

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**



**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**

**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** par

**UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET**

**INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**



**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire**

**THEME :**

**TRAITEMENT ALTERNATIF PAR LEMIEL ET LA CASEINE DE LA SOUCHE  
RESISTANTE**

**(PSEUDOMONAS AERUGINOSA DELA CHAUVE SOURIS)**

**Présenté par:  
Dey Saliha**

**Bachiri Imane**

**Encadre par :  
Mme Bourabahakila**

**Année universitaire : 2016 – 2017**

# *Remerciements*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.*

*En second lieu, nous voudrions présenter nos remerciements à notre encadreur « Mme bourabehakila ».*

*Nous voudrions également lui témoigner notre gratitude pour sa patience durant toute la période du travail et son soutien qui nous a été précieux afin de mener notre travail à bon port.*

*Merci*

*Nos remerciements s'étendent également à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.*

*Nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*On n'oublie bien évidemment pas nos camarades de formation et les remercie chaleureusement pour tous ces agréables moments passés ensemble.*

# *Dédicace*

*Je dédie mon travail à toute ma famille , surtout à mon père (رحمة الله) et ma mère n'oublie pas leur efforts pour obtenir ce niveau .*

*Je dédie aussi mes sœurs ( Halima ,Naima,Cherifa,Aziza,Reguaia,fatima ,Nour El Houda,Manou)*

*Et mes frères (Mohamad ,Houcine)*

*Et JadouKhadherAbdeElkader*

*Et je dit merci pour mes amies qui aide moi dans ces études :Aissa, Asnounelotfi .*

*Et ma meilleur famille d'université :Hafida, Daouida, Wahiba, Sara, Ferial , Ilham, Hanaa, Wassila , Fatiha, Sanaa .*

*Et tout personne encourage moi, je te dit merci*

# *Dédicace*

*Je dédie mon travail à toute ma famille, surtout à ma chère mère mon père et l'oncle mostapha n'oublie pas leur efforts pour obtenir ce niveau .*

*Je dédie aussi ma grande mère mbarka :mes sœurs rekaya fatna djamila fatima masouda et hayat*

*Et mes frères*

*Abas mostapha mailoud hawari zeane mohamed ahmed abdelilah abdeldjalil adam*

*Je dédie aussi à ma mère masouda qui toujours aide moi*

*Et je dis merci pour mes amies qui aident moi dans ces études :*

*Et ma meilleure famille d'université.*

*Et tout personne encourage moi je te dis merci*

## Sommaire

Remerciements .....

Dédicace .....

Liste des figures

### Chapitre01:études bibliographie de la bactérie

1. Historique .....	- 2 -
2. Définition .....	- 2 -
3. Habitat et pouvoir pathogène .....	- 3 -
3.1. Habitat .....	- 3 -
3.2. Pouvoir pathogène.....	- 3 -
3.2.1. Pouvoir pathogène chez l'homme .....	- 3 -
3.2.2. Pouvoir pathogène pour les animaux .....	- 4 -
3.2.3. Pouvoir pathogène pour les végétaux.....	- 4 -
Differentesclassrs des pseudomnacea : .....	- 5 -
Caractères généraux .....	- 5 -
1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	- 6 -
A. Habitat. Rôle pathogène .....	- 6 -
B. Morphologie .....	- 6 -
C. Caractère culturaux.....	- 6 -
D. Caractères biochimiques.....	- 7 -
I. Identification .....	- 8 -
2. PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI .....	- 9 -
A. Habitat. Rôle pathogène .....	- 9 -
B. Morphologie .....	- 9 -
C. Caractères culturaux .....	- 9 -
L'aspect des cultures est assez peu évocateur : .....	- 9 -
D. Caractères biochimique .....	- 9 -
E. Constitution antigénique.....	- 10 -
F. Pouvoir pathogène expérimental.....	- 10 -
G. Identification de P.pseudomallei .....	- 10 -
H. Diagnostic indirect .....	- 10 -
3. PSEUDOMONAS MALLEI.....	- 10 -
A. Habitat. Rôle pathogène .....	- 10 -
B. Morphologie .....	- 10 -

C. Caractères culturaux .....	- 11 -
D. Caractères biochimiques.....	- 11 -
E. Caractères antigéniques .....	- 11 -
F. Pouvoir pathogène expérimental.....	- 11 -
G. Diagnostic de la morve.....	- 12 -
H. Identification différentielle.....	- 12 -

## **Chpitre02:La Résistance de la Bactérie**

1. Résistance naturelle :.....	- 14 -
2. Résistance acquise :.....	- 14 -
A. Mécanisme enzymatique.....	- 14 -
B. Mécanisme non enzymatique .....	- 14 -
Résistance aux aminosides .....	- 15 -
Résistance aux fluoroquinolones.....	- 15 -

## **Chapitre03:Traitements alternatifs**

Histoire du miel médicinal .....	- 17 -
Effet du stockage et de chauffage .....	- 20 -
Activités bactéricide et bactériostatique.....	- 21 -
Mécanisme de l'activité antibactérienne.....	- 21 -
Peroxyde d'hydrogène.....	- 22 -
Osmolarité.....	- 22 -
Composés phyto-chimiques .....	- 23 -
Autres .....	- 23 -
Activité antifongique.....	- 24 -
Action antiparasitaire .....	- 25 -
L'antibiogramme :.....	- 25 -
-1- Définition de l'antibiogramme .....	- 25 -
-2- Définition de la notion de spectre.....	- 26 -
-3-Techniques classiques de l'antibiogramme .....	- 27 -
-3-1-1 Méthodes de dilution.....	- 27 -
- 3-2Technique en milieu liquide couramment utilisée : .....	- 27 -
-3-3-Méthodes de diffusion ( antibiogramme standard) : .....	- 28 -
-3-4-Expression des résultats .....	- 28 -
-3-5-Autres techniques : .....	- 29 -
-4-Conclusion .....	- 29 -

CASÉINES.....	- 30 -
La partie expérimentale.....	-32-
Matériels et méthode.....	-33-
Lieu d'étude.....	- 33 -
Prélèvement.....	- 33 -
Isolement et purification.....	- 33 -
Identification : .....	- 33 -
Conservation des souches.....	- 33 -
Etude de la sensibilité aux Antibiotiques .....	- 33 -
Matériels.....	- 34 -
Méthode.....	- 36 -
Résultats et discussion.....	- 38 -
Les résultats et la discussion .....	- 38 -
Conclusion.....	41
Les références.....	42

## Liste des figures

<b>Figure A:</b> Schémas des diamètres critiques.....	26
<b>Figure B :</b> Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide.....	27
<b>Figure C :</b> Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé .....	28
<b>Figure D :</b> leEtest.....	29
<b>Figure E:</b> matériels de travail .....	34
<b>FigureF :</b> l'agitateur « Vortex » .....	35
<b>Figure G :</b> spectrophotomètre.....	35
<b>Figure H :</b> Etuve .....	35
<b>Figure I :</b> les disques des antibiotiques .....	36
<b>Figure 01</b> .....	38
<b>Figure 02</b> .....	39
<b>Figure 03</b> .....	39
<b>Figure 04</b> .....	40



# Chapitre 01

## 1. Historique

En raison de leur présence généralisée dans l'eau et des graines de plantes telles que les dicotylédones, les *Pseudomonas* ont été observés au début de l'histoire de microbiologie.

Le nom générique *Pseudomonas* créé pour ces organismes a été défini en terme assez vague, en 1894 par Migula, comme un genre de bactéries à Gram-négatives, en forme de tige et possédants des flagelles polaires. Peu de temps après, les *Pseudomonas* ont été isolées de nombreuses niches naturelles et un grand nombre de noms d'espèces a été initialement attribuée au genre. Selon la deuxième édition du « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1986 ». L'historique des *Pseudomonas* peut être comme suit.

Au 18<sup>ème</sup> siècle : Monas = formes droites par Müller.

En 1894 : Découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894).

En 1917 : Famille des Pseudomonadaceae (flagelles polaires).

De 1920 - 1950 : Description de nombreux nouveaux *Pseudomonas*.

En 1960 : Classification des *Pseudomonas* sur la base de critères phénotypiques par Stanier et al., 1960).

De 1970-1980 : Eclatement du genre en 5 groupes génomiques sur la base de tests d'hybridation ADN-ADN (Palleroni, 1970) puis ARNr-ADN (de Vos, 1980) et des séquences de l'ARN 16S, l'ARN 23S, gyrB...

Depuis : Création de nouveaux genres et attente de nouvelles subdivisions (Innoel et al., 1987)..

## 2. Définition

Les *Pseudomonas* appartiennent aux Gamma- Protéobactéries. Ce groupe englobe la majorité des espèces de bactéries phytopathogènes. Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des Pseudomonaceae, il comprend une soixantaine d'espèces. Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *Pseudomonas fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différentes biovars.

*Pseudomonas aeruginosa*, communément appelé bacille pyocyanique, est l'est l'espèce type du genre *Pseudomonas* (Richard et Kiredjian, 1995). *P.aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, aérobic strict, à métabolisme oxydatif, non sporulé, en forme de bâtonnet de 0,5 à 0,8µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur, mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique, capable de se développant sur les milieux usuels à une température de croissance comprise entre 30°C à 37°C (Floret et al., 2009). Cependant les souches d'origine humaine peuvent se développer à des températures allant jusqu'à 41°C (Yétérián, 2010). Un milieu sélectif, contenant du cétrimide, peut être utilisé afin d'isoler *Pseudomonas aeruginosa*

à partir de prélèvement polymicrobiens. Les aspects des colonies sont de trois types : colonie la (large) sont grandes, rugueuses avec un centre plus bombé et un bord irrégulier, colonie sm (small) sont rondes, petites, convexes et lisses et colonie M (muqueuses) sont bombées, opaques, visqueuses, filantes ou parfois coulantes (Gellen-Dutremmer, 2007). C'est une bactérie ubiquiste, saprophyte de l'eau, des matières en décomposition et des végétaux. Ses exigences nutritionnelles modestes lui permettent de survivre et de se multiplier dans un environnement humide (éviers, siphons, certaines solutions antiseptiques) (Lahlou Amin et al., 2008). Bien qu'il ne fasse pas partie physiologiquement de la flore microbienne commensale de l'homme, il peut coloniser le tube digestif, l'oropharynx et les zones cutanées humides (Richet, 2003). *P. aeruginosa* est doté d'un véritable arsenal de facteurs de virulence qui sont, soit directement associés à sa cellule (flagelle, pili, LPS, alginate), soit excrétés dans le milieu extracellulaire (exotoxines, exoprotéases, hémolysines et chromophores) (Richard, 2005). Cette espèce est caractérisée par une aptitude particulière à acquérir et à accumuler de nombreux mécanismes de résistance. Cette accumulation de mécanismes de résistance est devenue problématique car elle conduit à une impasse thérapeutique en raison de l'émergence de souches dites totorésistantes vis-à-vis du panel d'antibiotiques actuellement disponibles (Minchella et al., 2010).

### **3. Habitat et pouvoir pathogène**

#### **3.1. Habitat**

La plupart des *Pseudomonas* sont très ubiquistes et elles sont isolées de l'eau (eaux douces, eaux saumâtres, eaux de mer), du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Les souches ubiquistes ont généralement une très large versatilité nutritionnelle et elles peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses (Emmanuelle & El Amari, 2004 ; Botelho & Leda, 2006). En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (éviers, siphons, vases, linge et objets de toilette, récipients contenant de l'eau...etc). De nombreuses souches sont psychrotrophes et elles peuvent altérer des denrées alimentaires, des réactifs biologiques, des solutés injectables, le sang ou les dérivés sanguins conservés au froid (Ellis et al., 2000).

#### **3.2. Pouvoir pathogène**

##### **3.2.1. Pouvoir pathogène chez l'homme**

Plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* sont des bactéries pathogènes ce qui explique aussi qu'une partie des données sur *P. Syringae* soient publiées par des revues

médicales (Wimalajeewa&Flett, 1985). Les *Pseudomonas* sp. Se comportent comme des agents opportunistes chez l'homme, comme chez les animaux, l'espèce la plus importante est *P. aeruginosa* ou bacille pyocyanique découvert par Gessard en (1882). Chez des individus immunodépressifs elle peut être la cause de diverses infections cutanées et viscérales voire même de septicémie. Elle comporte un risque particulièrement élevé d'infections nosocomiales (contractées par l'intermédiaire de soins en milieu hospitalier). Elle se retrouve en flore de transit sur la peau et les muqueuses et causes des surinfections de plaies ou brûlures comme indiquée dans la figure 1. Les autres espèces sont peu agressives par eux-mêmes mais se comportent en générale comme germes opportunistes profitant de conditions anormales d'implantation chez les individus débilisés, créant des flores de substitution ou des infections grave par introduction accidentelle dans l'organisme (Cathétèses, sondage,...) (Emmanuelle & El Amari, 2004).

### 3.2.2. Pouvoir pathogène pour les animaux

Outre *P. aeruginosa*, d'autres espèces du genre *Pseudomonas*, notamment, *P. fluorescens*, est isolée en médecine vétérinaire de divers prélèvements effectués chez de nombreux mammifères. Un pouvoir pathogène particulier de quelques espèces du genre *Pseudomonas* a été mis en évidence chez les oiseaux et les poissons.

Chez les oiseaux : *P. fluorescens* est responsable de la mort des embryons de nombreux oiseaux suite au trempage des œufs dans des solutions d'antiseptiques contaminés par des *P. fluorescens*. Cette espèce a également été incriminée dans les troubles respiratoires des dindes et des poulets (Bergsma et al., 2005).

Chez les poissons : Des infections à *P. fluorescens* ont été décrites chez diverses espèces de poissons : carpe argenté (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpe chinoise ou à grosse tête (*Aristichthys nobilis*), cyprin ou caraassin doré (*Carassius auratus*), tanche (*Tinca tinca*), carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*), et les carpes noire (*Mylopharyngodon piceus*). Les poissons malades présentent des hémorragies cutanées et des ulcérations des nageoires et de la queue. *P. chlororaphis* biovar *Chlororaphis* a été isolé en culture pure de saumons amago (*Oncorhynchus masou*) élevés au Japon. Les animaux malades présentent une distension de l'abdomen et des hémorragies superficielles (Hamdan et al., 1991 & Mavrodi et al., 2005).

### 3.2.3. Pouvoir pathogène pour les végétaux

Spécifiquement *P. syringae*. Cette espèce compte au moins 37 pathovars capables d'infecter de multiples espèces de végétaux. Face à l'arbre, le *P. syringae* semble opportuniste, infectant des plantes déjà affaiblies. Quatre cents souches de *P. syringae* ont été analysées

avant la fin 2006, sur la base de caractères phénotypiques et sur des bases génétiques. *P. syringae* a été retrouvé presque partout, avec une large diversité interspécifique, dont Ongle infecté génétique dans ceux des vergers de poirier, cerisier doux, cerisier acide et prunier qui ont été étudiés dans les régions belges de Gembloux et de Gorseme (Bossis et al., 2000 & Iacobellis, 2001), ses effets ont aussi été étudiés chez une plante modèle de laboratoire : *Arabidopsis*. (Janse, 1991 & Sekkour, 2008).

#### **Autres maladies causées par les *Pseudomonas sp*:**

La bactériose du Soja causée par *Pseudomonas syringae*pv. *glycinea*(anonyme, 2006). La bactériose à halo du haricot causé par *Pseudomonas syringae*pv. *phaseolicola*(anonyme, 2006). Le feu bactérien du tabac causée par *Pseudomonas syringae*pv. *Tabaci*(anonyme, 2006).

#### **Différentes classes des pseudomonaceae :**

##### **PSEUDOMONADACEAE**

Cette famille est composée de deux genres :

- Genre *Pseudomonas*.
- Genre *Xanthomonas*

##### **GENRE PSEUDOMONAS**

#### **Caractères généraux**

Le genre *Pseudomonas* comprend des bacilles habituellement fins, rectilignes ou plus rarement incurvés :

- Mobiles grâce à une ciliature polaire.
- Gram négatif.
- Cultivant bien sur milieux ordinaires.
- Aérobie strictes.
- Réduisant les nitrates.
- Possédant un métabolisme glucidique de type oxydatif ou dénués d'action sur les sucres.
- Oxydase+ (si l'on excepte *P. maltophilia*)
- Arginine-dihydrolase+ pour un grand nombre d'espèces (recherchée en milieu de Møller commercialisé).
- NH<sub>3</sub>+ (produit en bouillon).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont essentiellement saprophytes ou commensales. Certaines espèces peuvent acquérir un pouvoir pathogène, généralement

favorisé par terrain débilite (tel *Ps.aeruginosa*). D'autres sont constamment pathogènes (tel *Ps.mallei*). La première catégorie joue un grand rôle en médecine humaine ; la seconde en médecine vétérinaire.

Bien que des problèmes d'identification différentielle ne se posent qu'exceptionnellement entre les deux groupes.

Le pouvoir pathogène spontané des différentes espèces rencontrées en médecine humaine est comparable à celui de *P.aeruginosa* ; les infections qu'elles déterminent sont seulement plus rares (C.pilet et al. ; 1979)

## 1. *Pseudomonas aeruginosa*

### A. Habitat. Role pathogene

*Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une bactérie saprophyte de l'air, de l'eau et du sol. Commensale des téguments et des muqueuses de l'Homme et des Animaux. Elle possède un pouvoir pathogène étendu ; le bacille pyocyanique est essentiellement une **bactérie pyogène** qui provoque chez l'Homme et chez l'Animal des suppuration diverses, particulièrement fréquentes en milieu hospitalier. Ces infections se développent généralement sur des terrains débilites. Des septicémies, primitives ou secondaires, ne sont pas rares.

### B. Morphologie

*P.aeruginosa* se présente se présente comme un fin bacille ( $0,5 \times 3 \mu$ ) asporulé et acapsulé ; son extrême mobilité est due à une ciliature polaire en général monotriche. Gram négatif, il possède souvent des granulations plus fortement colorées.

### C. Caractère culturaux

C'est une bactérie très peu exigeante, se multipliant sur des milieux synthétiques simples avec comme source d'azote et de carbone de l'ammoniaque et du glucose.

Elle pousse facilement en 2 heures à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  et peut se développer à des températures variables ( $5$  à  $42^{\circ}\text{C}$ , l'optimum étant  $30^{\circ}\text{C}$ ) mais supporte de moindres variations de PH ( $6,5$  à  $7,5$ , l'optimum étant  $7,2$ ).

Aérobies strictes, les bactéries de l'espèce *P.aeruginosa* peuvent utiliser pour respiration les nitrates comme accepteurs d'hydrogène; en conséquence dans les milieux anaérobies contenant des nitrates, elles cultivent dans toute la hauteur du tube.

Le bouillon est troublé avec développement d'un voile en surface, parfois limité à un simple anneau adhérent aux parois du tube. La culture, très alcaline, répand une odeur aromatique. Après quelques jours, un sédiment visqueux s'accumule en profondeur.

Sur gélose apparaissent des colonies de quelques millimètres de diamètre, plates ou surélevées, opaques, à surface assez dépolie, limitées par un bord régulier ou finement dentelé, prenant en vieillissant des **reflets métalliques**. On peut aussi observer des formes **R** ou des formes **M**. Les dissociations sont fréquentes.

En 2 à 4 jours, on assiste souvent à un bleuissement ou verdissement des milieux de culture dû aux pigments diffusibles élaborés par la bactérie.

☞ *Remarque* : Il existe maintenant un milieu sélectif à la cétrimide, spécifique de *P. aeruginosa* ; *exceptionnellement P.maltophilia, P.putida et P.stutzeri peuvent y cultiver.*

## D. Caractères biochimiques

### 1) Etude générale du métabolisme :

- la réduction des nitrates allant souvent jusqu'au stade azote gazeux,
- la présence d'une oxydase,
- le métabolisme oxydatif des sucres, appréciable en milieu MEVAGou de Hugh et Leifson (milieux très pauvres en peptones, recouverts ou non de vaseline); retenir essentiellement l'action sur le glucose et sur le D-arabinose,
- le pouvoir protéolytique : liquéfaction de la gélatine en entonnoir, puis en coupe renversée,
- la présence d'une lécithinase, qui souvent ne peut être révélée qu'en **milieu liquide** : sur milieux gélosés les «réactions restreintes» (*cf. Techniques bactériologiques de la présente collection*) sont fréquentes.

### 2) Mise en évidence des pigments :

Ils peuvent être apparents sur milieux ordinaires ou mieux sur sérum de bœuf coagulé. On doit parfois avoir recours à des milieux spéciaux, type milieux de King A et B.

On distingue :

**a. La pyocyanine (dérivé de la phénazine)**, responsable de la teinte bleue intense des milieux de culture : sa production est favorisée sur milieu de King A.

Elle est soluble dans l'eau et le chloroforme (l' extraction s'effectue facilement sur milieux ordinaires solides ou liquides).

Si l'on ajoute un acide fort, la teinte de la pyocyanine vire au rouge. Oxydée, elle devient jaune (ce qui se produit parfois spontanément après exposition prolongée à la lumière). Réduit, elle se transforme en un leuco-dérivé incolore.

**b. La pyoverdine**, présentant une teinte vert fluorescent est souvent masquée par la pyocyanine. Sa production est maximale sur milieu de King B.

Elle est soluble dans l'eau mais **non dans le chloroforme**.

Oxydée (et c'est le cas dans les cultures âgées) la pyoverdine devient rouge.

☞ *Remarque* : *P.aeruginosa* possède en général les deux sortes de pigments. Certaines souches n'en ont qu'un ou en sont dépourvues. La pigmentation ne constitue donc pas un critère formel de l'identification du bacille pyocyanique : il n'en reste pas moins vrai que l'observation d'un pigment bleu-vert soluble dans le chloroforme suffit presque - lorsqu'elle est possible - à caractériser *P.aeruginosa*.

**c. Le pigment érythroène(rouge)** } sont beaucoup plus rares et moins significatifs.

**d. Le pigment mélanogène(noir)**

**e. Structure antigénique et chimique**

Il existe des antigènes O et H, qui permettent de distinguer différents types. Les antigènes O sont glucido-lipido-protéiques. On connaît 16 types antigéniquement différents (les sérums agglutinants sont actuellement commercialisés).

*P.aeruginosa* peut posséder un antigène de surface (souches muqueuses), qui joue un rôle dans la virulence.

**f. Lysotypie**

Elle est employée pour classer les différentes variétés de *P.aeruginosa* (laboratoires spécialisés).

**g. Pouvoir pathogène expérimental**

En général il n'est pas recherché; on peut injecter de fortes doses par voie intraveineuse au lapin ou au cobaye : si ces animaux ne meurent pas rapidement, ils présentent des abcès viscéraux. (c.pilet et al. ; 1979)

**h. Propriétés antibiotiques**

*P.aeruginosa* élabore diverses substances bactériostatiques dont certaines sont identifiables à la pyocyanine. Diverses bactéries sont sensibles à ces substances : **Neisseriaceae**, certaines **Enterobacteriaceae**, certaines **coques et bacilles Gram+** (*B.anthraxis*)

☞ *Remarque* : Inversement *P.aeruginosa* est résistant à la plupart des antibiotiques connus ; il n'est guère sensible qu'à la carbénicilline, la gentamycine, la colistine et la rifampicine. (c.pilet et al. ; 1979)

**I. Identification**

- L'identification du genre ne présente aucune difficulté.
- Les problèmes posés par la distinction entre les diverses espèces sont résolus grâce aux caractères exposés dans le tableau.



– La détermination du sérotype et du lysotype est nécessaire en cas d'enquête épidémiologique.

## 2. *Pseudomonas pseudomallei*

### A. Habitat. Rôle pathogène

*P.pseudomallei*, le bacille de Whitmore, est l'agent de la **mélioïdose**, maladie atteignant l'Homme et les Animaux, surtout dans les pays tropicaux, caractérisée par des suppurations localisées, aiguës ou torpides avec parfois des formes septicémiques.

### B. Morphologie

On observe des bacilles très mobiles, à ciliature polaire, rectilignes ou légèrement incurvés, de 3 à 6 µ de longueur, Gram négatif, non sporulés et capsulés.

### C. Caractères cultureux

*P.pseudomallei* se multiplie facilement sur les milieux ordinaires entre 20°C et 42°C. Aérobie strict, il est cependant capable de cultiver sur toute la hauteur d'une gélose profonde, en présence de nitrates. Il est inhibé par les sels biliaries, l'azide de sodium et les fortes concentrations de NaCl.

### L'aspect des cultures est assez peu évocateur :

– En bouillon nutritif : trouble uniforme s'accompagnant d'un voile épais adhérent à la paroi du tube ;

– Sur gélose : grand polymorphisme (évolution S à R, involution muqueuse).

Les cultures dégagent une forte odeur de truffe.

### D. Caractères biochimique

– Oxydase +, catalase +.

– Nitrates + jusqu'au stade azote.

– Métabolisme oxydatif des glucides (glucose + lactose +).

– RM – VP - .

– Citrate de Simmons + .

– Protéolyse de la gélatine et du sérum coagulé.

– Indole -, H<sub>2</sub>S -, LDC -.

– Lait acidifié et peptonisé .

– Lécithinase + et lipase +.

– ADH +.

### E. Constitution antigénique

*P.pseudomallei* possède un antigène O qui correspond à la paroi, un antigène K capsulaire, un antigène M particulier aux souches muqueuses et un antigène H flagellaire.

### F. Pouvoir pathogène expérimental

*P.pseudomallei* est pathogène pour un grand nombre d'animaux de laboratoire, par toutes les voies et à doses faibles.

L'animal de choix est le **hamster** : il meurt habituellement quelques jours après l'inoculation. A l'autopsie on constate des suppurations viscérales, en particulier pulmonaires.

### G. Identification de *P.pseudomallei*

La diagnose différentielle est à établir surtout avec des souches non pigmentées de *P.aeruginosa*

Avec *Pseudomonas mallei* la différenciation est aisée car cette bactérie est immobile, non protéolytique et donne une culture pauvre sur milieux usuels.

*Aeromonas* et *Vibrio* sont facilement éliminés grâce à leur métabolisme fermentatif, ainsi que les Entérobactéries (qui sont de plus oxydase -).

Toute identification doit être contrôlée par agglutination sur lame avec le sérum anti-W 1+2 ; une technique d'immunofluorescence indirecte peut également être utilisée.

### H. Diagnostic indirect

(Réservé aux laboratoires spécialisés.) L'agglutination est la plus employée, mais très sensible elle peut donner des résultats faussement positifs (c.pilet et al. ; 1979)

## 3. *Pseudomonas mallei*

Cette espèce autrefois classée dans le genre *Malleomyces*, est actuellement considérée comme un variant immobile de *Pseudomonas pseudomallei*.

### A. Habitat. Rôle pathogène

*P. mallei* est l'agent de la **morve**, maladie naturelle des solipèdes, caractérisée essentiellement par des abcès cutanés avec atteinte des vaisseaux et ganglions lymphatiques, des manifestations pulmonaires et une atteinte souvent très importante de l'état général.

### B. Morphologie

*P.mallei* se présente sous forme de bacilles immobiles dépourvus de spore, grêles dans les produits pathologique, plus courts et trapus dans les cultures jeunes, avec des formes filamenteuses dans les cultures âgées. Au sortir de l'organisme, il existe une capsule qui disparaît rapidement après repiquage.

Gram négatif, les bacilles morveux fixent irrégulièrement la couleur et sont toujours d'aspect granuleux après coloration par la thionine ou le bleu de toluidine.

**C. Caractères culturels**

*P. mallei* est une bactérie aérobie stricte qui se multiplie mal sur les milieux ordinaires à 37°C (limites thermiques 26 – 42°C).

- Sur gélose ordinaire les colonies n'apparaissent qu'en 48 heures : elles sont rondes, bombées, blanchâtres assez muqueuses. La culture est meilleure sur milieux glycinés et sur milieu à l'œuf (milieu de Dorset-Lu-beneau)
- Sur pomme de terre glycinée la culture devient abondante en 2 à 4 jours et se pigmente en chamois ou brun chocolat.
- En bouillon nutritif glyciné, en 48 heures, on observe un trouble dans la moitié supérieure du tube avec un voile mince non envahissant, puis un dépôt agglutiné et muqueux.

**D. Caractères biochimiques**

- Oxydase + : ce caractère est parfois difficile à observer, mais toujours positif si on le recherche sur le culot de centrifugation d'une culture de 48 heures.
- Catalase + faible.
- Nitrates + .
- Métabolisme oxydatif des glucides, étudié sur milieu de type MEVAG : l'acidification des milieux ne se manifeste souvent qu'après plus de 24 heures.
- RM + VP + Citrate de Simmons +.
- Pouvoir protéolytique faible.
- LDC – et ADH + .
- Lécithinase+ , Lipase + .

**E. Caractères antigéniques**

Notons l'existence d'antigènes communs à *P.mallei* et *P.pseudomallei*, ainsi que des antigènes communs avec *Actinobacillus*.

**F. Pouvoir pathogène expérimental**

- 1) L'âne est l'animal le plus sensible à l'infection morveuse ; après inoculation sur la peau de front scarifiée, la maladie évolue rapidement comme une morve aiguë et les lésions sont identiques à celles de la maladie naturelle.
- 2) Le cobaye est très sensible ; l'inoculation intrapéritonéale à un cobaye mâle engendre une vaginalite suppurée qui apparaît en 3 à 4 jours (singe de Strauss). On peut retrouver des abcès viscéraux.
- 3) La souris est également sensible.

**G. Diagnostic de la morve**

Ce diagnostic repose sur l'isolement et à l'identification de *P.mallei* .

L'injection intradermique de malléine (substance extraite de cultures de *P.mallei*) qui révèle un état d'hypersensibilité, est employée chez le cheval.

**H. Identification différentielle**

Elle s'effectue par rapport à :

- *Acinetobacterglucidolytica* : morphologie différente, oxydase - ; nitrate-réductase - ; non pathogène expérimentalement.
- *Pseudomonas aeruginosa* : pigmenté, mobile, protéolytique, culture à 42°C.
- *P.pseudomallei* : mobile, protéolytique, culture à 42°C.
- *Actinobacillus* : immobile, métabolisme fermentatif(c.pilet et al . ; 1979)

# Chapitre 02

Résistance aux  $\beta$ -lactamines

### 1. Résistance naturelle :

Les souches de *P. aeruginosa* produisent d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique inductible de classe C induit une résistance à l'amoxicilline, à l'acide clavulanique et aux céphalosporines de première et deuxième génération (C1G, C2G) céfalotine et céfoxitine notamment. Les souches sauvages restent sensibles aux carboxypénicillines, comme la ticarcilline et la carbénicilline, aux uréidopénicillines, comme la pipéracilline, à certaines céphalosporines (cefsulodine, céfoperazone et ceftazidime), aux monobactames, comme l'aztréonam, et aux carbapénèmes, comme l'imipénème (Poirel et Nordmann., 2006). Le système d'efflux actif MexAB-OPrM confère à la bactérie une résistance naturelle de bas niveau à différentes  $\beta$ -lactamines (à l'exception de l'imipénème) (Poole, 2004).

### 2. Résistance acquise :

#### A. Mécanisme enzymatique

La résistance acquise aux carbapénèmes (imipénème), initialement rapportée comme liée à un déficit de la porine OprD2, peut être maintenant en relation avec la synthèse de  $\beta$ -lactamase de type carbapénémase (classe B) (Philippon et Arlet., 2006). Ces carbapénémases acquises constituent quatre groupes (IMP, VIM, SPM, GIM) (Walsh et al., 2005). Les  $\beta$ -lactamases à large spectre (BLSE) sont responsables de la résistance à la plupart des  $\beta$ -lactamines chez *P. aeruginosa*, sauf pour carbapénèmes dont l'hydrolyse est assurée par les métallob $\beta$ -lactamases (Weldhagen et al., 2003). Concernant les céphalosporines de classe C, des mutations dans le système de régulation de la production de cette  $\beta$ -lactamase, elles entraînent une production stable à haute niveau d'AmpC affectant l'activité de l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception de celle des carbapénèmes (Poirel, 2006).

#### B. Mécanisme non enzymatique

La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques peut aussi résulter non pas d'une hydrolyse, mais d'une augmentation de l'efflux actif (Yoneyama et al., 1997). De nombreuses pompes à efflux ont été décrites chez *P. aeruginosa*. Ces systèmes ne sont pas exprimés de la même façon, seul le MexAB-OprM est produit constitutivement (Poole, 2004). La surexpression de la pompe MexAB-OprM résulte souvent d'une mutation dans le gène du répresseur adjacent MexR (Saito et al., 1999 ; Higgins et al., 2003). En plus la surproduction de la pompe MexAB-OprM la résistance peut résulter par la perte de la porine OprD2, cette protéine canalaire de la membrane externe possède un site spécifique de la liaison pour les carbapénèmes et permet la pénétration sélective de l'imipénème. Toute perte d'OprD2 entraînera donc une résistance à cet agent anti microbien (Lahlou Amin et al., 2008).

**Résistance aux aminosides**

*P.aeruginosa* contient des enzymes de modification des aminoglycosides AAC (6'), APH (2'), APH (3') et AAC (3') (Kettner et al., 1995). Considérant que, chez *P. aeruginosa* la pompe d'efflux MexXY est décrite comme la principale manifestation de la résistance aux aminosides, la modification de la cible (ARNr 16S) a également représenté plusieurs cas de résistance aux aminosides (Hocquet et al, 2003).

**Résistance aux fluoroquinolones**

La résistance aux fluoroquinolones est essentiellement liée à des mutations dans la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase. Et aussi la surexpression des pompes d'efflux actif MexAB-OprM peut contribuer également à la résistance intrinsèque aux fluoroquinolones (Lastours, 2010).

# Chapitre 03



**MIEL :****Histoire du miel médicinal**

L'usage du miel a été évoqué dans les écrits séculaires et différentes religions voilà des milliers d'années (GREENWOOD, 1995 ; KATOUZIAN-SAFADI, 2003). Ses propriétés antimicrobiennes et cicatrisantes ont été largement étudiées durant le 20ème siècle (ANKRABADU, 1992 ; MOLAN, 1998).

L'activité antibactérienne du miel a été reconnue en premier lieu en 1892, et en 1937 le peroxyde d'hydrogène ou inhibine comme facteur antibactérien a été caractérisé (DOLD et al. 1937).

**Action antibactérienne et origine du miel**

Une étude a porté sur les effets d'un miel originaire des émirats arabes unis et un mélange de miel, d'huile d'olive et de cire d'abeilles sur la croissance d'un isolat humain de *S.aureus*.

Cette mixture a été coulé dans des puits pratiqués dans des boîtes de pétriensemencées avec *S.aureus*. Le micro-organisme a été cultivé sur un milieu fait avec la mixture à base de miel, seule et, sur un milieu composé de ce mélange et de gélose. Une zone claire d'inhibition a été observée autour des puits remplis du mélange sur le milieuensemencé avec une CMI=50%. Aucune croissance n'a été observée sur le mélange seul. Une croissance légère à modérée a été constatée sur le milieu fait d'huile d'olive et de cire. (AL-WAILI, 2005).

Une étude d'AL WAILI et al. a porté sur l'effet d'un miel originaire des EAU vis-à-vis de pathogènes croissant sur milieu contenant déjà du miel et sur milieu additionné de miel qu'après ensemencement. Différentes bactéries d'origine humaine comprenant *S.aureus*, *Streptococcus pyogenes*, et *Escherichia coli* cultivés en bouillon contenant une concentration de miel à 10%/100%(w/v).

Après inoculation d'isolats en bouillon nutritif le miel a été ajouté, ensuite la croissance optimale des isolats, la période thérapeutique, et le temps pris par le miel pour montrer l'effet optimum ont été mesurés. Le temps optimum a été de 10h pour *E.coli* et 12h pour *S.aureus*. Le miel (30%-70%) a prévenu la croissance de tous les isolats testés.

Dans une autre étude portant toujours sur un miel originaire des EAU contre certains pathogènes communs à l'homme, incluant *E.coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella* species, *Haemophilus influenzae*, *Proteus* species, *S.aureus*, *Streptococcus hemolyticus* groupe B, et *Candida albicans*. (AL-WAILI, 2004).

L'inhibition des isolats a été complète pour une concentration de miel allant de 30-100%. Les plus sensibles furent *E.coli*, *P.aeruginosa* et *H.influenzae*. L'activité antibactérienne du miel a été plus marquée en milieu acide qu'en milieu neutre ou basique.

L'effet antimycobactérien de miel Iranien a été évalué *in vitro*. Deux bacilles de culture positives et deux autres provenant de frottis positifs de patients ont été inoculé en boîtes de pétri contenant le miel à différentes concentrations. Les résultats ont montré que la croissance des mycobactéries a été inhibée par ajout de 10% de miel aux milieux. Cependant cette croissance est possible en milieux contenant ce miel à 1%, 2,5% et 5%.

La croissance isolats d'*Helicobacterpyloria* a été inhibé par un miel (20%) collecté en Arabie saoudite (ALI et al, 1991).

Une étude menée à Oman sur l'activité antibactérienne contre *S.aureus*, *E.coli*, et *P.aeruginosa* de 24 échantillons de miels (16 de différentes régions d'Oman et 8 d'Afrique) (AL-JABRI et al, 2003). Quatorze des miels d'Oman et 5 d'Afrique ont fait preuve d'activité antibactérienne.

Une autre étude testant l'activité antibactérienne contre *S.aureus* du miel d'Oman, seul, celle de la gentamycine ainsi que leur effet combiné. Le miel seul a montré une activité antibactérienne, laquelle a renforcé par 22% celle de la gentamycine lors d'association. (AL-JABRI et al, 2005).

Des miels turques de différentes origines ont été testé contre *Bacillus cereus*, *S.aureus* ATCC 25923, ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Morganella morganii*, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *E.coli* ATCC 35218, et *C.albicans*. La sensibilité de ces pathogènes différaient en fonction des miels (MERCAN et al, 2007).

La synergie (*in vitro*) d'un miel indien avec trois antibiotiques d'usages commun : gentamicin, amikacin, et ceftazidime, envers quinze souches bactériennes multi résistantes (7 *Pseudomonas* et 8 *Klebsiella*) a révélé l'existence de synergie vis-à-vis de *Pseudomonas* et non envers *Klebsiella* (KARAYIL et al, 1998).

Par diffusion en gélose l'activité antibactérienne de miel de Manuka originaire d'Australie, de miel de bruyère du royaume unis et d'un miel indien, a été testée contre 152 isolats de *P.aeruginosa*. Le miel indien s'est montré plus performants que les autres (MULLAI et MENON, 2007).

En nouvelle Zélande le miel de Manuka a été intensément étudié pour son activité antibactérienne. Des espèces de *Pseudomonas* prélevées par écouvillonnage à partir de plaies infectées ont étéensemencées sur gélose nutritive contenant du miel de Manuka et de

pâturage à différentes concentrations. Les CMI du miel de Manuka ont été de 5,5-8,7% (COOPER et MOLAN, 1999).

Dix-sept souches de *P.aeruginosa* provenant de brûlures infectées ont montré une sensibilité similaire au miel de Manuka et au miel de pâturage avec une CMI inférieure à 10% (v/v), et les deux miels ont conservé leur effet même après une dilution d'un facteur de dix (COOPER et al, 2002).

Dans une autre étude, des miels de pâturages et de Manuka ont été testés sur 58 souches de *Staphylococcus aureus* coagulase-positives isolées à partir des plaies infectées.

Les CMI ont été entre 2-3% pour le miel de Manuka et entre 3 et 4% pour le miel de pâturage.

La détermination de la CMI – par la méthode d'incorporation en gélose vis-à-vis de 18 souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA), 7 souches d'*Enterococcus* sensibles à la vancomycine et 20 autres souches résistantes à la vancomycine (VRE). A deux miels naturels ainsi qu'à un miel artificiel (COOPER et al, 2002). Pour toutes les souches testées, les CMI avec le miel de Manuka et de pâturage étaient toutes inférieures à 10% (v/v) alors que pour le miel artificiel des concentrations au minimum 3 fois plus élevées étaient nécessaires pour arriver à une inhibition similaire.

Un patient avec une infection sub-clinique par MRSA d'un ulcère des pieds a été traité par application de miel de Manuka avec administration concomitante d'hydroxure ou de cyclosporine. Les germes ont été éradiqués de l'ulcère avec cicatrisation rapide (NATARAJAN et al, 2001).

Des études in vitro effectuées en Nouvelle Zélande ont montré que le miel est actif contre *S.a Pseudomonas aeruginosa*, (WILKINSON et CAVANAGH, 2005). L'activité antibactérienne se situe entre 2% (w/v) et 58%. Ni l'âge de miel ni la manière de collecte n'étaient associées avec l'activité la plus basse (ALLEN et al, 1991).

Des espèces de bactéries communément associées aux mammites des vaches, ont été testées par des miels de Nouvelle Zélande. La croissance de toutes les espèces testées ont été complètement inhibée par application superficielle en boîte de pétri du miel à une concentration de 10% (v/v) (ALLEN et MOLAN, 1997).

Les miels sombres qui contiennent une quantité plus élevée d'antioxydant étaient généralement plus actifs que les miels clairs, de plus leur activité antimicrobienne n'a pas été éliminée par un traitement à la catalase (TAORMINA et al, 2001). Cette activité bactérienne due au peroxyde d'hydrogène a été également démontrée avec des miels canadiens (BRUDZYNSKI, 2006).

6 variétés de miels (4 variétés du nord et 2 du Sahara) ont été testées pour leurs activités contre *P.aeruginosa*. Le miel du Sahara était le plus actif. L'activité antibactérienne de 4 autres variétés du miel Algérien vis-à-vis de *P.aeruginosa* a été testée avec CMI de 12-18% (v/v) (BOUKRAA, 2008).

Une autre étude évaluant l'effet synergique de l'addition de l'amidon au miel algérien a montré que cette addition a augmenté l'activité antibactérienne. Les amylases présents dans le miel ont hydrolysés l'amidon, produisant de la dextrine du maltose augmentant ainsi l'effet osmotique et par voie de fait l'activité antibactérienne (BOUKRAA et AMARA, 2008).

D'après des études Nigérienne, le miel non pasteurisé inhibe la croissance d'un certain nombre de champignons et de bactéries à l'origine de l'infections des plaies chirurgicales et non chirurgicales sauf pour *P.aeruginosa* et *Clostridium oedematiens*. Un sirop de sucre présentant les mêmes propriétés physiques que le miel n'a inhibé aucune des bactéries et des champignons testés exceptés *S.pyogene* (inhibition modérée seulement). Cette découverte démontre que le miel est supérieur dans son activité antimicrobienne à toute solution sucrée hypertonique (EFEM et al, 1992).

Au Portugal, les composés phénoliques de miels sombres et clairs ont été testés pour leurs effets antimicrobiens (*P.aeruginosa*).

Les composés phénoliques des miels sombres ont été plus actifs que ceux des miels clairs (ESTEVINHO et al, 2008).

Diverses études sur l'activité antibactérienne du miel montrent que cette activité dépend de son origine géographique. Cependant dans la plus part des études son origine botanique n'a pas été déterminée. Il est hautement probable que l'activité antibactérienne dépend de son origine botanique car les miels mono floraux de différentes origines géographiques présentent les mêmes propriétés physico-chimiques.

### **Effet du stockage et de chauffage**

Théoriquement le plus fort effet antibactérien du miel est observé avec les miels frais et non chauffés. Cependant, le miel est souvent commercialisé après chauffage et stockage.

Donc, il est important de savoir comment change l'activité antibactérienne après stockage. L'activité antibactérienne de différents miels originaires des Emirats arabes unis à des concentrations allant de 10% à 100% (w/v) ; des miels stockés, chauffés, et stockés et exposés aux ultra-violets ont été testés contre des bactéries pathogènes incluant *P.aeruginosa*. L'activité antibactérienne du miel a été testée en milieu acide, neutre et alcalin, et comparée à des concentrations similaires de glucose en bouillon nutritif. La croissance de tous les isolats

a été complètement inhibée par le miel dans une fourchette de concentration allant de 30 à 100%. L'activité antibactérienne du miel a été plus marquée en milieu acide. Le chauffage à 80°C pendant 1 heure du miel frais et du miel stocké a entraîné une diminution de l'activité antibactérienne. Le stockage pendant 5 ans du miel frais a également entraîné une baisse dans l'activité antibactérienne, par contre l'exposition aux rayons ultra-violet a augmenté son activité à l'encontre d'un certain nombre de micro-organisme (AL-WAILI, 2004).

BOGDANOV a testé l'effet du chauffage et du stockage sur l'activité antibactérienne peroxyde et non peroxyde de miels de nectar et de miellat contre *S.aureus*. Le chauffage à 70°C pendant 15 minutes a résulté par une diminution de l'activité peroxyde initiale du miel de nectar 92% et celui de miellat par 22% alors que l'activité non peroxyde des deux miels s'était traduite par une légère baisse.

Le stockage pendant 15 mois à une température ambiante et à la lumière a entraîné une diminution de l'activité initiale par 81% concernant le miel de nectar et par 37% pour le miel de miellat ; cet effet était moins prononcé lors du stockage à l'obscurité. Le stockage n'a influencé que faiblement l'activité non peroxyde. L'auteur concluant que le miel frais non chauffé possède l'activité antibactérienne la plus forte laquelle peut être mieux conservé à l'obscurité (BOGDANOV, 1997).

#### **Activités bactéricide et bactériostatique**

Diverses études ont rapporté les effets inhibiteurs des différentes variétés du miel. Cependant, elles n'ont pas indiqué clairement si cette inhibition était due à une activité bactériostatique ou bactéricide. Le miel de Tualang de Malaisie a présenté bactéricide ainsi que bactériostatique sur *E.cloacae*, *K.pneumoniae*, *Pseudomonas spp* (NASIR et al, 2010).

#### **Mécanisme de l'activité antibactérienne**

Le miel possède plusieurs effets ; antibactérien, antioxydant, anti tumoral, anti-inflammatoire ainsi que plusieurs effets métaboliques. Malgré une pléthore de publications, son mécanisme d'action exact est encore loin d'être élucidé. Pour percer le mécanisme de son activité antibactérienne l'utilisation de différentes techniques s'avère nécessaire. BOGDANOV de par l'utilisation de la méthode de diffusion en gélose n'a pu mettre en évidence que l'activité peroxyde, par contre avec le bouillon nutritif seule l'activité non peroxyde l'a été (BAGDONOV, 1984).

La part de cette inhibition imputable aux propriétés antimicrobiennes du miel, ou à son acidité et son hyper osmolarité n'a pas encore été bien établi (ARCHER et al, 1990).

Le miel est susceptible d'inhiber la croissance bactériennes par différentes voies 79 :  
Haute concentration en sucre (activité de l'eau réduite)

PH bas

Production de peroxyde d'hydrogène

Composés protéiniques

Divers composés non encore identifiés

### **Peroxyde d'hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène est un agent oxydant libéré sous l'action d'une enzyme, le glucose oxydase, laquelle est ajoutée au nectar par l'abeille (CLIFFORD et REPINE, 1982).

Lord de la dilution du miel le peroxyde d'hydrogène est généré (MOLAN, 2001). Il a été assumé que l'activité antibactérienne du miel naturel est due au peroxyde d'hydrogène (WHITE et al, 1963).

Les teneurs maximales de peroxyde d'hydrogène produites dans le miel ont lieu dans une fourchette de concentration comprises entre 30% et 50% (v/v) (BANG et al, 2003).

Un mélange de peroxyde d'hydrogène et d'acide ascorbique a été montré à l'origine d'un mécanisme antibactérien actif contre les bactéries gram (-) négatives, aboutissant à la mort bactérienne la rendant sensible à la lyse par les lysozymes (MILLER, 1969). Il a été trouvé que le miel contient une bonne quantité d'acide ascorbique (AL-WAILI et SALEEB, 2003). Qui pourrait potentialiser l'action bactéricide du peroxyde d'hydrogène. Des études assez récentes effectuées aux Emirats Arabes Unis ont montré que le miel contient des produits finaux de l'oxyde nitrique et augmente ce dernier dans les fluides biologiques. D'une part la production de l'oxyde nitrique et de peroxyde d'hydrogène par le miel pourrait potentialiser l'effet antimicrobien, et d'autre part l'oxyde nitrique protège les cellules des mammifères contre les effets cytotoxiques de peroxyde d'hydrogène (AL-WAILI, 2004).

Une étude portant sur le traitement d'*E.coli* avec l'oxyde nitrique et le peroxyde d'hydrogène pour une durée de 30 minutes a révélé que l'exposition à l'oxyde nitrique n'aboutit qu'à une toxicité minimal, mais et est grandement potentialisée (jusqu'à 1000 fois) par le peroxyde d'hydrogène (PACELLI et al, 1995).

### **Osmolarité**

Des solutions à haute osmolarité telles que le miel, le glucose et les pâtes de sucre inhibent la croissance microbienne, car ces molécules de sucres captent les molécules d'eau nécessaires à la croissance (PACELLI et al, 1995).

Une haute osmolarité est d'un certain intérêt dans les traitements des infections car elle prévient la croissance bactérienne et favorise la cicatrisation (KNUTSON et al, 1981). Il a été affirmé que les sucres du miel sont à l'origine de son activité antibactérienne de par l'effet osmotique (TOVEY, 1981).

### Composés phyto-chimiques

Les miels sombres sont plus à même de tuer les bactéries que les miels clairs. Parce que l'activité antimicrobienne du miel sombre n'a pas été éliminée par l'adjonction de la catalase, les composés non peroxydes tels que les antioxydants pourraient contribuer dans le contrôle de la croissance de certains pathogènes d'origine alimentaire.

Certaines sources florales prodiguent une activité antibactérienne additionnelle par le biais de dérivés chimiques végétaux présents dans le nectar, en l'occurrence les flavonoïdes et les acides aromatiques (TAORMINA et al, 2001). Fondamentalement, les grandes propriétés anti-oxydantes du miel de sarrasin proviennent des composés phénoliques, qui sont présents en quantité relativement importantes (VAN DEN BERG et al, 2008). Récemment, l'activité anti-oxydante du miel et sa teneur en produits de réaction de Maillard a été montrée être en corrélation avec l'activité antibactérienne contre *E.coli*. La nouvelle découverte dans cette étude est qu'une corrélation très significative existe entre l'activité anti-oxydante et la teneur des miels non chauffés en produits de la réaction de Maillard (DEL CASTILLO et al, 2007).

Il a été proposé que la fraction acide du miel en soit le principal facteur antibactérien (KIRNPAL-KAUR et al, 2011).

Ces acides pourraient être l'acide 10-dyhydroxydecénoïque et les acides phénoliques (ISIDOROV et al, 2011).

L'activité antibactérienne des extraits phénoliques de deux miels floraux a été étudiée. Les fractions phénoliques de ces deux miels ont montré une puissante activité antibactérienne (AL JADI et YOUSSEF, 2003).

Les Polyphénols et flavonoïdes extraits du miel inhibent *in vitro* la croissance bactérienne à des degrés variables (RUSSEL et al, 1990).

### Autres

L'activité antibactérienne non peroxyde du miel de Manuka est exceptionnellement élevée, qui est due à l'action du méthylglyoxal (MAVRIC et al, 2008). Dans ce miel le méthylglyoxal provient de la conversion non enzymatique du dihydroxyacétone présente à un niveau élevé dans le nectar. Le miel de Manuka fraîchement récolté contient un niveau bas de méthylglyoxal, mais durant le stockage à 37°C, sa teneur augmente. Méthylglyoxal in Manuka (WEIGEL et al, 2004).

KWAKMAN et collaborateurs ont caractérisé dans le miel une protéine provenant de la gelée royale (defensin-1) comme étant à l'origine de l'activité antibactérienne. Ce miel accumule 5.62 – 0.54 Mm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et contient 0.25 – 0.01 Mm méthylglyoxal. Après neutralisation enzymatique de ces deux composés le miel a retenu une activité substantielle. Suite à la

neutralisation combinée de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le methylglyoxal et de la defencin-, la perte de l'activité n'était que minime dans le miel à une concentration de 20%. Après ajustement subséquent du PH de ce miel de 3,3 à 7,0 ; l'activité est devenue comparable à celle du sucre seul (KWAKMAN et al, 2010).

### Activité antifongique

Chez l'homme les infections fongiques et les mycoses cutanées sont des maladies communes, et sont les plus difficiles à traiter avec succès 148. Du miel Américain non traité a été inoculé avec des souches toxigènes d'*Aspergillus flavus* NRRL 5862 et *Aspergillus parasiticus* NRRL 299. Ces fungi ont poussé et sporulé dans des miels dilués dans l'eau sans production d'aflatoxines.

La croissance et la sporulation subséquentes n'ont été observées qu'à des dilutions égales ou supérieures à 60%. Aucune des espèces d'*aspergillus* n'a produite de toxines même à la concentration de 10%. Ces résultats confirment que le miel pur inhibe la croissance fongique et que le miel dilué semble apte à inhiber ou neutraliser la production de toxines.

Une bactérie- identifiée par la suite comme étant *B.subtilis* – isolé de ce miel a montré une activité antifongique élevée contre *Byssochlamysfulva* H25. Cette activité antifongique marquée montrée par *B.subtilisa* été déterminée comme étant due à la production de *Bacillomycin*F.

Du miel de Nouvelle Zélande a présenté un effet inhibiteur sur un certain nombre de levures et d'espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*, aswellastodermatophytes (BRADY et al, 1996). Cependant, après ajout de catalase, aucun effet inhibiteur n'a été observé. D'autres chercheurs ont trouvé que 0,1 et 0,2 ml d'une huile volatile provenant de miels hongrois avait une méthode comparative portant sur l'incorporation du miel Algérien en milieu de culture avec et sans ajout d'amidon a été faite pour évaluer l'effet de l'amidon sur l'activité antifongique du miel.

Les concentrations inhibitrices exprimées en pourcentage (v/v), pour deux variétés de miels sans amidon ont été de 42% et 46% pour *C.albicans* et de 51% et 59% pour *A.niger*. Quand l'amidon a été incubé avec le miel puis ajouté au milieu de culture, les concentrations minimales inhibitrices ont été de 28% et 38% pour une concentration d'amidon de 3,6% en ce qui concerne *C.albicans* et de 40% et 45% avec une concentration d'amidon de 5,6% et 5,1% en ce qui concerne *A.niger* (BOUKRAA et BOUCHEGRANE, 2007).

Les effets de l'huile d'olive de cire d'abeille et de miel originaire des EAU, ont été testés sur *C.albicanis*olée à partir de spécimens humains. Une zone claire d'inhibition a été observée autour de tous les puits remplis de mélange comprenant le miel ainsi de miel seul.



Récemment 37 patients avec *Pityriasis versicolor*, *Tineacruris*, *Tineacorporis*, et *Tineafaciei* ont été traité avec la mixture précédemment cite (miel, huile d'olive et cire d'abeille). Une réponse clinique a été obtenue chez 86% des patients avec *P.versicolor*, 78% des patients avec *T.cruris*, et 75% des patients avec *T.corporis*. La guérison mycologique a été obtenue chez 75%, 71% et 62% des patients avec ces 3 organismes, respectivement. Le patient avec *T.facieia* montré une guérison clinique et mycologique 3 semaines après le début du traitement (AL-WAILI, 2004).

Différents échantillons de miel de différentes sources florales collecté en Turquie ont été évalué pour leur capacité à inhiber la croissance de 40 souches de levures (*C.albican*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* et *Trichosporonspp*).

Toutes les souches ont été inhibées par le miel. Une activité antifongique minimale ou absente n'a été observée qu'avec le miel à des concentrations inférieures à 23%. Le miel de %. Les miels de rhododendron et les miels multi floraux ont généralement plus d'activité inhibitrice que les miels d'Eucalyptus et d'oranger.

Les souches de levures résistantes au fluconazole n'ont été inhibées qu'avec des miels à des concentrations supérieures à 80% (KOC et al, 2009).

### Action antiparasitaire

In vitro le miel Syrien ainsi que le sucre ont une activité envers les leishmanias, mais les résultats indiquent la supériorité du miel par rapport au sucre (ZEINA et al, 1977).

Le miel a été utilisé dans le traitement de l'ulcère de la vessie provoqué par une infection à *Schistosomia hematobium* (ABDEL-RAHIM et al, 1982).

### L'antibiogramme :

#### -1- Définition de l'antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence d'un ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut par exemple placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Petri. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

L'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques. Par définition (O.M.S.), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de

la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée. (-10-articlea : ntibiogrammeveterinairedu comite de la societefrancaise de microbiologie 2015)

Aux regards des concentrations et des diamètres critiques sont considérées comme :  
Sensibles (S), les souches pour lesquelles la CMI de l'antibiotique testé est inférieure ou égale à la concentration critique basse (c), ce qui équivaut à un diamètre supérieur ou égal au diamètre critique D;

-Résistantes (R), les souches vis-à-vis desquelles la CMI de l'antibiotique testé est supérieure à la concentration critique haute C, correspondant à un diamètre inférieur au diamètre critique d;

De sensibilité intermédiaire (I), les souches vis-à-vis desquelles la CMI de l'antibiotique testé et du diamètre correspondant sont compris entre les deux concentrations critiques et les deux diamètres critiques.

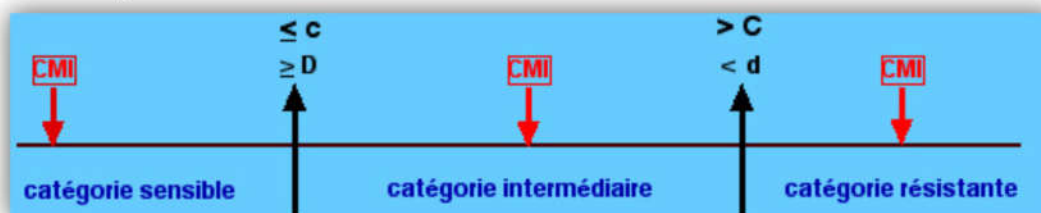


Figure A: Schémas des diamètres critiques

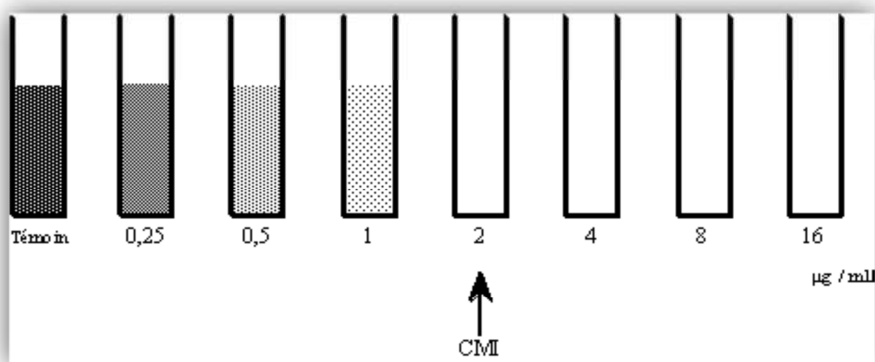
## -2- Définition de la notion de spectre

À chaque antibiotique est associée une liste d'espèces bactériennes qui constitue le "spectre d'activité" de la molécule. Le spectre naturel, établi dans les premières études avant tout emploi en thérapeutique, reste stable par définition puisqu'il ne prend pas en compte la proportion de bactéries ayant acquis une résistance à l'antibiotique après son utilisation. Cette proportion augmente au cours du temps parce que l'emploi de l'antibiotique exerce la pression de sélection nécessaire à l'émergence de mutants ou de souches porteuses de facteurs extra chromosomiques de résistance. Cette notion doit être connue du clinicien car elle explique des situations d'apparence paradoxale : par exemple, le spectre naturel de la pénicilline G comprend *Staphylococcus aureus* alors que 90% des souches sont actuellement résistantes par production de pénicillinase.

### 3-Techniques classiques de l'antibiogramme

#### 3-1-1 Méthodes de dilution

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique. En milieu liquide (figure 1), l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macro dilution) ou de cupules (méthode de micro dilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.

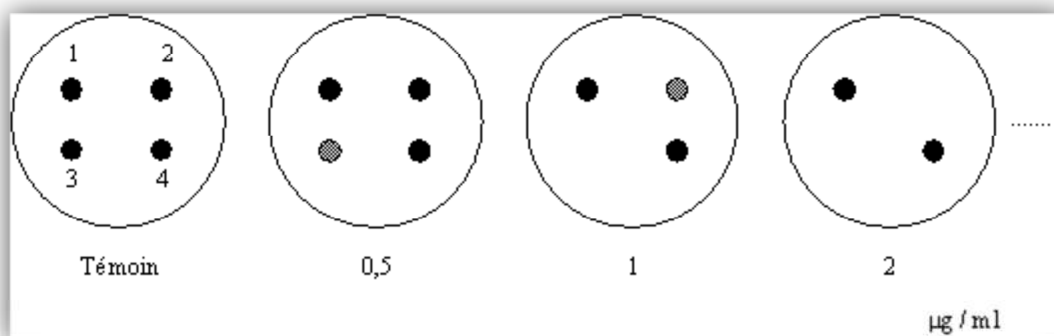


**Figure B** : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

La CMI de la souche testée est de 2 µg/mL (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'oeil nu).

#### - 3-2 Technique en milieu liquide couramment utilisée :

La détermination de la sensibilité peut se réaliser en milieu liquide en testant la sensibilité de la souche bactérienne vis-à-vis des concentrations critiques supérieures et inférieures des différents antibiotiques ou uniquement vis-à-vis des concentrations critiques inférieures. Ces méthodes simplifiées sont commercialisées, ce qui les rend accessibles aux laboratoires de diagnostic. L'inoculation des galeries et la lecture des résultats peuvent se réaliser manuellement ou à l'aide d'automates : technique en 24h (à 2 dilutions, c et C) ou en 4h (1 ou 2 dilutions possibles). En milieu solide (figure 8), l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Petri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique. La méthode de dilution en milieu gélosé, réalisée avec une gamme de concentrations en progression géométrique est la méthode de référence.



**Figure C** : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.

Une boîte de Petri permet de tester jusqu'à 30 souches différentes. Dans l'exemple présenté ci-dessus, le nombre de souches est limité à quatre.

La CMI de la souche 3 vis-à-vis de l'antibiotique incorporé à la gélose est de  $1\ \mu\text{g/mL}$ . La CMI de la souche 2 est de  $2\ \mu\text{g/mL}$ . Les déterminations des CMI des souches 1 et 4 nécessiteraient de tester des concentrations plus fortes en antibiotique. Les techniques de dilution en milieu gélosé permettent également de mesurer la concentration inhibitrice 99% (concentration qui inhibe la croissance de 99% des cellules d'une souche bactérienne) ou la concentration inhibitrice 50% (concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules d'une souche bactérienne). Les déterminations des concentrations inhibitrices 99% et 50% sont plus précises que la détermination des CMI puisque les écarts-types moyens sont respectivement de  $0,3\ \log$  base 2 et de  $0,07\ \log$  base 2 contre  $0,7\ \log$  base 2 pour la CMI. Dans la pratique courante, les méthodes de dilution sont de mise en œuvre délicate et/ou onéreuses et elles sont réservées à des laboratoires spécialisés.

### 3-3-Méthodes de diffusion (antibiogramme standard) :

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

### 3-4-Expression des résultats

En pratique, les laboratoires ne disposent pas des courbes de concordance, mais de bandelettes de lecture sur lesquelles sont reportés les diamètres correspondant aux concentrations critiques. Si le diamètre mesuré est inférieur au diamètre correspondant à la

concentration critique supérieure, la souche est résistante. Si le diamètre mesuré est supérieur au diamètre correspondant à la concentration critique inférieure, la souche est sensible. Si le diamètre mesuré est compris entre les diamètres correspondant aux deux concentrations critiques, la souche est de sensibilité intermédiaire. Les résultats quantitatifs (CMI en mg/L) sont le plus souvent interprétés par les laboratoires en terme de possibilité thérapeutique.

Cette interprétation consiste à comparer les valeurs des CMI avec les concentrations critiques établies pour chaque antibiotique. (-11-expose du 20 juin 2003 des bacteriologie) **antibiogramme** : la détermination des sensibilités aux antibiotiques –BURNICHON Nelly TEXIER Anthony )

### 3-5-Autres techniques :

Technique en milieu gélosé : le Etest La détermination précise de la CMI par la méthode de référence est difficilement utilisable en pratique quotidienne. La commercialisation d'une technique rapide et simple, le Etest (AB Biodisk) permet à un laboratoire une estimation indirecte de la CMI. Le Etest permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester.



**Figure D** : le Etest

### 4-Conclusion

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans le but d'adapter au mieux l'antibiothérapie dans un contexte infectieux. Cette étude a lieu in vitro et il convient de considérer d'autres caractéristiques des antibiotiques, pharmacocinétiques par exemple, afin de d'avoir le maximum de chances de guérison pour le malade.

Les techniques de réalisation des antibiogrammes n'ont cessé d'évoluer depuis une vingtaine d'années avec les progrès de l'automatisation. Ceci a permis de diminuer les temps d'attente dans une optique d'optimisation de la qualité des soins, mais également de

standardiser au mieux les antibiogrammes. Toutefois, les anciennes techniques n'ont pas disparu, car les techniques automatisées ne sont pas parfaites : les bactéries anaérobies et à croissance lente poussent mal dans le cadre de techniques en milieux liquides. Ceci tend à prouver qu'un laboratoire de bactériologie devrait posséder deux techniques pour réaliser les antibiogrammes : une automatique (choix d'un automate parmi ceux sur le marché) et une manuelle, afin d'obtenir une complémentarité maximale entre ces techniques.

### Caséines

Lorsqu'on examine du lait écrémé au microscope électronique, on observe la caséine sous la forme de granules sphérique (micelles) dont le diamètre moyen varie de 80 à 100 M $\mu$ . Par ultracentrifugation à 50 000 g on rassemble ces micelles en un sédiment blanchâtre gélatineux (caséine native) nettement séparé d'un liquide verdâtre et limpide (lactosérum). On peut aussi précipiter la caséine par acidification du lait à PH 4,6 , point isoélectrique de la protéine. On obtient alors la caséine isoélectrique .Enfin, en ajoutant de la présure au lait, on forme un coagulum de caséine-présure. Ces caséines «entières» obtenues par divers procédés ne sont pas identiques et se différencient notamment par la teneur en éléments minéraux.

On a cru pendant longtemps, à la suite des travaux du Suédois HAMMARSTEN, à la fin du siècle dernier, que la caséine étant une substance homogène constituée par une phosphoprotéine.

C'est pendant la période 1925-1929 que LINDERSTRØM-LANG et KODAMA parvinrent à fractionner la caséine en plusieurs fractions se distinguant notamment par leur solubilité dans le mélange éthanol-acide chlorhydrique. Peu après, vers 1930, SVEDBERG et ses collaborateurs confirmaient l'hétérogénéité de la caséine par l'emploi de l'ultracentrifugation. Depuis, de nombreux chercheurs se sont attachés à perfectionner les techniques de fractionnement d'abord en utilisant les propriétés dissolvantes sélectives de divers sels neutres puis en s'adressant, à partir de 1937, à l'électrophorèse qui permit immédiatement de séparer, sans contestation possible, trois fractions différentes appelées  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -caséine dans l'ordre de leur mobilité électrophorétique décroissante.

En 1956, il est démontré que la caséine  $\alpha$  est elle-même hétérogène. Elle comporte au moins deux composants se distinguant par leur sensibilité aux sels de calcium. A une concentration en calcium de 0.3 à 0.4 M. Soit environ dix fois la concentration notée dans le lait. Une fraction précipite. A pH 7 et à toutes températures, alors que l'autre reste en solution.

La première, dont on dit qu'elle est sensible au calcium, constitue la caséine  $\alpha_s$ , alors que la seconde, insensible au calcium, constitue la caséine  $x^1$ . (Roger VEISSEYRE. ; 1979).

Mais la finesse toujours plus grande des méthodes de séparation des protéines permet de montrer, à partir de 1958, que les fractions  $\alpha_s$  et  $x$  sont, elles aussi, hétérogènes.

L'électrophorèse et la chromatographie en présence d'urée, agent de dissociation des complexes protéiques, montrent que la fraction  $\alpha_s$  est formée d'un constituant majeur  $\alpha_{s1}$ , isolé depuis et bien caractérisé, et de plusieurs constituants mineurs moins connus et sans doute moins importants au plan technologique. Quant à la fraction  $x$  on sait depuis 1958 qu'elle est également hétérogène. Elle comprend une fraction majeure, la caséine  $x$  et une fraction mineure, peu connue, nommée caséine  $\lambda$ .

Au total, on peut considérer que la caséine entière comprend trois constituants essentiels : les caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $x$ . Un doute plane aujourd'hui sur la signification qu'il convient d'attribuer à la fraction  $\gamma$ . En effet, certains auteurs considèrent qu'elle n'est pas synthétisée par la mamelle mais qu'elle provient du sang. Ce ne serait donc pas une véritable caséine, substance spécifique de la sécrétion lactée (Roger VEISSEYRE. ; 1979).

# La partie expérimentale



**Lieu d'étude**

Ce travail s'est déroulé dans une période entre Décembre 2016 jusqu'au avril 2017. Les prélèvements ont été étudiés aux niveaux du laboratoire de microbiologie de l'Institut des Sciences Vétérinaires à l'université de Tiaret.

**Prélèvement**

Les prélèvements ont été effectués à partir de la matière fécale d'une chauve-souris ramenée d'une grotte à Tlemcen.

**Isolement et purification**

L'ensemencement des souches a été réalisé sur le milieu Mac Conkey et incubé à 37°C pendant 24 heures.

La purification des colonies bactériennes est procédée par repiquage successif sur même milieu.

L'isolement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est réalisé sur gélose nutritive additionné au cétrimide.

**Identification :**

Après l'isolement des souches par le milieu sélectif, des tests biochimiques et l'usage de la galerie Api E pour confirmer l'identification de la souche

**Conservation des souches**

Les souches ont été conservées à 4°C dans des tubes de glycérol.

**Etude de la sensibilité aux Antibiotiques****Principe :**

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classe semi-quantitatives (sensible S, intermédiaire I ou résistante R) et d'orienter l'antibiothérapie. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

**Technique**

A partir d'une culture bactérienne pure et jeune (de 24 h sur milieu gélosé), réaliser une suspension en ensemencant une colonie bien isolée dans 5 ml de bouillon BHIB et incubé 24h à 37°C, Réaliser une dilution de 1/100 dans 10 ml d'eau physiologique à 0,9%, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex ; sa densité optique doit être de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625nm équivalente à 0,5 Mac Farland; Ensemencer cette dilution par inondation sur les boîtes de pétri contenant 20 ml de gélose Müller-Hinton rejeter le surplus et laisser sécher les boîtes pendant 20 minutes à l'étuve à 37°C ; Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile. Laisser les boîtes 20 minutes à

température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incubent pendant 18-24 heures à 37°C.

### **Lecture**

La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Comparer ces résultats aux valeurs critiques, on classe les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire et Résistante.

06 antibiotiques ont été testés sur la bactérie isolée, ils sont : Colistine, Erythromycine, Ciprofloxacine, Acnalidixique, Ampicilline et Konamycine.

### **Matériels**

Milieu de culture « king A »

Le glycérol « conservateur de la bactérie »

Tube à essai

Boîte de pétrie



**Figure E:**matériels de travail

Pipette de pasteur

Bec benzène

L'eau distillée

Les écouvillons

L'agitateur « Vortex »

Spectrophotomètre



**Figure F** : L'agitateur « Vortex »



**Figure G** : spectrophotomètre



**Figure H** : Etuve

Milieu de culture « Muller Hinton »

Les disques des antibiotiques

Etuve



**Figure I** : les disques des antibiotiques

Syringu au verre

Miel

Caséine

**Méthode**

- On revivait la bactérie
- Le glycérol : augmentent la durée de vie de la bactérie + la congélation
- La dilution au l'eau distillé
- Étalement sur milieu de King A
- Incubation (37°C pendant 24h)
- On utilise les disques des antibiotiques, miel et caséine
- Lire les résultats à l'aide d'antibiogramme
- Pince stérile

# Résultats et discussion

## Résultats et discussion

### Les résultats et la discussion

Les antibiotiques testés et leurs chages sont mentionnés dans la figure suivante :

Institut des sciences vétérinaires Tiaret					
Laboratoire = Microbiologie 2		Service =			
Numéro d'identification = 011701		Date de prélèvement = 23-janv-2017			
<hr/>					
Colistine	S	14 mm	Acide nalidixique	I	18 mm
Erythromycine	R	6 mm	Ampicilline	R	6 mm
Ciprofloxacine	S	25 mm	Kanamycine	I	15 mm
<hr/>					
25-janv-2017 14:48		R = Résistant	I = Intermédiaire	S = Sensible	NS = Non-sensible
<hr/>					



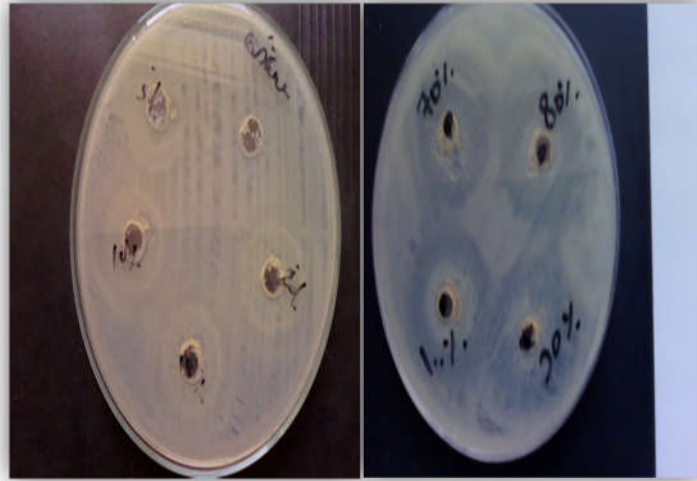
**Figure 01 : L'antibiogramme de la souche *Pseudomonas aeruginosa* .**

Dans la figure n° 01 ; les résultats d'antibiogramme fait apparaître que la bactérie est sensible uniquement aux Ciproflaxin et Colistin et résistante vis-à-vis l' Erythromycine et Ampicilline par contre elle est intermédiaire aux Kanamycine et l'acide nalidixique.

-Selon (Poirel et Nordmann., 2006) , Pool ; 2004 ; la *P. aeruginosa* est résistante aux B lactames, cette résistances est naturelle.

## Résultats et discussion

-Hocquet et al, 2003 mentionne que *P. Aeruginosa* peut avoir une résistance acquise vis-à-vis les aminosides et selon (Lastours, 2010) , il y a une résistance acquise vis à vis les quinolones.



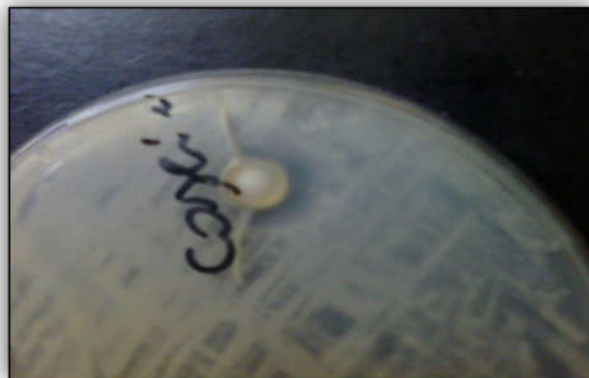
**Figure02 : Traitement alternatif par le miel de la souche étudiée .**

Dans la figure n° 02 :

- On a utilisé deux traitements alternatifs (e Miel et la Caséine) chacun seul puis en mélange. Pour le traitement par le miel, nos résultats sont contrairement de ce qui est dans la bibliographie .aucune réponse antibactérienne de deux types de miel (miel de l'ail et multi floral).

Des différentes doses ont été faites pour déterminer la CMI mais malheureusement, il y a aucune réponse.

La bibliographie qui est rapporté par ( AL-WAILI, 2004, AL-JABRI et al, 2003, COOPER et al, 2002). Les CMI est produite entre de 1-90% pour la *P .aeruginosa* contrairement ce qui est trouvé dans notre étude.



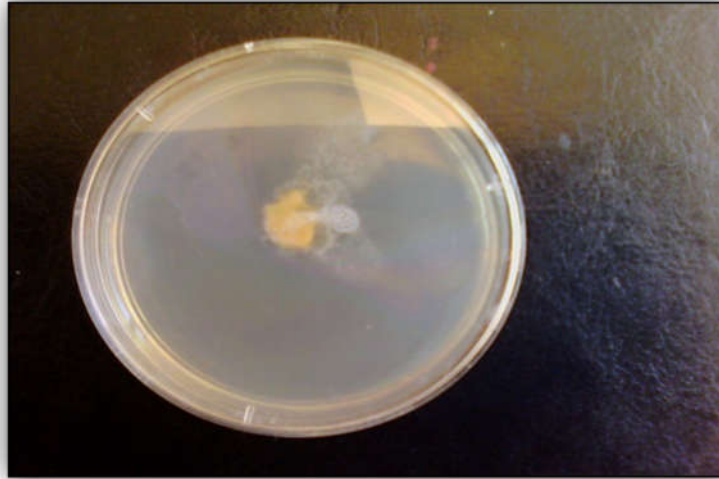
**Figure03 : Traitement alternatif par la caseine de la *Pseudomonas aeruginosa***

## ***Résultats et discussion***

---

### ***Dans la figure n°03 :***

La réponse de la bactérie contre la caséine est bonne, on a utilisé ce produit en poudre qui a donné une inhibition du germe, aucune étude qui a mentionné son effet contre *P. aeruginosa* malheureusement celle est classée dans les peptides antibiotiques .



**Figure0 4: Mélange de traitement alternatif (miel et la caseine)**

### ***Dans la figure n°04 :***

Dans notre étude, on a essayé de mélanger les deux constituants ; mais, on a observé que ce mélange n'a pas donné un effet ; L'explication reste à confirmer si le miel inhibe l'effet de la caséine ou non.



## *Conclusion*

---

Dans notre étude, l'isolat qui est ramené de la matière fécale de la chauve-souris a subi :

Une sensibilité vis-à-vis les antibiotiques ; Nos résultats ont montré une sensibilité de la *P. aeruginosa* vis-à-vis Ciproflaxin et Colistin et résistante vis-à-vis l' Erythromycine et Ampicilline par contre elle est intermédiaire aux Kanamycine et l'acide nalidixique.

- Pour le traitement par le miel :

Aucun effet antibactérien du miel contre la bactérie isolée de la chauve- souris . Ce traitement alternatif n'a pas de résultat ; Par contre le traitement par la caséine a donné un bon effet, malgré que le mélange entre les deux constituants n'a pas d'effet sur la bactérie étudiée.

## Les références bibliographique

**Article:**ANTIBIOGRAMME VETERINAIRE DU COMITE DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE 2015

**Bergsma, V. M., M. E. Prins., Staats, M and Raaijmakers, J. M.** (2005). Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing *Pseudomonas* species in the rhizosphère by Denaturing gradient gel électrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 993-1003.

**Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X and Gardan, L.** (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomies*. 20:51-53.

**Botelho, G. R and Leda, C. M.** (2006). Fluorescent *Pseudomonad* associated with the rhizosphère of Crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 401-416.

**Ellis, R. J., T. M., Timms, W and Bailey, M. J.** (2000). Identification of conserved traits in fluorescent *Pseudomonads* with antifungal activity. *Environ. Microbiol.*2:274-28.

**Emmanuelle, B et El Amari.** (2004). Traitement et pronostic des Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse n° 10406. Thèse présentée à la Faculté de Médecine De l'Université de Genève pour obtenir le grade de docteur en médecine.

**Expose du 20 juin 2003 DES bacteriologie L ANTIBIOGRAMME : LA DETARMINATION DES SENSIBILITES AUX ANTIBIOTIQUES-BURNICHON**  
Nelly TEXIER Anthony.

**Floret N ; Bertrand X ; Thouverez M ; Talon D.** (2009). Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie*. 57 : 9-12

**Gellen-Dautremen J.** (2007). Bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa* en médecine interne : revue rétrospective de 51 épisodes.

**Hamdan, H., Weller, D.M and L. S. Thomashow.** (1991). Relative importance of Fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3270-3277.

**Iacobellis, N. S.** (2001). Olive Knot. In, « Encyclopaedia of Plant Pathologie ». Vol. 2.(Eds OcMalloy. ID Murroy).713-715p. □Janse, J. D. (1991). Discrimination des pathovars au sein de *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* utilisant des acides gras

des cellules entières et la pathogénicité comme critères. Syst. Appl. Microbiol. 13:79-84.

ingae on stone fruits in Victoria. Plant. Pathology. 34: 248-254.

**Innoel, R., Krieg, G and John, H. (1987).** Bergeys manual of systematic bacteriology. Vol.1. Williams and wilkinsbaltimore. Md.

**Lahlou Amin I, Salord H, Gille Y, Roure C, Tigaud S, Bajou T, Ratbi N, Kassmi H-L. (2008).** Pseudomonas aeruginosa et résistance isolée à l'imipénème : clone émergent en milieu hospitalier. Les techniques de laboratoires. 11 : 4-9.

**Minchella A, Molinari L, Alonso S, Bouziges N, Sotto A, Lavigne J-P. (2010).** Evolution de la résistance aux antibiotiques de Pseudomonas aeruginosa dans un centre hospitalier universitaires entre 2002 et 2006. Pathologie Biologie. 58 : 1-6.

**Richard C, Keredjian M. (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobie stricts : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*. Inst Pasteur, 2<sup>e</sup> édition. 2 : 22-26.

**Richard. (2005).** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA 3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Maitrise en microbiologie-immunologie.

**Richet H. (2003).** Prise en charge d'une épidémie à *Pseudomonas aeruginosa*. Annals Françaises d'Anesthésie et Réanimation. 2 : 544-547.

**Sekkour, S. (2008).** Essai d'introduction d'un couple symbiotique Rhizobium –Acacia s'aligna pour la revégétalisation de la sablière de Sidi Lakhdar (Wilaya de Mostaganem). Mémoire de Magister de l'université d'Oran (Es – Sénia). 23-26p.

**Wimalajeewa, D. L. S and Flett, J. D. (1985).** A study of populations of *Pseudomonas syringae* pv. *Syr*

**Yétérian E. (2010).** Bases moléculaires de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.

□ **Icobellis, N. S. (2001).** Olive Knot. In "Encyclopaedia of Plant Pathology" Vol. 2. (Eds OC Malloy, TD Murray). 713-715p. (John Wiley and Sons).

□ **Mavrodi , D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M ., Soule, M. G ., Phillips, G and Thomashow, L. S. (2001).** Genetic diversity of *phlD* from 2,4-DAPG-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology. 91: 35-43. .