

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

***Staphylococcus aureus* isolée chez les grands brûlés
« Résistance aux antibiotiques et activité
antibactérienne d'une plante médicinale de la famille
des Fabacées »**

Présenté par :

MOUHOUB Imane

Soutenu le : **18 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M^r BOUKHALFA .F
M^{me} TOUATI .A
M^{me} GHAROUTE .A

MCB
MAA
MAA

Président
Promotrice
Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

REMERCIEMENTS

Nous remercie ALLAH tout puissant qui ma donné le courage et la volonté et de m'avoir bénié jusqu'à la réalisation de ce travail.

*je remercier chaleureusement mon promoteur **PR TOUATI.A**, mine de savoir et d'expérience, pour son grand soutien au travail.*

*je n'oublie pas de remercier co-encaadreur **Mme ZENATI Karima**, pour les efforts qu'elle a fournis durant notre cursus afin de nous amener jusqu'au bout de la mémoire.*

*Grand remerciement pour notre cher président, **Mr BOUKHALFA .F**, et examinatrice **Mme GHROUTE .A** et le chef département **Mr DJOUDI.F** et tous les enseignants de département des sciences de la nature et de la vie.*

Enfin, grands merci à ma familles respectivé et mes amis qui ma aidés. je profite de l'occasion pour remercier tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

MOUHOUB Imane

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie bibliographique01

I. Rappel de la structure de la peau.....02

II. Altération de la peau chez les grands brûlé04

II.1. Les infections bactériennes dues à *Staphylococcus aureus* chez les grands brûlés.....05

III. Etude de l'espèce.....06

III.1. Position taxonomique.....06

III.2. Habitat.....06

III.3. Caractères bactériologiques.....06

III.3.4. Caractères antigéniques.....09

III.3.5. Facteurs de virulence.....10

III.3.6. Substance élaborées.....12

IV. La Résistance aux antibiotiques.....14

IV.1. Mécanisme de résistance aux antibiotiques.....15

IV.2. Résistance à la méthicilline.....17

IV.3. Les infections aux SARM chez les grands brûlés.....18

Partie expérimentale.....22

Matériels et méthode

I. Matériels.....23

I.1. Matériels utilisés au laboratoire

I.2. Matériels biologiques

II. Méthodes25

II.1. Isolement.....26

II.2. Examens microscopique.....27

II.3. Test d'immuno-agglutination.....29

II.4. Identification biochimique.....30

II.5. Identification par l'API-Staph.....31

II.6. L'Antibiogramme.....34

II.7. Recherche de la résistance à la méthicilline (Screening test à l'oxacilline).....36

II.8. Etude de l'activité antibactérienne d'un extrait végétal.....	37
Résultats et Discussion	40
I. Résultats	
1. Aspect des colonies	41
2. Examens microscopique.....	43
3. Résultats de la recherche des enzymes respiratoire.....	44
4. Recherche de la coagulase.....	45
5. Immuno-agglutination.....	46
6. identification par système API-Staph.....	47
7. Test de sensibilité aux antibiotiques	48
8. Screening test a l'oxacilline pour les SARM.....	49
9. Test de l'activité antibactérienne de l'extrait végétal.....	50
II. Discussion	
Conclusion	56
Références bibliographiques	57

Liste des tableaux

Tableau N° 1 : Caractères biochimiques et métabolique de l'espèce <i>S.aureus</i>	08
Tableau N° 02 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	20
Tableau N° 03 : Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne.....	21
Tableau N°04 : Répartition des souches selon la nature du prélèvement, le service, l'âge et le sexe du patient.....	23
Tableau N°5 :Lecture de la galerie API Staph.....	33
Tableau N°6 :Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques pour les staphylocoques.....	35
Tableau N°7 : Résultats de l'incubation à 37°C sur les géloses utilisées.....	41
Tableau N°8 : Résultats des examens microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram.....	43
Tableau N°9 : résultats de la sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>S.aureus</i> selon la comité CLSI.....	48
Tableau N°10 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait polyphénolique.....	50
Tableau N°11 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	52

Liste des figures

Figure 1: Coupe de la peau.....	2
Figure 02 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe.....	19
Figure 03: Protocole d'extraction des poly phénols totaux.....	37
Figure N°4 : Aspect des colonies sur gélose au sang cuit.....	42
Figure N° 5 : Aspect des colonies sur Chapman.....	42
Figure N° 6: observation de la souche A après coloration de Gram sous microscope optique (objectif x100).....	44
Figure N°7 : test catalase.....	45
Figure N°8 : test de coagulase G : souche à identifier	45
Figure N°9 : Test d'agglutination (staphaurex),.....	46
Figure N°10 : Illustration du profil biochimique de la souche A identifiée par système API staph.....	47
Figure N°12 : screening test pour les souche A,B,C,E ,G, et la souche ATCC29213.....	49
Figure N°13 : Zone d'inhibition montre la sensibilité de la souche A de <i>S.aureus</i> à l'extrait polyphénolique.....	51

Abstract :

Since the introduction of antibiotics in therapy, we are witnessing the fast emergence of many bacterial strains became resistant to one or more antibiotics (multi-drug resistance).

The number of effective antibiotics is restricted which drives us to search for new effective molecules

Our work has focused on the isolation, biochemical identification of strains belonging to the species *S. aureus* with the miniaturized API systems and other preliminary test (catalase, sataphylocoagulas ...), their resistance to antibiotics by different methods ; the disk diffusion method according to CLSI recommendations, the screening test, and the study of the antibacterial power of total poly-phenols from a medicinal plant of the family ***Fabaceae***

On the strains isolated during the period from February to the month of May 2016.

The study of the sensitivity of our strains to a range of antibiotics was selected according to their spectrum of activity, revealed which strain studied respond differently to antibiotics tested with variable resistors rate.

The evaluation of the antibacterial activity of the poly-phenols of 7 strains from major burned by two methods; the method of agar disk diffusion and dilution method in solid medium (incorporation) shows antibacterial activity on most of the tested strains.

Poly-phenols, actives against strains, presenting a remarkable interest in herbal medicine. However, other biological investigations must be undertaken.

Résumé

Staphylococcus aureus est maintenant en charge du type d'infection de la peau lorsque des maladies grand brûlées . la contamination de la peau du commun et énorme et la gravité de ces bactéries en retournant à la sécrétion de nombreuses toxines et enzymes Laden nécessitent un traitement afin de maximiser à la fois local et réguliers, y compris l'utilisation d'antibiotiques.

utilisation des antibiotiques dans le traitement et nous assistons à l'émergence d'une souches continue et rapide de la résistance bactérienne à un ou plusieurs types d'antibiotiques (résistance aux médicaments multiples) Le nombre d'antibiotiques efficaces est en baisse, ce qui nous conduit à chercher des alternatives (nouvelles molécules efficaces).

Nous avons concentré notre travail sur isolation et l'identification de bio-chimique de antibiogramme en utilisant un système moléculaire miniature et d'autres tests (enzyme catalase, cluster coagulase)

La résistance aux antibiotiques de différentes méthodes et manières comment appliquer les comprimés antibiotiques selon les recommandations du test de dépistage, ainsi que l'étude de la capacité des bactéries contre polyphénols totaux extraits de plante médicale appartenant à la famille.

Fabaceae les souches isolées dans la période comprise entre le mois de Février et Mars 2016.

L'étude de la sensibilité de Staphylococcus aureus vers un groupe d'antibiotiques choisis en fonction du spectre d'activité a révélé des souches interagissent différemment avec des antibiotiques testés à une vitesse de résistances variables.

L'activité antibactérienne des polyphénols évaluée sur sept souches isolées à partir de patients atteints de brûlures du troisième degré à deux méthode de déploiement de disques et des moyens d'atténuation dans le centre du noyau de la voie (formation) montrent une activité antibactérienne sur la plupart des souches testées.

Polyphénols sont efficaces contre les souches utilisées et fournit un avantage remarquable en médecine à base de plantes, et il doit être d'autres expériences biologiques.

ملخص

المكورات العنقودية هو الآن النوع المسؤول عن أمراض العدوى للجلد عند الحرقى. تلوث الجلد عن طريق شائع و هائل و حدة هذه البكتيريا تعود الى إفراز العديد من السموم و الإنزيمات اذن تتطلب تعظيم العلاج على الصعيدين المحلي و النظامي بما في ذلك استعمال المضادات الحيوية.

منذ بدء استعمال المضادات الحيوية في العلاج و نحن نشهد ظهور مستمر و سريع لسلاسل بكتيرية مقاومة لنوع أو عدة أنواع من المضادات الحيوية (المقاومة المتعددة) عدد المضادات الحيوية الفعالة في تناقص مستمر مما يدفعنا للبحث عن البديل (جزيئات جديدة فعالة).

وقد ركزنا في عملنا هذا على العزل و التحديد الكيميائي الحيوي لسلاسل تنتمي إلى النوع المكورات العنقودية الذهبية باستخدام النظام الجزيئي المنموم و اختبارات أخرى (إنزيم الكاتلاز، المخثرة العنقودية....)

مقاومتها للمضادات الحيوية بمختلف الأساليب و الطرق طريقة تطبيق أقراص المضادات الحيوية وفعال توصيات اختبار الغريلة و أيضا دراسة القدرة ضد البكتيريا للبوليفينول الكلي المستخلص من عشبة طبية تنتمي إلى عائلة.

الفصيلة القرنية على سلاسل معزولة في فترة ما بين شهر فيفري و شهر مارس لعام 2016. الدراسة لحساسية سلاسلنا تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المختارة وفقا لطيف نشاطها كشف عن سلاسل تتفاعل بشكل مختلف مع المضادات الحيوية المختبرة بمعدل مقاومات متغير.

تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للبوليفينول على سبعة سلاسل معزولة من مرضى الحروق من الدرجة الثالثة بطريقتين طريقة نشر الأقراص و طريقة التخفيف في وسط صلب (التأسيس) تظهر النشاط المضاد للبكتيريا على معظم السلاسل التي تم اختبارها.

البوليفينول فعال ضد السلاسل المستعملة و يقدم منفعة ملحوظة في طب الأعشاب و مع ذلك لا بد من إجراء تجارب بيولوجية أخرى.

Introduction :

Les grands brûlés une catégorie à immunité affaiblie, due à la destruction de la première ligne de défense qui est la peau, assurant chez un immunocompétent (ayant la peau saine) la protection de l'organisme contre toute colonisation bactérienne, infection virale ou autre agent pathogène, en jouant un rôle primordiale de barrière physique contre la pénétration de ces pathogène.

La flore commensale de la peau, second facteur assurant la protection de l'organisme, l'existence de lésions cutanés tel que les brûlures induit la colonisation de l'organisme par cette même flore commensale, ainsi que d'autre bactéries pathogènes présentes en milieu hospitalier.

Ces bactéries sont souvent caractérisées par leurs multi-résistances aux antibiotiques généralement utilisé pour le traitement de ces infections (antibiothérapie) souvent accompagné de complications graves et même parfois mortelles. La présence de *Staphylococcus aureus* au niveau de la flore commensale de la peau ainsi qu'en milieu hospitalier favorise la pénétration de celui-ci à l'intérieur de l'organisme des grands brûlés.

Les infections à « *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline » appelé souvent les infections aux SARM. L'une des bactéries multi-résistante représentant un déficit international aux scientifiques afin de limiter la diffusion de ces clones portant le gène mec A responsable de cette multi-résistance.

Mise a part l'antibiothérapie, qui rencontre chaque année de nouveaux échecs passant de l'âge d'or à l'âge de fer des antibiotiques, ce qui rétrécit le succès thérapeutique des antibiotiques usuels et a nécessité la recherche de nouvelles solutions pouvant limiter la diffusion de ces SARM et assurer l'inhibition de leur croissance sans pour autant développer une résistance vis-à-vis de ces derniers.

Les plantes médicinales, sont connues depuis longtemps pour leurs propriétés : antibactérienne, antifongique, antivirale...etc. La famille des Fabacées possède des propriétés cicatrisantes connues, utilisée depuis longtemps pour accélérer la guérison des brûlures.

Notre travail consiste à l'isolement, l'identification et à l'étude du comportement de 07 souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* issue des grands brûlés vis-à-vis des antibiotiques testés afin d'étudier leur résistance d'une part et d'autre part vis-à-vis d'un extrait polyphénolique provenant d'une plante médicinale de la famille des Fabacées très utilisée en médecine populaire dans l'intention d'évaluer leur pouvoir antibactérien.

I. Partie bibliographique

I. Rappel de la structure de la peau :

La peau est un épithélium imperméable qui entoure la surface externe de l'organisme, constituée de trois tissus très différents mais complémentaires : l'épiderme, le derme et l'hypoderme, la **figure n°1** représente la structure de la peau.

C'est le premier rempart s'opposant à la pénétration des germes dans l'organisme, elle constitue une **barrière mécanique** empêchant l'entrée des bactéries, des virus et de certains parasites.

À sa surface, certaines bactéries inoffensives constituent une **barrière biologique**. Associées à la peau, certaines **glandes sécrètent des substances acides**, comme la sueur, qui a une fonction **antiseptique**, ces substances constituent une **barrière chimique**. La moindre plaie constitue un **point d'entrée** potentiel pour les **agents infectieux** tel que les **staphylocoques**, bactéries présentes normalement à la surface de la peau[20].

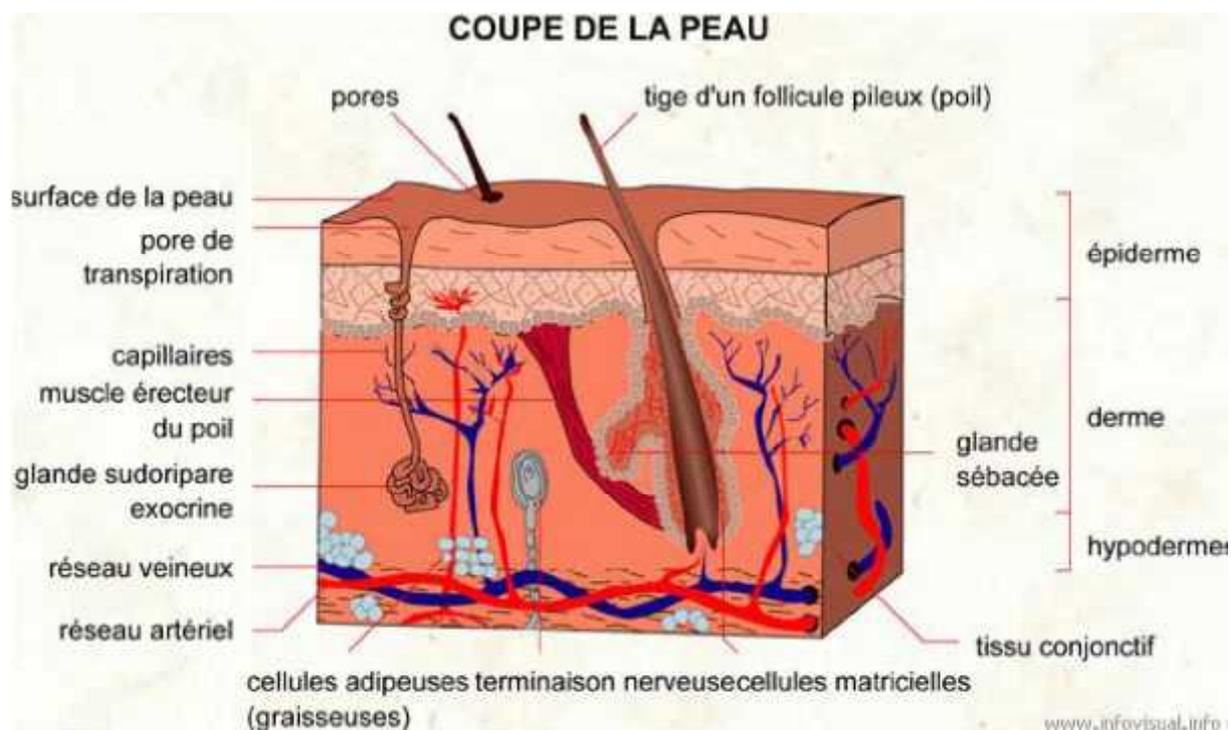


Figure N°1 : coupe de la peau[10].

La peau constitue :

✚ Une barrière physique:

- 2 couches (épiderme + derme).
- épithélium stratifié.
- kératinisation (kératinocytes produisent de la kératine, protéine difficilement dégradée par les micro-organismes).
- présence de cellules mortes en surface et phénomène de desquamation superficielle (élimination mécanique des germes en surface).

✚ Une barrière chimique:

- pH acide et sécheresse de la peau inhibent la croissance bactérienne.
- $T < 37^{\circ}\text{C}$.
- sécrétion de lipides toxiques et de lysozyme (dégrade le peptidoglycane de la paroi bactérienne) au niveau des follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares (« brèches naturelles de la peau » => possibles voies d'entrée pour bactéries).

NB : les furoncles sont souvent centrés sur un follicule pileux.

✚ Une barrière biologique: flore commensale cutanée normale :

- *Staphylococcus epidermidis*.
- Corynébactéries.
- *Propionibacterium acnes*

<p>Flore résidente empêche la colonisation par des bactéries pathogènes : compétition au niveau des sites et de l'utilisation des nutriments.</p>

Parfois, colonisation transitoire de la peau par des bactéries pathogènes :

- *Staphylococcus aureus*,
- *Enterococcus*,
- entérobactéries,
- *Pseudomonas aeruginosa* (souvent chez malades hospitalisés).

La peau représente donc un barrage continu qui ne peut pas être franchi par les bactéries. Sauf en cas de lésions : plaie, piqûre d'insecte, brûlure ce qui entraîne la **sensibilité des grands brûlés aux infections cutanées**[8].

II. Altération de la peau chez les grands brûlés :

La profondeur des brûlures se réfère classiquement à un classement selon 3 degrés de gravité Croissante :

- ✚ **Le premier degré** : ne concerne que l'épiderme superficiel et ne doit pas être pris en compte dans l'estimation initiale.
- ✚ **Le deuxième degré** : caractérisé par la présence de phlyctènes, se subdivise en stades superficiel et profond suivant que la membrane basale de l'épiderme est plus ou moins atteinte.

Pour le deuxième degré superficiel : il s'agit d'une lésion au niveau de la jonction dermo-épidermique avec des atteintes partielles de la membrane basale et de la couche cellulaire basale. Elle se manifeste cliniquement par des phlyctènes fines et fragiles, sous lesquelles la peau reste rosée.

Pour les brûlures de deuxième degré profond : l'atteinte histologique se situe principalement sous la jonction dermo-épidermique. Les annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares) sont généralement épargnées et présentent une réserve de cellules épidermiques qui permettra leur régénération. Cependant, des facteurs aggravants, tels que **l'infection** ou la diminution de la perfusion cutanée dans les jours suivant le traumatisme, peuvent détruire ces réserves de cellules épidermiques, ce qui implique la nécessité d'une greffe cutanée.

- ✚ **Le troisième degré** correspond à une destruction complète de la membrane basale ce qui interdit toute cicatrisation spontanée.

La distinction précoce entre ces différents stades est souvent difficile, et de peu d'intérêt vis-à-vis de la réanimation initiale.

Un grand brûlé souffre d'une brûlure du 2^{ème} ou 3^{ème} degré c'est celui-ci qui est exposé le plus aux infections bactériennes tel que celles dues aux *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et autres...etc.

La souche du micro-organisme colonisant dépend, en grande partie, de la diffusion dominante des pathogènes dans la micro-atmosphère hospitalière; dans ce sens, les données relatives au Centre des Grands Brûlés de Brindisi en Italie coïncident avec celles retrouvées dans la littérature internationale : reste marquée durant les dernières années.

Les examens culturaux témoignent le passage d'une flore composée en grande partie de Gram négatif (en particulier *Pseudomonas aeruginosa*) à une population microbienne mixte avec **une dominance de Gram positif**, en particulier des **souches multi-résistantes de *Staphylococcus aureus*** avec une **incidence élevée [22]**.

II.1. Les infections bactériennes dues à *Staphylococcus aureus* chez les grands brûlés :

Normalement présents dans les téguments (surtout au niveau des glandes sudoripares et des follicules pileux) et dans l'oropharynx: les **staphylocoques dorés** avec les streptocoques vont être les **premiers** à contaminer la brûlure.

Les staphylocoques dorés sont le plus souvent apportés par contamination croisée hospitalière. Ces bactéries pyogènes par excellence ;(*S.aureus* nommé :le microbe de la suppuration) sont actuellement les principaux responsables de l'infection des brûlures.

Parfois extrêmement résistants, ils demeurent heureusement pratiquement toujours sensibles à la vancomycine. La toxicité, la morbidité et la mortalité dont ils sont responsables sont très inférieures à celles des germes à Gram négatif (4 à 5 fois moindre).

Le staphylocoque doré demeure un adversaire de taille parce qu'il essaime facilement à distance (vers le poumon, l'endocardie, les articulations) [23].

III. Étude de l'espèce:

III.1.Position taxonomique :

La classification des staphylocoques dorés est comme suit :

- Domaine : *Bacteria*
- Phylum XIII : *Firmicutes*
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Bacillales*
- Famille : *Staphylococcaceae*
- Genre : *Staphylococcus* avec 44 espèces et des sous espèces
- Espèce : *aureus* [9].

III.2.habitat:

S.aureus est l'espèce majeure, d'origine humaine, animale (volaille, bovin, ovin, caprin...), environnementale (sol, air.. ;) ou non spécifique.

S.aureus se développe dans certains aliments dans lesquelles la pression osmotique est élevée (tel que le jambon et d'autres viandes salées et fumées) ou bien la teneur en eau faible, facteurs qui inhibent la croissance d'autres organismes, la pigmentation le protège contre les effets antimicrobiens du soleil et les mutants ceux qui en sont dépourvus sont tués plus facilement par les granulocytes neutrophiles.

III.3.Caractères bactériologiques :

III.3.1.Caractères morphologiques :

A l'examen microscopique, les staphylocoques se présentent sous l'aspect de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes de 3 à 5 éléments positivement colorés au Gram[1]. Le mode de groupement dit en "grappes" ou en "amas" est plus caractéristique après culture sur un milieu gélosé[1,13]. La disposition en amas s'explique par la division cellulaire

des staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres, et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues[19].

Sur le plan individuel, ce sont des cocci sphériques de 0,5 à 1 micron de diamètre immobiles, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule [1,6].

III.3.2. Caractères culturels :

Les Staphylocoques sont en général aéro-anaérobie facultatif et poussent sur milieu ordinaire.

Cependant, certains facteurs de croissance sont indispensables pour la multiplication des staphylocoques tels que la Vitamine B1 et l'acide nicotinique.

La température optimale de croissance est de +30 à +45°C avec un maximum à 37°C et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5.

En bouillon ordinaire :

La culture est rapide et les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt.

En milieu solide:

On observe des colonies opaques, plus ou moins bombées avec un diamètre variant de 1,5 à 4mm.

- Sur milieu Chapman (milieu hypersalin à 75 g/l de NaCl, mannitol comme substrat pour caractère différentiel) à 37°C pendant 24 heures, les colonies apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté sinon les colonies sont de couleur blanche, régulièrement rondes lisses, l'utilisation du milieu de culture sélectif hyper-salé de Chapman pour isoler le staphylocoque d'un prélèvement poly-microbien.
- En milieu gélose au sang frais, on observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (bêta hémolyse) autour des colonies. Ceci est lié au fait que certains staphylocoques, en particulier *S. aureus*, sont susceptibles de synthétiser quatre hémolysines distinctes et variables d'une souche à l'autre, et dont l'activité diffère selon le type d'hématies en cause.
- Sur gélose au sang cuit les colonies ont une couleur blanche ou jaune pigmenté.

La plupart des souches de staphylocoques poussent sur un milieu synthétique contenant entre autre du glucose, des sels minéraux, 14 acides aminés dont la cystéine, la vitamine B1 et l'acide nicotinique[1,13].

III.3.3. Caractères biochimiques et métaboliques :

Les caractères biochimiques et métaboliques des *S.aureus* sont représentés dans le tableau N°1.

Tableau N°01 : caractère biochimique et métabolique de l'espèce *S.aureus* [13, 24, 18].

Caractère biochimique	<i>S.aureus</i>
Fermentation du Mannitol	+
Fermentation du glucose	+
Nitrate reductase	+
DNase	+
Protéine A	+
Thermonucléase	+
Novobiocine 5µg	S
Catalase	+
Coagulase liée (récepteur de Fibrinogène)	+
oxydase	-
Coagulase libre	+
Phosphatase	+
enzymes : phosphatase alcaline (PAL), arginine dihydrolase (ADH), uréase	+

S : sensible, + : présence

III.3.4. Caractères antigéniques :

Il existe trois groupes d'antigènes somatiques chez *S. aureus*:

A.Trois antigènes pariétaux caractéristiques de l'espèce qui sont le peptidoglycane, la protéine A et les acides téichoïques.

B.Les antigènes pariétaux de type.

C.Les antigènes de surface.

A.Les antigènes pariétaux :

A.1.Le peptidoglycane :

Constitué d'un enchaînement linéaire de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique.

Le peptidoglycane a une activité adjuvante et mitogène sur les lymphocytes B et pourrait induire les cellules immunosuppressives. Il est reconnu comme étant responsable d'effets toxiques semblables à ceux observés avec l'endotoxine.

A.2.La protéine de type :

Holoprotéine élaborée par 90 sur 100 souches de *S. aureus* d'origine humaine, elle l'est également par toutes les souches coagulase négative possédant une thermo nucléase.

Sa structure est subdivisée en deux régions fonctionnellement distinctes dont la région N-terminale qui se fixe sur les IgG au niveau de leur fraction Fc.

Cette propriété lui permet d'interférer avec le système immunitaire, ce qui explique son utilisation en thérapeutique pour réduire le taux des immuns complexes circulants. Elle active le complément et déclenche la réaction inflammatoire; induit l'hypersensibilité retardée et immédiate, et est mitogène et cytotoxique [1,13,6].

A.3.Les acides teichoïques :

Ce sont des polymères linéaires de ribitol ou de glycérol, unis par des liaisons phosphodiester et substitués selon le cas par la N-acetylgalactosamine ou N-acétylglucosamine. Ils sont fixés sur le peptidoglycane par une liaison béta-1-6 entre le NAG

de l'acide teichoïque et le NAM du peptidoglycane. Leur activité biologique est peu connue, mais ils sont immunogènes[1,13].

B.Les antigènes pariétaux de type :

Toutes les souches de *S. aureus* possèdent des antigènes de type qui sont recherchés lors de la sérotypie par des réactions d'agglutination [1].

C .Les antigènes de surface ou antigènes capsulaires :

Les souches de *S. aureus* peuvent posséder soit une capsule vraie, soit une pseudo-capsule ou microcapsule.

La capsule vraie, visible en microscopie optique après coloration négative par l'encre de chine est retrouvée chez les souches M, Smith et T.

La pseudo-capsule qui est une fine couche polysaccharidique externe dénommée "Slime" n'est pas visible en microscopie optique.

Ces antigènes sont constitués d'acides uraniques acétylés ou aminés avec 11 types sérologiques dont les types 5 et 8 sont les plus fréquents en clinique humaine[1,6,13,14].

III.3.5.Facteurs de virulence :

On distingue cependant une espèce à fort potentiel pathogène : *Staphylococcus aureus* (espèce type).

Responsable de suppurations divers (furuncles, phlegmons, panaris), de manifestations systémiques (ostéomyélites, septicémies), et de manifestations digestives lors d'intoxications alimentaires.

Les toxines suivantes constituent les facteurs de virulence de *S.aureus* :

III.3.5.1. Les hémolysines :

Quatre hémolysines différentes ont été identifiées et elles produisent toutes une bêta hémolyse claire, mais elles diffèrent de par leur mécanisme d'action et leur spécificité d'action sur les hématies (humaines et animales).

Une souche va produire plus d'un type d'hémolysine qui vont s'attaquer aux cellules tissulaires entraînant ainsi une nécrose locale et la mort des animaux de laboratoire[6].

- L'alpha-hémolysine ou alpha-toxines : produite par 80 à 90 % des souches de *S. aureus*, elle est la principale hémolysine des souches retrouvées chez l'homme. Elle est active sur les hématies de lapin à 37°C et inactive sur les hématies humaines.
L'alpha-toxine entraîne la production d'antitoxine qui empêche la fixation bactérienne sur la membrane cellulaire et peut être transformée en anatoxine[1,6].
- La Béta-hémolysine ou bêta-toxine : Observée surtout chez les souches animales, elle est active sur les hématies de mouton. Son activité hémolytique est de type "chaud-froid" (inactive à 37°C et active à 4°C) [3,16].
- La Gamma-hémolysine ou gamma-toxine : Elle est constituée de deux protéines de base agissant de concert et qui diffèrent par leur masse moléculaire et leur point isobestique. Elle est active sur les hématies de lapin, de mouton, d'homme mais inactive sur les hématies de cheval. Elle est cependant inhibée par l'agar, certains polymères sulfatés, le cholestérol et bien d'autres lipides. Elle présente une activité antigénique chez l'homme[1,6].
- Delta-hémolysine ou delta-toxine : produite par la plupart des souches humaines, elle est active sur les hématies de lapin, de cheval, d'homme et de cobaye. Elle est inhibée par le sérum sanguin, le fibrinogène et les globulines[1,6].

III.3.5.2. La leucocidine de Panton et Valentine :

Produite par la plupart des souches de *S. aureus*, elle agit uniquement au niveau des granulocytes, des macrophages et des basophiles de l'homme et du lapin. C'est une protéine constituée de 2 composants F et S qui agissent en synergie sur la membrane cellulaire et vont entraîner la lyse de la cellule. Elle est antigénique et est donc inductrice de la synthèse d'anticorps chez les sujets contaminés[1,6].

III.3.5.3. L'exfoliatine ou épidermolysine :

Il existe deux types d'exfoliatine:

- Le type A, le plus fréquent, qui est d'origine chromosomique
- Le type B, qui est d'origine plasmidique.

Elles sont responsables de différentes formes de staphylococcies cutanées bulleuses dont la plus typique est "le syndrome de la peau ébouillantée".

III.3.5.4. Les entérotoxines staphylococciques :

16 Fabriquées par certaines souches de *S. aureus*, elles sont au nombre de 8 et sont immunologiquement distinctes. Les souches productrices d'entérotoxines sont responsables d'intoxications alimentaires et d'entéocolites pseudomembraneuses.

III.3.5.5. Toxine du syndrome du choc toxique staphylococcique :

Produite par 15% des souches d'origine humaine, elle est d'origine chromosomique et est surtout observée avec les souches fortement protéolytiques mais peu ou pas hémolytiques, résistantes à la pénicilline G.

III.3.6. Substances élaborées :

Les Staphylocoques, particulièrement *S. aureus* produisent une grande variété de protéines antigéniques dans le milieu extra cellulaire.

Ces protéines sont douées soit d'une activité toxique, soit d'une activité enzymatique et contribuent à la pathogénicité des Staphylocoques en s'attaquant aux tissus de l'organisme au niveau intra cellulaire, comme au niveau de la membrane cytoplasmique.

Ces protéines sont synthétisées pendant la phase exponentielle de croissance ou au début de la phase stationnaire.

III.3.6.1. Enzymes staphylococciques :

A. La coagulase libre :

Elle est capable de coaguler en quelques heures le plasma humain ou de lapin citraté, héparine ou oxalaté; c'est une enzyme d'origine chromosomique dont l'action est indépendante du calcium et du fibrinogène mais nécessite la présence d'un facteur appelé " coagulas reacting factor " qui est une globuline voisine de la prothrombine[1].

B. La coagulase liée ou clumping factor :

Elle intervient également dans la pathogénicité des Staphylocoques, fixés à la surface de presque toutes les souches d'origine humaine; elle est diffusible dans le milieu de culture après autolyse et réagit directement avec le fibrinogène ou avec des monomères solubles de fibrine[1].

C. La fibrinolysine :

C'est une staphylokinase qui métabolise le plasminogène en plasmine et qui agit sur le plasma de lapin, d'homme, de cobaye et de chien[1].

D. Les lipases :

Elles sont au nombre de 3 : les lipases, les phosphatases et les estérases. Les phosphatases sont localisées sur la membrane cytoplasmique au niveau de l'acide teichoïque. Ce sont les phosphatases alcalines et acides, ayant des pH optimaux respectifs de 10,8 et 5,2 et dont seule la phosphatase acide est partiellement libérée dans le milieu et peut donc être recherchée[1].

E. Les protéases :

Elles sont également au nombre de 3 : la sérine protéase, la métalloprotéase et la thiolprotéase[1].

F. La nucléase :

Elle a une activité exo et endonucléasique sur l'ADN mais également sur l'ARN et elle est active à pH alcalin en présence de calcium[1].

G. Le lysozyme et la lysostaphine :

Le lysozyme est une endo-bêta-N-acétylglucosaminidase qui provoque la lyse de la paroi bactérienne. La lysostaphine est constituée de trois enzymes qui agissent respectivement au niveau de la chaîne térapeptidique entre l'acide N-acétylmuraminique et la L-alanine, au niveau de la chaîne polysaccharidique et au niveau des ponts polyglycines spécifiques aux staphylocoques[1].

H. La hyaluronidase :

C'est une enzyme qui hydrolyse l'acide hyaluronique et qui joue un rôle dans la pathogénicité des staphylocoques en favorisant sa diffusion dans le tissu conjonctif [1].

IV. La Résistance aux antibiotiques :

Les staphylocoques peuvent être sensibles à divers antibiotiques mais mise à part leur résistance naturelle (Acide nalidixique, Colistine) *S. aureus* se caractérise par une aptitude remarquable à acquérir de multiples caractères de résistance.

Actuellement, environ 95% des souches sont résistantes à la pénicilline G, aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux uréidopénicillines. Les souches communautaires sont, en général, sensibles à la pénicilline M (méthicilline, oxacilline) qui reste l'antibiotique de choix.

Elles sont le plus souvent sensibles aux macrolides, aminoglycosides, fluoroquinolones et synergistines.

La méthicillino-résistance s'accompagne d'une résistance à toutes les β -lactamines ainsi qu'à d'autres antibiotiques dont les aminoglycosides (TM), les macrolides et apparentés (E, L), les synergistines (PT), les fluoroquinolones (FQ) ou encore la fosfomycine (FOS). Les glycopeptides, la rifampicine, l'acide fusidique sont, par ordre décroissant, les molécules qui restent le plus souvent actives sur ces souches. Ces souches sont plus communément appelées souches méti-R ou SARM (*S. aureus* Résistant à la Méthicilline).

Depuis 1997, des souches présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides ont été décrites et elles sont plus communément appelées GISA (Glycopeptide Intermediate *S. aureus*). Le mécanisme mis en jeu semble lié à l'activation de la synthèse de la paroi bactérienne en l'absence des gènes *Van* responsables de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques.

Deux souches de *S. aureus* résistantes aux glycopeptides et possédant le gène *Van* ont été décrites aux Etats-Unis. Or, les glycopeptides sont des rares molécules utilisables dans les infections à SARM.

Les linézolides (Zivoxid[®]) restent, en général, actifs sur les GISA [12].

IV.1. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques :

La pénicilline et les autres bêtalactamines agissent en se fixant à des enzymes appelées protéines liant la pénicilline (penicillin-binding proteins ou PBP).

Ces protéines enzymatiques (transpeptidases, carboxypeptidases) sont essentielles à la synthèse de la paroi cellulaire pour les staphylocoques.

Le substrat normal de ces enzymes (c'est-à-dire des penicillin-binding proteins) est l'acyl-D-alanyl-D-alanine ; la pénicilline et les autres bêtalactamines agissent alors comme des substrats analogues. Or, contrairement au substrat normal, la pénicilline empêche la synthèse de la paroi cellulaire et cause éventuellement la lyse bactérienne

Les repères du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) sont les suivants :

Pour la méthicilline, sensible, ≤ 8 mg/l et résistant, ≥ 16 mg/l ;

Pour l'oxacilline, sensible, ≤ 2 mg/l et résistant, ≥ 4 mg/l.

Les souches sensibles de *Staphylococcus aureus* produisent quatre types de PBP nommées PBP 1, PBP 2, PBP 3 et PBP 4. Les trois premiers types sont considérés comme les cibles les plus importantes des bêtalactamines. La résistance à la méthicilline est attribuable à la modification d'une des protéines liant la pénicilline (PBP) au niveau de la paroi bactérienne.

Le gène *MecA* responsable de cette modification est situé dans le chromosome bactérien et code pour la synthèse d'une PBP 2 différente, appelée PBP 2A ou PBP 2', qui a une affinité réduite pour toutes les bêtalactamines[59].

L'origine du gène *MecA*, et de façon plus générale de la région du génome qui l'entoure sur le chromosome bactérien appelée région *mec*, est inconnue et fait l'objet de discussion dans la littérature. Le gène *MecA* a probablement été acquis par transfert horizontal (ex. : transposon) puisque la région du gène *mec* est un lieu de prédilection pour l'ajout de séquences d'insertions et de transposons [60].

Le gène *MecA* est essentiel pour l'expression de la résistance de haut niveau à la méthicilline. Il ne se retrouve donc pas dans le *S. aureus* sensible à la méthicilline ou le *S. aureus* présentant une résistance limite ou de bas niveau à la méthicilline, c'est-à-dire les souches appelées BORSA (pour borderline résistant *S. aureus*) qui présentent une résistance à la méthicilline à cause d'une hyperproduction de bêtalactamase, et les souches appelées MODSA (pour modified penicillin-binding protein) qui présentent une résistance à cause

d'une surproduction de PBP 4 (dont l'affinité pour les bêtalactamines est plus faible) ou d'une modification de PBP 2 par mutation, avec diminution de l'affinité pour les bêtalactamines[61].

Il est important de différencier les souches présentant une résistance limite à la méthicilline des souches de SARM, puisque des mesures spéciales de prévention des infections ne sont pas recommandées pour les patients colonisés ou infectés par les souches ayant une résistance limite à la méthicilline. En conséquence, des souches de *S. aureus* qui se révèlent résistantes à la méthicilline ou à l'oxacilline, mais qui sont sensibles à la plupart des autres antibiotiques comme la clindamycine, devraient être confirmées comme souches de SARM au moyen d'une épreuve de sensibilité de référence (Boyce 1998). Le gène *MecA* est présent dans plusieurs bactéries, incluant les staphylocoques à coagulase négative, et peut donc être transféré à d'autres bactéries par un transposon.

L'expression phénotypique du gène *MecA* peut être variable et dépend d'autres gènes (de gènes régulateurs comme *MecRI* et *MecI*, et de gènes auxiliaires comme les gènes *Fem*).

Une particularité de la résistance à la méthicilline est son expression phénotypique hétérogène [62].

En effet, dans une population bactérienne présentant une résistance hétérogène, toutes les cellules possèdent les gènes de résistance à la méthicilline, mais seules quelques bactéries parmi des milliers expriment cette résistance à la méthicilline.

L'inactivation des gènes auxiliaires *Fem* dans les souches de SARM transformerait l'expression phénotypique de la résistance homogène à la méthicilline en résistance hétérogène. De plus, de nombreux facteurs expérimentaux influencent le phénomène de la résistance hétérogène comme le pH, la concentration de NaCl, la température, l'osmolarité et la bêtalactamine utilisée, ce qui complique la détection de la résistance en laboratoire par les méthodes traditionnelles.

Certaines méthodes, comme la méthode de dépistage en gélose (agar screen), sont plus sensibles et plus aptes à repérer la résistance à l'oxacilline ou à la méthicilline (NCCLS 1993). Des études récentes, basées sur les contrôles de qualité externe en Ontario et au Québec, relatent le faible taux de réussite des laboratoires dans la détection de la résistance de souches de SARM avec de faibles concentrations minimales inhibitrices, c'est-à-dire de 8 à 16 µg/ml [63].

La méthode de diffusion en gélose et certains systèmes automatisés semblent être des techniques d'analyse pour ces souches.

NB : Certaines souches de *S. aureus* possédant le gène *MecA* ont été reconnues comme sensibles à la méthicilline, ce qui laisse penser que le gène *MecA* n'est pas suffisant pour établir la résistance à la méthicilline.

IV.2.Résistance à la Méthicilline :

Le SARM (parfois appelé «germe résistant aux antibiotiques») signifie *staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. C'est une bactérie de la famille du *staphylococcus aureus*.

Le staphylocoque doré (SD) est un type de bactérie courant. Environ 1 personne sur 3 le porte à la surface de la peau ou dans le nez sans développer d'infection ; cela s'appelle être « colonisé » par la bactérie. Cependant, si la bactérie SD pénètre dans le corps par une plaie, elle peut causer une infection.

La méthicilline est un antibiotique utilisé pour lutter contre le SD. Les bactéries SARM sont des bactéries SD résistantes à la méthicilline (et généralement aux autres antibiotiques généralement utilisés pour soigner les infections dues au SD). Le SARM ne résiste pas entièrement aux antibiotiques. Il se peut que vous ayez à prendre des antibiotiques plus longtemps, à un dosage supérieur ou un antibiotique auquel le SARM n'est pas résistant **(Boyce 1998)**.

La recherche de la résistance à la méthicilline ou recherche de souches methi-R est essentielle dans l'antibiothérapie anti-staphylococcique.

En effet ce sont des souches qui présentent une multi-résistance simultanée à la plupart des antibiotiques actifs sur les staphylocoques, notamment l'érythromycine, la clindamycine, les tétracyclines, le chloramphénicol, la gentamicine, les bêta-lactamines en général [25].

IV.3.Les infections au SARM chez les grands brûlés :

Généralement, les infections du SARM ne se développent pas chez les personnes en bonne santé. Elles sont plus courantes chez celles qui sont déjà hospitalisées car la bactérie trouve souvent un point d'entrée dans le corps, tel qu'une plaie issue d'une brûlure du 2ème ou 3ème degré.

Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) aggravent le pronostic et compliquent de manière sérieuse la prise en charge des staphylocoques. De ce fait, elles représentent un problème de santé publique majeur.

La bactérie SARM se répand habituellement par contact avec une personne ayant l'infection du SARM ou colonisée par la bactérie. Elle peut aussi se répandre par contact avec des objets touchés par une personne infectée par le SARM. Les personnes les plus exposées au SARM sont celles ayant une plaie, **une brûlure ou** une coupure ouverte ; celles qui ont un problème de peau grave telle que le psoriasis ; celles qui ont un système immunitaire affaibli (personnes âgées, personnes ayant une maladie de longue durée telle que le cancer, etc.) ; celles qui ont un cathéter ou une perfusion ; celles qui ont été opérées récemment. Bien que les infections du SARM se développent généralement chez les personnes hospitalisées, il peut arriver que le personnel hospitalier et les visiteurs soient infectés s'ils font partie de l'un de ces groupes à risque[25].

V. Les Polyphénols :

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite[34].

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains pour prévenir, soigner ou soulager divers maladies.[35,36].

L'action de ces plantes médicinales sur l'organisme dépend de leur composition en substances chimiques actives dont elles contiennent des centaines voire des milliers de principes actifs à savoir : les alcaloïdes et les polyphénols (les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tanins...). [34].

La famille des polyphénols devient le point de départ de toutes les recherches scientifiques en particulier la découverte de nouvelles substances naturelles bioactives.

Les composés phénoliques ou les polyphénols(PP) sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués, possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures différentes connues [37,38].

Tous les polyphénols ont une structure chimique identique, ils sont constitués d'un ou plusieurs noyaux aromatiques à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) dont en fonction du nombre de ces noyaux et des éléments qui les relient, les polyphénols sont classés en différents groupes[39]. La figure 02 montre les différentes classes des polyphénols.

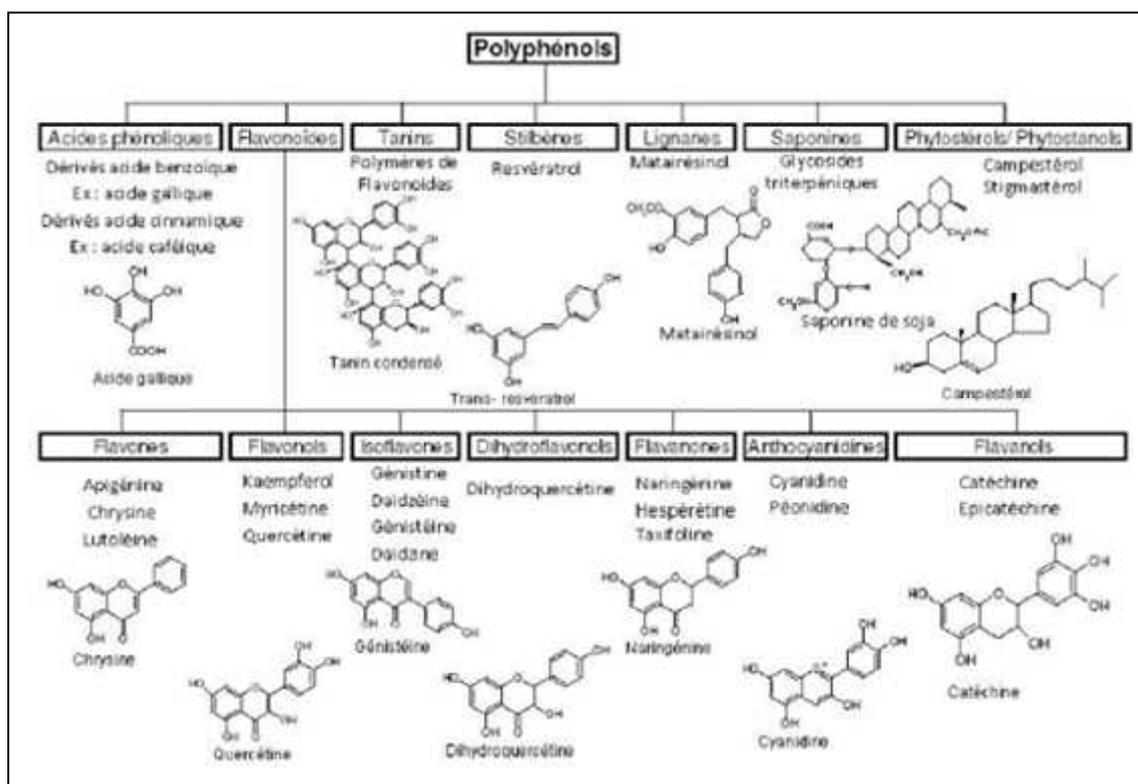


Figure 02 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe[39].

Ces différentes classes des composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes.[40]. Ils trouvent d'ores et déjà une large utilisation en phytothérapie. Pour autant, leur connaissance est encore imparfaite. Ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies liées au vieillissement : infarctus du myocarde, cancers, maladies neurodégénératives et beaucoup d'autres maladies. Le tableau N° 02 Résume quelques activités biologiques des polyphénols.

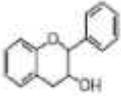
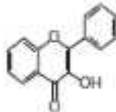
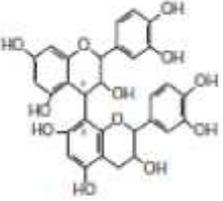
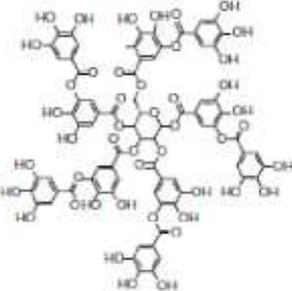
Tableau 02 : Activités biologiques des composés polyphénoliques[41].

POLYPHENOLS	ACTIVITES
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et Antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes

V.1. Activités antimicrobiennes des polyphénols :

Les polyphénols sont des composés principaux antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action diverses et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'une grande catégorie de microorganismes procaryotes et eucaryotes (bactéries et champignons)[42].

Tableau 03 :Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne[43].

Composés phénoliques et leurs structures	Microorganismes sensibles	Exemples
 <p>Flavane-3-ol</p>	Bactéries	<i>V.cholerae</i> , <i>S.mutans</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>C.perfringes</i> , <i>E.coli</i> , <i>B.Cereus</i> , <i>H.pylori</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>A.naeslundii</i> , <i>P.oralis</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>P.melaninogenica</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>C.pneumonia</i>
 <p>Flavonole</p>	Virus	Adénovirus, Entérovirus, Flu virus.
	Champignons	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporumgypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .
 <p>Tannins condensés</p>	Bactéries	<i>S.mutans</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> .
	Virus	Virus de l'influenza A, type -1 herpes simplex virus (HSV).
	Bactéries	Différentes souches de: <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>E.coli</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Campylobacter</i> ,

Tannins hydrolysables		<i>Lysteria.</i>
	Virus	Le virus Epstein-Barr, les virus Herpes HSV-1 et HSV-2.
	Champignons	<i>Candida parapsilosis.</i>

II. Partie expérimentale

Matériels et méthodes :

I. Matériel :

1. Matériel utilisé au laboratoire :

L'ensemble du matériel et des produits utilisés au laboratoire seront cités au sein des techniques au fur et à mesure de leurs utilisations.

2. Matériel biologique :

2.1. Souches bactériennes :

Il s'agit d'une étude prospective portée sur 7 souches bactériennes issues de plusieurs prélèvements de différentes personnes brûlées dont l'âge et le statut de santé sont différents. Ces souches proviennent de différents établissements hospitaliers de la wilaya d'Annaba. Toutes les informations concernant la répartition de ces souches sont rapportées dans le tableau N°4.

Tableau N°4 : la répartition des souches selon la nature du prélèvement, le service, l'âge et le sexe du patient.

Souche	Nature des prélèvements	Age (années)	Sexe	Service
A	Pus	3	M	R/P
B	Sang	24	M	G.B
C	Sang	24	M	G.B
D	Sonde urinaire	75	M	R/M
E	Sang	22	M	G.B
G	Sang	36	M	G.B
H	Pus	1	F	R/P

M : Masculin F : Féminin G/B : Grand brûlé R/P : réanimation pédiatrique.

NB : la souche F correspond à la souche de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC29213.

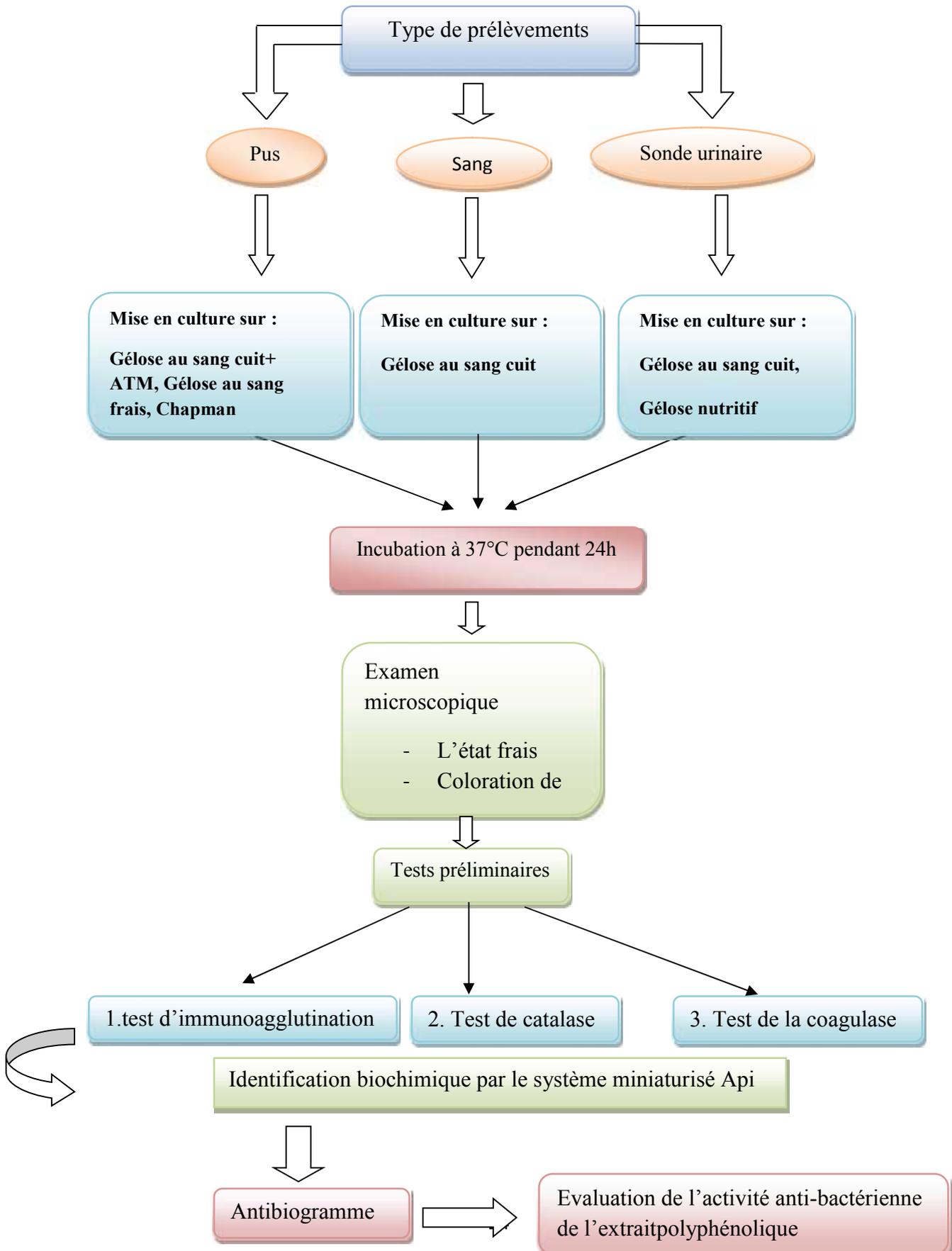
1.2. Plante étudiée :

La récolte de la plante appartenant à la famille des Fabacées a été effectuée dans la région de Collo de la wilaya de Skikda durant le mois d'avril de l'année 2016. La plante fraîchement récoltée a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré, après une semaine, les feuilles sèches sont conservées dans des sacs en papier propres et aérés jusqu'à leur usage.

Notre étude expérimentale a été réalisée durant la période du mois de Mai au mois de septembre de l'année 2016 au niveau du laboratoire de microbiologie de l'hôpital pont blanc à Annaba.

II. Méthodes :

Le protocole suivi lors de notre travail expérimental est le suivant :



1. Isolement :

L'isolement a été réalisé du prélèvement de :

- **Sang:**

Le prélèvement sanguin est obtenu dans un flacon contenant un anti coagulant et un bouillon d'hémoculture (enrichissement du prélèvement).

Les flacons sont incubés à 37° pendant 24h (Jour2/J2) puis agité manuellement afin de favoriser la croissance de germes oxydatifs si elles existent.

- **Mise en culture :**

A l'aide d'une seringue prélever 1ml du mélange sang-bouillon, l'ensemencement sur gélose au sang cuit par le dépôt d'une goutte de sang est sur l'extrémité de la boîte de pétrie et en trois cadrant à l'aide d'une pipette Pasteur flambée au bec bensen et l'incubé à l'étuve à 35° pendant 24h.

Réensemencer le prélèvement sur gélose au sang cuit (GSC) à J5 et à J7 si Les flacons sont incubés à 37° pendant 24h (Jour2/J2) puis agités manuellement afin de favoriser la croissance de bactéries oxydatifs si elles existent.

- **Pus :**

Le pus est obtenu dans un écouvillon.

- **Mise en culture :**

Décharger l'écouvillon contenant le pus en un seul cadrant (1^{er}) sur les milieux suivants :

- Gélose au sang cuit + Aaztreonam
- GSF (gélose au sang frais).
- Un milieu sélectif pour les staphylocoques : Chapman.

Poursuivre l'ensemencement du pus à l'aide d'une pipette Pasteur jusqu'au 4^{ème} cadrant dans chaque milieu.

- **sonde urinaire :**

Le bout de sonde est obtenu dans un tube stérile.

- **Mise en culture :**

Selon la technique de Brun-Buisson qui consiste à:

- Recueillir le bout de sonde dans 1 ml d'eau physiologique stérile.
- Agitation ou vortex, étaler 10 μ l (anse calibrée) sur GSC et sur GN.
- Après 24h les bactéries poussent sur les milieux précédent, celles qui donnent un aspect de staphylocoques seront ré-isoler sur Chapman pour purifier la souche, incubation à 35°C pendant 24h.

2.Examens microscopique :

2.1.Examen a l'état frais :

- **Principe :**

L'examen à l'état frais, permet de visualiser la morphologie, la mobilité ainsi que le mode de regroupement des staphylocoques.

- **Méthode :**

- Sur une lame propre nettoyée avec de l'alcool, on dépose une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prendre quelques colonies bien isolées à partir de la culture sur GSC après incubation, à l'aide d'une pipette Pasteur flambé au bec benzène.
- Déposer les colonies sur la goutte d'eau physiologique.
- Un étalement de l'échantillon à l'aide de la pipette permet son homogénéisation.
- Recouvrir avec une lamelle l'échantillon.
- Observation sous microscope optique (objectif×40).

➤ **Lecture :**

A l'issu de cet examen microscopique, on peut observer la forme, le mode de regroupement et la mobilité des bactéries

2.2. Coloration de Gram :

➤ **Principe :**

C'est une coloration complexe et différentielle qui divise les bactéries en deux classes : Gram + et Gram- en se basant sur la différence de la perméabilité des bactéries à l'alcool, donc sur la composition chimique de la paroi en lipides qui sont élevés (20%) chez les Gram- et faibles chez les Gram+. Elle permet aussi de mettre en évidence les caractères morphologiques (la forme en bâtonnet ou cocci et la taille) des bactéries ainsi que leurs arrangements cellulaires [27].

➤ **Méthode:**

- Préparation du frottis : Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile, une à deux colonies à partir d'une culture jeune de 24 heures.
- Réaliser un frottis bactérien en étalant l'échantillon sur une lame de verre stérile contenant quelques gouttes d'eau physiologique.
- Fixer la préparation au bec benzène (flambage).
- Couvrir le frottis bactérien avec un premier colorant : violet de Gentiane,
- Laisser agir pendant une minute.
- Eliminer l'excès du colorant par un rinçage à l'eau courante.
- Recouvrir le frottis avec le Lugol (mordant)
- Laisser agir pendant une minute.
- Rincer à l'eau courante.
- Décolorer à l'alcool 95% jusqu'à ce que les dernières gouttelettes d'alcool qui s'écoulent deviennent incolores.
- Rincer à l'eau courante pour éliminer l'excès d'alcool.
- Recouvrir le frottis d'un deuxième colorant : la Fuschine et laisser agir pendant 30 secondes.
- Eliminer l'excès de « Fuschine » par un rinçage abondant à l'eau courante.
- Sécher la lame entre deux feuilles propres de papier buvard.

- Observer au microscope optique à l'objectif ($\times 100$) après avoir déposé une goutte d'huile de cèdre.

➤ **Lecture :**

A l'issue de cette coloration, on peut distinguer ; soit des bactéries colorées en rose (Gram-) ou bien des bactéries colorées en violet (Gram+)[27].

II.3. Test d'Immuno-agglutination (Staphaurex) :

➤ **Principe :**

Le latex test Staphaurex Plus* se présente sous forme de particules de latex jaunes recouvertes de fibrinogène et d'immunoglobulines G (IgG) de lapin spécifiques anti *S.aureus*. Lorsqu'une goutte de réactif est mélangée avec des organismes *S. aureus* sur une carte de réaction, une agglutination rapide apparaît du fait de l'interaction entre le fibrinogène et le facteur d'agglutination, la fraction Fc de l'IgG et la protéine A ou l'IgG spécifique et les antigènes de surface[30].

➤ **Technique :**

- Bien agiter et vérifier l'absence d'agrégats dans les réactifs au latex avant utilisation.
- Pour chaque échantillon, placer une goutte de latex test sur un cercle d'une carte de réaction et 1 goutte de latex contrôle sur un autre cercle, les compte-gouttes sont tenus verticalement pour une distribution précise de gouttes.
- A l'aide d'un bâtonnet d'homogénéisation, prélever une quantité suffisante de colonies d'une culture pure ou de colonies bien isolées, pour couvrir l'extrémité plate du bâtonnet. Il convient, à titre indicatif, de prélever une quantité de culture équivalente à environ 6 colonies de taille moyenne.
- Emulsionner l'échantillon de culture dans la goutte de latex test en frottant avec l'extrémité plate du bâtonnet.
- Etaler le latex sur environ la moitié de la surface du cercle.
- A l'aide d'un autre bâtonnet, émulsionner un échantillon similaire de culture dans le latex contrôle comme décrit à l'étape précédente.

- Faire doucement osciller la carte jusqu'à 30 secondes en observant l'apparition éventuelle d'une agglutination.
- Jeter la carte de réaction utilisée.

➤ **Lecture :**

Résultat positif : Une agglutination du latex test accompagnée d'une absence d'agglutination du latex contrôle indique la présence de coagulase, de protéine A ou d'antigènes communs de *S. aureus* dans la culture testée.

Résultat négatif : Une absence d'agglutination dans les deux réactifs signifie que la culture analysée n'est vraisemblablement pas de l'espèce *S. aureus*.

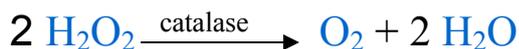
4. Identification biochimique :

4.1. Test catalase :

➤ **Principe :**

Pendant la respiration aérobie, certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce à des enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase.

Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction suivante:



➤ **Technique :**

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes ;
- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, ajouter l'inoculum bactérien (quelque colonies);
- Observer immédiatement ;

➤ **Lecture :**

Les bulles correspondent au dégagement gazeux de dioxygène O₂.

- Apparition de bulle  catalase +
- Absence de bulles  catalase -.

II.4.2. Test de la staphylocoagulase:

➤ Principe :

Ce teste a pour but de déterminer la pathogénicité d'un staphylocoque, les espèces de ce type secrètent une enzyme qui est la staphylocoagulase qui a la propriété de coaguler le plasma.

➤ Technique :

- Dans un tube d'hémolyse stérile, on introduit 0.5 ml de plasma humain qui correspond au surnageant issu de la centrifugation du sang humain.
- Ajouter 0.5 ml d'une suspension bactérienne de la souche étudiée (*S.aureus*).
- Placer le mélange à 37°C dans l'étuve pendant 6 heures.

➤ Lecture :

- Coagulation du plasma  coagulase+
- Pas de coagulation du plasma  coagulase-

SCN : *staphylococcus* à Coagulase Négative[31].

II.4.3. L'identification par l'API-Staph (système miniaturisé) :

➤ Principe :

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification [29].

➤ Technique :

• Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Faire sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Préparation de l'inoculum :
 - Ouvrir une ampoule d'API Staph Medium.
 - Préparer une suspension bactérienne homogène, d'opacité égale à 0,5 de McFarland, des cultures jeunes (18-24 heures).
- Inoculation de la galerie:
 - A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Mediumensemencé.
 - Remplir uniquement les tubes et non pas les cupules, sans dépasser le niveau du tube. poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant pour éviter la formation de bulles au fond des tubes.
 - Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
 - Renfermer la boîte d'incubation.
 - Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

➤ **Lecture :**

Après incubation, lire les réactions conformément au Tableau de Lecture tableau N°2 en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

- Test VP : VP 1 et VP 2. Attendre 10 minutes.
 - Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive.
 - Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.
- Test NIT : NIT 1 et NIT 2. Attendre 10 minutes.
 - Une coloration rouge indique une réaction positive.
- Test PAL : ZYM A et ZYM B. Attendre 10 minutes.
 - Une coloration violette indique une réaction positive.

Noter les résultats sur la fiche de résultats.

Tableau N°5 : Lecture de la galerie API Staph .

Tests	Composants Actifs	Réaction d'enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	
Glu Fru Mne Mal Lac Tre Man XLT Mel	D-glucose D-fructose D-mannose Maltose Lactose D-tréhalose D-mannitol Xylitol D-melibiose	Acidification à partir du carbohydrole.	Rouge	Jaune
Nit	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	Nit ₁ + Nit ₂ pendant 10 min	
			Incolore ou Rose pâle	Rouge
Pal	B naphtyle Acide phosphate	Phosphate alcaline	ZymA+ZymB pendant 10min	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone methylocarbinol	VP ₁ + VP ₂ pendant 10 min	
			Incolore	Violet ou Rose
RAF Xyl Sac MDG NAG	Raffinose Xylose Saccharose α -méthyle de glucide N-acétyle glucosamine	Acidification à partir du carbone hydrate	Rouge	Jaune
<u>ADH</u> <u>URE</u>	Arginine Urease	Arginine dihydrolase Urease	Jaune ouJauneOrange	Rouge ou Violet

4. L'antibiogramme :

L'antibiogramme se fait par méthode de diffusion en milieu solide, c'est une méthode qui reflète l'aspect qualitatif de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques.

Selon les recommandations de l'organisation mondiale de la santé on préconise d'adopter la méthode des disques selon la CLSI (Committee for Laboratory Standard Institut) 2012[21].

4.1. Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, et bien homogénéiser la suspension bactérienne, jusqu'à obtenir une opacité équivalente à 0.5 Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'inoculum doit être ensemencé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

4.2. Ensemencement :

- Le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidie à 45°C coulé en boîte de pétrie à une épaisseur de 04 mm pour la solidification.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube sans oublier de le faire pivoter, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois en tournant l'écouvillon en lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

La souche de référence est ensemencée pour tester la fiabilité des antibiotiques utilisés ; *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

4.3. Application des disques d'antibiotique :

Elle est réalisée à l'aide d'un distributeur pasteur automatique (applicateur).

La liste des antibiotiques à tester, établie selon la bactérie considérée, et selon leur disponibilité est représenté dans le tableau N°6.

Il ne faut pas mettre plus de six disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm de diamètre.

Les disques d'antibiotique doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.

4.4. Incubation :

Pendant 18h à 35°C.-

4.5. Lecture :

Mesurer en millimètre avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique et comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans le tableau de lecture Tableau N°6. Classer la bactérie dans l'un des catégories : Sensible, intermédiaire, résistante.

Tableau N°6 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques pour les staphylocoques [2].

Antibiotiques Testés	Abréviation	Charge du disque en µg	Diamètre critique		
			Résistant	Intermédiaire	Sensible
Les bêtalactamines					
Penicilline	P	6	≤28	-	≥29
Oxacilline	OX	5	≤17	-	≥18
Céfoxitine	FOX	30	≤14	15-17	≥18
Les aminosides					
Gentamycine	GM	15	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamycine	K	30	≤13	14-17	≥18
Tobramycine	TMN	10	≥ 20		< 20
Les quinolones					
Ofloxacin	OFX	5	≤16	17-21	≥22
Les macrolides					
Erythromycine	E	15	≤13	14-22	≥23
				-	
Les glycopeptides					
Vancomycine	VA	30	≤9	10-11	≥12
Teicoplanine	TEC	30	≤17	-	≥18

I-5- Recherche de la résistance à la méthicilline (Test de screening à l'oxacilline):

➤ Milieu :

Gélose MH additionné de 4% de NaCl et de 6µg d'oxacilline.

➤ Préparation de la solution d'oxacilline :

Diluer 6 mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis faire une dilution au 1/10^{ème}.

Prendre 2 ml de cette solution dans une boîte de Pétri de 90mm de diamètre, ajouter 18ml de gélose MH additionnée de 4% de NaCl.

Mélanger en faisant des mouvements rotatoires. Laisser solidifier puis sécher les boîtes à l'étuve.

➤ Inoculum :

A partir d'une culture pure de 18 h sur milieu d'isolement, préparer une suspension bactérienne en eau physiologique à 0,9% d'une opacité équivalente à 0,5 Mc Farland. L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ Ensemencement :

L'ensemencement se fait par spot, en appliquant verticalement, sur la gélose, l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne (ou ensemencer un cadran entier).

Les souches de référence doivent être testées dans les mêmes conditions :

S.aureus ATCC 29213 sensible à l'oxacilline.

S.aureus ATCC 43300 résistant à l'oxacilline.

Incubation : 24h à 35°C en atmosphère ordinaire.

➤ Lecture : La culture de plus d'une colonie de la souche test indique une résistance à l'oxacilline, impliquant la résistance à toutes les bêta-lactamines[44].

III. Etude de l'activité antibactérienne d'un extrait végétal :

Notre étude a porté sur un extrait brut poly phénolique d'une plante médicinale de la famille des fabacées très utilisée par la population pour traiter de nombreuses affections de la peau notamment les brûlures.

L'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles sèches de notre plantes a été faite par une macération dans une solution hydro-méthanolique à 80%. Le rapport solvant/matériel végétal était de (10/1 : ml/g) [17]. Cette macération a été faite en trois jours successifs avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Ceci pour permettre une meilleure extraction des composés phénoliques.

Après filtration, les filtrats sont soumis à une évaporation à basse pression à 65°C pour éliminer le maximum de solvant et de concentrer l'extrait. Ce dernier est laissé au réfrigérateur pendant 24heures, afin de décanter les cires, les boues, les lipides risquant de gêner la suite des opérations. La phase limpide a ensuite subit un lavage par l'éther de pétrole (v/v) (l'opération est répétée 3fois) pour se débarrasser encore des cires, des lipides et de la chlorophylle[4,5]. La **figure n°3** illustre le protocole expérimental suivi.

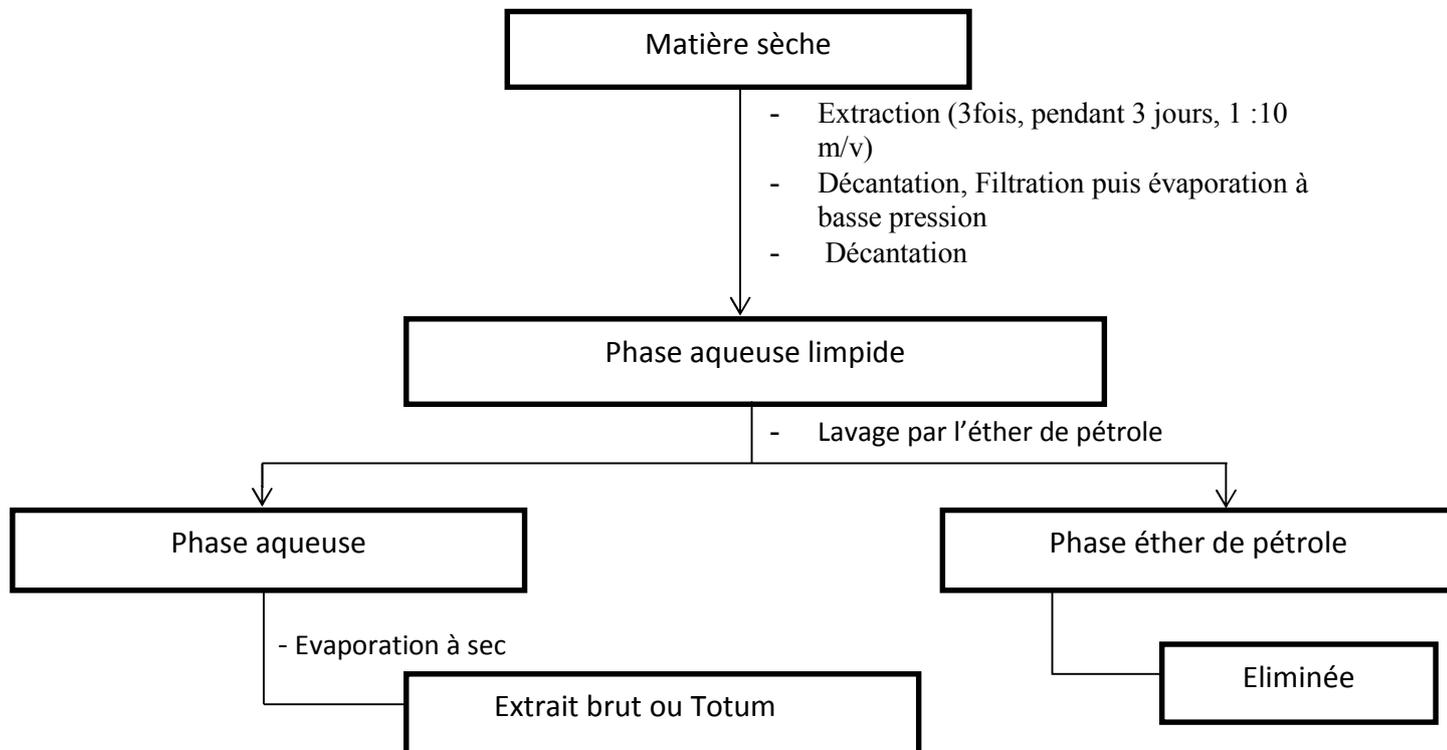


Figure 03: Protocol d'extraction des poly phénols totaux

Après lavage, l'extrait est subit une autre fois une évaporation à sec et a été repris dans un solvant organique (DMSO) puis conserver dans des tubes stériles à 4°C avant la réalisation des tests antibactériens.

1. Test de l'activité anti bactérienne :

L'étude de l'activité antibactérienne des polyphénols *in vitro* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* a été réalisée par deux méthodes :

- La méthode de diffusion en milieu solide.
- La méthode de dilution en milieu solide (incorporation) ; qui permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentration de l'extrait incorporé dans le milieu de culture.

a- La méthode de diffusion en milieu solide

➤ Principe

Cette méthode est inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des extraits végétaux par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier buvard ou de cellulose imprégné d'extrait ou de produit à base d'extrait végétal.

➤ Technique

1-Préparation des dilutions d'extrait

L'extrait a été dissous dans un solvant organique (diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives à raison de 1/2, sachant que la concentration de la solution mère est de 40mg/ml.

On a opté pour le DMSO pour son innocuité vis-à-vis de microorganisme, et pour l'absence d'interférence avec les extraits.

2- Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé de la même façon que celle de l'antibiogramme.

3- Ensemencement

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé Mueller Hinton en surfusion a été coulé aseptiquement à raison de 18ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile a été imbibé dans la suspension bactérienne et étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum, après des disques stériles imprégnés de la solution mère de notre extrait à raison de 10µl par disque[45].; ont été déposés à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose. Des témoins imbibés seulement par le DMSO ont été réalisés. Les boîtes ont été incubées 24 h à 37 °C.

4- Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone de diamètre qui est représentée par une auréole formée autour de disque ou aucune croissance n'est observée.

b-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée[46].Elle été déterminée par la méthode de dilution en milieu solide ; décrite par [47]et rapporté [48].Et qui consiste à disperser l'extrait à des concentrations variable dans le milieu gélosé avant sa solidification, donc une gamme de concentration des extrait dilués dans le DMSO a été préparé, chaque dilution (2 ml) a été incorporée à 18 ml de MH maintenu en surfusion. Aussitôt, le mélange a été réparti dans des boîtes de pétri.

Après solidification du milieu, l'ensemencement a été exécuté par des spots à l'aide d'une pipette Pasteur. L'ensemble a été incubé 24h à 37C°. Un témoin de croissance a été réalisé.

Résultats et discussion

I.Résultats :

1.Aspect des colonies :

- **Sur Gélose au sang cuit:**

Après incubation des 07 souches à 37°C pendant 18 à 24 h les résultats sont reproduits dans le **tableau N°7** et **figure n°4 et n°5**.

Tableau N°7 : Résultats de l'incubation à 37°C sur les géloses utilisées.

La gélose au sang cuit	Gélose Chapman
<p>Les colonies sont de taille moyenne, blanchâtre, rondes, lisses, bombées, à contour régulier toutes les souches présentent un aspect muqueux.</p>	<p>Les colonies sont de petite taille, lisses, rondes, bombées et opaques.</p> <p>Les colonies apparaissent pigmentées en jaune ceci est due à la fermentation du mannitol présent dans le milieu</p>



Figure N°4 : Aspect des colonies sur gélose au sang cuit.



Figure N° 5 : Aspect des colonies sur Chapman.

- **2. Examens microscopiques ::**

Les résultats obtenus après observation à l'état frais et la coloration différentielle de Gram des 30 souches testées sont démontrés dans le **tableau N°8** et la **Figure N° 6**.

Tableau N°8 : Résultats des examens microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram.

Observation à l'état frais	Observation après coloration de Gram
<p>07 souches présentent sous une forme de cocci, immobile, disposés en amas, en diplocoques et en grappes de raisin.</p>	<p>Les 07 souches sont des cocci colorées en violet</p> <p> Cocci à Gram positif.</p>



Figure N° 6: observation de la souche A après coloration de Gram sous microscope optique (objectifx100).

3. Résultats de la recherche des enzymes respiratoires :

- **Catalase**

On remarque l'apparition de bulles donc les colonies sont catalase+, alors que le témoin négatif (F) est dépourvu de bulles donc catalase – sur la **figure N°7**.



Figure N°7 : test catalase E :souche à identifier,F :témoin ATCC25923.

4. Résultats de la recherche de la coagulase :

On remarque la formation d'un coagulum au fond du tube contenant les souche à identifier donc elles sont coagulase +, alors que le tube contenant le témoin SCN ;staphylocoque acoagulase négatifreste visqueux donc absence de coagulum et par conséquencecoagulase -.

La figure n°8 démontre les résultats obtenus.



Figure N°8 : test de coagulase G : souche à identifier SCN : témoin staphylococcus a coagulase négative.

Les résultats pour le reste des souches (6 restante) est identique a celui de la souche G, toujours une coagulation+ et donc elles sont toutes coagulase+.

4. Test d'immunoagglutination IgG spécifique anti *S.aureus* du lapin et protéine A staphylocoque (supplémentaire) :

On observe une agglutination franche au niveau de la souche A donc la souche A correspond au *Staphylococcus aureus*, alors que le contrôle négatif est marqué par une absence d'agglutination Sur la **Figure N°9**.



Figure N° 9: Test d'agglutination(staphaurex),

A : souche a identifié ; Contrôle négatif : contrôle - d'agglutination.

Ce test a été effectué sur les 07 souches et le résultat est toujours une immuno-agglutination franche tel que celle de la souche A, donc des *staphylococcus aureus*.

Sur la base d'un virage du milieu Chapman en jaune doré, et suite à une coloration de Gram qui nous permet d'observer des cocci à Gram positif, ainsi que la présence d'une staphylocoagulase. Ces résultats nous orientent vers des souches du genre staphylocoque. Et l'immunoagglutination de la protéine A et les IGg du sérum de lapin nous oriente vers l'espèce *aureus* car il existe les faux positif en immuno-agglutination (souches sauvages d'autre espèce)

Pour la confirmation de l'espèce, ces souches ont été testées par le système API-Staph.

5. Identification par le système APIstaph (système miniaturisé) :

Les résultats des souches testées par le système APIstaph sont représentés dans la figure n°10.

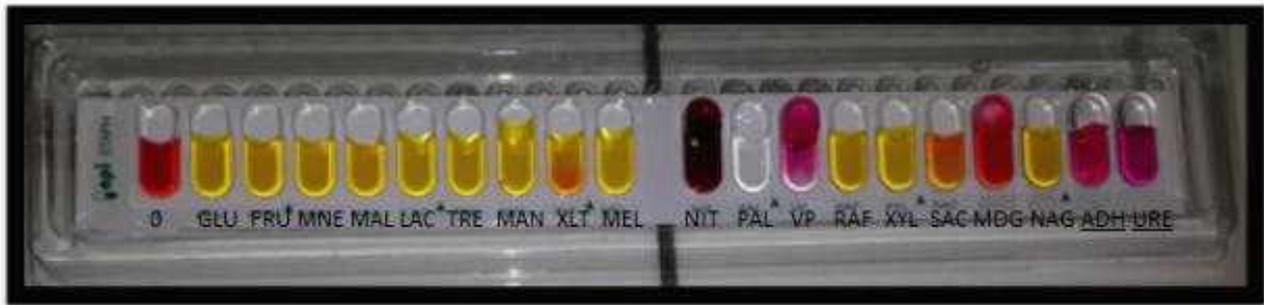


Figure N°10 : Illustration du profil biochimique de la souche A identifiée par système API staph.

Après l'utilisation du logiciel Excel d'identification suivant les variations colorées sur le système miniaturisé API staph, les 07 souches testées se sont avérées des *Staphylococcus aureus*.

6. Test de sensibilité aux antibiotiques:

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques selon la méthode de diffusion de disques des souches de *Staphylococcus aureus* testées, sont reportés dans le tableau N°9 et la figure N°11.

Tableau N°9: résultats de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S.aureus* selon les recommandations CLSI.

Souche	P	OX	FOX	VA	TEC	GMN	KMN	TMN
A	S	S	S	S	S	R	R	R
B	R	R	R	S	R	S	S	R
C	R	R	R	S	S	R	R	R
D	S	S	S	S	S	S	S	R
E	R	R	R	S	R	S	R	R
G	R	R	R	S	S	R	R	R
F	S	S	S	S	R	S	S	R
H	R	R	S	S	R	S	S	R

F : souche de référence ATCC25923S : sensibilité R : résistance I : intermédiaire.

7. Screening test a l'oxacilline pour les souche multi résistante(SARM ; *S.aureus* Résistante a la méthicilline : Fox-R ,Oxc-R) :

Les résultats du screening test pour les souches Oxa-R Fox-R c qui sont les souches A,B,C,E ,G et la souche de référence ATCC29213 montre le développement de colonies blanchâtre autour des dépôt de la suspension bactérienne effectué à l'aide d'un écouvillon de la souche B, C ,E, et G c.à.d. elles sont résistantes à laméthicilline ou oxacilline et à tous les bêta-Lactamines mais au niveau de la souche A absence de colonie(s) signifie que la souche A est sensible a l'oxacilline et à tous les bêta-Lactamines.tel que la souche de référence ATCC29213 sensible a l'oxacilline

Les résultats sont représenté sur la **figure N°11**.



Figure N°11: screening test pour les souche A,B,C,E ,G, et la souche ATCC29213.

9. Test de l'activité antibactérienne de l'extrait végétal:

L'activité antibactérienne de l'extrait polyphénolique de notre plante de la famille des fabacées est testée vis-à-vis de sept souches cliniques et une souche de référence ATCC25923 des *staphylococcus aureus* via deux méthodes ; méthode de diffusion en milieu gélosé et celle de dilution en milieu solide.

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait polyphénolique de notre plante exerce un effet antibactérien vis-à-vis de la plupart des souches testées avec des zones d'inhibition et des CMI varient d'une souche à une autre. Les résultats des diamètres d'inhibitions ainsi que des CMI obtenus sont montrés respectivement dans les **tableaux N°10,N°11** et **figureN°12**.

Tableau N°10: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait polyphénolique.

Souches testées	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)	
	Témoin (DMSO)	Extrait poly phénolique
A	-	8
B	-	8
C	-	13
D	-	11
E	-	-
F	-	16
G	-	-
H	-	-

- : Absence de zone d'inhibition ,F : ATCC25923

D'après les valeurs enregistrées, la quasi-totalité des souches bactériennes testées ont montrées une sensibilité à l'extrait qui s'est traduit par l'apparition des zones d'inhibitions varient entre 8mm et 16mm.

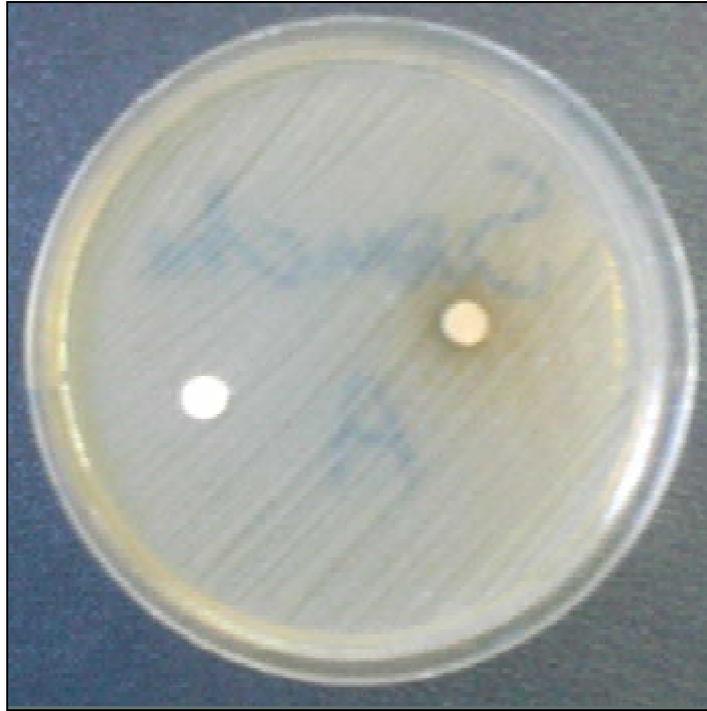


Figure N°13: Zone d'inhibition montre la sensibilité de la souche A de *S.aureus* à l'extrait polyphénolique.

Tableau N°11 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI).

	C1	1/2	1/4	1/6	1/8	1/10	1/12	DMSO
A	S	S	S	R	R	R	R	R
B	S	R	R	R	R	R	R	R
C	S	R	R	R	R	R	R	R
D	S	S	S	R	R	R	R	R
E	R	R	R	R	R	R	R	R
F(ATCC)	S	S	S	S	S	S	R	R
G	R	R	R	R	R	R	R	R
H	R	R	R	R	R	R	R	R

S : la CMI, R : résistante, S : sensible

L'étude a révélé des valeurs de CMI relativement élevées, ce qui témoigne d'un pouvoir antibactérien modéré dont notre extrait polyphénoliquea présenté un effet sur la croissance bactérienne à la solution mère et aux dilutions 1/4 et 1/10 ce qui correspond à une CMI compris entre 40mg/ml et 4mg/ml.

II. Discussion :

Durant notre étude qui s'est déroulée dans le mois de Mai jusqu'au mois de septembre, 07 souches ont été collectées à partir de différents produits pathologiques provenant divers établissements de la wilaya de Annaba. Les examens microscopiques, l'identification biochimique et physiologique par différents tests complémentaires : Catalase, Staphaurex et staphylocoagulase et par des systèmes miniaturisés API, nous a permis de rattacher 07 souches à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

1-Comportement des souches vis-à-vis des antibiotiques :

Afin de déterminer la résistance des souches récoltées aux antibiotiques, un antibiogramme a été réalisé selon les recommandations CLSI applicable à chaque espèce bactérienne, ainsi un test pour rechercher la résistance à la méticiline (le screening test) et le test de Détection de la résistance inductible à la clindamycine par la méthode de diffusion des disques (MLSB).

D'après les résultats obtenus nous avons constaté que :

1- La majorité des souches testées ont révélé à haut niveau de résistance aux différentes molécules des Béta-lactamines ; Oxacilline, Pénicilline.

Ces résultats sont comparables à ceux d'une étude menée par Dr.Cohen et Coll sur des bactéries responsables d'infections urinaires et leur antibiothérapie Cohen et Coll(2007).

On a également constaté un comportement variable des souches vis-à-vis la Céfoxitine ; un taux de résistance de 71.42 % qui est beaucoup plus élevé que celui obtenu par une étude de l'organisation mondiale de la santé (OMS) en Algérie durant l'année 2010 avec un taux de 11,7%. La résistance à cette famille d'antibiotiques est due à la production de Béta-lactamases.

2- En ce qui concerne la famille des aminosides le comportement des souches est variable ; on note une sensibilité, avec un pourcentage de 100% concernant l'Amikacine, un comportement variable des souches vis-à-vis de la Kanamycine et la Gentamycine ; un taux de 57.14 % pour la Kanamycine et de 28.57 % pour la Gentamycine, contrairement aux études précédentes qui ont montré que la prévalence de la résistance à cette famille d'antibiotiques est beaucoup plus importante Millet et Coll(2009).

En France, la fréquence de sensibilité des souches de SARM à cette famille d'antibiotique a augmenté depuis 1998. Par exemple, la fréquence de sensibilité à la Gentamicine est passée de 61% en 1998 à près de 90 % en 2002 [64].

Cette résistance est due à l'action d'un plasmide codant 3 enzymes ; phosphotransférase, acetyltransférase et adényltransférase, modifiant la molécule d'antibiotique en la rendant inactive Poole(2005).

3- Pour l'antibiotique de la famille des Quinolone ; l'Ofloxacin, nos souches présentent une sensibilité avec un pourcentage de 100% à ce qui est en accord avec une étude effectuée par Jane R.N en Europe où le taux a été de 86%.

La résistance à cet antibiotique est due à une mutation chromosomique au niveau de la cible des Quinolones qui est l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase (la fixation des Quinolones sur ces deux enzymes bactériennes donne une inhibition rapide de la synthèse et la réplication de l'ADN). Elle est due aussi à une imperméabilité de la membrane de la cellule bactérienne aux Quinolones Euzéby (2001) et Poole (2005).

4- Concernant la famille des Macrolides, nos résultats ont montré un comportement variable avec une résistance de 28.57 % à l'Erythromicine contrairement aux résultats obtenus récemment, un taux de 46.2 % [49] qui reste moins important que celui constaté aux USA 66 % [50].

La résistance à ce type d'antibiotique est due d'une part, à une modification de la cible ribosomale et d'autre part, au mécanisme d'efflux.

5-Alors que pour la famille des glycopeptides, la majorité des souches de *S.aureus* ont présenté une sensibilité importante pour la Vancomycine et la Teicoplanine, sauf la souche E qui s'est avérée résistante à la Vancomycine.

6- La totalité de nos souches a montré une sensibilité au Chloramphénicol avec un taux de 100%. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par [51].

Cette résistance est due à une acétylation du chloramphénicol par un acétyl transférase [52].

Nos résultats sont en accord avec ceux de [53] qui ont testé l'activité antimicrobienne des polyphénols de la plante *Cuminumcyminum*, de la région de Batna (Algérie) par la méthode de diffusion sur une variété d'espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées en milieu hospitalier : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiellapneumoniae* et *Streptocoque sp*. Les résultats obtenus ont prouvé que les souches de *S.aureus* ont révélé une zone d'inhibition relativement faible entre 9 et 16 mm de diamètre.

Les zones d'inhibition de croissance bactérienne d'un extrait poly phénolique peut être affectées par sa solubilité et par son degré de diffusion dans la gélose

D'autres études faites par [54] sur l'activité antimicrobienne des poly phénols d'une plante médicinale *Thymus vulgaris* par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur les deux souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, ont donné des résultats qui ne sont pas en accord avec nos résultats avec des zones d'inhibitions plus large que les notre qui varient de 19 à 38 mm.

La différence de sensibilité des souches bactérienne étudiées aux extraits poly phénolique de notre plante et de celle-ci de *thymus vulgaris* peut s'expliquer par la composition des poly phénols qui sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité [55]. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [56].

En outre, l'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques [57]. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés [58].

Conclusion :

Notre étude a porté sur l'identification de 07 souches bactériennes isolées à partir de différents prélèvements pathologiques (sang, sonde urine et pus) et l'étude de leur comportement vis-à-vis des antibiotiques testés ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des polyphénols d'une plante médicinale de la famille des fabacées.

D'après les résultats que nous avons obtenu nous pouvons conclure que :

Staphylococcus aureus est une bactérie qui se distingue par leurs grandes qualités d'adaptation aux différentes situations environnementales et leur capacité à résister aux différentes familles d'antibiotiques.

L'étude du comportement de ces souches vis-à-vis des antibiotiques appliqués et des tests a montré que toutes ces dernières ont développé des résistances, ce qui confirme le phénomène de propagation de la multirésistance.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des polyphénols a montré, que la quasi-totalité des souches bactériennes testées sont sensibles à l'extrait. Cette sensibilité s'est traduit par l'apparition des zones d'inhibitions varient entre 8mm et 16mm

Ainsi, notre étude a révélé des valeurs de CMI relativement élevées, ce qui témoigne d'un pouvoir antibactérien modéré dont notre extrait polyphénolique, ce qui correspond à une CMI compris entre 40mg/ml et 4mg/ml, ce qui nous emmène à conclure que les polyphénols ont une forte activité antibactérienne et notre plante pourraient probablement rivaliser avec les produits chimiques synthétiques et les antibiotiques.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antimicrobienne de l'extrait de cette plante.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- Faire une étude biochimique sur cette plante.
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments à base de plantes, doués d'une activité antibactérienne.

Références bibliographique

1. **AOUATI ,H.** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* à la méthicilline étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. *Microbiologie appliquée et Biotechnologies microbiennes*, Université Mentouri. Constantine, 2009.
2. **BACHA M.-** Bactériologie et virologie culture cellulaire-biomédicaux. pp : 76.
3. **BANNERMAN T. L., KLEEMAN K. T. ; AND KLOOS W. E.** Evaluation of the Vitek System Gram Positive. *J. Clin. Microbiol*, 1993, 31 (5) : 1322-1325.
4. **BENHAMMOU, N; AtikBekkara, F; Kadifkova, P. (2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*, 29(3), 155-161.
5. **BENHAMMOU, N; AtikBekkara, F; KadifkovaPanovska, T. (2009).** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*, *C. R. Chimie* 12:1259–1266.
6. **BLOCK .P, AND CIE.** Catalogue Poly-labo, ed. 1994.
7. **BRUN Y. ET BES M.** Méthodes diagnostiques des *Staphylocoques* coagulase négatifs. *Med. Mal. Inf.* 1990, hors série Mars : 16-23
8. **CHARACHON, S.** Relation hôte-bactérie. *Bactériologie*. Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes, 2007, 7p.
9. **DELARRAS, C.** Pratique en microbiologie de laboratoire recherche de bactéries et de levures-moisissures. *LAVOISIER*, 2014, Paris, vol 772, p 596.
10. **DERY, B.** corps humain. In: *Le Dictionnaire visuel*, 2005-2009, vol 3.
11. **DIAMONET, F.,** 2002.- *Dictionnaire Larousse médicale*. pp : 831.
12. **FERRON A .** Bactériologie médicale. Editions C et R , 15ème ed , 1994.
13. **FLEURETTE, J.** *Staphylocoques et microcoques*. Bactériologie médicale. mal., med. Science, Paris 1ère ed 1982.
14. **FOURNIER J. M.** *S. aureus* Incryz S. J. Jr ; vaccines and Immunotherapy Pergamon Press, 1991 : 166-177.
15. **KLOOS W. E. AND LAMBE JR .D .W.** *Staphylococcus* In manual of clinical microbiology, 4th ed Am. Soc. For Microbiology , 1981 : 222-235.
16. **LEYRAL.G,E.Vierling;** *Microbiologie et Toxicologie des aliments ; Première partie : microbiologie des aliments*, France, 2007. p 44 .
17. **MARSTON A., Hosttmann K. (2006).** Separation and Quantification of Flavonoids. In "Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylors and Francis: 1-36.

18. **MAY HALL C. G.** Prevention and control of Vancomycin resistance in Gram Positive coccalmicroorganisms :fire fighting. *Infect. Contro. Hosp. Epidemiol.* 1996, 17 : 353-355.
19. **NOVICK R. P.** Staphylococci In *Microbiology*, 4th ed, 1990: 539-560.
20. **PAULINE, R.** L'implication du laboratoire dans la médecine des grands brûlés. *Santé. Lausanne, école supérieur de Santé*, 2009, 75p.
21. **RAHAL, K.** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. *INSP Algérie 5ème édition*, 2008.
22. **VERRIENTI, R.** Protocole de maitrise des infections chez les grands brûlés. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 1996, vol IX, p3.

Autres références :

23. http://www.medbc.com/annals/review/vol_17/num_1/text/vol17n1p25.asp
24. www.wikipedia.com
25. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/staph.html>
26. www.nhs.uk
27. Le bouvard V., 2009. - Entérobactéries VP+. *Bull Inst.Past.* pp : 1300.
Catalase : N. Troillet, M.C. Eisenring, F. Bally. *Staphylocoque dorés multirésistants en pratique ambulatoire. Caduceus express*, Juillet/ Aout 2005, N° 7.
28. N. Troillet, M.C. Eisenring, F. Bally. *Staphylocoque dorés multirésistants en pratique ambulatoire. Caduceus express*, Juillet/ Aout 2005, N° 7.
29. 07468K - fr - 2009/11. -Système d'identification des staphylocoques, microcoques et apparentés, bioMérieux SA Français – 2.
30. *Antibiogramme. Pasteur en diffusion, Recommandations techniques et guides.*
31. Diamonet F., 2002.- *Dictionnaire Larousse médicale.* pp : 831.
32. *Standardisation des tests de sensibilité des antibiotique à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire).* 7ème édition, 2014.
33. <http://www.santé.dz/aarn/index.htm>.
34. Iserinet *al*, 2001.
35. Elqajet *al*, - 2007
36. Farnsworth *et al*, 1986.

37. Bahorun, 1997.
38. Akowauhet *al*, 2004.
39. Boros, 2010.
40. Beta *et al*, 2005.
41. Bahorun, 1997.
42. Cowan, 1999.
43. Daglia, 2011.
44. Ammari *et al*, 2015.
45. Ngameniet *a.*, 2009.
46. Skandamis *et Nyeha* , 2001.
47. Benjilali *et al*, 1986.
48. Billerbeck *et al* 2002.
49. Touatia , 2016.
50. Pillar *et al* ; 2008.
51. Erjavec *et Coll*, 2007.
52. Aujjar *et Coll*, 2006.
53. S. Athamena *et al*, 2010.
54. G. Yakhlef *et al* 2011.
55. Cowan, 1999.
56. Scalbert, 1991.
57. Dhaouadi *et al.*, 2010.
58. Essawi *et Srour*, 2000).
59. Fraimow *et Abrutyn* 1995, Maranan *et al.* 1997, Michel *et Gutmann* 1997.
60. Roy 1997, Shlaes *et al.* 1997.
61. Jorgensen 1991, Michel *et Gutmann* 1997.
62. Chambers 1997.
63. MacKenzie 1995.
64. Bertrand *et al*, 2005.

