes, 2000).

2-1- Composants de la paroi :

2-1-1- Peptidoglycane ou mucopeptide :

Le peptidoglycane est un élément constant de la paroi bactérienne et assure sa rigidité. C'est une énorme molécule réticulée faite de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par de courts peptides. Les chaînes polysaccharidiques sont faites de l'alternance de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Sur les résidus d'acide N-acétylmuramique sont fixés des térapeptides faits de l'alternance d'acides aminés (Nauciel et Vilde, 2005). Chez *S. aureus* la production de grandes quantités de peptidoglycane lors d'infection locale (abcès, infections articulaires) provoque un chimiotactisme des cellules phagocytaires et une libération de cytokines (IL-1, 6, 8, et TNF α) qui, en grande quantité, provoquent des lésions tissulaires et une hyperthermie (Garrity *et al.*, 2007 ; Avril *et al.*, 2003).

2-1-2- Acide téichoïque (polysaccharide A) :

C'est un glycopolymère qui forme le peptidoglycane par liaison covalente. L'acide téichoïque de *S. aureus*, un glycopolymère de la paroi cellulaire, peut être défini comme le ribitol phosphate substitué par α - ou β -N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et D-alanine. Ce polymère, dont les molécules (40 à 50) sont constituées d'unités répétitives de ribitol phosphate, permet à *S. aureus* d'adhérer de manière spécifique aux membranes muqueuses, et donc à la muqueuse nasale. L'acide téichoïque est responsable de la résistance aux lysosomes et aux peptides antimicrobiens ainsi que de l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte. Outre la fermeté et l'élasticité de la paroi cellulaire, le peptidoglycane et l'acide téichoïque ont d'autres activités biologiques telles que l'activation du complément, l'inhibition de la chimiotaxie et la stimulation de la production d'anticorps (Biljana *et al.*, 2015).

Synthèse bibliographique

2-1-3- Capsule :

Environ 90 % des souches de *S. aureus* produisent une capsule polysaccharidique, on retrouve dans sa composition des dérivés osidiques (galactose, fructose, mannose, ...) ainsi que des acides aminés. La production des enzymes nécessaires à la synthèse des polysaccharides de la capsule de *S. aureus* est fortement dépendante des conditions du milieu. Plusieurs études s'accordent à dire que la production de la capsule est maximale en phase post-exponentielle (Vieu, 2014).

2-2- Composants de la surface :

2-2-1- Protéine A :

La protéine A est produite lors de la phase exponentielle de croissance. Elle est retrouvée dans la majorité des souches pathogènes pour l'homme (Koreen *et al.*, 2004). Elle se fixe sur le fragment Fc des immunoglobulines de classe G et M, ce qui perturbe l'opsonisation et donc la phagocytose de la bactérie (Falugi *et al.*, 2013). Elle a un rôle dans le phénomène d'agrégation bactérienne et favorise le développement de biofilms, renforçant ainsi l'adhésion et la protection de la bactérie face à l'action des agents antimicrobiens produits par les cellules immunitaires (Merino *et al.*, 2009).

2-2-2- Adhésines :

S. aureus peut exprimer à sa surface un panel de protéines favorisant l'attachement à certaines molécules de l'hôte telles que la fibronectine, la laminine et le collagène qui forment la matrice extracellulaire des surfaces épithéliales et endothéliales. Ces protéines bactériennes sont nommées MSCRAMM « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules » (Clark et Foster, 2006 ; Foster *et al.*, 2013).

Les protéines de liaison à la fibronectine et au fibrinogène sont retrouvées dans la majorité des souches de *S. aureus*. Elles contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang tels que les cathéters (Vaudaux *et al.*, 1995).

La protéine de liaison au fibrinogène, également appelée coagulase liée ou clumping factor, est responsable de l'adhésion bactérienne aux caillots sanguins et aux tissus endommagés (Foster *et al.*, 2013 ; Boden et Flock, 1989). C'est une protéine de surface pouvant aussi être diffusible suite à l'autolyse. Contrairement à ce que son nom semble indiquer, elle est dépourvue d'activité enzymatique. Sa structure, complémentaire de celle du fibrinogène, lui permet

Synthèse bibliographique

d'interagir directement avec lui ou avec des monomères de fibrine. Ainsi, elle inhibe la phagocytose par les neutrophiles en formant à la surface de *S. aureus* une couche protectrice de fibrinogène, empêchant la reconnaissance du pathogène, même opsonisé (Ko *et al.*, 2013). Au sein du genre *Staphylococcus*, seule l'espèce *S. aureus* possède cette protéine. Cette observation associée aux propriétés intrinsèques de la coagulase liée ont permis la mise au point d'un test de différenciation des espèces de staphylocoques basé sur l'agglutination d'hématies en présence de *S. aureus* (Brown, 2005).

La protéine de liaison au collagène est plutôt retrouvée dans les souches causant de l'arthrite septique et de l'ostéomyélite. L'interaction avec le collagène favorise l'attachement de la bactérie aux tissus endommagés où la couche sous-jacente a été exposée (Patti *et al.*, 1994).

2-3- Composants sécrétés :

S. aureus élabore des protéines diffusibles douées soit d'activité toxique, soit d'activité seulement enzymatique (fessler *et al.*, 2010).

2-3-1- Toxines :

2-3-1-1- Alpha-toxine ou alpha-hémolysine :

Synthétisée par 80 à 90 % des souches, son poids moléculaire (PM) est de 26000 à 30000 Da. Elle est de nature protéique, thermostable, active sur le sang de mouton et exprime des activités cytocides (qui tuent les cellules) sur un plus large éventail de types de cellules, y compris les cellules polynucléaires humaines. Elle est capable de lyser les globules rouges de plusieurs espèces animales différentes. La toxine provoque une nécrose du derme lorsqu'elle est administrée par voie sous-cutanée. Pour les animaux, elle est létale lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse. C'est aussi une neurotoxine puissante. Cette toxine est responsable de la formation de la zone hémolytique autour d'une colonie de certains types de *S. aureus* sur une gélose au sang (Biljana *et al.*, 2015).

2-3-1-2- Bêta-hémolysine :

Elle est plus fabriquée par les souches animales que par les souches humaines. Il s'agit d'une phospholipase de type C, thermolabile, son PM est de 26000 à 38000 Da. Elle est particulièrement active sur les hématies du mouton en provoquant une hémolyse partielle qui augmente considérablement à une température de 4 °C, d'où la dénomination «chaud-froid».

Synthèse bibliographique

Cette toxine est plus fréquemment produite par les souches de *S. aureus* d'origine alimentaire (Dinges *et al.*, 2000).

2-3-1-3- Gamma-hémolysine :

C'est une toxine produite par 50 % des souches, comporte deux facteurs I et II agissant en synergie et de PM de 29000 et 26000 Da, respectivement. La gamma-hémolysine a pour effet d'hémolyser les érythrocytes du lapin, du mouton et celles de l'homme, ce qui provoque une rupture lysosomiale. Elle est antigénique chez l'homme (Le Minor et Veron, 1982).

2-3-1-4- Delta-hémolysine :

Cette toxine est de PM de 103000 Da, composée de petites sous-unités, thermostable, contient des acides aminés hydrophobes et hydrophiles, et elle est faiblement antigénique. Elle agit comme un détergent sur la membrane cytoplasmique sans spécificité et inhibe la respiration mitochondriale et la phosphorylation. Elle est également capable d'activer l'adénylcyclase provoquant la production de c-AMP (Le Minor et Veron, 1982 ; Biljana, 2015).

2-3-1-5- Leucocidine de Panton Valentine (LPV) :

La LPV est une exotoxine qui se compose de deux protéines : LukS-pv et LukF-pv (20 à 27 % d'homologie entre elles). Ces deux composants sont sécrétés séparément puis s'assemblent en octamère à la surface des cellules cibles, ce qui provoquera la formation d'un pore au niveau de la membrane cellulaire. Cette exotoxine induit la lyse de plusieurs types cellulaires comme les polynucléaires, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (Genestier *et al.*, 2005).

2-3-1-6- Exfoliatine ou épidermolysine :

Deux principales formes sérologiques d'exfoliatine, désignées ETA et ETB, ont été liées à des infections humaines. Une troisième exfoliatine (ETC) a été caractérisée et purifiée à partir d'un isolat de *S. aureus* obtenu d'un cheval. Une nouvelle exfoliatine, appelée ETD, a été identifiée comme étant un nouveau sérotype de toxine exfoliative avec des similitudes de séquences de 40 % avec ETA, 59 % avec ETB, et 13% avec ETC (Podbielska *et al.*, 2011). Les souches productrices d'ETA et/ou d'ETB sont responsables du syndrome de la peau échaudé. Ces deux toxines sont antigéniques et stimulent les anticorps de l'hôte (Biljana *et al.*, 2015).

Synthèse bibliographique

2-3-1-7- Entérotoxines staphylococciques :

Les entérotoxines staphylococciques sont des exotoxines gastro-intestinales puissantes synthétisées par *S. aureus* tout au long de la phase exponentielle de la croissance ou durant la transition de cette phase à la phase stationnaire. Elles sont actives en faible quantité (Argudin *et al.*, 2010). Ces exotoxines ont été traditionnellement subdivisées en types classiques SEA à SEE et de nouveaux types SEG à SEV2 ont apparu (Hannekine *et al.*, 2010). Actuellement, plus de 21 types d'entérotoxine ont été décrits. Entérotoxine A (SEA), SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEIJ (Balaban et Rasooly, 2000), SEIK (Orwin *et al.*, 2001), SEIL, SEIM, SEIN, SEIO (Jarraud *et al.*, 2001), SEIP (Omoe *et al.*, 2005), SEIQ (Orwin *et al.*, 2002), SER (Omoe *et al.*, 2003), SES, SET (Ono *et al.*, 2008), SEIU (Letertre *et al.*, 2003), SEIU2 et SEIV (Thomas *et al.*, 2006). Cette nomenclature stipule que si la toxine possède une activité émétique prouvée, elle serait appelée SE. Dans le cas contraire, elle serait désignée SEI (Staphylococcal Enterotoxin-like) (Boisset et Vandenesch, 2010).

Cinq d'entre elles sont les plus impliquées dans les toxi-infections alimentaires (TIA)(SEA, SEB, SEC, SED, SEE). Ces SE agissent directement sur l'épithélium intestinal et sur le nerf vague provoquant une stimulation du centre émétique et du transit intestinal (Le Loir et Gautier, 2010).

L'intoxication alimentaire staphylococcique est caractérisée par une courte période d'incubation (2 à 6 heures) après l'ingestion de toxine préformée, suivie de nausées, de vomissements, de douleurs abdominales et de diarrhée. Les vomissements commencent habituellement en premier, puis la diarrhée qui suit peu de temps après (Balaban et Rasooly, 2000).

L'activité superantigénique résulte de l'interaction directe des SE avec les cellules T réceptrices d'antigène (TCR) et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Cette liaison entraîne l'inactivation non spécifique et la prolifération des cellules T ainsi qu'une sécrétion massive d'interleukines qui semble être impliquée dans le mécanisme de la toxicité des SEs (Podbielska *et al.*, 2011).

Les caractéristiques des entérotoxines staphylococciques sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Synthèse bibliographique

Tableau 05 : Caractéristiques des entérotoxines staphylococciques (Hennekine *et al.*, 2010).

Toxines	PM (Da)	Localisation génétique	Activité superantigénique	Activité émétique
SEA	27,1	prophage	+	+
SEB	28,336	chromosome, plasmide, îlot de pathogénicité	+	+
SEC1, 2 et 3	27,500	plasmide	+	+
SED	26,36	plasmide (pIB485)	+	+
SEE	26,425	prophage	+	+
SEG	27,043	chromosome	+	+
SEH	25,21	transposon	+	+
SEI	24,928	chromosome	+	+
SEIJ	28,565	plasmide (pIB485)	+	nd
SEK	25,539	îlot de pathogénicité	+	nd
SEIL	24,593	îlot de pathogénicité	+	-
SEIM	24,842	chromosome	+	nd
SEIN	26,067	chromosome	+	nd
SEIO	26,777	chromosome	+	nd
SEIP	26,608	prophage (Sa3n)	+	nd
SEIQ	25,076	îlot de pathogénicité	+	-
SER	27,49	plasmide (pIB485)	+	+
SES	26,217	plasmide (pIB485)	+	+
SET	22,614	plasmide (pIB485)	+	+
SEIU	27,192	chromosome	+	nd
SEIU2	26,672	chromosome	+	nd
SEIV	24,997	chromosome	+	nd
nd : non déterminé				

Synthèse bibliographique

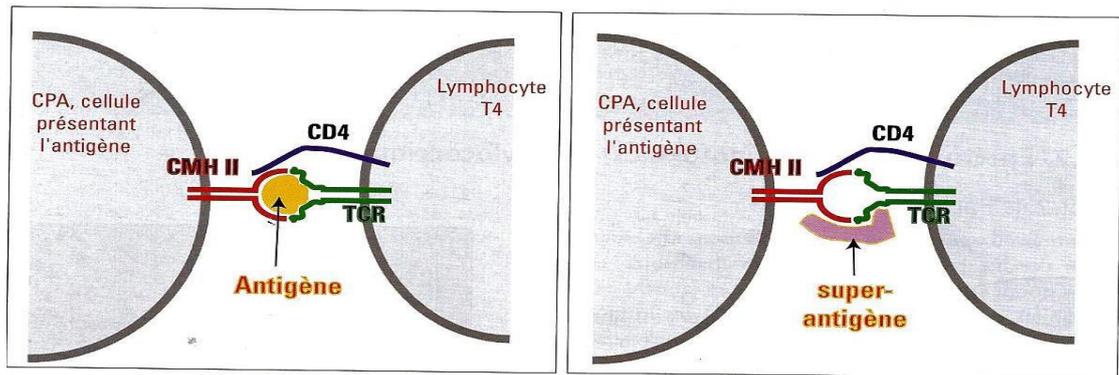


Figure 03 : Mécanisme d'action de l'entérotoxine staphylococcique (à gauche fonctionnement normal, à droite fonctionnement avec superantigène) (Leyral et Vierling, 2007).

2-3-1-8- Toxine du syndrome du choc toxique (TSST) :

Comme son nom l'indique, cette toxine conduit au syndrome de choc toxique. Bien que cette toxine ait une large gamme d'activités biologiques, son rôle dans la formation du syndrome du choc toxique reste peu clair. Le syndrome du choc toxique est une maladie multi-systémique caractérisée par : fièvre, hypotension, érythrodermie, vomissement, diarrhée, insuffisance rénale, céphalée et conjonctivite. La maladie a été observée chez les femmes utilisant des tampons hyper-absorbants pendant leurs périodes. Par la suite, la maladie a été trouvée chez les deux sexes patients atteints d'abcès staphylococciques, ostéomyélite, après la chirurgie des infections de la plaie, et pneumonie (Biljana *et al.*, 2015). Ces symptômes sont dus à la synthèse par les staphylocoques d'une exotoxine appelée toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) à activité superantigène. TSST-1 provoque une activation polyclonale des lymphocytes T, suivie d'une réponse inflammatoire caractéristique de l'activité superantigène (Madigan et Martinko, 2007).

2-3-2- Enzymes :

2-3-2-1- Coagulase libre :

S. aureus fabrique une substance capable de coaguler en quelques heures le plasma humain ou le plasma de lapin citraté, hepariné ou oxalaté. C'est une substance thermostable fabriquée en phase exponentielle de la croissance. Elle paraît être d'origine chromosomique et agit en présence d'un facteur qui est une globuline voisine ou identique à la prothrombine (Brun *et al.*, 2003).

Synthèse bibliographique

2-3-2-2- Lipase :

Quatre-vingt pour cent des souches de *S. aureus* expriment des lipases et une enzyme modifiant les acides gras bactéricides, nommés FAME (Fatty Acid Modifying Enzym). Ces enzymes favorisent la pénétration de la bactérie à travers la barrière cutanéomuqueuse. Les lipases clivent les acides gras de la peau, qui sont secondairement inactivés par l'enzyme FAME (Long *et al.*, 2010).

2-3-2-3- Phosphatase :

Localisée sur la membrane ou sur l'acide téichoïque, où se trouvent les phosphatases alcalines et acides dont le rôle physiologique n'est pas connu (Le Minor et Veron, 1982).

2-3-2-4- Hyaluronidase :

C'est une enzyme thermolabile de PM de 80000 Da, capable de dégrader l'acide hyaluronique et joue un rôle pathogène en favorisant la diffusion de staphylocoques dans le tissu conjonctif (Le Minor et Veron, 1982). Elle est produite par un certain nombre de bactéries pathogènes à Gram positif qui initient des infections au niveau de la peau ou à la surface des muqueuses (Podbielska *et al.*, 2011).

2-3-2-5- Nucléase :

La nucléase (ADNase) de *S. aureus* (thermonucléase) est thermostable, alors que celle des autres bactéries est thermolabile. L'activité enzymatique est mise en évidence sur milieu à base d'ADN avec du bleu de Toluidine (halo rosé) (Avril *et al.*, 2000).

2-3-2-6- Protéolysines :

De nombreuses enzymes protéolytiques ont été isolées et purifiées chez *S. aureus* : élastases, gélatinases, caséinases, ... (Le Minor et Veron, 1982).

2-3-2-7- Lysozyme :

S. aureus produit le lysozyme qui est capable de lyser la paroi de la cellule bactérienne (Le Minor et Veron, 1982).

Synthèse bibliographique

2-3-2-8- Fibrinolysine ou Staphylokinase :

De nombreuses souches de *S. aureus* expriment un activateur de plasminogène appelé staphylokinase. Ce facteur lyse la fibrine. Un complexe formé entre la staphylokinase et le plasminogène qui active l'activité protéolytique de type plasmine, ce qui provoque la dissolution des caillots de fibrine. Cette enzyme contribue à la propagation bactérienne (Podbielska *et al.*, 2011).

Chapitre III : Résistance aux antibiotiques

3-1- Définition d'antibiotique (ATB) :

Un ATB est une substance antimicrobienne d'origine biologique, c'est-à-dire produite par un micro-organisme (champignon microscopique et bactérie), ou de synthèse chimique ; et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres micro-organismes. La pénicilline est par exemple produite par le champignon *Penicillium notatum* (Boulahbal, 2002).

La résistance bactérienne aux ATB ou antibiorésistance est un phénomène de portée universelle, il n'a cessé d'augmenter de manière progressive au cours de ces dernières années. Ce problème de santé publique touche à la fois la santé animale et la santé humaine (Faye, 2005). La diffusion d'un grand nombre de bactéries pathogènes résistantes à plusieurs antimicrobiens a été reconnue par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAE) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme un problème sérieux en raison de la fréquence avec laquelle de nouveaux phénotypes de résistance apparaissent parmi les agents pathogènes et même chez les micro-organismes commensaux (OIE, 2008).

3-2- Principales familles d'ATB :

Les principales familles d'ATB, leur activité, leur mécanisme d'action et leur mode de résistance sont rapportés dans le tableau 06.

Synthèse bibliographique

Tableau 06 : Activité, mécanisme d'action et mode de résistance des principales familles d'ATB (Petignat, 2005).

Famille d'ATB	Activité	Mécanismes d'action	Mécanismes de résistance
Bêta-lactamines : - Pénicillines - Céphalosporines - Carbapénèmes	- Gram + - Gram -	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	- Modification de la cible - Production de β -lactaminases
Glycopeptides	Gram +	Inhibition de la paroi bactérienne	Modification de la cible
Aminoglycosides (aminosides)	Gram -	Inhibition de la synthèse des protéines, ribosomes	- Modification de la cible - Production d'un inhibiteur
Tétracyclines	- Gram + - Gram -	Inhibition de la synthèse des protéines, ribosomes	- Modification de la cible - Mécanismes de reflux
- Macrolides - Lincosamide	- Gram + - Gram -	Inhibition de la synthèse des protéines, ribosomes	- Modification de la cible - Imperméabilité de la paroi à Gram -
Quinolones	- Gram + - Gram -	Inhibition de la réplication de l'ADN, ADN gyrase	Modification de la cible
Rifamycines	Gram +	Inhibition de la synthèse de l'ARN, ARN polymérases	Modification de la cible
- Triméthoprime - Sulfonamides	- Gram + - Gram -	Inhibition de la synthèse des acides nucléique, enzymes	Modification de la cible

3-3- Mécanisme d'antibiorésistance :

Il existe deux mécanismes d'antibiorésistance :

- La transmission verticale : lorsque les conditions de la vie deviennent désagréables, la bactérie peut muter et transmettre à sa descendance la résistance.
- La transmission horizontale : les bactéries peuvent être parasitées par des virus dont l'ADN code une multirésistance aux ATB. Elle est responsable de la majorité des résistances (Afssa, 2006).

Il existe de très nombreux ATB répartis en différentes familles selon leur mode d'action ou leur structure moléculaire. La plupart d'entre eux cible les fonctions physiologiques ou métaboliques essentielles à la cellule bactérienne. Parmi les ATB bactéricides, les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, monobactames) et les glycopeptides inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. En particulier, les β -lactamines se lient à des enzymes appelées

Synthèse bibliographique

protéines de liaison aux pénicillines (PLP) qui participent à la synthèse du peptidoglycane, le principal constituant de la paroi bactérienne. Il existe différentes PLP (PLP 1, PLP 2, etc.) n'ayant pas la même affinité vis-à-vis des β -lactamines. Les glycopeptides tels que la vancomycine inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en induisant un encombrement stérique qui bloque l'assemblage des précurseurs lors de la formation du peptidoglycane (Lewis, 2013).

3-3-1- Résistance à la pénicilline :

La pénicilline était le premier ATB découvert en 1929 par Alexander Fleming. Introduit au début des années 1940, pratiquement toutes les souches de *S. aureus* étaient sensibles à la pénicilline G, mais en 1944 la première preuve de résistance de *S. aureus* à la pénicilline avait déjà paru. Aujourd'hui presque toutes les souches de *S. aureus* sont résistantes aux pénicillines naturelles, ce qui implique aussi une résistance à l'ampicilline, la ticarcilline, la pipéracilline et l'aminopénicilline (Rice, 2006).

Le mécanisme de résistance à la pénicilline repose sur la synthèse par la bactérie d'une enzyme appelée β -lactamase ou pénicillinase. Cette enzyme plasmidique inductible hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines A et G et les rend inactives (Korta et Mobashery, 1998).

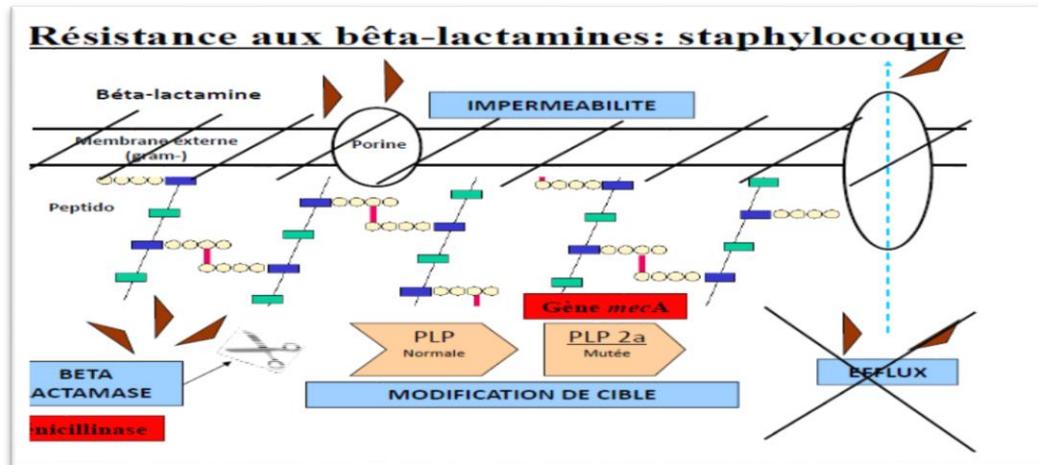


Figure 04 : Résistance du staphylocoque aux bêta-lactamines (Mainardi, 2015).

3-3-2- Résistance à la méticilline :

La méticilline, l'oxacilline et d'autres pénicillines résistantes à l'action de la pénicillinase sont introduites dès les débuts des années 1960 pour le traitement des infections causées par les *S. aureus* résistants à la pénicilline. Cependant, au fil du temps des souches de SARM commencent à apparaître et à se répandre au sein du milieu hospitalier et récemment au sein de la communauté (Pesavento *et al.*, 2007). La résistance à la méticilline est croisée vis-à-

Synthèse bibliographique

vis des autres bêta-lactamines, ce qui implique que les souches résistantes à la méticilline (Mét-R) doivent toujours être considérées comme résistantes à toutes les bêta-lactamines y compris aux céphalosporines de 3^{ème} génération (Katayama et Hiramatsu, 2000).

La résistance à la méticilline est principalement due à la modification de la cible des β -lactamines, enzymes appelées aussi protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP interviennent dans la synthèse de la paroi bactérienne en catalysant la formation des ponts peptidiques entre les chaînes glycaniques (Ghuysen, 1994).

Les β -lactamines se fixent à ces enzymes et bloquent la polymérisation de la paroi bactérienne, altérant ainsi sa structure et provoquent la lyse de la bactérie. *S. aureus* produit naturellement les PLP 4, les β -lactamines doivent en inhiber plus d'une pour obtenir une activité antibactérienne efficace (Korta et Mobashery, 1998).

3-3-3- Résistance aux aminosides :

Les aminosides sont des ATB bactéricides utilisés en thérapeutique pour l'accélération de la vitesse de bactéricidie qu'ils apportent aux inhibiteurs de paroi (les bêta-lactamines et les glycopeptides) (Tankovic *et al.*, 1997).

Les aminosides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien (Ramirez et Tolmasky, 2010). Les CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) de la gentamicine, la nétilmicine et la tobramycine sont égales à 0,1 ou 0,2 mg/l et celle de l'amikacine à 0,5 mg/l (Tankovic *et al.*, 1997).

La résistance aux aminosides est rarement due à des mutations affectant les cibles ribosomales des ATB. Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamycine) est surtout dû à la production par les staphylocoques d'enzymes modifiant la cible ribosomale. Il existe trois enzymes de résistance, chacune d'entre elles conférant un phénotype de résistance spécifique aux aminosides (tableau 06). Ces enzymes (acétyltransférases, nucléotidyltransférases et phosphotransférases) sont codées par des gènes plasmidiques ou transposables (Tankovic *et al.*, 1997). Les trois phénotypes de résistance sont :

- Aminoglycoside (3')-phosphotransférase : cette enzyme confère la résistance à la kanamycine et à la néomycine (phénotype K). Les souches qui produisent ces enzymes apparaissent sensibles à l'amikacine dont les CMI sont multipliées seulement par trois. Cette enzyme est présente chez moins de 10 % des souches méticillino-sensibles ;

Synthèse bibliographique

- Aminoglycoside nucléotidyltransférase (4'-4'') : cette enzyme confère la résistance à la kanamycine, à l'amikacine et à la tobramycine (phénotype KT). Cette résistance est présente chez environ 1/3 des souches résistantes à la méticilline ;

- Aminoglycoside acétyltransférase (6')-aminoglycoside phosphotransférase (2'') : cette enzyme bifonctionnelle confère la résistance à la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine (phénotype KTG). L'amikacine et la nétilmicine paraissent actives avec des CMI cependant multipliées respectivement par 10 et 15. Cette enzyme est détectée chez 2/3 ou plus des souches méticillino-résistantes (Leclercq, 2002).

Tableau 07 : Principaux mécanismes, supports et phénotypes de résistances acquises aux aminosides (Quincampoix et Mainardi, 2001).

Enzymes	Support génétique	Phénotypes	K	An	Tm	Gm	Net
aph3'	aph3'a	K	R	R	S	S	S
ant4'	ant4'a	KT	R	R	R	S	S
aph2''	aph2''a	KTG	R	R	R	R	R

K : kanamycine ; An: amikacine ; Tm: tobramycine; Gm : gentamicine ; Net : nétilmicine ;

S : sensible ; R : résistant

3-3-4- Résistance aux glycopeptides :

Les glycopeptides (téicoplanine et vancomycine) sont utilisés en alternative aux bêta-lactamines dans le traitement des infections à staphylocoques dorés méticillino-résistants. Ces ATB ont un effet bactéricide s'exerçant lentement. Ils agissent sur la synthèse de la paroi bactérienne à un stade plus précoce que les bêta-lactamines, en ciblant le résidu D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane pour se fixer (Tankovic *et al.*, 1997).

Le mécanisme de résistance à la vancomycine est lié à un épaissement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé (McCallum *et al.*, 2010). Cette résistance est due à des mutations de *S. aureus*, obtenues après transfert conjugatif de l'opéron de gène van A codant pour la résistance à la vancomycine chez les entérocoques résistantes aux glycopeptides (Tankovic *et al.*, 1997 ; McCallum *et al.*, 2010).

Synthèse bibliographique

3-3-5- Autres résistances :

3-3-5-1-Tétracyclines :

Les tétracyclines sont des molécules comprenant un noyau tétracyclique linéaire, elles agissent en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome, ce qui empêche l'ARNt de s'y associer et inhibe la synthèse protéique (Speer *et al.*, 1992).

La résistance est due soit à un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire codée par les gènes tetK et tetL qui sont d'origine plasmidique, soit à une protection de la cible par une protéine codée par le gène transposable tetM (Courvalin et Leclercq, 2012).

3-3-5-2-Sulfamides :

Ce sont des analogues structuraux des para-amino-benzoïques (PAB). La résistance est due à une hyperproduction d'acide PAB. Les sulfamides entrent en compétition avec le PAB dans la synthèse de l'acide dihydrofolique (DHF). Ils remplacent les PAB en se fixant sur la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse cette synthèse à partir de PAB, la synthèse se poursuit par l'incorporation d'acide glutamique et la formation de l'acide dihydrofolique couramment appelé l'acide folique. Chez *S. aureus*, la résistance est due à la production des DHPS ayant une affinité réduite à cet ATB (Goldstein, 2012).

3-3-5-3-Acide fusidique :

Un ATB naturel isolé à partir de micromycète *Fusidium coccineum*, il est apparenté chimiquement à la céphalosporine P1. Cet ATB est à spectre étroit, il est principalement actif sur les bactéries à Gram positif. L'acide fusidique est un inhibiteur de la synthèse protéique interférant avec le facteur d'élongation G (EF-G). Cette GTPase est essentielle à la translocation du peptidyl-ARNt du site A ribosomique vers le site P. Après hydrolyse du GTP, le complexe EF-G-GDP est libéré du ribosome ; mais en présence de l'acide fusidique, EF-G-GDP est stabilisé au niveau du ribosome bloquant ainsi l'élongation de chaîne polypeptidique (Courvalin et Leclercq, 2012). Chez *S. aureus*, il existe deux mécanismes de résistance à cet ATB : mutation dans le gène fusA codant le facteur d'élongation G ou diminution de la perméabilité (Daurel et Leclercq, 2008).

Synthèse bibliographique

3-4- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) :

Dès les années soixante, des résistances à la pénicilline sont observées chez *S. aureus*. La méthicilline (bêta-lactamine de la classe des pénicillines), qui commença à être utilisée en médecine humaine durant cette période, permit de contourner cette problématique. Peu après son apparition, on rapporte rapidement des cas de résistance à la méthicilline chez *S. aureus* au Royaume-Uni (Xia, 2013). Au cours des années 80, les SARM sont devenus endémiques dans pratiquement tous les hôpitaux américains. Selon un rapport du « Center for Diseases Control and Prevention » (CDC), 75309 cas d'infection à SARM ont été répertoriés en 2012 et ont mené à 9670 décès aux Etats-Unis (Rehm et Tice, 2010). Une autre étude rapporte que plusieurs pays estiment que 25-50 % des infections nosocomiales à *S.aureus* sont causées par les SARM (Xia, 2013). Le terme SARM est surtout une dénomination historique puisque ces derniers sont aujourd'hui résistants, voir multirésistants, à plusieurs classes d'ATB différentes. Cette résistance historique à la méthicilline et à presque toutes les bêta-lactamines est conférée par le gène *mecA* codant pour une protéine de liaison à la pénicilline modifiée (PLP2a) (Rehm et Tice, 2010). Récemment, un variant du gène *mecA*, aujourd'hui appelé *mecC*, a été découvert. De façon constitutive, les *S. aureus* possèdent des protéines périplasmiques de liaison à la pénicilline (PLP) (Lim et Strynadka, 2002). Les PLP effectuent la transpeptidation du peptidoglycane de la paroi bactérienne chez *S. aureus* (Mun *et al.*, 2014). Les bêta-lactamines sont des analogues du substrat des PLP bloquant leur fonction de transpeptidation (Lim et Strynadka, 2002). La PLP2a n'est pas affectée par les bêta-lactamines, ce qui provoque une résistance envers ces ATB (Rehm et Tice, 2010). Les souches de *S. aureus* sont considérées comme résistantes à la méthicilline lorsqu'elles présentent une CMI supérieure ou égale à 4 µg/ml (Lim et Strynadka, 2002).

Synthèse bibliographique

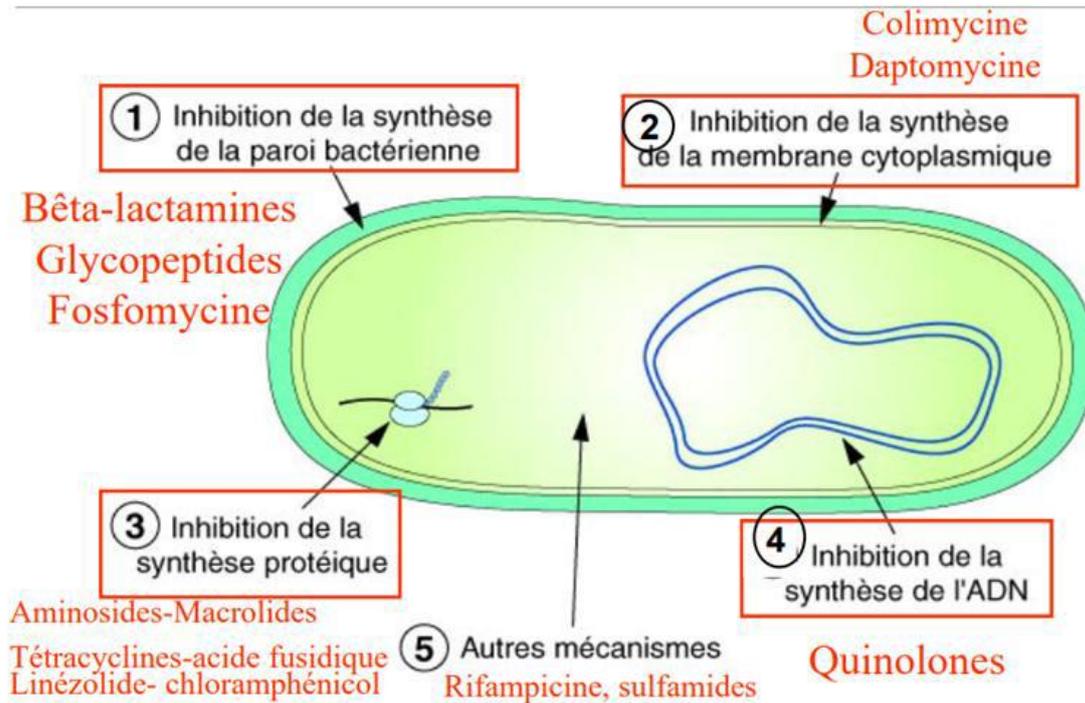


Figure 05 : Mécanismes de résistance liés au mode d'action de l'ATB (Mainardi, 2015).

Chapitre IV : Généralités sur le miel

4-1- Définition :

Le miel est la substance naturelle sucrée, produite par les abeilles *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes, de sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou d'excrétions d'insectes butineurs laissées sur les parties vivantes de plantes ; que les abeilles butinent, transforment, en les combinant avec des substances spécifiques qu'elles sécrètent elles-mêmes, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et murir dans les rayons de la ruche (Codex, 2001).

4-2- Origine du miel :

Il existe deux variétés de miel selon l'origine sécrétoire : le miel de nectar et le miel de miellat (Philippe, 1991; Bessas, 2008 ; Lequet, 2010).

4-2-1- Nectar :

Le nectar est un liquide sucré sécrété par les nectaires, il présente une composition complexe mais variable selon les espèces, et différente de celle de la sève. On y trouve de l'eau, des sucres, des substances aromatiques, des colorants, des acides, des minéraux ou quelques substances diverses et rares comme des vitamines ou des protéines. La qualité et la composition du nectar influencent donc les propriétés du miel, par exemple au niveau des arômes et des sucres (Philippe, 1991; Bessas, 2008 ; Lequet, 2010).

4-2-2- Miellat :

Selon Biri (1999), le miellat est un liquide sucré produit par plusieurs espèces d'insectes parasites vivant sur les feuilles de nombreuses plantes. Le miel de miellat présente une couleur sombre foncée et son goût est agréable. Il est très riche en sels minéraux, et contrairement aux nectars, les miellats contiennent beaucoup d'éléments indigestes pour l'abeille y compris certains sucres polyholosides (Schweitzer, 2000).

Synthèse bibliographique

4-2-3- Autres origines du miel :

Il existe aussi du « miel de sucre », miel produit par des abeilles nourries à l'aide de sucre (Apfelbaum *et al.*, 2004), et quelque fois fruits, cannes à sucre, etc. (Schweitzer, 2000).

4-3- Types des miels :

Il existe de nombreuses variétés de miel qui peuvent être classées de façons diverses (Bogdanov *et al.*, 2001).

4-3-1- Selon l'origine florale :

On distingue deux grandes variétés de miel en fonction de l'origine sécrétoire : miel de nectar et miel de miellat (Bogdanov *et al.*, 2001).

4-3-2- Selon l'origine géographique :

4-3-2-1- Miel monofloral :

Un miel unifloral ou monofloral est un miel récolté par les abeilles sur une espèce végétale unique (Gonnet, 1982). Les miels monofloraux possèdent des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques spécifiques (Bogdanov *et al.*, 2001).

4-3-2-2- Miel polyfloral :

Appelé aussi miel de toutes fleurs, le miel polyfloral est préparé à partir du nectar et/ou du miellat de plusieurs fleurs différentes (Makhloufi, 2010), souvent classé suivant les lieux de récolte (miel de montagne ou de forêt), ou encore suivant les saisons (miel de printemps ou d'été) (Donadieu, 1982).

4-4- Composition chimique du miel :

Le miel est une substance complexe dont la composition varie d'un échantillon à l'autre en fonction de nombreux facteurs tels que :

- Origine florale ;
- Condition météorologique ;
- Nature du sol (Guerriat, 2000 ; Makhloufi, 2010).

Synthèse bibliographique

Le miel contient approximativement 181 composés. C'est un produit liquide naturel, hautement sucré, avec d'autres composés en petites quantités tels que les acides organiques, les acides aminés, les protéines, les minéraux, les vitamines, les enzymes, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les pigments, ainsi que des substances volatiles donnant au miel son arôme (Nair, 2014).

4-4-1- Composition majeure :

4-4-1-1- Eau :

L'eau est le deuxième composant principal du miel. Elle dépend non seulement des facteurs environnementaux, tels que le temps et l'humidité à l'intérieur de la ruche, mais également des traitements appliqués pendant la collection et le stockage du nectar et du miel. C'est un paramètre de qualité important, car il prévoit la durée de vie du produit et la capacité du miel de rester stable et exempt de fermentation. La teneur en eau la plus élevée augmente la probabilité que le miel commencera la fermentation lors du stockage. Malgré tout, la mesure simple et rapide de la teneur en eau s'est avérée suffisante pour doser le risque de fermentation de miel (Ronald, 2011).

4-4-1-2- Glucides :

Les glucides représentent de 95 à plus de 99 % de la matière sèche des miels, parmi ces sucres, figurent le fructose et le glucose, que l'on trouve en quantité voisine dans les miels. Cependant, le rapport de la quantité de fructose sur la quantité de glucose est très important et varie de 0,76 à 1,76 environ, ainsi le saccharose dont la quantité peut aller jusqu'à 7 % et le maltose dont la quantité varie de 2 à 7 % (Khenfer *et al.*, 2001 ; Louveaux, 1968).

4-4-2- Composants mineurs :

Ce sont les acides, les protéines, les aminoacides, les vitamines, les enzymes et les minéraux (Nair, 2014).

Synthèse bibliographique

Tableau 08 : Vitamines dans le miel (Nair, 2014).

Vitamine	Quantité (mg/100 g)
Thiamine (vitamine B1)	0.00 - 0.01
Riboflavine (vitamine B2)	0.02 - 0.01
Niacine (vitamine B3)	0.01 - 0.32
Acide pantothénique (vitamine B5)	0.10 - 0.20
Pyridoxine (vitamine B6)	0.02 - 0.11
Acide ascorbique (vitamine C)	2.2 - 2.5
Phyloquinone (vitamine K)	0.025

4-5- Propriétés du miel :

4-5-1- Propriétés organoleptiques :

4-5-1-1- Couleur :

Les miels ont de multiples couleurs qui sont déterminées par les espèces des fleurs butinées. On peut diviser les couleurs en 5 catégories principales : brun, ocre, ambré, jaune intense et jaune paille. La couleur d'un même miel peut varier d'une année à l'autre (Schweitzer, 2000 ; Ibrahim Khalil *et al.*, 2012).

4-5-1-2- Odeur :

Elle est considérée comme deuxième élément pour déguster pleinement un miel. Les odeurs varient considérablement mais s'évaporent très rapidement. Elles sont végétales, puissantes ou non, florales ou fruitées, fines, lourdes et vulgaires. Certains miels peuvent avoir une odeur de fumée, de métal de fermentation ou de produits chimiques. Cet état pourrait provenir des manipulations de l'apiculteur (Mokeddem, 1998 ; Guerzou et Nadji, 2002).

4-5-1-3- Texture :

La texture est largement tributaire de la provenance du nectar, elle influence l'expérience gustative qui suivra et représente un trait caractéristique du miel. Celui-ci peut être liquide, crémeux, visqueux ou même granuleux (François, 2017).

Synthèse bibliographique

4-5-1-4- Cristallisation :

Elle désigne un processus naturel complexe du fait de la présence de plusieurs sucres en mélange et de leurs différences de solubilité. Plus la teneur en fructose est élevée, plus le miel reste liquide, le fructose influence souvent la solubilité du glucose (Bogdanov, 1984 ; Guerriat, 2000 ; El Sohaimy *et al.*, 2015). Il forme d'abord de petits cristaux qui vont se lier entre eux progressivement pour former de plus gros cristaux et donner une consistance grumeleuse au miel (Dailly, 2008 ; Koechler, 2015).

4-5-1-5- Goût :

Les parfums et les arômes influencent très largement la saveur du miel, on trouve parfois le goût très fort comme le miel de sauge, parfois plus doux comme le miel d'acacia, parfois amer comme le miel de châtaignier ou très sucré comme le miel de bruyère (Anonyme 1).

4-5-1-6- Arômes :

L'arôme de miel est donné soit par l'acide phénylacétique, qui est présent dans tous les miels et qui donne le goût caractéristique de ces derniers ; soit par une auxine présente dans la sève de certains arbres et elle est transférée au miel à travers le miellat (Anonyme 2). En règle générale, les miels foncés sont plus aromatiques que les autres (Guerzou et Nadji, 2002).

4-5-2- Propriétés physico-chimiques :

4-5-2-1- Viscosité :

Le miel de haute qualité est habituellement épais et visqueux. Si la concentration de l'eau est augmentée, le miel devient moins visqueux. Les protéines et d'autres substances colloïdales augmentent la viscosité de miel, mais leur quantité dans le miel peut être insignifiante (Boukraa, 2010).

4-5-2-2- Densité :

La densité du miel est une mesure de la densité du miel par rapport à l'eau et dépend de la teneur en celle-ci. Elle est de 1,40 à 1,45 g/cm³. Autres facteurs tels que la source florale affectent légèrement la densité du miel. Les miels de différentes origines ou lots devraient être bien mélangés pour éviter la superposition (Boukraa, 2010).

Synthèse bibliographique

4-5-2-3- Activité de l'eau (AE):

L'AE dans un produit est le rapport entre la pression de vapeur d'eau à la surface du produit et la pression de vapeur de l'eau pure (vapeur saturée) à la même température T du produit (Amrouche, 2010). L'influence de la composition du miel sur la valeur de l'AE a été étudiée dans les travaux de Ruegg et ses collaborateurs (1981). Les valeurs de l'AE du miel varient entre 0,55 et 0,75. Les miels dont l'AE est $< 0,60$ peuvent être, du point de vue microbiologique, qualifiés de stables. Bien que l'activité de l'eau soit un facteur de qualité important, on ne la détermine que rarement (Bogdanov *et al.*, 2003). Auparavant, la mesure de l'AE était longue et frustrante. Les nouvelles technologies de mesure ont grandement amélioré la rapidité, la précision et la fiabilité des mesures (Chouia, 2014).

4-5-2-4- Conductivité électrique :

La conductivité électrique représente un bon critère pour la détermination de l'origine botanique du miel. Cette mesure dépend de la teneur en minéraux et de l'acidité du miel, plus elles sont élevées, plus la conductivité correspondante est élevée (Mazrou, 2008). Elle est intéressante car elle permet de distinguer aisément des miels de miellats des miels de fleurs, les premiers ayant une conductibilité bien plus élevée que les seconds (Emmanuelle *et al.*, 1996).

4-5-2-5- pH :

Tous les miels sont acides et c'est probablement l'abeille qui leur confère cette propriété. Le pH et l'acidité libre vont influencer la stabilité du miel et ses conditions de conservation (Mbogning *et al.*, 2011). Le pH se situe entre 3,5 et 4,5 pour les miels de nectar et entre 4,5 et 5,5 pour un miel de miellat (Cari, 2011).

4-5-3- Propriétés biologiques :

4-5-3-1- Qualité nutritionnelle :

Le miel contient essentiellement des glucides, des protéines, des lipides, des enzymes et des vitamines. C'est un aliment sain, léger, naturel et riche en calories. Son apport énergétique est un peu moins important que celui du sucre (316 kcal pour 100 g contre 400 kcal pour 100 g). C'est une alternative au sucre de table convenant aux personnes portant une attention particulière à leurs apports énergétiques (Velghe, 2016). Traditionnellement, il a été utilisé dans la nourriture comme agent édulcorant. Cependant, plusieurs aspects de son utilisation indiquent qu'il fonctionne comme un conservateur alimentaire (Ferrerres, 1993).

Synthèse bibliographique

4-5-3-2- Valeurs thérapeutiques :

Le miel est une source de « guérison pour les gens ». Il est facilement digéré, les estomacs les plus sensibles le tolèrent ainsi très bien, malgré son taux d'acidité élevé. Il contribue à un meilleur fonctionnement des reins et des intestins, comme il diffuse rapidement dans le sang en l'espace de 7 minutes, ses molécules de sucres libres contribuent à un meilleur fonctionnement de cerveau, car le cerveau est l'organe le plus consommateur de sucre, c'est le moyen le plus efficace pour éliminer la fatigue et augmenter les performances sportives. Il contribue aussi à la production de sang. De plus il permet sa purification, sa régulation et sa circulation (Magalon et Vanwijck, 2003).

Grace à sa capacité d'absorber l'humidité de l'air, le miel facilite la guérison et la cicatrisation des blessures (Amirat, 2014). Son action, à la fois nettoyante et protectrice, le rend utilisable comme pansement à n'importe quel stade de la cicatrisation. Il a une action nutritive qui favorise la régénération tissulaire. Le miel peut être appliqué sur des plaies infectées qu'il stérilise rapidement sans les effets secondaires des ATB locaux, comme il réduit la douleur probablement par réduction du processus inflammatoire local (Magalon et Vanwijck, 2003).

4-5-4- Propriétés antimicrobiennes :

L'activité antimicrobienne est multifactorielle, le miel peut donc inhiber la croissance d'un large spectre de bactéries, champignons, protozoaires et virus ; sans que ces derniers ne puissent développer de résistante (Delphine, 2010).

Les mécanismes mis en jeu dans le caractère antimicrobien ne sont pas tous élucidés, mais cette activité est liée à des facteurs bien connus : la forte concentration en sucres, l'osmolarité élevée, le faible pH, ainsi la présence de plusieurs composants antimicrobiens appelés « inhibines » (Dold, 1937).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est considéré comme la principale inhibine contenue dans le miel (Adcock, 1962 ; Bogdanov et Pascale, 2001).

D'autres travaux ont montré la présence d'autres facteurs « non-peroxydiques » impliqués dans cette activité tels que : des flavonoïdes, des acides phénoliques, et plus récemment, le méthylglyoxal (retrouvé en particulier dans le miel de manuka) et les défensines-1 (protéines fabriquées par les abeilles) qui ont été identifiées comme des composés antibactériens

Synthèse bibliographique

importants dans le miel (Allen *et al.*, 1991 ; Molan, 1992 ; Kwakman *et al.*, 2010 ; Paulus *et al.*, 2011).

4-5-4-1- Osmolarité :

L'effet osmotique est la conséquence de la forte teneur en sucre, dont 84 % étant un mélange de fructose et glucose dans le miel. Ce dernier agit comme une solution hypertonique et l'eau contenue représente habituellement 15 à 21 % du poids. La forte interaction de ces molécules de sucres avec les molécules d'eau laisse très peu de molécules d'eau disponibles pour les micro-organismes et conduit à une déshydratation qui absorbe l'eau vitale de ces derniers. L'effet osmotique joue un rôle fondamental dans l'action antibactérienne du miel, toutefois un certain nombre de bactéries n'étant pas inhibées dans des milieux à faible coefficient hydrique, il est clair que d'autres mécanismes interviennent (Brudzynski, 2006).

4-5-4-2- Effet du pH :

Le pH du miel est relativement acide, il varie entre 3,2 et 5,5. Cette acidité est principalement due à sa teneur en acide gluconique et en gluconolactone. D'autres études retrouvent la persistance d'une activité antibactérienne marquée lorsque le miel a été neutralisé. Malgré ces observations, cela ne signifie pas que l'acidité ne contribue pas à l'activité antibactérienne du miel (Bogdanov et Blumer, 2001).

Le pH du miel semble être suffisamment bas pour ralentir ou éviter la croissance de nombreuses espèces pathogènes (Brudzynski, 2006). Cependant certains miels ont un pH nettement plus élevé, entre 5 et 6 (miel de châtaignier, miel de miellat, ...), mais ceux-ci possèdent néanmoins un effet antibactérien (Bogdanov et Blumer, 2001).

4-5-4-3- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

Le H₂O₂, aussi appelé l'eau oxygénée, constitue le principal agent antimicrobien retrouvé dans la plupart des miels. Le H₂O₂ et l'acide gluconique résultent de l'oxydation de l'eau et du glucose par la glucose-oxydase (Kwakman *et al.*, 2012).

La glucose-oxydase est une enzyme du miel sécrétée par les glandes nourricières des abeilles qui est ajoutée lors de la transformation du nectar en miel (Bogdanov et Pascale, 2001).

Le H₂O₂ est réduit par la catalase également trouvée dans de nombreux miels et qui représente l'antagoniste de la glucose-oxydase, alors que celle-ci est éliminée par la catalase.

Synthèse bibliographique

Donc la concentration en H₂O₂ dépend de l'activité de ces deux enzymes (Kwakman *et al.*, 2012).



Sa production est influencée par la chaleur, la lumière et la durée du stockage ; ainsi elle n'est pas active dans le miel pur mais elle inhibe que faiblement le développement bactérien, par contre, elle devient active lorsque le miel est dilué (Molan, 1992 ; Bogdanov et Pascale, 2001 ; Libonatti *et al.*, 2014 ; Kwakman *et al.*, 2012 ; Jessica, 2015).

4-5-4-4- Système non-peroxydique :

Certains acides aromatiques ou composés volatiles, ainsi que des flavonoïdes et des acides phénoliques transmis par la plante sont des composants non-peroxydiques (Blanc, 2010). En effet, l'activité antimicrobienne n'est pas uniquement corrélée au taux du peroxyde. Les principaux composants ayant une activité non-peroxydique sont : les lysozymes (enzymes bactériostatiques présentes dans le miel et produites par les abeilles), la pinocembrine (un flavonoïde présent dans le miel et produit par les abeilles) et d'autres nombreux composants chimiques comme les terpènes, l'alcool benzénique et l'acide syringique (Bogdanov, 1997).

Contrairement aux composants à activité peroxydique, ces facteurs non-peroxydiques sont beaucoup moins sensibles à la chaleur, la lumière et la durée du stockage (Bogdanov, 1997 ; Bogdanov et Pascale, 2001 ; Cushnie et Lamb, 2005).

4-5-4-5- Méthylglyoxal (MGO) :

Il est trouvé dans les miels médicaux et est vraisemblablement responsable de l'activité non-peroxydique observée dans les miels (Badet et Quero, 2011 ; Majtan, 2011 ; Annie, 2013).

4-5-4-6- Défensine-1 :

On l'appelle aussi la défensine de l'abeille. Elle est trouvée dans les produits Revamil® (gamme de produits à base de miel thérapeutique) (kwakman *et al.*, 2010), et qui a montrée son rôle dans la contribution dans l'activité antimicrobienne (Annie, 2013).

Chapitre V : Partie expérimentale

5-1- Objectif du travail :

L'objectif principal de notre étude consiste à isoler des souches de *Staphylococcus aureus* à partir de divers prélèvements : urine, pus, sperme, prélèvement vaginal, ... ; d'évaluer la sensibilité des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques et de déterminer l'effet antibactérien du miel sur celles-ci.

5-2- Durée et lieu de l'étude :

Le prélèvement des échantillons a été effectué durant la période s'écoulant entre le mois de février et le mois de mars 2020. L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire des analyses médicales « Zibouche » situé au niveau de la Wilaya d'Aïn Defla.

5-3- Matériel et méthodes :

5-3-1- Matériel :

- Etuve (incubateur) (Mettler, Germany) ;
- Bec Bunsen ;
- Balance électronique (Denver instrument, USA) ;
- Réfrigérateur (Essalem Electronics, Algérie) ;
- Vortex (Heidolph, Germany) ;
- Bain-marie (Mettler, Germany) ;
- Autoclave (pbi international, Milano) ;
- Microscope optique (Ceti, Royaume-Uni) ;
- Verrerie et outils : boîtes de Petri, tubes à essai, pipettes Pasteur, écouvillons, tubes à hémolyse, anse de platine, micropipettes, embouts (0.1 et 1 ml), spatules, flacons en verre, lames et lamelles pour microscopie, pince bactériologique.

Partie expérimentale

Milieux de culture et réactifs :

- Eau peptonée tamponnée (Conda Pronadisa, Spain) ;
- Bouillon Clark et Lubs (Institut Pasteur d'Alger, Algérie) ;
- Milieu Chapman;
- Tellurite de potassium (Institut Pasteur d'Alger, Algérie) ;
- Gélose Mueller-Hinton (Conda Pronadisa, Spain) ;
- Bouillon nitraté (Conda Pronadisa, Espagne) ;
- Gélose à ADN (Conda Pronadisa, Espagne) ;
- Milieu BHI (Brain Heart Infusion) ;
- Gélose nutritive (GN) ;
- Bouillon nutritif (BN) ;
- Réactifs Voges-Proskauer (VP) I (α -naphtol à 5 % dans l'éthanol absolu) et II (KOH à 40 % dans de l'eau pure désionisée ou NaOH à 40 %) (Institut Pasteur d'Alger, Algérie) ;
- Réactifs nitrate réductase 1 (NR1) et 2 (NR2) (Institut Pasteur d'Alger)
- HCl 37 % (MERCK, Germany) ;
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Cosmania, Algérie) ;
- Eau physiologique stérile ;
- Eau distillée stérile ;
- Glycérol ;
- Plasma humain ;
- Violet de gentiane ;
- Solution de Lugol ;

Partie expérimentale

- Alcool ;
- Fuchsine ;
- Poudre de zinc ;
- Disques d'antibiotiques (Liofilchem, Italie).

Matériel biologique :

- Souche de référence *S. aureus* ATCC 25923, désignée par S13.

Tableau 09 : Origine et caractéristique de la souche *S. aureus* de référence.

Origine	Référence	Caractéristique	Désignation
Institut Pasteur d'Alger	ATCC 25923	Sensible à la pénicilline	S13

5-3-2- Méthodes :

5-3-2-1- Techniques de prélèvement :

Prélèvement des urines pour l'examen cytbactériologique (ECBU) :

Il est préférable de recueillir des urines du matin afin d'obtenir une urine ayant séjourné suffisamment longtemps, au moins 3 à 4 heures dans la vessie, notamment en cas de diurèse importante. La méthode recommandée consiste à récupérer les urines, après un lavage hygiénique des mains et une toilette des organes génitaux externes. Après évacuation du premier jet (≈ 20 ml), on recueille au moins 20 ml dans flacons stériles (Slaninova, 2016).

Ces flacons sont fournis par le laboratoire de bactériologie. De plus et pour chaque prélèvement, une fiche de renseignement est remplie. Dans cette dernière, les informations concernant le nom du patient et son âge, la date et l'heure du prélèvement ainsi qu'une éventuelle prise de traitement (antibiotiques, corticoïdes, immunodépresseurs ou autres) sont notées. Tous les prélèvements urinaires se font selon les recommandations décrites par Grinfeld (Grinfeld, 1999).

Chez le petit enfant, on doit utiliser un collecteur stérile spécifique. Ce dispositif à usage unique adapté à l'anatomie des enfants se pose après désinfection soigneuse et ne peut être laissé en place plus d'une demi-heure. Passé ce délai, si l'enfant n'a pas uriné, le dispositif est

Partie expérimentale

éliminé et remplacé par un collecteur neuf. Dès que la miction sera terminée, le collecteur serait enlevé et les urines seraient transvasées soigneusement dans un flacon stérile (Charles, 2012).

Prélèvement du pus à partir de plaies infectées :

La méthode de prélèvement dépend de la nature et de la localisation de suppuration.

Dans le cas d'un prélèvement d'un pus sur peau saine et non suintante ou une plaie aiguë, la plaie et la peau doivent être désinfectées à l'alcool iodé. Tous les exsudats doivent être éliminés à l'aide d'une compresse stérile et de sérum physiologique stérile. Ensuite nous imbibons la partie cotonnée de l'écouvillon de sérum physiologique stérile, qui sera appliquée en effectuant plusieurs rotations au niveau de la suppuration sans toucher la peau saine. Enfin, nous capuchonnons l'écouvillon qui sera transporté par la suite au laboratoire.

Lorsqu'il s'agit d'un abcès superficiel fermé ou d'une plaie profonde, le prélèvement s'effectue à l'aide d'une seringue dont l'aiguille sera introduite dans le foyer infectieux pour aspirer le pus à travers la peau. Si le volume du prélèvement est faible, nous ajoutons quelques gouttes de sérum physiologique stérile à l'aiguille et nous déchargeons le contenu de la seringue dans un tube à essai stérile (Williams *et al.*, 2004).

5-3-2-2- Isolement et identification des staphylocoques :

L'examen bactériologique permet la mise en culture, l'isolement et l'identification des staphylocoques présents dans les prélèvements pathologiques. Cette recherche est effectuée selon le protocole décrit par Leyral et ses collaborateurs (Leyral *et al.*, 2003).

Partie expérimentale

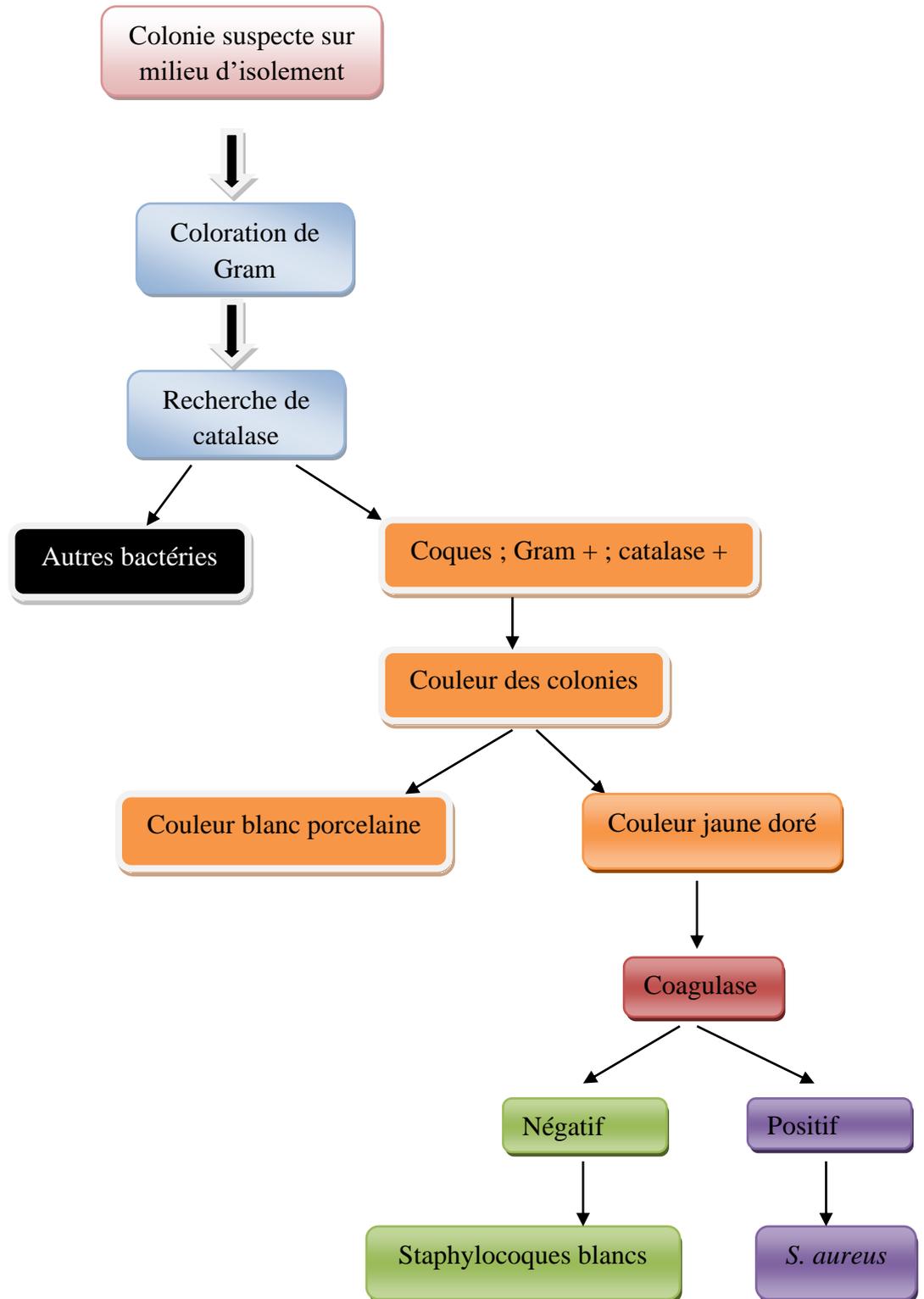


Figure 06 : Organigramme résumant les étapes de la recherche et l'identification des staphylocoques (Leyral *et al.*, 2003).

Partie expérimentale

5-3-2-2-1- Identification des espèces du genre *Staphylococcus* :

Isolement sur milieu sélectif :

L'isolement des bactéries consiste à ensemencer le produit pathologique dans un milieu de culture sélectif, en l'occurrence le milieu Chapman gélosé.

Pour le pus, il s'agit de mettre l'eau distillée dans l'écouvillon jusqu'à ce que la partie cotonnée y soit trempée. Après homogénéisation du mélange, une goutte sera déposée sur le milieu de culture à l'aide d'une anse de platine. Pour l'urine, il s'agit de prendre directement une goutte de celle-ci en se servant toujours d'une anse de platine et la déposer sur le milieu de culture.

L'ensemencement de l'urine se fait par la réalisation de 4 stries parallèles sur le milieu de culture à l'aide d'une anse de platine. Par contre, l'ensemencement du pus se fait directement en stries serrées à l'aide d'une pipette Pasteur.

L'incubation de la boîte sera réalisée dans l'étuve à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Après 24 heures, voire 48 heures, d'incubation sur milieu Chapman, des colonies de *S. aureus* suspectes (colonies jaunes, de taille moyenne, bombées, lisses et à contour régulier, avec coloration jaune du milieu) feront l'objet d'une purification suivie d'une identification par une coloration de Gram, une microscopie et des tests biochimiques.

Purification :

La purification consiste à repiquer chaque souche suspecte dans un milieu de culture gélosé, à savoir la GN.

Coloration de Gram :

Principe : c'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour classer les bactéries. Elle est aussi effectuée afin de confirmer la pureté des isolats.

Partie expérimentale

Technique : les étapes suivies dans cette technique se résument en :

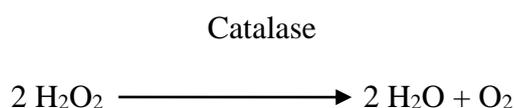
- 1^{ère} étape : nous effectuons la préparation du frottis. Sur une lame, nous déposons une goutte d'eau physiologique stérile ou directement le prélèvement s'il est liquide. Ensuite nous ajoutons une colonie isolée qui sera étalée et fixée à la chaleur.

- 2^{ème} étape : nous réalisons la coloration du frottis. D'abord, nous effectuons une coloration par le violet de gentiane et laissons agir pendant 2 minutes. Ensuite nous rinçons à l'eau courante et recouvrons le frottis par la solution de Lugol et laissons agir pendant 30 secondes. Une décoloration à l'alcool sera faite rapidement pendant 15 secondes, suivie par un rinçage à l'eau. Enfin, une recoloration à la fuchsine sera effectuée pour une durée d'une minute, suivie par un rinçage à l'eau et séchage de la lame. L'observation se fait à l'aide d'une goutte d'huile à immersion (grossissement $\times 10$, puis grossissement $\times 40$).

Lecture : les bactéries en violet sont à Gram (+) et celles en rose fuchsine sont à Gram (-).

Test de la catalase :

Principe : la catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , produit toxique du métabolisme aérobie. Elle est présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif et permet de différencier les staphylocoques des streptocoques.



Technique : mettre une goutte d'eau oxygénée sur une lame. Ensuite, déposer, à l'aide de l'anse bouclée en platine, une colonie isolée (ou plusieurs s'il s'agit de petites colonies) provenant du milieu GN contenant une souche suspecte purifiée.

Lecture : la souche est dite à catalase positive si des bulles de gaz d'oxygène apparaissent dans la goutte d' H_2O_2 .

Partie expérimentale

5-3-2-2-2- Identification biochimique de l'espèce *S. aureus* :

Test de la coagulase :

Principe : la coagulase libre est présente chez *S. aureus*, mais aussi produite par *S. intermedius* ou *S. hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur.

Technique : la détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse 0.5 ml de plasma humain ou de lapin et quelques colonies pures de staphylocoque d'une culture fraîche de 24 heures. Le mélange est placé à l'étuve à 37 °C et est incubé pendant 24 heures.

Lecture : un test positif se traduit par la formation d'un coagulum. Le témoin positif est réalisé de la même manière en utilisant une souche de référence *S. aureus* ATCC 25923.

Test Voges-Proskauer (VP) :

Principe : chez les bactéries anaérobies facultatives, la fermentation du glucose conduit à la production d'acétoïne par la voie fermentaire du butane-2,3-diol qui est mise en évidence par le test VP suite à une réaction colorée.

Technique : ensemercer largement le milieu Clark et Lubs par une ou plusieurs colonies pures de 24 heures issues du milieu BHI. Incuber pendant 24 à 48 heures à 37 °C. La production de l'acétoïne est révélée par l'ajout de 15 à 20 gouttes du réactif VP I (α -naphtol 5 %) et le même volume du réactif VP II (KOH à 40 %). Enfin, incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation et attendre quelques minutes à 1 heure.

Lecture : la souche est considérée VP positive si une coloration rouge apparaît en surface du tube.

Recherche de nitrate réductase :

Principe : cette technique se fait à l'aide d'un bouillon nitraté permettant la recherche de l'utilisation de l'ion nitrate par certains micro-organismes.

Technique : le test consiste à ajouter une goutte de suspension bactérienne, de densité de 0,5 McFarland, au bouillon nitraté. L'incubation se fait à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

Partie expérimentale

Lecture : après avoir vérifié la présence d'une multiplication bactérienne, les réactifs nitrites 1 et 2 seront ajoutés :

- Une coloration rouge signe la présence de nitrites (réduction du nitrate en nitrite), la bactérie est nitrate réductase (+).
- En cas de milieu incolore, nous ajoutons du zinc (réducteur des nitrates) et attendons quelques minutes. Une coloration rouge montre la présence de nitrite, la bactérie est donc nitrate réductase (-). Par contre une absence de coloration montre l'absence de nitrates, car la bactérie les a réduits en diazote N_2 (il n'y en a plus dans le milieu pour que le zinc les réduise), du coup la bactérie est nitrate réductase (+).

Recherche de la fermentation du mannitol :

Principe : le milieu mannitol-mobilité est un milieu de culture qui permet la mise en évidence de l'utilisation de mannitol et la mobilité bactérienne.

Technique : une colonie caractéristique purifiée à partir du milieu Chapman sera ensemencée par piqûre centrale, sur milieu mannitol-mobilité, à l'aide d'une pipette Pasteur. L'incubation du milieu se fait à 37 °C pendant de 18 à 24 heures.

Lecture : elle s'effectue de la manière suivante :

- Pas de dégradation du mannitol : pas de virage de couleur ;
- Dégradation du mannitol : virage de la couleur du milieu au jaune ;
- Bactérie non mobile : culture bactérienne autour du lieu de l'ensemencement (piqûre centrale) ;
- Bactérie mobile : apparition d'une culture bactérienne dans tout le milieu.

Mise en évidence de l'hémolysine :

Principe : le test est réalisé sur gélose au sang frais humain qui est un milieu riche permettant la mise en évidence la présence d'une hémolysine chez les bactéries comme *S. aureus*. L'hémolysine est une substance produite par certaines bactéries et susceptible de causer une destruction des globules rouges.

Partie expérimentale

Technique : réaliser des stries serrées sur gélose au sang à partir d'une culture jeune purifiée, puis incuber à 37 °C pendant 24 heures.

Lecture : la présence d'un halo d'éclaircissement complet à bords nets autour des colonies signifie la lyse des hématies et la digestion totale de l'hémoglobine libérée, il s'agit de l'hémolyse bêta.

5-3-2-3- Antibiogramme :

La sensibilité des souches de staphylocoques isolées a été étudiée conformément aux recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), en appliquant la méthode de diffusion sur milieu gélosé MH en utilisant des disques. La sensibilité des souches a été testée vis-à-vis de 11 molécules antibiotiques listées dans le tableau 10.

Technique :

Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures à 37 °C. Quelques colonies sont raclées à l'aide d'une anse de platine ou pipette Pasteur, elles sont ensuite déchargées dans 5ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est homogénéisée d'une façon manuelle ou à l'aide d'un vortex.

L'opacité de la suspension bactérienne est ajustée à 0.5 selon le standard McFarland, soit en ajoutant de la culture à la suspension soit de l'eau physiologique stérile.

Le milieu MH est coulé dans une boîte Petri à une épaisseur de 4 mm. Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, puis est essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, ensuite est frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche du haut en bas en stries serrées. L'opération est ainsi répétée trois fois en tournant la boîte à 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (CLSI, 2017).

Enfin, les disques d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose en les appliquant délicatement et en appuyant légèrement à l'aide d'une pince stérile. Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm. Une fois appliqué, le disque ne

Partie expérimentale

doit pas être déplacé. Les boîtes sont ensuite immédiatement incubées pendant 24 heures à 37 °C (CLSI, 2017).

Lecture et interprétation :

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, elle doit être précise en millimètre à l'aide d'une règle graduée à l'extérieur de la boîte fermée.

La souche est alors classée comme sensible **S**, intermédiaire **I** ou résistante **R** par comparaison aux valeurs critiques expérimentales diffusées par le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie).

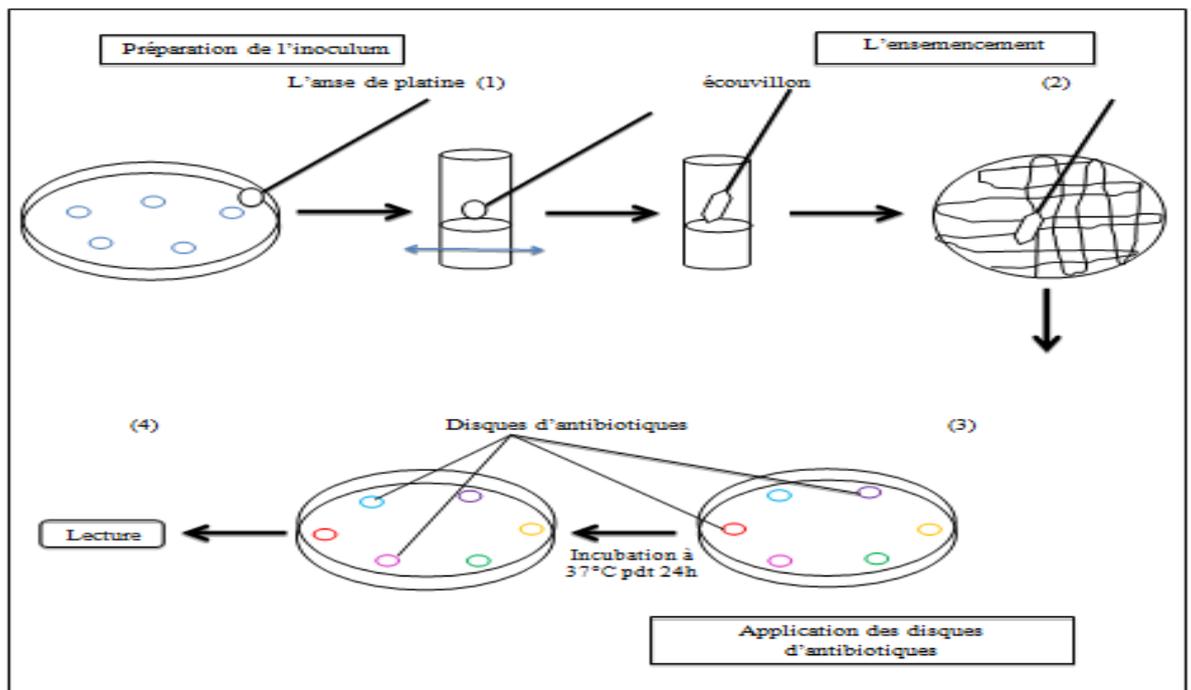


Figure 07 : Technique d'antibiogramme (Zaika, 1988).

Partie expérimentale

Tableau 10 : Liste des molécules antibiotiques testées.

Antibiotiques	Abréviation	Charge (μg)	Marque
Pénicilline	P	10	Liofilechem, Italie
Oxacilline	OX	1	Liofilechem, Italie
Ofloxacine	OFX	5	Liofilechem, Italie
Vancomycine	VA	30	Liofilechem, Italie
Gentamicine	GN	10	Liofilechem, Italie
Erythromycine	E	15	Liofilechem, Italie
Doxicycline	DO	30	Liofilechem, Italie
Clindamycine	CD	2	Liofilechem, Italie
Fosfomycine	FO	30	Liofilechem, Italie
Amikacine	AK	30	Liofilechem, Italie
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	SXT	25	Liofilechem, Italie

5-3-2-4- Sensibilité des souches bactériennes au miel :

On a testé la sensibilité des souches bactériennes isolées vis-à-vis d'une seule variété de miel naturel.

On a utilisé un miel de la roquette *Eruca Sativa*, qui a été récolté en été 2016 dans la région « Teghlissia », située dans la Wilaya d'Aïn Defla.

Le miel récolté a été conservé dans des flacons en verre stériles (figure 08), hermétiquement fermés et gardés à la température ambiante.

Partie expérimentale



Figure 08 : Echantillon du miel testé (photo personnelle, 2020).

L'évaluation du pouvoir antibactérien du miel sur les 13 souches bactériennes isolées est réalisée par la technique de diffusion sur milieu gélosé et la méthode de dilution en milieu liquide.

Méthode de dilution en milieu liquide :

Cette méthode est mise en œuvre pour déterminer la CMI de la croissance bactérienne d'une souche *S. aureus* de référence ATCC 25923.

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'un agent antibactérien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures.

Technique :

Dans 4 tubes stériles, nous mettons 500 μ l d'une suspension bactérienne de *S. aureus* ATCC 25923 dont son opacité est de 0.5 selon la norme McFarland avec un volume de 5 ml de BN.

Nous ajoutons dans chaque tube 1 ml d'une des dilutions du miel suivantes : 0.25 %, 0.5 %, 0.75 % et 1 %. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 18 heures (Feddaoui et Kerdouci, 2013).

Partie expérimentale

Lecture et interprétation :

La détermination de la CMI s'effectue par la mesure de la turbidité induite par la croissance du germe étudié. Elle correspondra donc à la plus petite concentration à laquelle il y a absence de turbidité (Moroh *et al.*, 2008).

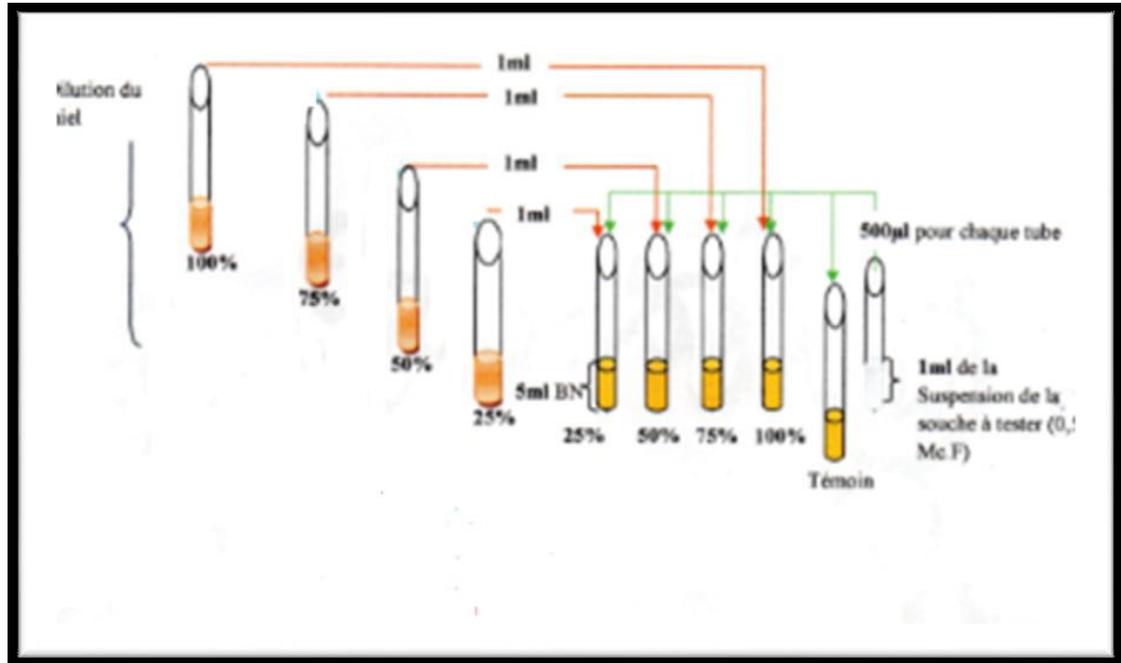


Figure 09 : Protocole de la détermination de la CMI (Feddaoui et Kerdouci, 2013).

Méthode de diffusion sur milieu gélosé :

Cette méthode est basée sur la technique d'antibiogramme utilisée en bactériologie médicale. Elle permet de tester l'effet d'un produit antibactérien sur une souche bactérienne grâce à l'apparition des zones d'inhibition (zones de stérilité) autour des disques imprégnés de différents produits (principes actifs) à tester (figure 10). La mesure des diamètres des zones d'inhibition nous permet d'évaluer le degré d'action des composés testés sur la croissance des bactéries.

Technique :

Le milieu de culture, l'ensemencement et l'incubation sont les mêmes que pour l'antibiogramme.

Partie expérimentale

Méthode des disques :

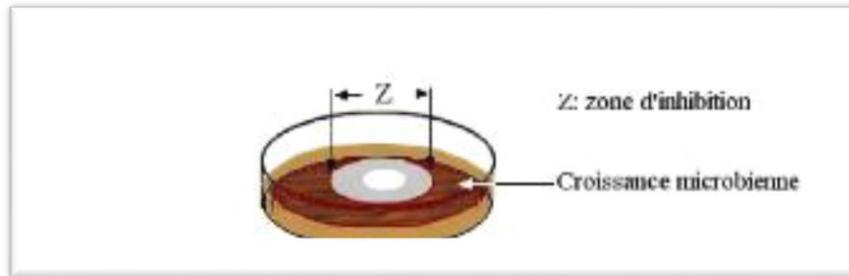


Figure 10 : Principe de la méthode de diffusion par disque (Zaika, 1988).

Les disques sont préparés à partir d'un papier filtre appelé papier Whatman, en utilisant un emporte-pièce de 5.5 mm de diamètre. Ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 15 minutes.

Les disques sont ensuite imprégnés de miel testé à la CMI trouvée (Merah *et al.*, 2010) et un disque sera déposé sur le milieuensemencé par la souche à tester (Boufaghes et Mherigue, 2011).

Après l'incubation, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à celui de la gélose stérile.

Méthode des puits :

La méthode de diffusion par puits a été utilisée telle que décrite par Berghe et Vlietinck (1991).

Un puits, de 6 mm de diamètre et de 4 mm de hauteur, est réalisé sur le milieuensemencé par la souche à tester.

Une quantité de miel testé à la CMI trouvée est déposée dans les puits à l'aide d'une seringue graduée stérile (Feddaoui et Kerdouci, 2013).

Lecture et interprétation :

Le profil de sensibilité des souches bactériennes au miel peut être déterminé par la mesure des diamètres des zones d'inhibition entourant les disques ou les puits.

Partie expérimentale

Une souche est considérée sensible si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 10 mm et résistante si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm. Par contre la sensibilité est dite intermédiaire si le diamètre est égal à 10 mm (Merah *et al.*, 2010).

5-3-2-5- Conservation des souches :

Une fois que toutes les souches isolées sont identifiées, elles sont conservées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans des tubes contenant du glycérol qui est un cryoprotecteur.

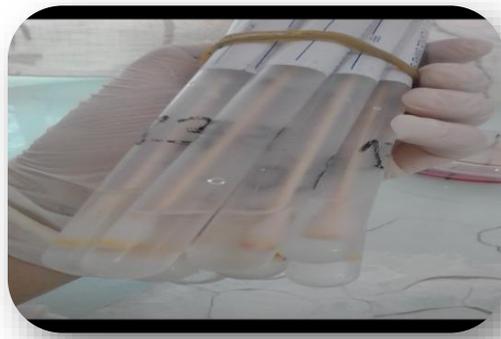


Figure 11 : Conservation des souches bactériennes isolées au glycérol (photo personnelle, 2020).

5-4- Résultats :

5-4-1- Nature et nombre d'échantillons :

Compte tenu de l'état sanitaire pandémique et du confinement appliqué par l'Etat, le déroulement de l'étude a été contrarié, du coup on a pu travailler uniquement sur 8 échantillons : 7 échantillons d'urine et 1 échantillon de pus.

5-4-2- Isolement des colonies de staphylocoques :

5-4-2-1- Aspect macroscopique :

Les colonies présumées d'être *S. aureus*, et isolées sur le milieu Chapman, présentaient généralement les caractères culturels suivants : petites colonies de couleur jaune (doré), rondes, bombées, lisses, à contour régulier, avec un virage de couleur du milieu vers le jaune.

Partie expérimentale

5-4-2-2- Aspect microscopique :

L'examen microscopique après coloration de Gram a révélé les caractères morphologiques suivants : cocci en diplocoques, en très courtes chaînettes et surtout regroupés en amas sous forme de grappe de raisin, ils sont de couleur violette, c.à.d. bactéries à Gram (+).

5-4-3- Identification biochimique :

Les tests qu'on a pu réaliser sur les souches bactériennes isolées étaient les tests de catalase et de coagulase. Toutes les souches isolées étaient à coagulase (-).

Les résultats de ces 2 tests sont présentés dans le tableau suivant (tableau 11) :

Tableau 11 : Résultats des tests de catalase et de coagulase.

		Souches bactériennes							
		S1	S2	S7	S8	S10	S11	S12	S14
Test	Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
	Coagulase	-	-	-	-	-	-	-	-



Figure 12 : Test de catalase pour la souche S1 (photo personnelle, 2020).

Partie expérimentale



Figure 13 : Test de coagulase de *S. aureus* ATCC 25923 (photo personnelle, 2020).

5-4-4-Antibiogramme :

On a réalisé le test d'antibiogramme seulement pour les souches S10, S11 et S14.

Les résultats de l'antibiogramme sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Sensibilité des souches S10, S11 et S14 aux antibiotiques testés.

		Souches bactériennes		
		S10	S11	S14
Antibiotique testé	Pénicilline	R	R	S
	Oxacilline	S	S	S
	Ofloxacine	S	S	S
	Vancomycine	S	S	S
	Gentamicine	S	S	S
	Erythromycine	R	S	S
	Doxicycline	S	S	S
	Clindamycine	S	S	S
	Fosfomycine	S	S	S
	Amikacine	S	S	S
	Triméthopriime/sulfaméthoxazole	R	S	S

Partie expérimentale

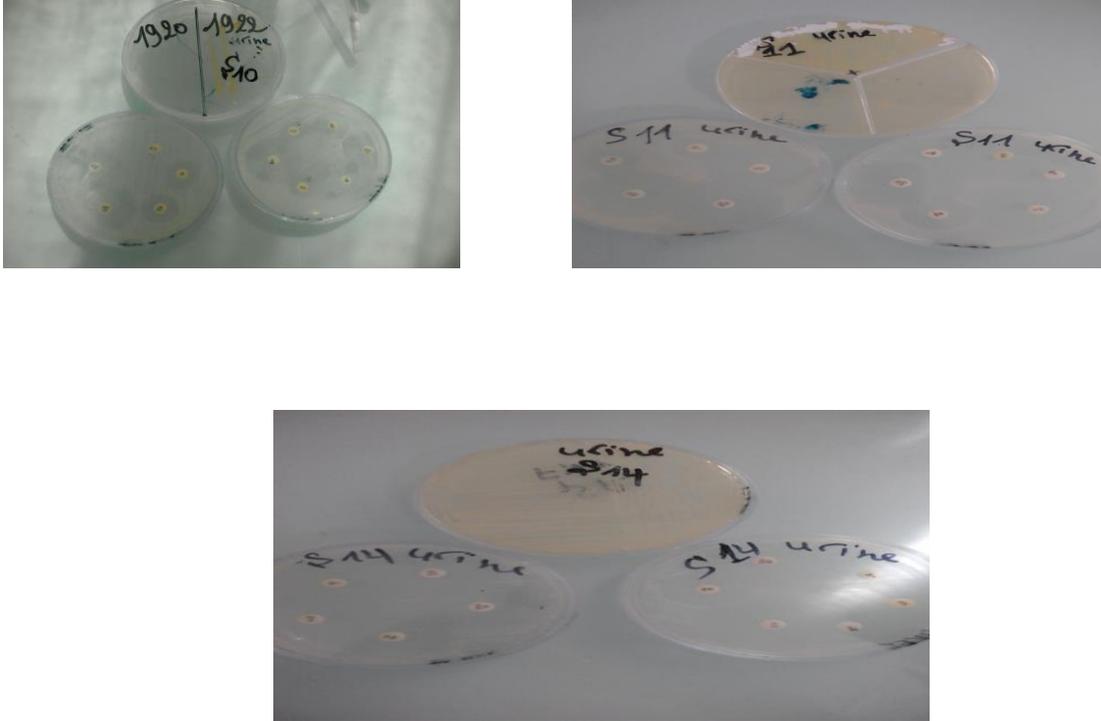


Figure 14 : Résultats de l'antibiogramme des 3 souches testées (photos personnelles, 2020).

Conclusion

Conclusion

Staphylococcus aureus est un agent pathogène majeur de l'homme et de l'animal et constitue un réel problème de santé publique. Des éléments génétiques mobiles sont responsables de l'apparition de souches hyper-virulentes sécrétrices de toxines (TSST-1, LPV, ...) impliquées dans des infections potentiellement létales, parfois couplées à une multirésistance aux antibiotiques n'offrant que peu d'alternatives thérapeutiques (Chaalal, 2019).

On distingue l'espèce *Staphylococcus aureus* à coagulase positive appelée également staphylocoque doré (élaboration d'un pigment caroténoïde donnant une couleur dorée à la colonie), qui est le germe le plus fréquemment rencontré dans toutes les infections des sites opératoires (Birgand, 2014).

Comme toutes les bactéries Gram positif, *Staphylococcus aureus* présente une résistance naturelle à l'aztréonam, colistine et à l'acide nalidixique. Sa particularité est d'avoir une résistance naturelle à la ceftazidime uniquement parmi les céphalosporines. La résistance à la méticilline est un problème majeur de santé publique. Ces staphylocoques ont acquis le gène mec qui permet la synthèse d'une enzyme (PBP2a ou PBP2') n'ayant qu'une affinité très faible pour les β -lactamines, qui ne peuvent plus exercer leur action inhibitrice. La plupart de ces staphylocoques sont également résistants aux quinolones et aux macrolides. Les staphylocoques communautaires sont habituellement sensibles à la méticilline. Les SARM sont principalement observés en milieu hospitalier. Les souches hospitalières sont caractérisées par leur résistance aux antibiotiques notamment aux bêta-lactamines (Ahamogbe, 2014).

La recherche sur les bactéries multirésistance telles les SARM chez les différentes espèces animales est nécessaire à une meilleure compréhension du phénomène de l'antibiorésistance. L'espèce *S. aureus* domine souvent le profil épidémiologique pour les infections communautaires, alors que les staphylocoques à coagulase négative ont été retrouvés prédominants chez les patients hospitalisés. La multirésistance des staphylocoques est devenue remarquablement répandue dans les prélèvements humains, d'où la nécessité de la mise en œuvre d'une stratégie active et efficace garantissant une sécurité microbiologique afin d'éviter la propagation de cette résistance (Hadj Mohamed, 2014).

D'après Kerkvliet, l'effet antimicrobien du miel peut particulièrement être expliqué par son contenu important en glucose oxydase, enzyme qui active la transformation du glucose en

Conclusion

acide gluconique et en H₂O₂. Le miel est doté d'un large spectre d'activité inhibitrice sur les souches bactériennes à Gram (+) et à Gram (-) (Kerkvliet, 1996).

Les résultats de l'évaluation du potentiel bactérien indiquent, selon Murat et ses collaborateurs, que le miel a une activité antibactérienne élevée (Murat *et al.*, 2004).

Il est possible d'utiliser le miel comme un antibactérien naturel pour traiter les maladies provoquées par des germes pathogènes (Benbarka et Hafsaoui, 2019).

La valeur médicinale du miel comme antibiotique naturel est de plus en plus scientifiquement démontrée, ce qui constitue l'importance de son utilisation en médecine et dans le secteur de l'industrie pharmaceutique et cosmétique (Benbarka et Hafsaoui, 2019).

Adcock D. (1962). The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys, J. Apicult. Res., Vol. 1, p38-40.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, Rapport du groupe de travail « Antibiorésistance », Maisons-Alfort, p214.

Ahamogbe K. A. L. (2014). Résistance bactérienne en cas d'infection de plaies diabétiques, diagnostic et surveillance au laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako, Thèse de doctorat en pharmacie, Université des sciences des techniques et des technologies de Bamako, p74.

Allen K. L., Molan P. C. et Reid G. M. (1991). A survey of antibacterial activity of some New Zealand honeys, J. Pharm. Pharmacol., Vol. 43, p817-822.

Amirat A. (2014). Contribution à l'analyse physico-chimique et pollinique du miel de *Thymus algeriensis* de la région de Tlemcen, Thèse de master, Université Abou-Bekr Belkaid, Tlemcen, p45.

Amrouche L. (2010). Etude de la qualité physico-chimique de quelques miels, Mémoire pour l'obtention du diplôme de master d'ingénieur, U.S.T.H.B., Alger, p49.

Annie K. (2013). The therapeutic effects of honey, The Plymouth student scientist, Vol. 6, n° 1, p376-385.

Anonyme 1. Les propriétés médicinales du miel, www.ndarinfo.com, Consulté le 6 mars 2020.

Anonyme 2. Miel et fleur, l'arôme du miel, www.miel-et-une-fleur.e-monsite.com, Consulté le 6 mars 2020.

Apfelbaum M., Romon M. et Dubus M. (2004). Diététique et nutrition, 6^{ème} édition, Elsevier-Masson, Paris, p345.

Argudin M. A., Mendoza M. C. et Rodicio M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins, Toxins, n° 2, p1751-1773.

Avril J. L., Dabernat H., Denis F. et Monteil H. (2000). Les cocci à Gram positif, In Bactériologie clinique, Ellipses, Paris.

- Avril J. L., Dabernat H. et Denis F. (2003). Bactériologie clinique, Ellipses, Paris, p602.
- Badet C. et Quero F. (2011). The in vitro effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria, *Anaerobe*, Vol. 17, p19-22.
- Balaban N. et Rasooly A. (2000). Staphylococcal enterotoxins, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 61, p1-10.
- Benbarka O. et Hafsaoui I. (2019). Etude de l'activité antimicrobienne du miel récolté du territoire algérien, Thèse de doctorat, Université Saad Dahlab, Blida.
- Bessas A. (2008). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le Sud Algérien. Mémoire d'obtention de diplôme d'ingénieur d'état en biologie, Université Djilali Liabes, Sidi Bel Abbès, Algérie.
- Biljana M. S., Dinic M., Orlovic J. et Babic T. (2015). *Staphylococcus aureus*: immunopathogenesis and human immunity, *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, Vol. 32, p243-257.
- Biri M. (1999). Le grand livre des abeilles, l'apiculture moderne, Edition Vecchi S. A., Paris, p260.
- Birgand G. (2014). Infection du site opératoire, approche originale du diagnostic et de la prévention, Thèse de doctorat en épidémiologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris, p10.
- Blanc M. (2010). Propriétés et usage médical des produits de la ruche, Thèse pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Limoges, France.
- Bodén M. K. et Flock J. I. (1989). Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*, *Infect. Immun.*, n° 57, p2358-2363.
- Bogdanov S. (1984). Characterisation of antibacterial substances in honey, *Lebensm-Wiss, U. Technol.*, Vol. 17, p74-76.
- Bogdanov S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey, *Lebensm-Wiss, U. Technol.*, Vol. 30, p748-753.

Bogdanov S., Bieri K., Gremaud G., Iff D., Kanzig A., Seiler K., Stockli H. et Zurcher K. (2003). Produits Apicoles, 23A Miel, Revus par le groupe d'experts « Produits apicoles », p1-37.

Bogdanov S. et Blumer P. (2001). Propriétés antibiotiques naturelles du miel. Centre Suisse de recherche apicole, Station fédérale de recherche laitière, Liebfeld CH-3003, Berne.

Bogdanov S., Lullmann C. et Martin P. (2001). Qualité du miel et norme internationale relative au miel, Rapport de la commission internationale du miel, Abeille Cie, Vol. 4, n° 71, p12.

Bogdanov S. et Pascale B. (2001). Propriétés antibiotiques naturelles du miel, RSA, 98 (3), p107-114.

Boisset S. et Vandenesch F. (2010). Les facteurs de virulence autres que les entérotoxines, *In Staphylococcus aureus*, Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.

Bouaziz S. et Ramdane A. (2006). Contrôle de l'état général d'hygiène au niveau de service des urgences de l'hôpital de Mohamed Boudiaf, p22.

Boufaghes B. et Mherigue M. (2011). Effet antimicrobien des extraits phénoliques du miel, Université kasdi Merbah, Ouargla.

Boukraa L. (2010). Honey in traditional and modern medicine, 1^{ère} édition, CRC Press, p26-32.

Boulahbal F. (2002). Microbiologie S1 clinique, Numéro d'édition 2487, OPU (Office des Publications Universitaires), Alger.

Brown D. F. J., Edwards D. I., Hawkey P. M., Morrison D., Ridgway G. L., Towner K. J. et Wren M. W. D. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol. 56, p1000-1018.

Brudzynski K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys, *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 12, n° 52, p1228-1237.

Brun Y. et Bes M. (2000). *In Précis de bactériologie clinique*, Freney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C., Ed. ESKA, Paris, p783-830.

Brun Y., Bes M. et Vandenesch F. (2003). *Actualités permanentes en bactériologie clinique*, p55.

Cari (2011). *Les paramètres physico-chimiques du miel, l'apiculture Wallonne et Bruxelloise*, En ligne www.cari.be/article/les-parametres-physico-chimiques.

Chaalal W. (2019). *Caractérisation moléculaire des souches de S. aureus isolées à partir des denrées alimentaires*, Thèse de doctorat, Université Ahmad Ben Bella, Oran.

Chouia A. (2014). *Analyses polliniques et caractérisations des composés phénoliques du miel naturel de la région d'Aïn Zaâtout*, Université Mohamed Khider, Biskra.

Clarke S. R. et Foster S. J. (2006). *Surface adhesins of Staphylococcus aureus*, *Adv. Microb. Physiol.*, n° 51, p187-224.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (2017). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard*, NCCLS document M38-A, NCCLS, Wayne, Pa.

Codex Alimentarius (2001). *Codex standard for honey*, 12-1981, Revue 1 (1987), p1-10.

Codex Alimentarius Commission (2001). *Revised Codex Standard for honey*, 12-1981, Rev. 2, *In Standards and standard methods*.

Courvalin P. et Leclercq R. (2012). *Antibiogramme*, 3^{ème} édition, ESKA, Paris.

Cushnie T. et Lamb A. (2005). *Antimicrobial activity of flavonoids*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, Vol. 26, p343-346.

Dailly H. (2008). *Cristallisation du miel*, Abeille 8 Cie, Vol. 3, n° 124, p24-28.

Daurel C. et Leclercq R. (2008). *L'antibiogramme de Staphylococcus aureus*, Elsevier Masson SAS, n° 407.

De Buyser M. L. et Sutra L. (2005). *Staphylococcus aureus*, *In Bactériologie alimentaire*, *Compendium d'hygiène des aliments*, 2^{ème} édition, Economica, Paris.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire, Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.

Delphine I. (2010). Le miel et ses propriétés thérapeutiques, Thèse de doctorat, Université de Bordeaux.

Dinges M. M., Orwin P. M. et Schliefer T. P. M. (2000). Les facteurs de virulence autres que les entérotoxines, In *Staphylococcus aureus*, Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.

Dold H. (1937). Nachweis antibakterieller, hitz-und lichtempfindlicher Hemmungsstoffe (inhibine) im Naturhonig (Blutenhonig), Zeitschrift fur Hygiene Und Infektionskrankheiten, Vol. 120, p155-167.

Donadiou Y. (1982). Pollen, thérapeutique naturelle, 5^{ème} édition, Maloine S. A., Paris, p31.

El Sohaimy S. A., Masry Sh. D. et Shehata M. G. (2015). Physicochemical characteristics of honey from different origins, Annal of Agricultural Sciences, Vol. 60, n° 2, p279-287.

Emmanuelle H., Guinot L. et Coustel J. (1996). Les constituants chimiques du miel, Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires 1, Avenue des Olympiades, 91744 Massy Cedex-France, Méthode d'analyses chimiques, Département Sciences de l'Aliment, En ligne www.beekeeping.com/articles/fr/chimie_miel.htm.

Falugi F., Kim H. K., Missiakas D. M. et Schneewind O. (2013). Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*, M. Bio, 4 (5), e00575-13. Doi:10.1128.

Faye K. (2005). Le point sur l'usage vétérinaire des antibiotiques : impact sur l'antibiorésistance des bactéries en santé animale et humaine, Vol. 7, n° 1, Masson, Paris, p45-52.

Feddaoui C. et Kerdouci S. (2013). Effet antibactérien du miel, Université 8 Mai 1945, Guelma.

Fernandez L. G. et Turner M. C. (2017). The chronicles of incision management, clinical insights, perspectives and treatment approaches, Duke University medical center and University of Texas medical center, Vol. 1.

Ferrerres F., Garcaviaguera C., Tomaslorente F., Tomasbarberan F. et Hesperetin C. (1993). A marker of the floral origin of citrus honey, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 61, p121-123.

Fessler A., Scott C., Kadlec K., Ehricht R. et Monicke S. (2010). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n° 65, p619-625.

Foster T. J., Geoghegan J. A., Ganesh V. K. et Hook M. (2013). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 12 (1), Doi: 10.1038/nr micro 3161, p49-62.

François L. (2017). La texture du miel, *Journal Aliments Naturels et Biologiques*, En ligne www.essentielle-coop.qc.ca.

François D., Marie C., Christian M., Edouard B. et Roland Q. (2007). *Bactériologie médicale*, 2^{ème} édition, Dessins de Carole Fumat, Masson, Paris.

Garrity G. M., Lilburn T. G., Cole J. R., Harrison S. H., Euzéb Y. J. et Tindall B. J. (2007). Taxonomic outline of bacteria and archaea release, *The bacteria*, Phylum *Firmicutes*, Class *Bacilli*, Vol. 7, n° 7, p9.

Genestier A. L., Michallet M. C., Prevost G., Bellot G., Chalabreysse C., Peyrol S., Thivolet F., Etienne J., Lina G., Vallette F. M., Vandenesch F et Genestier L. (2005). Les facteurs de virulence autres que les entérotoxines, *In Staphylococcus aureus*, Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.

Ghuysen J. M. (1994). Molecular structures of penicillin-bending proteins and beta-lactamases, *Trends Microbiol.*, Vol. 2, p372-380.

Goldstein F. W. (2012). Sulfamides et trimethoprim, *In AntibioGramme*, 3^{ème} édition, ESKA, Paris.

Gonnet M. (1982). Le miel, composition, propriétés et conservation, INRA, Station expérimentale d'apiculture, p1-18.

Guerriat H. (2000). Etre performant en apiculture, Édition Rucher du Tilleul, p415.

Gurezou M. N. et Nadji N. (2002). Etude comparative entre quelques miels locaux et autres importés, Mémoire d'obtention d'ingénieur d'état en agronomie, Université Zyan Achour, Djelfa, p25-26.

Hadj M. R. (2014). Identification et antibiorésistance des staphylocoques isolés de plusieurs prélèvements, Thèse de master, Université Saad Dahlab, Blida.

Hannekine J. A., Ostyn A., Guillier F., Herbin S., Pruffer A. L. et Dragacci S. (2010). How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized?, *Toxins Review*, Vol. 2, p2106-2116.

Ibrahim-khalil M., Moniruzzaman M., Boukraa L., Benhanifia M., Asiful-Islam M. D., Nazmul-Islam M. D., Siti-Amrah S. et Hna-Gan S. (2012). Physico-chemical and antioxidant properties of Algerian honey, *Molécules*, Vol. 17, n° 9, p11199-11215.

INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), Résistance à l'antibiotique, <http://www.inserm.fr/thermatique/microbiologie-et-maladies-infectieuses/dossiers-d-information/résistance-aux-antibiotiques>, Consulté le 10 Avril 2020.

Jarraud S., Peyrat M. A., Lim A., Tristan A., Bes M., Mougel C., Etienne J., Vandenesch F., Bonneville M. et Lina G. (2001). Egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Immunology*, Vol. 166, p669-677.

Jessica Y. Y. (2015). Etude de l'effet de quatre composés contenant du miel sur deux bactéries cariogènes : *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus rhamnosus*, Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire, Université de Bordeaux.

Katayama Y. et Hiramatsu K. (2000). A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents chemother.*, Vol. 44, p1549-1555.

Kerkvliet J., Ortiz A., Ivanov T. D., Arcy B., Mossel B. et Vit P. (1996). Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission, *Bee World*, Vol. 80, n° 2, p61-69.

Khenfer A. et Fettal M. (2001). Le miel, Ministère de l'agriculture, Direction de la formation de la recherche et de la vulgarisation, p23.

Kloos W. E. et Schleifer K. H. (1984). Bactériologie médicale, *Staphylococcus* et *Micrococcus*, 2^{ème} édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, p773-794.

Kloos W. E., Schleifer K. H. et Götz F. (1992). The genus *Staphylococcus*, In Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W. et Schleifer K.-H., The Prokaryotes Springer-Verlag, New York, 1369-1420.

Ko Y. P., Kuipers A., Freitag C. M., Jongerius I., Medina E. et Van Rooijen W. J. (2013). Phagocytosis escape by a *Staphylococcus aureus* protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface, Skaar EP Editor Plos Pathog., n° 9, e1003816. Doi: 10.1371.

Koehler S. (2015). Le miel dans la cicatrisation des plaies : un nouveau médicament, Thèse d'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université Lorraine.

Koreen L., Ramaswamy S. V., Graviss E. A., Naidich S., Musser J. M. et Kreiswirth B. N. (2004). Spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implication for use of a single marker to detect genetic micro- and Macrovariation, J. Clin. Microbiol., 42 (22), Doi:10.1128/JCM, p792-799.

Korta L. P. et Mobashery S. (1998). β -lactam antibiotic, β -lactamases and bacterial resistance, Bull. Inst. Pasteur, Elsevier Paris, Vol. 96, p139-150.

Kwakman P. H. S., Tevelde A. A., De Boer L., Speijer D., Vanden-brouckegrauls C. M. J. E., Sebastian A. J. et Zaat S. A. (2010). How honey kills bacteria, FASEB J., Vol. 24, p2576-2582.

Kwakman, P. H. S. et Zaat S. A. (2012). Antibacterial components of honey, IUBMB Life, Vol. 64, n° 1, p48-55.

Leclerq. (2002). Résistance des staphylocoques aux antibiotiques, Ann, Fr. Anesth. Réanim., Vol. 21, p375-383.

Le Loir Y. et Gautier M. (2010). Monographie de la microbiologie : *Staphylococcus aureus*, Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.

Le Minor L. et Veron M. (1982). Bactériologie médicale, 1^{ère} édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Lequet L. (2010). Du nectar à un miel de qualité : contrôle analytique du miel et conseils pratiques à l'intention de l'apiculteur amateur, Thèse d'obtention de garde de docteur vétérinaire, Université Claude-Bernard, Lyon I.

Letertre C., Perelle S., Dilasser F. et Fach P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*, Journal of Applied Microbiology, Vol. 95, p38-43.

Lewis K. (2013). Platforms for antibiotic discovery, Nat. Rev. Drug Discov., Vol. 12, p371-387.

Leyral G. et Vierling E. (2001). Microbiologie et toxicologie des aliments, 3^{ème} édition, Paris.

Leyral G. et vierling E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments, hygiène et sécurité alimentaire, 4^{ème} édition, Paris.

Leyral G. et Joffin J. N. (2003). Microbiologie : documentation technique, CRDP d'Aquitaine, Bordeaux, p299.

Libonatti C., Soledad V. et Basualdo M. (2014). Antimicrobial activity of honey, a review of honey around the world, Microbiology and Antimicrobials, Vol. 6, n° 3, p51-56.

Lim D. et Strynadka N. (2002). Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Nature Structural and Molecular Biology, Vol. 9, n° 11, p870-876.

Lobreau Callen D., Marmion V. et Clément M. C. (2000). Les miels, In Techniques de l'ingénieur, p1-20.

Long J. P., Hart J., Albers W. et Karpal F. A. (2010). Les facteurs de virulence autres que les entérotoxines, In *Staphylococcus aureus*, Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.

Louveaux J. (1968). L'analyse pollinique des miels, In Traité biologique de l'abeille, 3^{ème} édition, Masson de Cie, Paris, p324-361.

Madigan M. et Martinko J. (2007). Biologie des micro-organismes, 11^{ème} édition, BROCK, Paris.

Magalon G. et Vanwijck R. (2003). Guide des plaies, du pansement à la chirurgie, John Libbey Eurotext, Paris, p104.

Mainardi J. L. (2015). Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques/Session interactive autour de l'antibiogramme, Unité mobile de microbiologie clinique, Service de microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou et Faculté de médecine, Paris.

Majtan J. (2011). Methylglyoxal, a potential risk factor of manuka honey in healing of diabetic ulcers, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, p1-5.

Makheloufi Ch. (2010). Melissopalynologie et étude des éléments bioactifs des miels Algériens, Thèse d'obtention du diplôme de doctorat en sciences agronomiques, Université d'Alger.

Mazrou K. (2008). L'effet de la température sur l'évolution de l'HMF dans les miels Algériens, Mémoire d'obtention de diplôme d'études supérieures en biologie, Université Ibn Khaldoune, Tiaret, Algérie.

Mbogning E., Tchoumboue J., Damesse F., Sanou-Sobze M. et Canini A. (2011). Caractéristiques physico-chimiques des miels de la zone Soudano-guinéenne de l'ouest de l'Adamaoua Cameroun, Tropicultura, Vol. 29, n° 3, p168-175.

McCallum N., Berger-Bachi B. et Senn M. (2010). Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, International Journal of Medical Microbiology, Vol. 300, n° 1, p118-129.

Merah M., Bensaci-Bachagha M. et Boudershem A. (2010). Etude de l'effet antimicrobien de trois échantillons de miel naturel récoltés du territoire Algérien, Annales des Sciences et Technologie, Vol. 2, n° 2, p115-125.

Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J., Solano C. et Calvo E. (2009). Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., n° 191, Doi:10.1128/JB.01222-08, p832-843.

Mokeddem T. (1998). Contribution à l'analyse physico-chimique et pollinique du miel d'oranger dans la région de Mitidja, Thèse d'ingénieur en agronomie, Université des sciences et de la technologie de Blida.

Molan P. C. (1992). The antibacterial activity of honey, the nature of the antibacterial activity, Bee world, Vol. 73, p59-76.

Nair S. (2014). Identification des plantes mellifères et analyses physico-chimiques des miels Algériens, Thèse de doctorat, Université d'Oran.

Nauciel C. et Vilde J. L. (2005). Bactériologie médicale, 2^{ème} édition, Masson, Paris.

OIE (Office International des Epizooties) (2008). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th edition, Paris, France.

Omoe K., Hu D. L., Takahashi-Omoe H., Nakane A. et Shinagawa K. (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids, Infection and Immunity, Vol. 71, p6088-6094.

Omoe K., Imanishi K., Hu D. L., Kato H., Fugane Y., Abe Y., Hamaoka S., Watanabe Y., Nakane A., Uchiyama T. et Shinagawa K. (2005). Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P, Infection and Immunity, Vol. 73, p5540-5546.

Ono H. K., Omoe K., Imanishi K., Iwakabe Y., Hu D. L., Kato H., Saito N., Nakane A., Uchiyama T. et Shinagawa K. (2008). Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T, Infection and Immunity, Vol. 76, p4999-5005.

Orwin P. M., Leung D. Y., Donahue H. L., Novick R. P. et Schlievert P. M. (2001). Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K, Infection and Immunity, Vol. 69, p360-366.

Orwin P. M., Leung D. Y. M., Tripp T. J., Bohach G. A., Earhart C. A., Ohlendorf D. H. et Schlievert P. M. (2002). Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V, subfamily of pyrogenic toxins, Biochemistry, n° 41, p14033-14040.

Parker C. M., Kutsogiannis J., Muscedere J., Cook D., Dodek P., Day A. G. et Heyland D. K. (2008). Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or

Pseudomonas aeruginosa: prevalence, incidence, risk factors, and outcomes, Journal of Clinical Care, Vol. 23, n° 1, p18-26.

Patti J. M., Bremell T., Krajewska-Pietrasik D., Abdelnour A., Tarkowski A. et Rydén C. (1994). The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis, Infection and Immunity, n° 62, p152-161.

Paulus H. S., Kwakman P. H. S., Sebastian A. J. et Zaat S. A. (2011). Antibacterial components of honey, IUBMB Life, Vol. 64, n° 1, p48-55.

Pesavento G., Ducci B., Comodo N. et Lo Nostro A. (2007). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *staphylococcus aureus* (MRSA), J. Food Control, n° 18, p196-200.

Philippe J. M. (1991). La pollinisation des abeilles, Edition Edisud la Calade, Aix-en-Provence.

Pilly E. (2008). Maladies infectieuses et tropicales, Alinéa Plus – CMIT, Paris.

Podbielska A., Galkowska H. et Olszewski W. 2011. Staphylococcal and enterococcal virulence, Central-European Journal of Immunology, 36(1), p56-64.

Quincampoix J. C. et Mainardi J. L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif, Réanimation, n° 10, p267-275.

Ramirez M. S. et Tolmasky M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes, Drug Resistance Updates, n° 13, p151-171.

Rehm S. J. et Tice A. (2010). *Staphylococcus aureus*: methicillin-susceptible *S. aureus* to methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*, Clinical Infectious Diseases, 51, Suppl. 2, p176-82.

Rice L. B. (2006). Antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria, The American Journal of Medicine, n° 119, p11-19.

Robert D. (2013). *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises et implication en pathologie communautaire illustrée

par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive, Thèse de doctorat, Université d'Angers, France, p115.

Ronald S. (2011). Advanced in food nutrition research, Speciality Wines and Academic Press, Vol. 63, ISBN : 978-0-12-384927-4, ISSN : 1043- 4526, p104-105.

Schleifer K. H. (1984). *In* Bergey's manual of systematic bacteriology, Holt J. G., Sneath P. H. A., Mair N. S. et Sharpe H. E., Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, p999-1005.

Schweitzer P. (2000). La couleur des miels, Syndicat National d'Apiculture, En ligne <http://www.apiservices.biz>.

Slaninova J. (2016). Pertinence de l'ECBU aux urgences adultes du CHU de Nantes, Thèse de doctorat en médecine, Université de Nantes, France, p40.

Speer B. S., Shoemaker N. B. et Salyers A. A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 5, n° 5, p387-399.

Srednik M. E., Usongo V., Lepine S., Janvier X., Archambault M. et Gentilini E. R. (2018). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis bovine milk in Argentina, *Journal of Dairy Research*, n° 85, p57-63.

Tankovic J., Aubry-damon H. et Leclercq R. (1997). Resistance aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*, *Méd. Mal. Infect.*, n° 27, p207.

Thomas D. Y., Jarraud S., Lemercier B., Cozon G., Echasserieau K., Etienne J., Gougeon M. L., Lina G. et Vandenesch F. (2006). Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster, *Infection and Immunity*, n° 74, p4724-4734.

Vaudaux P. E., François P., Proctor R. A., McDevitt D., Foster T. J. et Albrecht R. M. (1995). Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins, *In* promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunt, *Infect. Immune*, n° 63, p585-590.

Velghe C. (2016). Miel, valeurs nutritionnelles et bienfaits, Santé-MGC Prévention, En ligne www.mgc-prevention.fr, Nutrition, Aliments et Santé.

Vieu G. (2014). Diversité génétique des isolats de *S. aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse, Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Toulouse III, Paul Sabatier, France.

Watson K., Carville K., Bowman J., Jacoby P., Riley T. V., Leach A. J. et Lehmann D. (2006). Upper respiratory tract bacterial carriage in aboriginal and non-aboriginal children in a semi-arid area of Western Australia, *Podiatry Infectious Diseases Journal*, n° 25, p782-790.

Wattam A. R., Abraham D., Dalay O., Diaz T. I. et Gabbard J. I. (2014). PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center), the bacterial bioinformatics database and analysis resource, *Nucleic Acids Res.*, n° 42, Doi:10.1093/nar/gkt1099, p581-591.

White J. W. (1979). Composition of honey, *In Crane E., Honey: A Comprehensive Survey*, Heinemann, London, p157-206.

Williams D. T., Hilton J. R. et Harding K. (2004). Diagnosing foot infection in diabetes, *Clinical Infection Diseases*, Vol. 39, p83-86.

Xia J. *et al.*, (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance and virulence, *Bioscience Trends*, Vol. 7, n° 3.

Yves L. et Michel G. (2009). *Staphylococcus aureus*, Lavoisier, Paris, p1-61.

Zaika L. (1988). Spices and herbs, their antimicrobial activity and its determination, *Journal of Food Safety*, Vol. 9, n° 2, p97-118.