

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et
Sciences de la Terre et de l'Univers



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au
Biomédical et à l'environnement*

« LAMAABE »

MEMOIRE

Présenté par

AISSAOUI Hadjira

KENDOUCI Chaima

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie Fondamentale

Thème

**Effet du venin d'abeille sur des biofilms bactériens
d'origine hospitalière (Synthèse d'articles)**

Soutenu le 02/09/2020, devant le jury composé de :

Présidente	BOUBLENZIA Lamia	Maître de conférences A	Université Tlemcen
Promoteur	HASSAINE Hafida	Professeur	Université Tlemcen
Examinatrice	BELLIFA Samia	Maître de conférences B	Université Tlemcen

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Avant tous nous remercions **Dieu, Allah tous puissant** de nous avoir donné la force, le courage et la volonté pour la réalisation de ce modeste travail.

Nous sommes fières d'exprimer nos très chers remerciements et notre gratitude à nos parents qui, sans leurs soutiens, leurs présences et leurs prières, nous n'aurions pas atteint ce niveau, que Dieu vous protège et vous garde pour nous, vous accorde santé, longue vie et bonheur.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement « LAMAABE » de l'Université Abou Berk Belkaid sous la direction de Madame **HASSAINE Hafida** Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement, et exprimer nos sincères et hautes considérations à Madame **HASSAINE Hafida** pour son encadrement, son orientation, ses conseils, ses efforts dans le suivi et la réalisation de ce travail.

Nous désirons remercier profondément les doctorantes **DIDI Wafaa** et **GAOUAR Sara** pour leurs précieux conseils, leurs disponibilités et leurs gentillesse.

Madame **BOUBLENZA Lamia** Maître de conférences A pour l'honneur qu'elle nous fait a présidé le jury de ce mémoire veuillez trouver ici nos sincères remerciements

Madame **BELLIFA Samia** Maître de Conférences B, Université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail

Un grand merci pour tous les professeurs du département de biologie particulièrement les microbiologistes, merci de nous orienter et nous informer durant notre parcours universitaire.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire,

*A tous les plus proches de mon cœur Source de vie, de bonheur,
d'amour et d'affection.*

Hadjer

Dédicaces

Je dédie cette thèse

A

*L'âme de mon cher père **KENDOUCI Mohammed***

*Ma chère mère **KENDOUCI-LAIREDJ Fatiha***

Source de vie, de bonheur, d'amour et d'affection

Mes chers frères Mebarek et Moustafa et ma chère sœur Samira et son époux Lakhdar

Veillez trouver dans ce modeste travail un témoignage de mon amour et toute ma gratitude, de mon affection la plus sincère et de mon attachement le plus profond. Je vous souhaite une belle vie.

Mes nièces Meriem et Mouad

Mes chères tantes Hafida, Hanane et Imane,

Je vous remercie pour votre soutien et tous vos conseils

Mes précieuses amies,

Je n'oublierai jamais nos moments de joie et de folies passés ensemble

Merci d'être toujours à mes côtés

Merci pour vos conseils et votre soutien durant les moments difficiles

Mon binôme Hadjer,

Avec toi, nous avons pu surmonter tous les problèmes, merci pour les grands moments que j'ai vécu avec toi, pour tes efforts, je te souhaite une vie heureuse.

Toutes les personnes chères à mon cœur.

Chaïma

Résumé

ملخص

سم النحل هو مزيج معقد التركيب لعدة مكونات ذات فوائد علاجية مثل الميليتين الذي يعتبر مكون أساسي ، الذي تفرزه الغدد السامة لعاملات النحل *Apis mellifera*. ان استعمال طريقة اللوحة الزراعية للأنسجة (TCP) من خلال المقالات الخمسة المدروسة لغرض الكشف عن تأثير السم والميليتين على الغشاء الحيوي للسلاسل المقاومة للأدوية المتعددة المتواجدة في المستشفى (*Enterococcus faecalis* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Enterobacter cloacae* ، *Acinetobacter baumannii*) ، *Staphylococcus aureus* ، *Staphylococcus hemolyticus*). تؤكد نتائج المقالات الخمسة التي تمت دراستها أن سم النحل والميليتين كان له تأثير مثبط على تكوين الأغشية الحيوية بتركيزات دون MIC. هذه التأثيرات المثبطة أكثر أهمية على الأغشية الحيوية الشابة إيجابية الجرام منها على الأغشية السالبة الجرام. هناك الكثير من الأبحاث التي يجب القيام بها من أجل تثمين هذا المنتج الطبيعي لعلاج وإزالة الأغشية الحيوية في المستشفيات والالتهابات الأخرى المرتبطة بالأجهزة الطبية.

الكلمات المفتاحية: سم النحل – الميليتين - *Apis mellifera* - الغشاء الحيوي - بكتيريا المستشفى - السلاسل المقاومة للأدوية المتعددة - MIC - المثبطة

Abstract

Bee venom is a complex product of several components which have therapeutic interests such as melittin major component, it is secreted by the venomous glands of the worker bees *Apis mellifera*. The establishment of the tissue culture plate (TCP) method by the five articles treated was for the purpose of detecting the effect of venom and melittin on the biofilm of multidrug-resistant strains of hospital origin (*Acinetobacter baumannii* , *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*). The results of the five articles studied confirm that bee venom and melittin had an inhibitory effect on biofilm formation with concentrations of sub-MIC. These inhibitory effects are more important on young biofilms with Gram-positive bacteria than on Gram-negative ones. A lot of research needs to be done for the valorization of this natural product for the treatment and elimination of biofilms in hospitals and other infections linked to medical devices.

Key words: Bee venom - Melittin - *Apis mellifera* - Biofilm - Hospital strains -Multidrug resistant - Sub-MIC - Inhibition

Résumé

Le venin d'abeille est un produit complexe de plusieurs composants qui ont des intérêts thérapeutiques tel la mélittine qui est son composant majeur, il est secrète par les glandes venimeuses des abeilles ouvrières *Apis mellifera*. La mise en place de la méthode de plaque de culture de tissus (TCP) par les cinq articles traités était dans le but de la détection de l'effet de venin et la mélittine sur le biofilm des souches multirésistantes d'origine hospitalière (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*). Les résultats des cinq articles étudiés confirment que le venin d'abeille et la mélittine avaient un effet inhibiteur de la formation du biofilm avec des concentrations de sous-CMI. Cet effets inhibiteurs sont plus importants sur des biofilms jeunes a bactéries à Gram positif que sur des Gram négatif. Plusieurs recherches doivent être effectuées pour la valorisation de ce produit naturel pour le traitement et l'élimination de biofilm en milieu hospitalier et autres infections liées aux dispositifs médicaux.

Mots clé : Venin d'abeille - Mélittine - *Apis mellifera* – Biofilm -Bactéries hospitalières - Multirésistantes – Sous -CMI – Inhibition.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	02
Première partie : Synthèse bibliographique	03
1. Généralité sur l'abeille.....	04
1.1. Définition.....	04
1.2. Classification et répartition géographique.....	04
2. Généralité sur les produits de la ruche.....	05
3. Présentation de venin d'abeille.....	06
3.1. Production de venin d'abeille.....	07
3.2. Propriétés de venin d'abeille.....	08
3.3. Composition de venin d'abeille : la mélittine et son mécanisme d'action	08
3.4. Propriétés thérapeutiques de venin d'abeille.....	12
3.4.1. Antibactérienne.....	12
3.4.2. Antibiofilm.....	13
3.4.3. Antifongique.....	14
3.4.4. Antiviral.....	14
3.4.5. Antiparasite.....	16
3.4.6. Autre effets de venin d'abeille.....	16
4. Applications pratique de venin d'abeille : Thérapies.....	16
Deuxième partie : Matériel et méthodes	18
1. Prélèvements et mise en culture.....	19
2. Identification des bactéries isolées.....	19
2.1. Test catalase.....	20
2.2. Test coagulase (Staphylocoagulase).....	21
2.3. Test de la DNase (Désoxyribonucléase).....	21
3. Identification par VITEK 2.....	21
4. Recherche et identification des gènes nuc et mecA par PCR : Cas des SARM.....	23
5. Etude de sensibilité aux antibiotiques : Antibiogramme.....	24
6. Capacité des bactéries isolées a formé un biofilm : méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	24

7. Activité anti-biofilm du venin d'abeille et de son composant actif : La mélittine.....	26
7.1.Inhibition de la formation du biofilm par le venin ou la mélittine.....	27
7.2.Elimination de la formation du biofilm.....	27
Troisième partie : Résultats et discussion.....	29
1. Souches identifiées selon cinq articles étudiés.....	30
1.1.Identification des gènes nuc et mecA par PCR.....	30
1.2.Sensibilité aux antibiotiques.....	30
2. Capacité des bactéries isolées à former un biofilm : méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	32
3. Activité anti-biofilm du venin d'abeille et de son composant actif : La mélittine.....	34
3.1.Inhibition de la formation du biofilm par le venin ou la mélittine.....	34
3.2.Elimination de la formation du biofilm.....	41
Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	50
Annexes.....	63

Liste des abréviations

<i>A. baumannii</i>	: <i>Acinetobacter baumannii</i>
AMPs	: Peptides antimicrobiens
ATCC	: American Type Culture Collection
BV	: Venin d'abeille (Bee Venom)
CMI	: Concentration minimal inhibitrice
CMIB	: Concentration minimales inhibitrice de biofilm
DNase	: Désoxyribonucléase
dNTPs	: Désoxyribonucléotides triphosphate
<i>E. cloacae</i>	: <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent-assay
GN	: Gram négatif
GP	: Gram positif
IFN	: Interférons
<i>K. pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	: Luria-Bertani
MCDP	: Mast Cell Degranulation Peptide 5 (Peptide de dégranulation des Mastocytes)
MDR	: Multi Drug-Resistant (Multirésistances)
Mel	: Mélittine
MSSA	: <i>Staphylococcus aureus</i> sensible à méthicilline
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PC	: Phosphatidylcholines
PCR	: Polymérase Chain Réaction
PDR	: Pan Drug Resistant (Resistant à tous les antibiotiques)
PE	: Phosphatidyléthanolamines
PG	: Phosphatidylglycérol
PLA2	: Phospholipase A2

PS	: Phosphatidylsérine
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. haemolyticus</i>	: <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
SARM	: <i>Staphylococcus aureus</i> résistante a la méthicilline
SCCmec	: Staphylococcal cassette chromosome mec
<i>T. rubrum</i>	: <i>Trichophyton rubrum</i>
TSB	: Bouillon de soja trypticase
VRSA	: <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la vancomycine
XDR	: Extensively Drug Resistant (Extrêmement résistantes aux antibiotiques)

Liste des figures

Figure 1 :	Les castes de l'abeille.....	04
Figure 2 :	Aires de répartition des espèces du genre <i>Apis</i>	05
Figure 3 :	Les produits de la ruche.....	05
Figure 4 :	Anatomie d'une abeille ouvrière.....	06
Figure 5 :	Venin d'abeille (A) l'état liquide (B) l'état sec.....	07
Figure 6 :	Glande venimeuse chez hyménoptères <i>Apis mellifera</i> (Apidae).....	07
Figure 7 :	Représentation schématique de la structure en hélice- α de la mélittine.....	10
Figure 8 :	Différents mécanismes d'action de la mélittine.....	11
Figure 9 :	Modèles de formation des pores induits par la mélittine.....	12
Figure 10:	Effet du venin d'abeille par rapport aux médicaments antimycotiques courants à 10mL^{-1} sur la transition dimorphique de <i>Candida albicans</i>	14
Figure 11:	Les différents formulaires d'utilisation de venin d'abeille.....	17
Figure 12:	Photo montrant une plaque API 20 E.....	19
Figure 13:	Photo montrant une plaque API 20 NE.....	20
Figure 14:	Photo montrant une plaque API Staph.....	20
Figure 15:	Photo montrant l'automate VITEK 2.....	22
Figure 16:	Photo montrant le système de PCR.....	23
Figure 17:	Les étapes de formation de biofilm par la microplaque 96 puits.....	26
Figure 18:	Collecteur de BV.....	26
Figure 19:	Apiculteur avec un collecteur BV.....	26
Figure 20:	Cinétique de la formation de biofilm des souches isolées dans les études de (A) Bardbari <i>et al.</i> , (2018) ; (B) Khozani <i>et al.</i> , (2018).....	33
Figure 21:	Concentration minimale inhibitrice de biofilm (CMIB) de la mélittine sur des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> isolées du milieu hospitalier.....	34
Figure 22:	Effet de la mélittine à différentes concentrations sur la formation du biofilm.....	35
Figure 23:	Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm d' <i>Enterobacter cloacae</i> (MDR).....	36
Figure 24:	Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR).....	36
Figure 25:	Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> (MDR).....	37

Figure 26:	Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm des souches multirésistantes de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine (MDR-VRSA).....	38
Figure 27:	Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MDR).....	38
Figure 28:	Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm d' <i>Enterococcus faecalis</i> (MDR).....	39
Figure 29:	Cinétique de la dégradation de biofilm par la mélittine.....	41
Figure 30:	La courbe cinétique de la capacité de la mélittine à tuer les bactéries examiner dans le biofilm.....	42
Figure 31:	Effet de mélittine sur élimination de biofilm à des quantités de 0.5 à 16µg pendant 6h et 24 h.....	43
Figure 32:	Effet de mélittine sur élimination de biofilm à une quantité de 32µg pendant 6h et 24 h.....	43
Figure 33:	Action de la mélittine sur les biofilm <i>Acinetobacter baumannii</i>	44
Figure 34:	Effet de la mélittine sur la biomasse du biofilm d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	45
Figure 35:	La morphologie de biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> le biofilm a été étudiée après 30 min de traitement avec 10 µg de mélittine.....	46
Figure 36:	Effet de la mélittine sur la formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i>	47

Liste des tableaux

Tableau 1 :	La classification et description de l'abeille.....	04
Tableau 2 :	Les composants du venin d'abeille.....	09
Tableau 3 :	L'effet antibactérien de venin d'abeille sur des bactéries d'origine hospitalière..	13
Tableau 4 :	Quelques exemples des biofilms traites par le venin d'abeille.....	13
Tableau 5 :	Effet antiviral de venin d'abeille et de ses composants.....	15
Tableau 6 :	Amorces utilisées pour déterminer les types de SCCmec, les isolats de SARM..	23
Tableau 7 :	Les étapes utilisées dans les cinq articles étudiés pour détecter la formation de Biofilm.....	25
Tableau 8 :	Résultat des bactéries identifiées selon les cinq articles traités.....	30
Tableau 9 :	Les souches identifiées selon les cinq articles étudiées.....	31
Tableau10 :	La capacité des bactéries a formé des biofilms dans les études de Fadl, (2018) et Karyne <i>et al.</i> , (2020).....	32
Tableau11 :	Résultats d'inhibition de formation de biofilm à des concentrations sous CMI de venin d'abeille ou mélittine dans les articles étudiées.....	39

Introduction

La plupart des bactéries qui ont déclenché des maladies graves et qui étaient autrefois traitées efficacement avec plusieurs groupes d'antibiotiques distincts sont maintenant devenues souvent résistantes à de nombreux antibiotiques (**Laxminarayan et al ., 2013**). L'émergence de ces souches pathogènes et résistantes est un problème de santé publique de plus en plus critiqué [(**Blair et al ., 2015**) ; (**Karyne et al ., 2020**)], de plus le nombre limité de nouveaux antibiotiques a compliqué le problème de la résistance aux antimicrobiens, entraînant des taux de morbidité et de mortalité plus élevés et des coûts de soins de santé plus élevés (**Fadl, 2018**).

S'ajoute à tout cela la capacité des bactéries à former des biofilms qui sont devenus l'une des préoccupations majeures de la question de la résistance aux antibiotiques (**Percival et al ., 2015**). Les bactéries présentes dans les biofilms ont une tolérance aux antibiotiques beaucoup plus élevée jusqu'à 1 000 fois supérieure à leurs homologues planctoniques (**Khozani et al ., 2018**) et cela en raison de la diminution de la diffusion des agents antimicrobiens dans la matrice extracellulaire, augmentation d'activité des pompes à efflux, détection de système quorum et la présence des cellules persistantes (**Dosler et al ., 2016**). Ce facteur de virulence « biofilm » occupe une position clé dans la progression des maladies chroniques (**Lister et Horswill, 2014**), la propagation des infections aiguës (la septicémie) (**Fadl, 2018**) et dans les infections liées aux dispositifs médicaux.

Il est donc urgent de développer des composés naturellement bioactifs comme alternatives aux quelques antibiotiques qui restent efficaces (**Han et al., 2016**). Dans cette condition vitale, le venin d'abeille représente un nouvel espoir pour le traitement des infections bactériennes, il présente une grande valeur thérapeutique en raison de son action rapide et de son large spectre d'activités contre des bactéries à Gram négatifs et positifs, virus, champignons et parasites (**Bardbari et al., 2018**). Le venin d'abeille possède une combinaison complexe des enzymes, des peptides et des amines, en raison de son activité biologique, Il est utilisé depuis l'antiquité en thérapie primitive pour guérir les maladies (**Fadl, 2018**).

Suite aux situations difficiles de cette année 2020 et de la pandémie du **Covid-19**, notre sujet de master et objectif d'origine restent irréalisables, en raison de la fermeture des laboratoires de recherche et des universités. En conséquence, nous avons orienté notre travail sur la réalisation d'une synthèse des cinq articles portant sur notre thème de départ à savoir l'effet du venin d'abeille sur la forme biofilm de certaines bactéries d'origine hospitalières.

Première partie :
Synthèse bibliographique

1. Généralité sur l'abeille

1.1. Définition

L'abeille est un insecte appartenant à l'ordre des hyménoptères et vivant en société, celle-ci étant caractérisée par la division et la spécialisation du travail. Dans les colonies d'abeilles, une seule, la reine, est capable de pondre des œufs ; les mâles, appelés aussi faux bourdons, ont pour principal rôle social celui de féconder la reine. Les ouvrières accomplissent des tâches plus diverses, entre autres la récolte de l'aliment, l'organisation de leur nid, l'entretien des larves, la défense de la ruche contre les attaques d'ennemis éventuels. Leur rôle est donc veiller à la sécurité et à la prospérité de la famille (Biri, 2010).

Les 3 castes représentent des différences dans leurs morphologie (la tête, thorax, l'abdomen les ailes et les pattes) (Nenni, 2019) (Figure 1).



Figure 1: Les castes de l'abeille (Rasolofoarivao, 2014).

1.2. Classification et répartition géographique

L'abeille de genre *Apis* présente une classification scientifique décrite dans le (Tableau1)

Tableau 1 : La classification et description de l'abeille (Peacock, 2011).

Classification	Nom	Description
Règne	Animalia	Ce sont des animaux
Embranchement	Arthropoda	Ils sont des pattes jointes
Classe	Insecta	Ils sont six pattes
Ordre	Hymenoptera	Ils sont des ailes semblables à des membranes
Sous-ordre	Apocrita	Ils possèdent un dard
Super –famille	Apoidea	Ce sont des abeilles
Famille	Apidae	Ce sont des abeilles sociales
Genre	<i>Apis</i>	Abeilles
Espèce	<i>Mellifera</i>	Produit du miel

L'abeille mellifère du genre *Apis* est répartie sur la totalité du globe terrestre. L'aire géographique d'extension d'*Apis mellifera* couvre ainsi les continents Africain, Européen et Asiatique à l'exception du Sud Est asiatique que se partagent les trois autres espèces d'abeille (Figure 2).



Figure 2 : Aires de répartition des espèces du genre *Apis* (Charpentier, 2013).

2. Généralité sur les produits de la ruche

L'abeille et la société à laquelle elle appartient fascinent depuis des siècles. Elle est bien sûr, indispensable et irremplaçable pour assurer la reproduction des plantes mais elle fournit également à l'homme des produits consommables parce qu'elle est une formidable « usine » de production des substances naturelles tels que le miel, le pollen, la gelée royale, la propolis, la cire et le venin qui possèdent plusieurs propriétés antibactériens, antifongiques, antivirales, anti-inflammatoires, antioxydants, anti-tumorales et cicatrisants [(Gharbi, 2011) ; (Amigou, 2016)] (Figure 3).

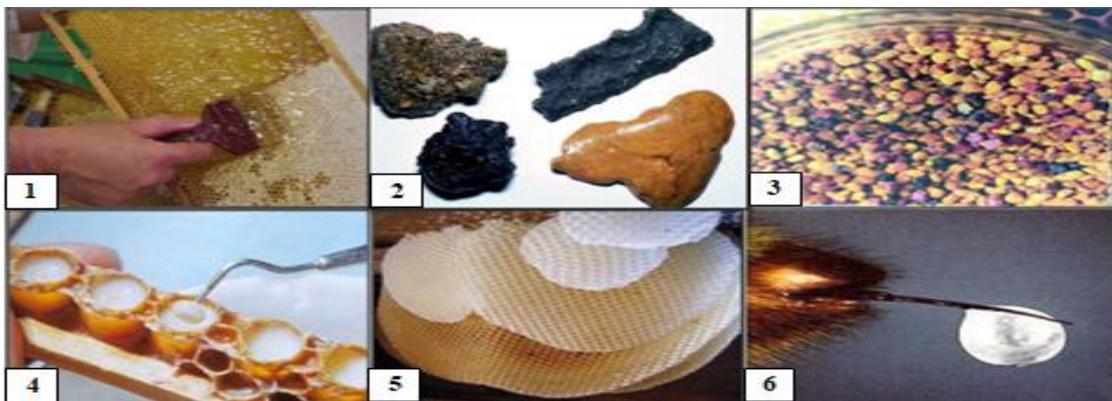


Figure 3: Les produits de la ruche : (1) Le miel (Cuvillier, 2015), (2) La propolis (Draiaia, 2016), (3) Le pollen (Desrochers et Schmidt, 2013), (4) La gelée royale (Rossant, 2011), (5) La cire (Ballot-Flurin, 2011), (6) Le venin (Bogdanov, 2016a).

Les abeilles sont des insectes vivant en colonies avec une organisation sociale complexe. Leur nid contient des réserves alimentaires sous forme de miel et de pollen, ainsi que la couvée, la reine et les abeilles elles-mêmes. Ces ressources doivent être défendues contre un large éventail des prédateurs et des parasites, par la capacité des abeilles ouvrières (gardiennes) de piquer et injecter le venin dans un réflexe d'auto-défense du par les phéromones d'attaque (message chimique) [(Ali, 2012);(Mizrahi et Lensky, 2013) ;(Cousin, 2014) ;(Nouvian *et al.*, 2016)].

3. Présentation de venin d'abeille

A la naissance, l'abeille ne possède ni venin ni réflexe de piqûre. Ce n'est que durant la première semaine de vie post-larvaire que les glandes se mettent à sécréter le venin, lequel va mûrir dans le réservoir pendant quelques semaines. Il acquiert ses qualités dans les 3 à 4 dernières semaines de vie correspondant à la période où l'abeille devient butineuse et gardienne (Douzi ,2010).

Le venin d'abeille est issu des glandes à venin acides et basiques situées dans la partie postérieure de l'abdomen des abeilles ouvrières (Deltombe, 2018) (Figure 4).

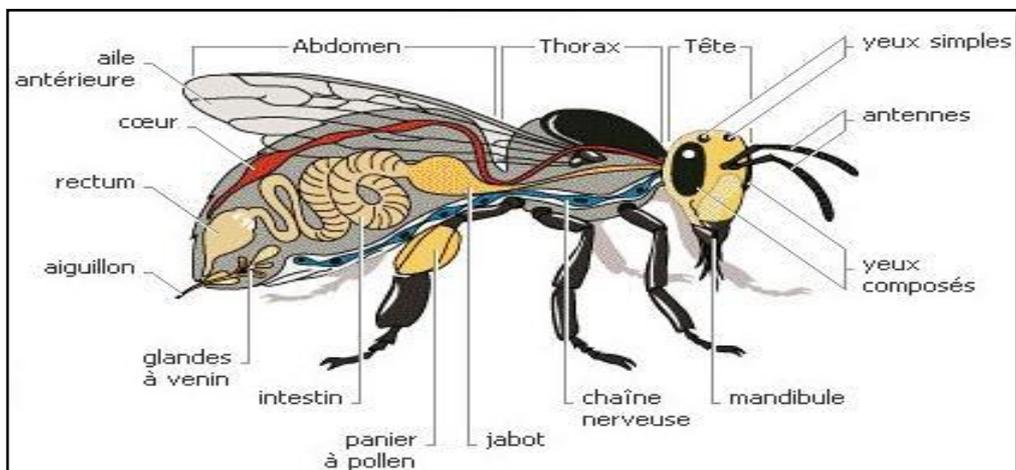


Figure 4 : Anatomie d'une abeille ouvrière (Deltombe ,2018).

La quantité du venin libérée lors d'une piqûre varie d'une espèce à une autre et même au sein de la même espèce. Le sac à venin peut contenir jusqu'à plus de 300 μg de venin. Toutefois, la quantité libérée lors d'une piqûre est moindre, allant de 50 μg à 140 μg (Douzi, 2010).Le venin existe sous deux formes : liquide (tel qu'il est injecté) ou séché (Deltombe ,2018) (Figure 5).

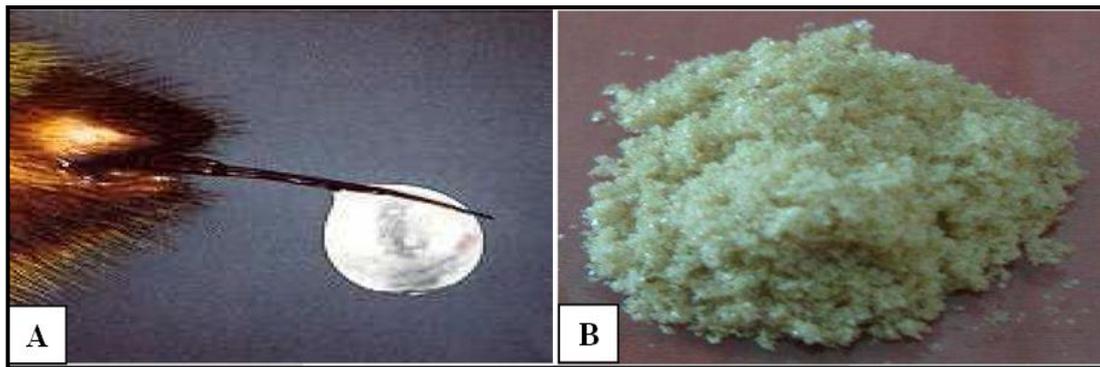


Figure 5 : Venin d'abeille (A) l'état liquide (B) l'état sec (Bogdanov ,2016a).

3.1. Production de venin d'abeille

Les ouvrières d'abeilles (*Apis mellifera*) sécrètent du venin par les glandes venimeuses (Abdel-wahed *et al.*, 2018) (Figure 6):

- Une glande acide mesurant environ 5 mm, contient un réservoir à venin qui sert à stocker le liquide acide sécrété par la glande.
- Une glande alcaline ou glande de Dufour, secrète un liquide atoxique sert de tampon pour diminuer l'acidité du venin. Ce liquide permet de lubrifier l'appareil inoculateur (Douzi, 2010).

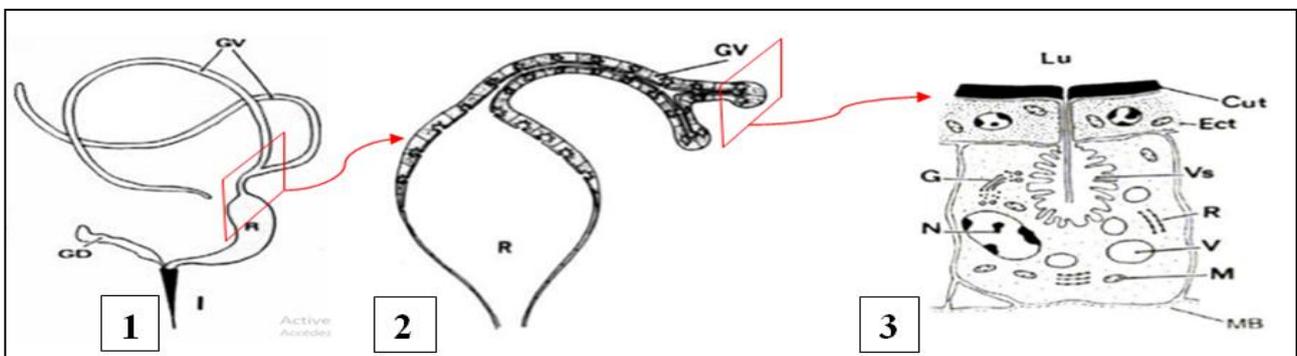


Figure 6: Glande venimeuse chez hyménoptères *Apis mellifera* (Apidae). (1) Glande venimeuse et son réservoir. R réservoir ; GD glande de Dufour ; GV glande venimeuse, (2) La distribution des cellules sécrétrices dans la glande et le réservoir à venin de l'abeille domestique, schéma d'une coupe longitudinale. Gv glande à venin ; R réservoir (3) .Parois de la glande venimeuse en coupe. Cut cuticule; Ect ectoderme; G appareil de Golgi; Lu lumière de la glande; M mitochondrie; MB membrane basale; N noyau; R réticulum endoplasmique; VS vésicule sécrétrice et ses microvillosités; V vacuole

(Pecault, 2002)

3.2. Propriétés de venin d'abeille

Une goutte de venin est composée de 88% d'eau et seulement 0,1 µg de venin sec .C' est un liquide jaunâtre opalescent parfois presque incolore, il est inodore ou semblable au miel avec un goût aromatique, amer, acide et piquant, son pH est de 4,5 à 5,5. Il est soluble dans l'eau (environ 10% sont insolubles) et les acides dilués mais insoluble dans l'alcool, sa gravité est environ 1,13 [(Bogdanov, 2016a) ; (Omar, 2017) ; (Wehbe *et al.*, 2019)].

Le venin recueilli sèche rapidement dans une pièce a température ordinaire, se transformant en une masse cristalline de poudre jaune-brunâtre. Il est détruit par la lumière du soleil et à des températures élevées mais plus stable à basse température .ce lui ci est également détruit des substances oxydantes tels le permanganate de potassium, potassium sulfate, les éléments halogènes-le chlore, le brome et par l'alcool (Bogdanov ,2016a).

3.3. Composition de venin d'abeille : La mélittine et son mécanisme d'action

Après une synthèse de plusieurs articles, le venin d'abeille est très diversifié il est composé de peptide, enzyme et d'amine et présentes plusieurs effets, tous ces caractéristiques sont données dans le (Tableau 2).

Tableau 2: Les composants du venin d'abeille

(Douzi ,2010) ; (Kintz et Villain, 2011) (Oršolić, 2012) ; (Ali ,2012) ; (Bellik ,2015) ; (Moreno et Giral, 2015) ; (Bogdanov ,2016 a) ; (Eze *et al.*, 2016) ; (Hossen *et al.*, 2017a); (Abdel-wahed *et al.*, 2018) ; (Pucca *et al.*, 2019) ; (Wehbe *et al.*, 2019) ; (Zhang *et al.*, 2020) ;(Baek *et al.*, 2020)

Classe	Composant / Masse moléculaire (Da)	Poids Sec%	Effets
Peptides	Méllittine (2840)	40-50	Disfonctionnement des phospholipides membranaires
	Apamine (2036)	2-3	Neurotoxine inhibiteur des canaux K ⁺ dépendants de Ca ²⁺
	Peptide de dégranulation des mastocytes (MCD) (2588)	2-3	Neurotoxine, bloqueur des canaux K ⁺ . Affecte les mastocytes en sécrétant ou pas l'histamine
	Adolapine (11500)	1	Bloque de la synthèse des prostaglandines, de l'activité de la cyclooxygénase et la lipoxycgénase
	Inhibiteurs de la protéase (9000)	<0.8	Inhibiteur de l'agrégation des érythrocytes
	Minimine (6000)	2-3	Inhibiteur de l'activité des protéases
	Procamine A, B (500)	1.4	
	Tertiapine (2000)	0.1	Bloque des canaux K ⁺ myocytes cardiaques
	Cardiopep (2500)	<0.7	Inhibiteur de la phosphodiesterase et de la capacité d'activation enzymatique de calmoduline
	Méllittine F(2840)	0.01	-
	Secarpine (2600)	0.5	-
	Pamine	1-3	-
Petits peptides (≤600)	13-15	-	
Enzymes	Phospholipase A2 (19000)	10-12	Catalyseur de l'hydrolyse de la liaison ester d'acyle gras de sn-2 position de la membrane glycéro-3-phospholipides
	Hyaluronidase (38000)	1.5-2	Facteur de propagation qui hydrolyse le polymère d'acide hyaluronique
	α-Glucosidase (170000)	0.6	Catalyseur de l'hydrolyse de la liaison α-glycosidique du côté terminal non réducteur d'un substrat
	Phospholipase B (Lysophospholipase) (22000)	1	Catalyseur de l'hydrolyse des chaînes acyle des positions sn-1 et sn-2 d'un phospholipide
	Acide phosphomonoestérase	1	-
	Phosphatase	1	-
	Diastase	-	-
Amines vasoactives	Histamine (307.14)	1.5	Responsables de l'augmentation de la perméabilité capillaire et des réactions anaphylactoides
	Dopamine (189.64)	0.13-1	
	Noradrénaline (169.18)	0.1-0.7	
	Leucotriènes	-	
Acides amines	Acide r-aminobutyrique	0.5-1	-
	Acide B-aminoisobutyrique		
	Tryptophane	-	
Glucides	Glucose, Fructose	-	-
Minéraux	P, Ca, Mg, Cu, S	2-4	-
Phéromones	Ethers complexes	3-4	Provoque une alarme pour la colonie des abeilles et son comportement défensif
Divers	Choline, Acide chlorhydrique, Orthophosphorique, formique	4-8	-

La principale composante du venin d'abeille est appelé mélittine (absente chez les autres hyménoptères) (Pecault, 2002) , elle contient 26 acides aminés, ce biopeptide est synthétisé dans la glande à venin d'abeilles sous la forme d'un précurseur inactif connu sous le nom « prepromelittine », qui se compose de 70 acides aminés (Ceremuga *et al.*, 2020).

La mélittine est composé de deux hélices α asymétrique reliées par un segment flexible [(Memariani *et al.* , 2019) ;(Memariani *et al.* , 2020)]. Cette asymétrie de la distribution des acides aminés polaires et non polaires donne lieu à l'amphipathicité et la solubilité dans l'eau de la mélittine (Jamasbi *et al.*, 2016) (Figure 7).

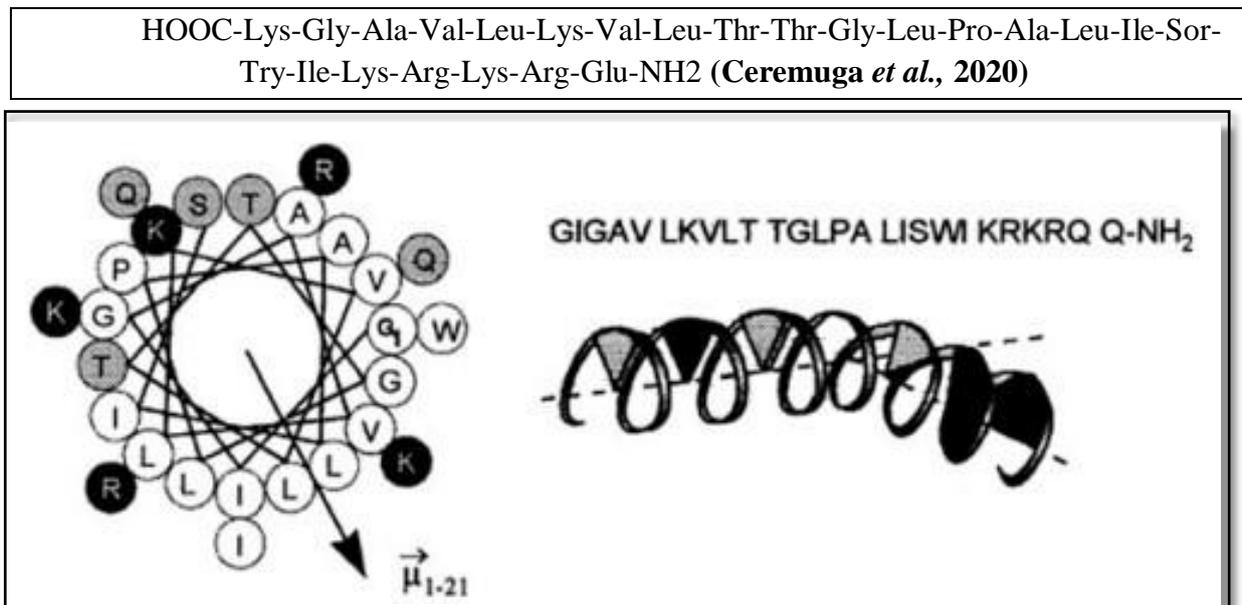


Figure 7: Représentation schématique de la structure en hélice- α de la mélittine. Les résidus hydrophobes sont indiqués en blanc, les résidus polaires en gris et les résidus cationiques en noir (Therrien, 2016).

La mélittine s'insère facilement dans les membranes et perturbe les phospholipides de la bicouche lipidique (naturelle ou synthétique) (Bellik, 2015), grâce à son affinité pour la plupart des types de phospholipides membranaires comprenant à la fois des phospholipides zwitterioniques ((phosphatidylcholines (PC) et phosphatidyléthanamines (PE)) et les phospholipides anioniques ((la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylglycérol (PG)) (Jamasbi *et al.*, 2016).

Cette action est médiée par la formation des pores transitoires qui sont diffusables pour les ions ou des pores stables qui sont accessibles à des molécules relativement grandes (glucose), conduisant à la lyse des cellules procaryotes et eucaryotes de manières non

sélectives (Wehbe *et al.*, 2019), qui peut suivre les modèles «toroïdal pore», «barrel stave» et «tapis» [(Gordon-Grossman *et al.*, 2012) ;(Therrien, 2016)]. La mélittine agit aussi par la fusion et par vésiculation (Oršolić, 2012) et va se lier rapidement aux vésicules impliquant quatre étapes: interaction électrostatique, insertion de mélittine dans la membrane lipidique (qui est une interaction hydrophobe), changement de formation de bobine aléatoire à hélice α et agrégation de la mélittine en phase lipidique (Jamasbi *et al.*, 2016) (Figure 8).

En effet, les actions cytolytiques de mélittine qui sont du essentiellement a la région carboxy-terminale sous forme monomère (Wehbe *et al.*, 2019), induisant la mort cellulaire par plusieurs mécanisme (Soliman *et al.*, 2019).

La perturbation des membranes cellulaires par la mélittine dépend de la géométrie et de l'épaisseur de la bicouche lipidique de composition de la membrane et de sa charge polaire (Jamasbi *et al.*, 2016) mais aussi d'orientation et état d'agrégation de la mélittine (Moreno et Giralt, 2015).

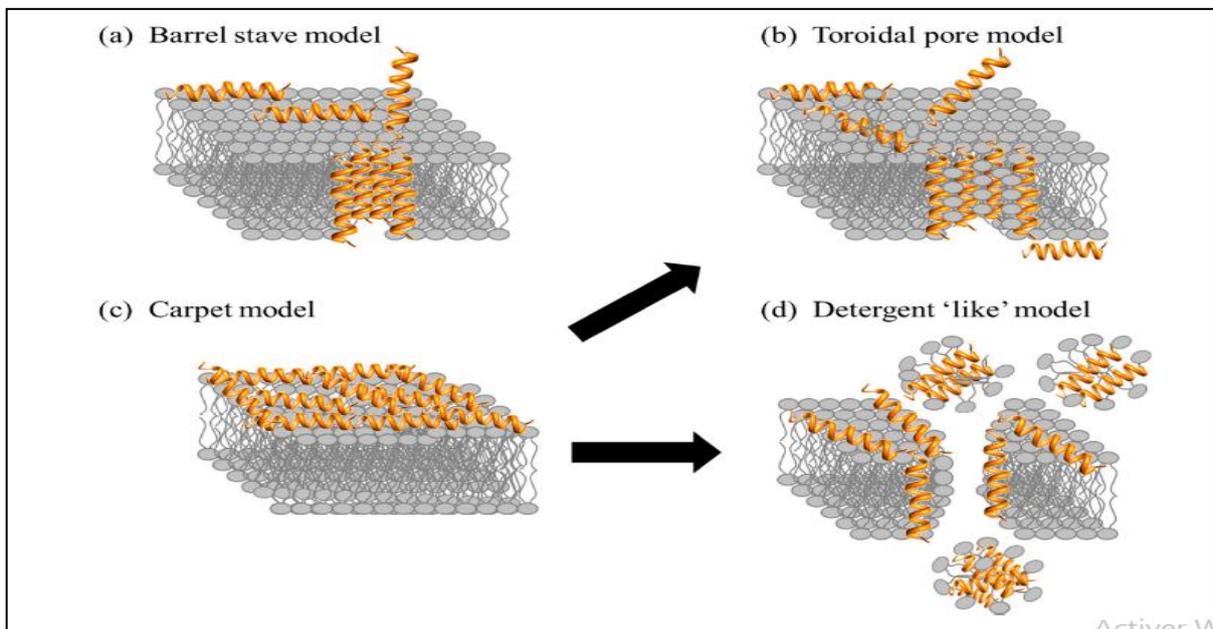


Figure 8: Différent mécanismes d'action de la mélittine (Kumar *et al.* , 2018)

3.4. Propriétés thérapeutiques de venin d'abeille

3.4.1. Antibactérienne

Le venin d'abeille comprend un mélange très complexe des peptides antimicrobiens (AMPs) actifs, d'enzymes et d'amines, leur activité antimicrobienne a été documentée pour les bactéries à Gram - et à Gram+ (**Zolfagharian *et al.*, 2016**).

Les actions antibactériennes des principaux composants de cette apitoxine agissent principalement sur la membrane plasmique bactérienne, qui est considérée comme une cible essentielle à la survie de bactérie (**Boix-Lemonche *et al.*, 2020**).

La mélittine peut se lier à la membrane dans une orientation parallèle (1) ou une orientation perpendiculaire (2). L'orientation perpendiculaire induit la formation de pores, tandis que l'orientation parallèle est inactive (**Pucca *et al.*, 2019**) (**Figure 9**).

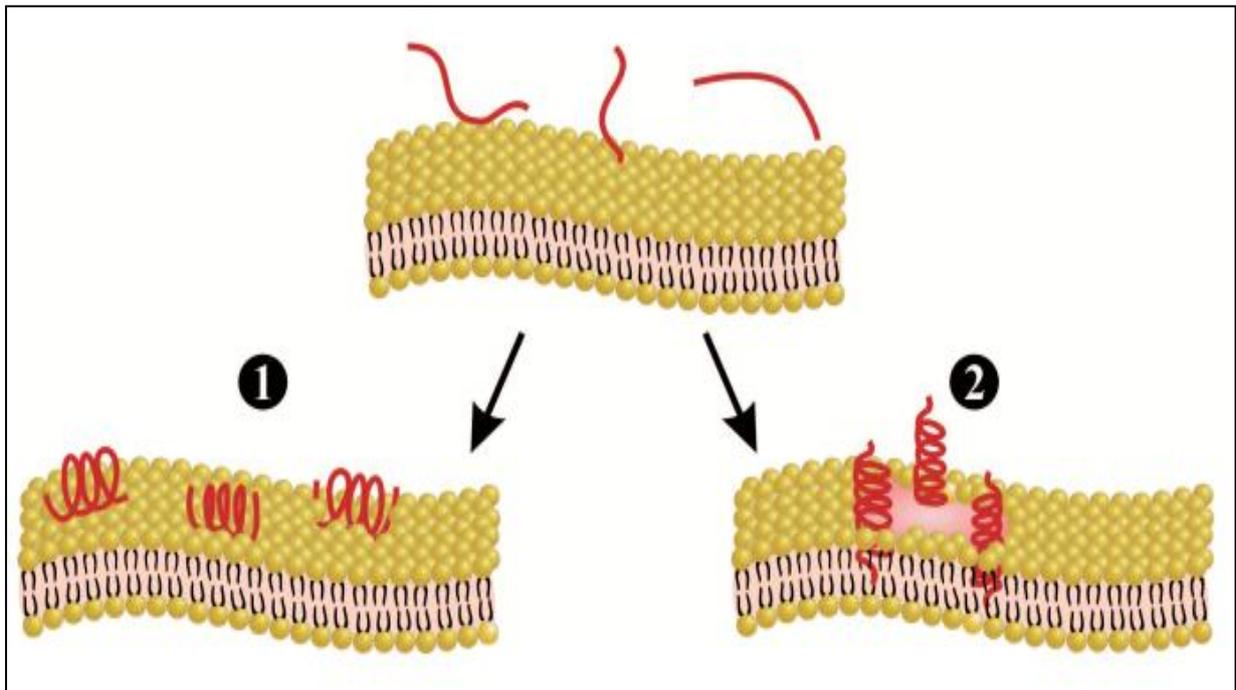


Figure 9: Modèles de formation des pores induits par la mélittine (**Pucca *et al.*, 2019**)

De nombreuses études ont prouvé des effets antibactériens de venin d'abeille sur différents souches d'origine hospitalière (**Tableau 3**)

Tableau 3 : L'effet antibactérien de venin d'abeille sur des bactéries d'origine hospitalière

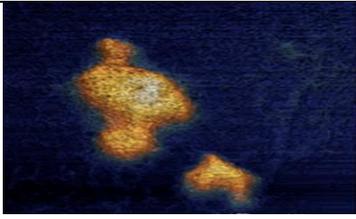
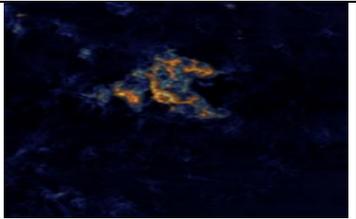
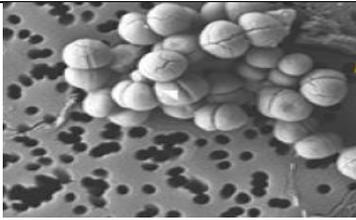
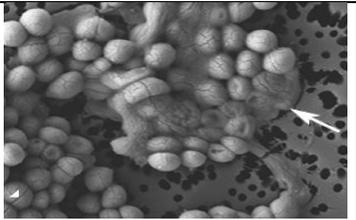
Type	Bactéries	Références
Gram -	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Giacometti <i>et al.</i> , 2003
	<i>Escherichia coli</i>	Gopal <i>et al.</i> , 2013 ; Ebbensgaard <i>et al.</i> , 2015
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Blondelle et Houghten, 1991; Gopal <i>et al.</i> , 2013; Khozani <i>et al.</i> , 2018
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Gopal <i>et al.</i> , 2013
	<i>Yersinia ruckeri</i>	Ebbensgaard <i>et al.</i> , 2015
Gram +	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ebbensgaard <i>et al.</i> , 2015
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Blondelle et Houghten, 1991; Dosler et Gerceker, 2012 ; Gopal <i>et al.</i> , 2013 ; Ebbensgaard <i>et al.</i> , 2015

3.4.2. Antibiofilm

En plus de son effet antibactérien le venin d'abeille et ses composants peuvent réduire le nombre et / ou la viabilité des bactéries en mode biofilm, avec des effets sur la morphologie et la taille de biofilm (Socarras *et al.*, 2017).

Le venin d'abeille provoque à la fois la dispersion et la perméabilité du biofilm, ce qui peut fournir des avantages anti-inflammatoires potentiels en dispersant le biofilm et permettant une réponse immunitaire plus efficace (Maiden *et al.*, 2019) (**Tableau 4**) .

Tableau 4 : Quelques exemples des biofilms traités par le venin d'abeille

Bactéries	Références	Avant traitement	Après traitement
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Socarras <i>et al.</i> , 2017		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Boix-Lemonche <i>et al.</i> , 2020		

3.4.3. Antifongique

Le venin d'abeille exerce des activités antifongiques beaucoup plus fortes que celles du fluconazole essentiellement vis-à-vis des agents pathogènes de la peau (*Trichophyton mentagrophytes* et *T. rubrum*) (Yu *et al.*, 2012). La mélittine exerce des effets cytolytiques chez *Candida albicans* via l'induction d'apoptose (Park et Lee, 2010).

Il semble donc que le venin d'abeille est plus efficace par rapport aux antifongiques (Amphotéricine B, Nitrate de miconazole, Fluconazole et la 5-Fluorocytosine) [(Ali, 2014) (Do *et al.*, 2014)] (Figure 10). De plus, leurs activités anti-*Candida* sont beaucoup plus élevées que ceux des produits phytochimiques (polyphénols, phénoliques, terpenoïdes et alcaloïdes) (Lee, 2016).

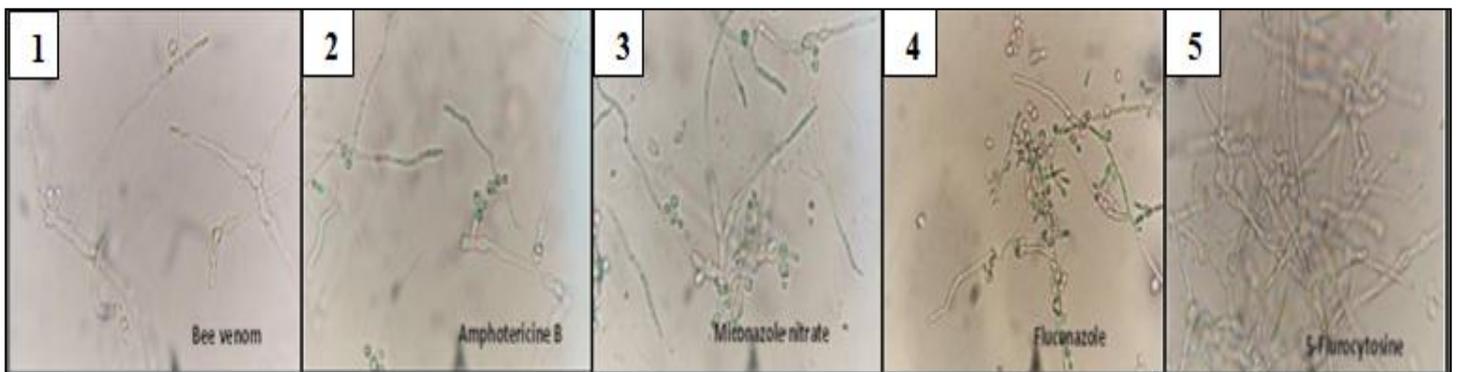


Figure 10 : Effet du venin d'abeille par rapport aux médicaments antimycotiques courants à 10mL^{-1} sur la transition dimorphique de *Candida albicans* (1) venin d'abeille ;(2) Amphotéricine B ;(3) Nitrate de miconazole ; (4) Fluconazole ;(5) 5-Fluorocytosine (Ali, 2014).

3.4.4. Antiviral

Le venin d'abeille et ses composants ont des effets importants contre de nombreux virus enveloppés et non enveloppés dépendant des paramètres cliniques (Wehbe *et al.*, 2019). Le prétraitement ou le post-traitement de venin d'abeille peut inhiber la réplication du virus, en particulier, le prétraitement peut induire la sécrétion d'IFN de type I (IFN- β), déclenchant l'état antiviral (Uddin *et al.*, 2016).

Le tableau (ci-dessous) récapitule les activités de la mélittine et les autres composants de venin d'abeille sur différents virus (Tableau 5).

Tableau 5 : Effet antiviral de venin d'abeille et de ses composants

Famille/Virus	Résultats d'impact venin/composants	Référence	
<i>Arenaviridae</i> Virus Junín (IV 4454)	Mélicitine entrave la multiplication du virus Junín dans les cellules infectées à une multiplicité d'infection	Matanic et al., 2004	
<i>Flaviviridae</i> Virus de la diarrhée virale bovine (NADL)	Mélicitine n'a pas réussi à réduire les particules virales, bien que l'ajout d'Apamine ait potentialisé son activité antivirale.	Picoli et al., 2018	
<i>Herpesviridae</i> HSV-1 F, HSV-2 G, HSV fusionné avec GFP, BoHV-1 HSV-1, HSV-1 M, HSV-2 G	Mélicitine empêché la fusion cellulaire induite par le HSV-1 chez les mutants de la glycoprotéine k et inhibe son adsorption et sa pénétration et l'infectiosité HSV-1 et 2	Baghian et Kousoulas, 1993 ; Matanic et al., 2004	
	Mélicitine inactive complètement HSV-1 M, HSV-2 G	Yasin et al., 2000	
	Mélicitine réduire l'expression de la GFP dans les cellules infectées	Uddin et al., 2016	
	Mélicitine élimine complètement BoHV-1	Picoli et al., 2018	
<i>Orthomyxoviridae</i> Virus de la grippe A à fusion GFP (PR8)	Mélicitine réduit à la fois les titres viraux et l'expression de la GFP dans les cellules infectées (sans affecter l'attachement ou l'entrée du virus dans les cellules).	Uddin et al., 2016	
<i>Papillomaviridae</i> HPV16, HPV18	Venin d'abeille supprime des cellules infectées par HPV16 et des cellules infectées par HPV18	Kim et al., 2015	
<i>Picornaviridae</i> EV-71 Virus Cocksackie (H3) fusionné avec GFP	Mélicitine réduit l'ineffectivité d'EV71, les effets cytopathiques et les niveaux d'expression d'ARNm. Il a diminué l'expression de la GFP dans les cellules infectées	Uddin et al., 2016	
<i>Pneumoviridae</i> RSV fusionné avec GFP	Mélicitine réduit considérablement les titres viraux mais l'expression de la GFP dans les cellules infectées	Uddin et al., 2016	
<i>Rhabdoviridae</i> VSV fusionné avec GFP, VHSV	Mélicitine causé la suppression de l'infectiosité du VSV, la réduction le titre du virus et l'expression de la GFP dans cellules infectées Les liposomes et immunoliposomes chargés de mélicitine ont inhibé la formation de foyers cellulaires infectés par le VHSV et réduit son propagation dans la culture cellulaire	Uddin et al., 2016 Falco et al., 2013	
<i>Retroviridae</i>	MuLV (ATS-124)	Mélicitine a désintégré la membrane virale entraînant la libération complète de la transcriptase inverse	Esser et al., 1979
	RAV-2	Mélicitine a rendu l'enveloppe virale perméable	Boone et al., 1980
	HIV-1 (SF2)		Yong et al., 1990
	HIV-1 (IIIB)	Mélicitine a réduit l'infectiosité du HIV	Wachinger et al., 1992
	HIV-1 (IIIB) et HIV-1 (RF)	Mélicitine a inhibé la production de virus dans LT ou les cellules fibroblastoïdes infectées par le HIV-1.	Wachinger et al., 1998 ; Azam et al., 2018.
	HIV-1	PLA2 inhibe la réplication du virus grâce à leur séquence peptidique Mélicitine sur les nanoparticules fusionne avec les enveloppes virales formant des pores sans détruire les cellules normales	Fenard et al., 2001 ; Wehbe et al., 2019
	HIV-1 (NLHX) HIV1(NLYU2)	Mélicitine libre et chargées dans les nanoparticules réduisent l'infectiosité du virus	Hood et al., 2013
<i>Virgaviridae</i> TMV (U1)	Mélicitine a diminué l'infectiosité du TMV et les changements conformation induits dans l'ARN du TMV	Marcos et al., 1995	

3.4.5. Antiparasite

Une importante enquête génétique a démontré que l'expression du gène PLA2 (phospholipase A2 composants de venin) dans l'intestin moyen des moustiques transgéniques réduisait considérablement leur capacité à soutenir le développement du plasmodium et la transmission du parasite à d'autres hôtes vertébrés (Bellik ,2015).

3.4.6. Autres effets

Le venin d'abeille et ses composants possèdent d'autres propriétés thérapeutiques très importantes telles que les propriétés antioxydantes (Bellik ,2015), anti-inflammatoires et anti-tumorales (Memariani *et al.*, 2019).

4. Les applications pratiques du venin d'abeille: Apithérapie

L'apithérapie (Apis est un mot latin qui signifie abeille) est le pratique d'utiliser des produits apicoles tels que le miel, le pollen, la propolis, gelée royale et venin d'abeille pour la prévention ou le traitement des maladies [(Kintz et Villain, 2011) ;(Trumbeckaite *et al.*, 2015) ;(El Gendy *et al.* , 2017)] . Le venin a été utilisé pour apithérapie dans les premières civilisations en Chine 3-5000 ans, en Inde, en Egypte, Babylone, et en Grèce (Oh et Song, 2020). La plupart des demandes d'apithérapie n'ont pas été révélées aux normes scientifiques de la médecine fondée sur des preuves et sont anecdotiques. La thérapie de venin d'abeille est une forme de guérison alternative (Hegazi *et al.*, 2015), ses propriétés curatives sont inclus dans nombreux religions , y compris les Védas, la Bible et le Coran (Ali, 2012).

L'emploi de venin d'abeille pur se fait par différentes manieres soit par la ponction avec des abeilles entières dans des points spécifiques ou non spécifiques, l'acupuncture au venin d'abeille dans laquelle le venin d'abeille est appliqué sur les pointes des aiguilles d'acupuncture, les aiguillons sont extraits des abeilles où les abeilles sont détenues avec un instrument, tel qu'un une pince, pressée pour faire sortir le dard du bas de l'abdomen, puis des aiguilles ou du dard sont appliqués sur la peau, et aussi par micropuncture avec l'aiguillon de venin d'abeille ou des injections. Il est souvent utilisé et commercialisé sous forme d'onguents, crèmes, pilules, gouttes ou préparations homéopathiques ce qui rend la thérapie au venin disponible sans que le patient doive recevoir de piqûres d'abeille [(Bogdanov, 2016 b) ; (Cherniack et Govorushko, 2018)] (Figure 11).



Figure 11 : Les différents formulaires d'utilisation de venin d'abeille

(Bogdanov, 2016 b)

L'utilisation de venin d'abeille à des fins thérapeutiques dépend de plusieurs paramètres tel que les types des maladies du patient, sa sensibilité vis - à -vis du venin ou l'un de ces composants (allergène ou pas), le mode d'administration de ce traitement (voie sous-cutanée, interperitoniale, thérapie génique et immunoconjugués) et aussi la durée et la dose du traitement [(Rady *et al.*, 2017) ;(Zhang *et al.*, 2018)]

La thérapie au venin d'abeille est utilisée pour le traitement de nombreuses maladies notamment les neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, Sclérose en plaques), L'arthrite (Arthrose ,Polyarthrite rhumatoïde), la maladie de Lyme, névralgie, maladie du foie [(Azam *et al.*, 2018) ;(Wehbe *et al.*, 2019)], l'allergie (Bellik,2015) cancer (foie, sein, poumon, sang, ovaires ,col de l'utérus, estomac, prostate, colon, os et la peau) (Rady *et al.*, 2017) même pour le diabète (Hossen *et al.*, 2017b).

Deuxième partie :
Matériel et méthodes

1. Prélèvements et mise en culture

Après lecture des cinq articles (**Annexe**), nous constatons que tous les prélèvements étaient d'origine hospitalière et étaient effectués à partir d'abcès, d'expectorations, des urines et chez des patient s présentant des brulures.

Ces différents prélèvements ont été mis en culture pour la recherche de bactéries à Gram positif et négatif :

Concernant les bactéries à Gram + essentiellement la recherche de staphylocoques dans les études de **Hakimi Alni et al., (2020)** et de **Fadl , (2018)** a été faite sur gélose au sang et gélose hypersalée additionnée de mannitol telle une gélose de Chapman . Le tout était incubé à 37°C pendant 24 heures.

Les autres bactéries à Gram+ tels les streptocoques ont été recherchées sur des géloses de base additionnées de sang frais.

Les bactéries à Gram – recherchées dans ces études ont étéensemencées sur des milieux sélectifs. Toutes les cultures sont incubées pendant 24h à 37°C.

2. Identification des bactéries isolées

Des galeries API 20E, 20 NE, API Staph ont été utilisées dans l'ensemble de ces articles. Ces galeries comportent 20 microtubes contenant un substrat déshydraté, elles sont inoculées avec une suspension bactérienne. 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 du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

L'API 20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif (**Figure 12**).



Figure 12 : Photo montrant une plaque API 20E

L'API 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatifs non entérobactéries (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*) (Figure 13).

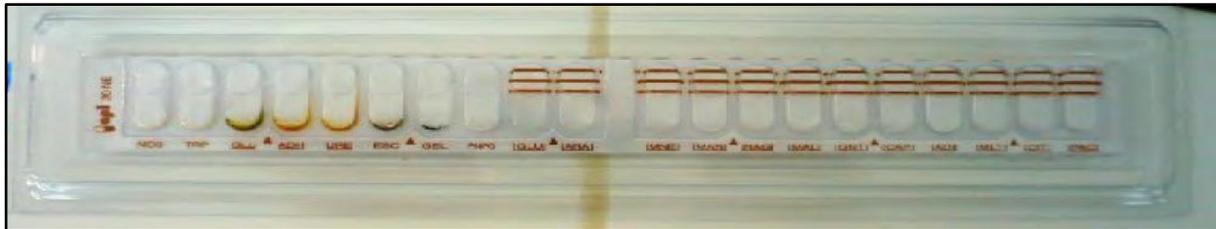


Figure 13 : Photo montrant une plaque API 20 NE

L'API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria*. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests, dont la lecture de cette plaque est basée sur l'ajout des réactifs spécifiques tels que VP1 et VP2, nitrate 1 et nitrate 2 et ZYM A et ZYM B (Figure 14).



Figure 14 : Photo montrant une plaque API Staph

Pour caractériser les souches de staphylocoques, **Hakimi Alni et al., (2020)** dans leur étude ont effectués d'autres tests: la catalase, la DNase et le test de coagulase.

2.1. Test catalase

La catalase est une enzyme produite par des bactéries aérobies qui peuvent décomposer les peroxydes H_2O_2 avec dégagement d' O_2 sous forme gazeux. Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques (**Chaalal, 2013**).



2.2. Test coagulase (Staphylocoagulase)

La production de la coagulase libre par *Staphylococcus aureus* provoque une coagulation du plasma lapin, c'est un critère important de son identification. Ce test se traduit par la formation d'un caillot de coagulation (Aouati, 2009).

2.3. Test de la DNase (Désoxyribonucléase)

La mise en évidence chez *Staphylococcus* d'une DNase thermostable suffit à l'identification de l'espèce *S.aureus*, cette enzyme hydrolyse l'acide désoxyribonucléase (ADN).

La recherche de l'enzyme se fait à l'aide des réactifs comme d'acide chlorhydrique HCl qui précipite les molécules d'ADN combinées à des protéines et le bleu de toluidine qui se colore en rose en présence des composés d'hydrolyse de l'ADN (Rebiahi,2012).

3. Identification par VITEK 2

Dans l'article de Fadl, (2018) l'identification de certains isolats était confirmée par l'automate VITEK2.

Le VITEK 2 est un automate de microbiologie qui permet d'obtenir, rapidement, des résultats d'identification bactérienne et d'antibiogramme avec une expertise du phénotype. L'étape d'identification nécessite l'utilisation des cartes réactives. Celles-ci permettent de mesurer diverses activités métaboliques comme l'acidification, l'alcalinisation, l'hydrolyse enzymatique (Eddayab, 2012) (Figure 15).

- Une carte GN pour bacilles à Gram négatif fermentatifs et non fermentatifs : 47 tests biochimiques, 19 tests enzymatiques dont les identifications sont disponibles après 10 h (Funke et Funke-Kissling., 2004)
- Une carte GP pour cocci à Gram positif : 43 tests biochimiques, 17 tests enzymatiques dont les identifications sont disponibles après 8 h (Funke et Funke-Kissling., 2005).

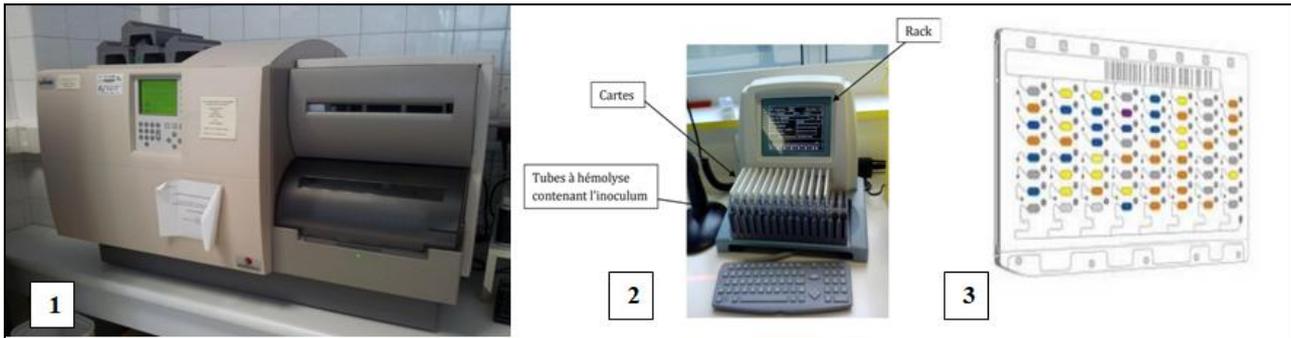


Figure15 : Photo montrant Automate VITEK 2 (1) Automate VITEK 2. Poste délocalisé relié au VITEK 2 disposé sur la paillasse (Eddayab, 2012), (3) une carte du système Vitek (Matuszewski, 2009)

- L'identification d'*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a été faite selon les étapes suivant :

Les échantillons ont été isolés et purifiés sur gélose au sang de mouton Columbia, gélose Mac Conkey et gélose trypticase soja pendant 18 à 24 h à 37 °C avant d'être soumis à l'analyse par le VITEK 2.

Pour cela la suspension bactérienne étudiée devait être ajustée à un standard MacFarland de 0,5 dans 2,5 mL d'une solution de chlorure de sodium à 0,45%.

- La carte est placée sur la cassette conçue pour VITEK 2, scellée, incubée à 35,5 ° C dans une chambre à vide de l'automate VITEK 2.
- La mesure colorimétrique a été faite automatiquement en utilisant une nouvelle tête de lecture optique toutes les 15 min pour une période d'incubation maximale de 10 h.
- Les données ont été analysées à l'aide de la base de données VITEK 2 version 4.01, qui permet l'identification de l'organisme en mode cinétique après 2 h d'incubation.
- L'identification des souches de *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* ont suivi les mêmes étapes décrites précédemment, avec quelques modifications.
 - Le changement des cartes en GP (Gram Positif).
 - La période d'incubation maximale est de 8 h
 - L'identification à partir de 3h après le début de l'incubation

4. Recherche et identification des gènes nuc et mecA par PCR : Cas des SARM

Dans l'étude de **Hakimi Alni et al., (2020)**, l'identification de SARM a été confirmée par la recherche de gène nuc et gène mecA en utilisant la technique de PCR (**Figure 16**) d'écrite par **Zhang et al., (2005)**.

La PCR (**Polymérase Chain Réaction**) est une méthode permettant l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN. La réaction PCR nécessite 2 amorces oligonucléotidiques et la séquence cible d'ADN devant être répliquée, chacune étant complémentaire à un des deux brins d'ADN. Les amorces sont généralement ajoutées en excès par rapport à la quantité d'ADN à amplifier dans le mélange réactionnel (**Tableau 6**). Ce dernier est également composé de l'ADN polymérase, de dNTPs (désoxyribonucléotides triphosphate), de sels (MgCl₂, KCl), d'un tampon et de l'échantillon d'ADN (**Touaitia, 2016**).

Tableau 6 : Amorces utilisées pour déterminer les types de SCCmec, les isolats de SARM (Hakimi Alni et al., 2020).

Amorce	Séquence 5'-3'	Type
Type I-F	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG	SCCmecI
Type I-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	/
Type II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	SCCmecII
Type II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC	/
Type III-F	CCATATTGTGTACGATGCG	SCCmecIII
Type III-R	CCTTAGTTGTTCGTAACAGATCG	/
Type IV a -F	GCCTTATTCGAAGAAACCGSCC	mecIVa
Type IV a R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	/
Type V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	SCCmecV
Type V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	/
MecA147-F	GTGAAGATATAACCAAGTGATT	/
MecA147-R	ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	/
16sRNA-F	AGCCGACCTGAGAGGGTGA	/
16sRNA-R	TCTGGACCGTGTCTCAGTTCC	/
nucA-F	GCGATTGATGGTGATACGGTI	/
nuc A-R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	/

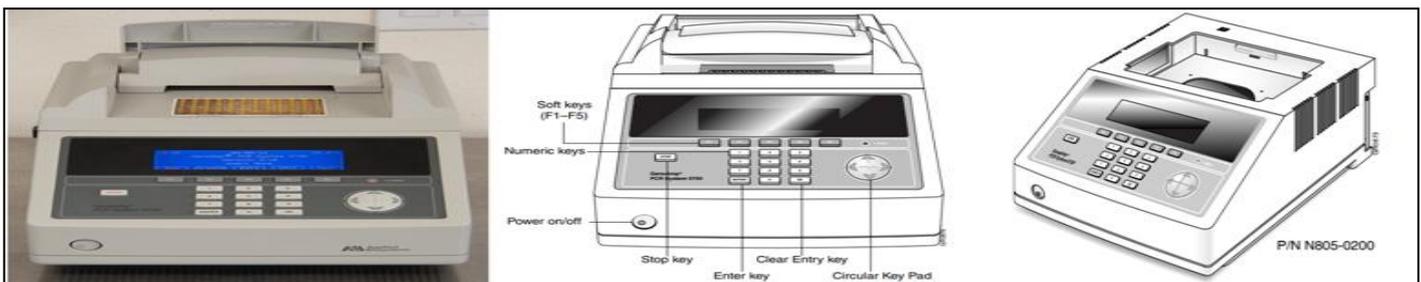


Figure 16 : Photo montrant le système de PCR (User's Manuel 2003/2010)

5. Etude de sensibilité aux antibiotiques : Antibiogramme

Dans ces différents articles, la sensibilité aux antibiotiques a été également recherchée et déterminée par la méthode de diffusion des disques en milieu solide (Antibiogramme).

Les géloses Mueller-Hinton ont étéensemencées, à l'aide d'un écouvillon, à partir d'une culture bactérienne jeune (18h à 24h) à 0.5 MacFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL) diluée au 1/100. Les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'un distributeur automatique. Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 18 à 24 h à 37°C. À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques ont été mesurés afin d'interpréter les bactéries en 3 catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante [(Ayad, 2017) ; (CA-SFM, 2020)].

L'ensemble des antibiotiques testés dans ces études étaient :

Gentamicine, Ceftazidime, Ciprofloxacine, Pipéracilline – Tazobactam, Doripénème, Lévofloxacine, Céphalothine, Doxycycline , Céfépime , Flucloxacilline, Vancomycine, Clindamycine, Erythromycine , Kanamycine , Tobramycine , Ofloxacine , Rifamycine , Aztréonam , Norfloxacine , Gatifloxacine , Céphradine ,Tétracycline et l'oxacilline .

6. Capacité des bactéries isolées à former un biofilm : méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

Dans ces articles les auteurs ont essayé d'étudier la capacité des souches isolées à former un biofilm, la technique utilisée était la TCP (**Figure 17**)

Le test TCP décrit par **O'Toole *et al.*, (2000)** permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm par l'utilisation d'une microplaque de 96 puits suivant ce protocole.

Les suspensions bactériennes des souches testées ont été ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre dans le milieu de croissance puis déposées dans les puits d'une microplaque à 96 puits, à l'exception des deux puits (témoin). La plaque était incubée à 37°C pendant 24h avec / sans agitation.

Après incubation, les puits ont été lavés 3 fois afin d'éliminer les bactéries non fixées. Le biofilm formé a été ensuite coloré avec du cristal violet et quantifié à l'aide de détecteurs après une solubilisation [(Bardbari *et al.* , 2018) ; (Fadl , 2018) ;(Hakimi Alni *et al.*, 2020) ;(Khozani *et al.*, 2018) ;(Karyne *et al.* , 2020)] (Tableau7).

Tableau 7 : Les étapes utilisées dans les cinq articles étudiés pour détecter la formation du biofilm

Sources Etapes	Fadl, 2018	Khozani <i>et al.</i>, 2018	Bardbari <i>et al.</i>, 2018	Karyne <i>et al.</i>, 2020	Hakimi Alni <i>et al.</i>, 2020
[] de l'inoculum	DO570 nm > 0,1	1,5.10 ⁷ UFC/ mL	10 ⁷ UFC/mL	0,5 MacFarland	/
V de l'inoculum	/	/	100 µL	100 µL	200 µL
Milieu de culture	Bouillon de soja trypticase additionné de 0,25% de glucose	TSB-glucose	TSB additionne de glucose (1%)	Luria Bertani	TSB
Fixateur	Ethanol à 95%	200 µL de méthanol (99%)	100 µL méthanol absolu	/	/
Colorant	Cristal violet à 1%	Cristal violet à 1% pendant 5 min	100 µL de cristal violet (1%) pendant 5 min	100 µL de cristal violet à 0,1% pendant 30 min	100 µL de cristal violet (% 1)
Lavage	/	250 µL de Phosphate Buffered Saline (PBS)	PBS /Eau déionisée	Eau distillé	100 µL alcool-acétique
Homogénéisateur	/	Ethanol (95%)	100 µL éthanol absolu	Ethanol (95%)	100 µL alcool-acétique
Détecteur	/	Spectrophotomètre pour microplaques	Spectrophotomètre pour microplaques	ELISA	Microtitration ELISA
Longueur d'onde (nm)	570	595	595	590	570

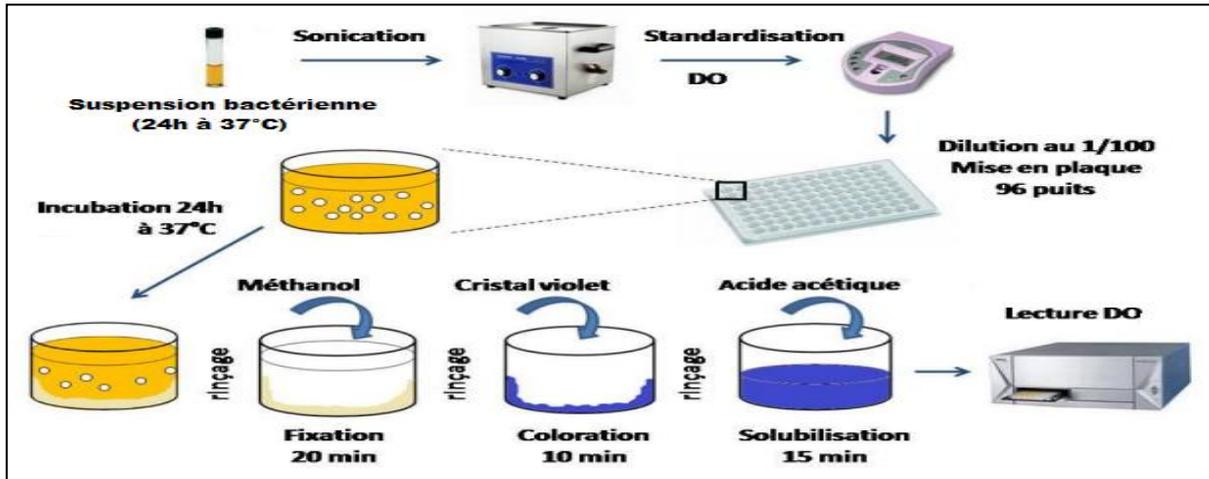


Figure 17 : Les étapes de formation de biofilm par la microplaque 96 puits
(Source internet)

7. Activité anti-biofilm du venin d'abeille et de son composant actif : La mélittine

L'étude de l'activité du venin d'abeille et la mélittine par la technique TCP était appliquée sur les souches bactériennes isolées afin d'étudier l'inhibition et/ou l'élimination d'un biofilm formé.

A cet effet, **Fadl, (2018)** dans son étude a collecté du venin d'abeille (BV) par la méthode de l'électrostimulation décrite pour la première fois en 1954 par de Markovic Mollnar (**Bogdanov., 2016a**) (**Figure 18, 19**).

Dans les études respectives de **Bardbari et al., (2018)**, **Hakimi Alni et al., (2020)** **Khazani et al., (2018)** après récupération du venin, celui-ci était traité pour isoler uniquement la mélittine (Mel) qui est le composé le plus important du venin, soit alors il était acheté dans le cas d'étude de **Karyne et al., (2020)** puisque celui-ci commercialisé.

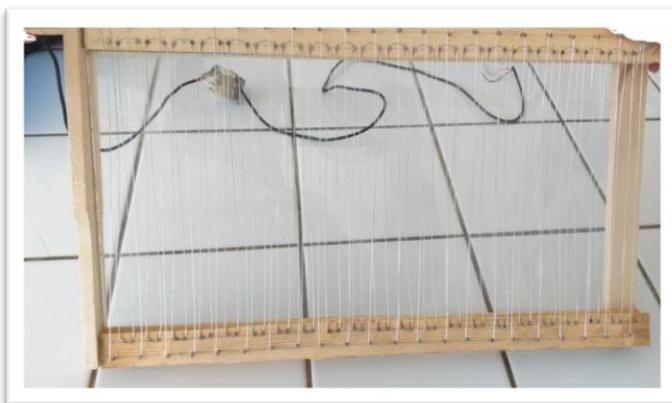


Figure 18 : Collecteur de BV (source personnel)



Figure19 : Apiculteur avec un collecteur BV
(Bogdanov., 2016a)

7.1. Inhibition de la formation du biofilm par le venin ou la mélittine

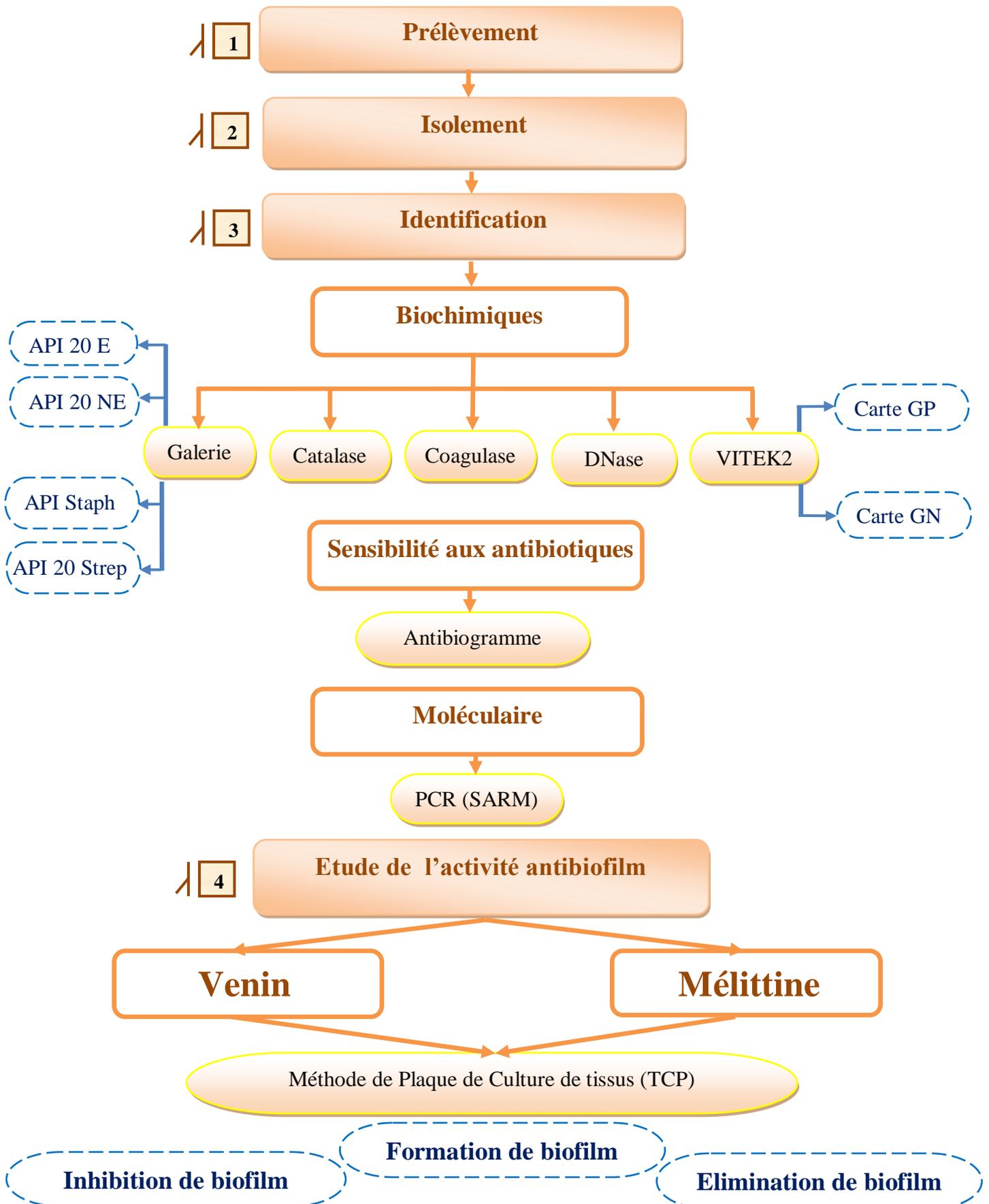
Une suspension bactérienne était distribuée dans chaque puits de plaque en polystyrène à 96 puits en présence de milieu de culture (TSB ou LB), le BV ou Mel étaient ajoutés à des différentes concentrations afin de déterminer la CMIB. Après l'incubation pendant 24h à 37°C. Les cellules planctoniques ont été retirées et chaque puits de la microplaque est lavé et coloré par le cristal violet. Les biofilms colorés ont été solubilisés par l'éthanol absolu et les valeurs de densité optique (DO) ont été mesurées. Chaque essai a été effectué en trois exemplaires et le contrôle négatif était les bactéries dans le milieu de culture sans BV ou Mel. Le pourcentage de réduction de biofilm a été calculé en utilisant les résultats des bactéries cultivées en l'absence de BV ni Mel [(**Bardbari et al., 2018**) ;(**Fadl , 2018**); (**Hakimi Alni et al., 2020**)].

7.2. Elimination de la formation du biofilm

Le test élimination du biofilm a été effectué en utilisant des microplaques en polystyrène à 96 puits.

Tout d'abord les bactéries examinées ont formé le biofilm comme décrit précédemment. La mélittine a été préparé avec une série de concentrations, puis ajoutée aux puits et incubées à 37°C pendant 24h dans l'étude de **Bardbari et al., (2018)** et 2h pour l'étude de **Karyne et al., (2020)**. L'élimination du biofilm a été mesurée par dosage colorimétrique. Le contrôle positif était les bactéries présentes dans le milieu de culture sans mélittine, pour l'étude de **Khozani et al ., (2018)** ce test a été cinétiquement effectué (après 1,3,6 et 24h) pour déterminer la quantité cible et le temps dans lequel la plus grande dégradation serait enregistrée

Schéma récapitulatif des techniques utilisées dans les cinq articles étudiés



Troisième partie :
Résultats et Discussion

1. Souches identifiées dans les cinq articles étudiés

Les résultats des identifications (galerie API, test catalase, test de coagulase, test de DNase et le VITEK 2) qui ont été effectuées sur les différents prélèvements des cinq articles étudiés, Les isolats sont regroupés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Résultats des bactéries identifiées dans les cinq articles traités

Type	Bactéries	Origine	Références
Gram -	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Infektions pulmonaires et des brûlures	Bardbari et al ., 2018
		Hospitalière	Karyne et al ., 2020
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Abcès, du pus, des expectorations et de l'urine	Fadl, 2018
	<i>Escherichia coli</i>		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brulure 3 ^{émé} degré	Khozani et al., 2018	
Gram+	<i>Enterococcus faecalis</i>	Abcès, du pus, des expectorations et de l'urine	Fadl, 2018
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Brûlures	Hakimi Alni et al., 2020

1.1. Identification des gènes nuc et mecA par PCR

Les Staphylocoques isolés dans l'étude de **Hakimi Alni et al., (2020)**, ont subi non seulement une détection de gène nuc afin de confirmer la présence des *S. aureus* mais également , la révélation du gène mecA pour la confirmation de leur résistante à la méthicilline (SARM). Le typage SCCmec parmi les isolats de SARM a montré l'existence de plusieurs types SCCmec (type I, type II, type III, type IV, et type V) (**Tableau 9**).

1.2. Sensibilité aux antibiotiques

L'ensemble des souches isolées dans les articles, ont étaient multirésistantes à plusieurs antibiotiques (MDR) (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Résultats des souches identifiées dans les cinq articles étudiées

Espèces	Souches	Références
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> MDR1	Bardbari et al ., 2018
	<i>A. baumannii</i> MDR2	
	<i>A. baumannii</i> MDR3	
	<i>A. baumannii</i> MDR4	
	<i>A. baumannii</i> MDR5	
	<i>A. baumannii</i> Non-MDR	
	<i>A. baumannii</i> 31852 Sensible (S)	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> 33677 Extrêmement résistantes(XDR)	Karyne et al ., 2020
	<i>A. baumannii</i> 96734 (XDR)	
	<i>A. baumannii</i> 100 Résistantes à tous les antibiotiques testés (PDR b)	
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> (MDR)	Fadl, 2018
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (MDR)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (MDR)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR)	Khozani et al., 2018
	<i>P. aeruginosa</i> MDR1	
	<i>P. aeruginosa</i> MDR2	
	<i>P. aeruginosa</i> MDR3	
	<i>P. aeruginosa</i> MDR4	
<i>P. aeruginosa</i> MDR5		
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> (MDR)	Fadl, 2018
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i> (MDR)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S.aureus</i>	Fadl, 2018
	<i>S. aureus</i> SARM	
	<i>S. aureus</i> résistante à la vancomycine (VRSA)	
	SARM-1, SCCmec I	Hakimi Alni et al., 2020
	SARM-2, SCCmec II	
	SARM-3, SCCmec III	
	SARM-4, SCCmec IV	
	SARM-5, SCCmec V	
	<i>S.aureus</i> sensible à méthicilline-1 (MSSA-1)	
	MSSA-2	
	MSSA-3	
	MSSA-4	

Une exposition étendue aux antibiotiques augmente rapidement la propagation des bactéries résistantes à des différentes échelles, souvent appelés superbactéries, ce qui complique le choix des chimiothérapies et limite les options de traitement [(Mohamed et al ., 2017) ; (Memariani et al ., 2019) ; (Pashaei et al ., 2019)], la résistance s'explique grâce à l'acquisition et à l'expression des gènes de résistance, puis les partagent avec d'autres bactéries tels que les processus de surexpression des gènes (Collignon et al., 2018). Ce problème est

directement associée à la capacité des bactéries à survivre dans l'environnement hospitalier en raison de la présence d'une couche de biofilm par laquelle elles peuvent résister à l'entrée d'antibiotiques (Qi *et al.* , 2016). Il est donc un problème majeur de santé publique et sous-entend le besoin des solutions nouvelles et efficaces (Lashinsky *et al.* , 2017) .

2. Capacité des bactéries isolées à former un biofilm : méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

Dans l'étude de Hakimi Alni *et al.*, (2020) , la méthode de TCP a caractérisé toutes les souches isolées en quatre groupes, des fortement formatrices de biofilm soit la majorité des souches ,des modérées, et des faibles ou non formatrices du biofilm.

Les isolats des études de Fadl, (2018) et Karyne *et al.* , (2020) ont tous été de bons formateurs de biofilm , le tableau suivant récapitule les résultats trouvés (Tableau10).

Tableau 10 : La capacité des bactéries à former des biofilms dans les études de Fadl, (2018) ; Karyne *et al.* , (2020).

Souches	Formation de biofilm			Références
	Forte	Modéré	Faible	
<i>A.baumannii</i> ATCC 19606			+	Karyne <i>et al.</i> , 2020
<i>A. baumannii</i> 31852 (S)		+		
<i>A. baumannii</i> 33677 (XDR)			+	
<i>A. baumannii</i> 96734 (XDR)			+	
<i>A. baumannii</i> 100 (PDR b)		+		
<i>E. cloacae</i> (MDR)	+			Fadl, 2018
<i>E. coli</i> (MDR)			+	
<i>K. pneumoniae</i> (MDR)		+		
<i>P.aeruginosa</i> (MDR)	+			
<i>E. faecalis</i> (MDR)	+			
<i>S. haemolyticus</i> (MDR)	+			
<i>S.aureus</i>	+			
<i>S. aureus</i> SARM		+		
<i>S.aureus</i> VRSA	+			

Bardbari et al ., (2018) dans leurs étude ont quantifié le biofilm en fonction du temps avec un profil de cinétique de la formation de biofilm pour toutes les souches sur une période de 6 jours, en utilisant la méthode de coloration au cristal violet.

Toutes les souches d'*A.baumannii* bactérie à Gram négatif isolées ont montré une forte formation de biofilm, à l'exception de la souche ATCC 19606 qui est une souche de référence non formatrice de biofilm (**Figure 20**). Les résultats de la cinétique de formation du biofilm ont montré qu'une valeur maximale de densité optique (DO) était atteinte après 48 à 72 h d'incubation correspondant à la maturation de biofilm. Au-delà de cette période, une diminution de la densité du biofilm a été observée où il y a un phénomène de dispersion du biofilm.

Alors que dans l'étude de **Khozani et al .,(2018)**, la DO maximale de la majorité des isolats de *P.aeruginosa* est atteinte après 24h variant entre 0,85 et 2, suivie une diminution remarquable à 48 h (**Figure 20**).

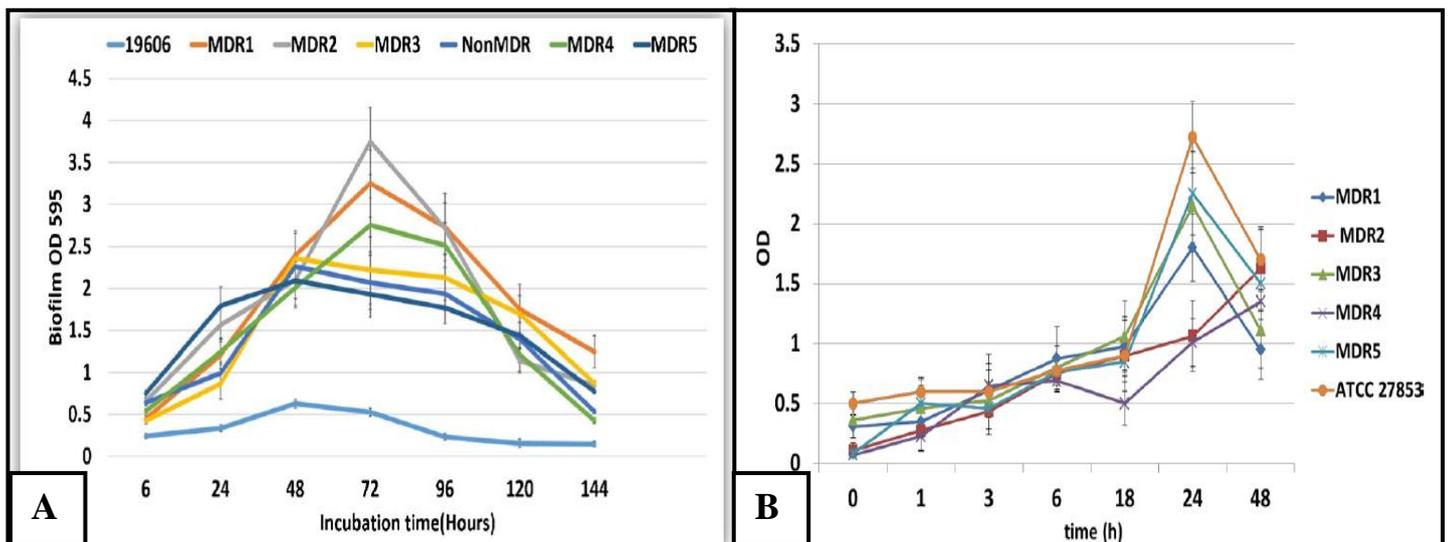


Figure 20 : Cinétique de la formation de biofilm des souches isolées dans les études de (A) : **Bardbari et al ., (2018)** ; (B) : **Khozani et al ., (2018)**

La cinétique de la formation de biofilm dans les étude de **Bardbari et al., (2018)** et de **Khozani et al .,(2018)** est produite de manière dépendante du temps et des bactéries productrices. Ce problème peut être dû à différents profils d'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm.

La plupart des bactéries à Gram négatif ont de longues chaînes de polysaccharidiques dans leur lipopolysaccharides ayant pour résultat une surface hydrophile, tandis que les bactéries à Gram positif ont la partie d'acide lipotéichoïques qui se prolonge à l'extérieur de la cellule rendant leur surface hydrophobe (Frank, 2001).

Le mode de vie des bactéries en biofilm est souvent lié à la structure pariétale de la bactérie et la nature de surface qui influencent leur adhésion. L'adhérence peut se faire sur différents supports, chacun ayant des caractéristiques d'hydrophobicité et de charges de surface différentes, ce qui peut favoriser ou non l'adhérence microbienne en fonction des souches bactériennes utilisées (Bellifa, 2014).

3. Activité anti-biofilm du venin d'abeille et de son composant actif : La mélittine

3.1. Inhibition de la formation du biofilm par le venin ou mélittine

Les résultats de Bardbari *et al.*, (2018) ont bien montré l'effet positifs de la mélittine sur l'inhibition de biofilm de toutes les souches *A. baumannii* multirésistantes isolées du milieu hospitalier (brûlures et des infections pulmonaires), avec des CMIB allant de 1 à 2 µg/ mL. Avec une moyenne se situant à 1,42 µg/ mL (Figure21).

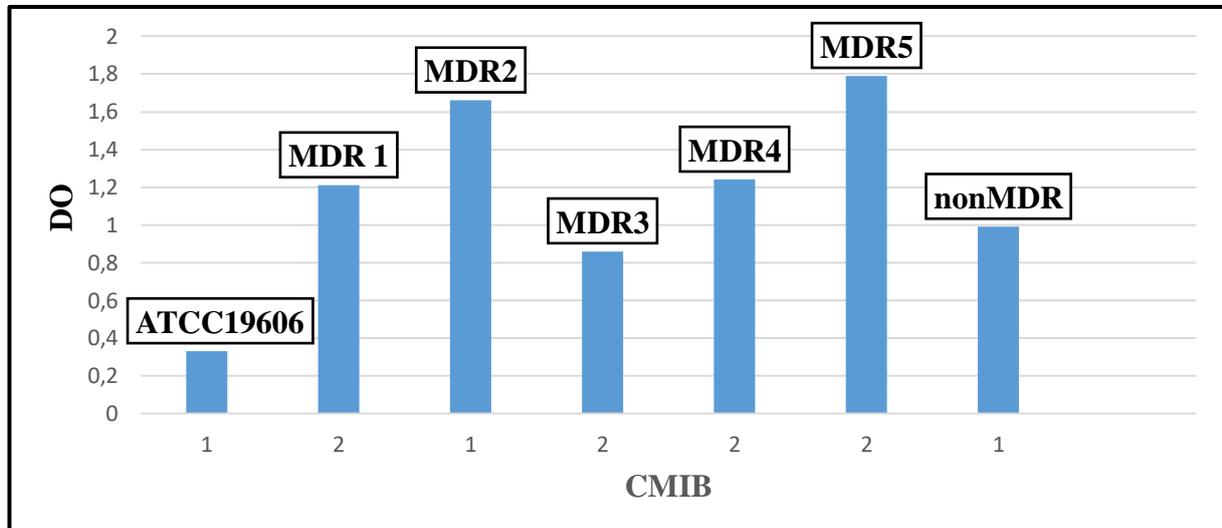


Figure 21 : Concentration minimale inhibitrice de biofilm (CMIB) de la mélittine sur des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées du milieu hospitalier (Bardbari *et al.*, 2018).

Dans l'étude de **Hakimi Alni et al., (2020)** la formation du biofilm par la technique de TCP des 9 souches (4 isolats de SARM , 4 MSSA et une souche *S.aureus* de référence ATCC33591), a montré que les concentrations de mélittine à des doses inférieures de CMI de la mélittine soit des sous-CMI : CMI/2 ,CMI/4,CMI/8 et CMI/16 sur des cellules planctoniques avait un effet sur l'inhibition et destruction de biofilm de l'ensemble des souches de Staphylocoques étudiées comme le montre la **Figure 22**. On constate qu'une CMI/16 avait un effet sur l'inhibition du biofilm où la moyenne des DO est passée de 2.65 à 2.34. Une sous-CMI/2 de la mélittine avait un effet considérable, où la DO a diminué de presque 50% non seulement par rapport à la moyenne des DO des souches de Staphylocoques étudiées mais également de celle de la DO de la souche contrôle (bonne formatrice de biofilm).

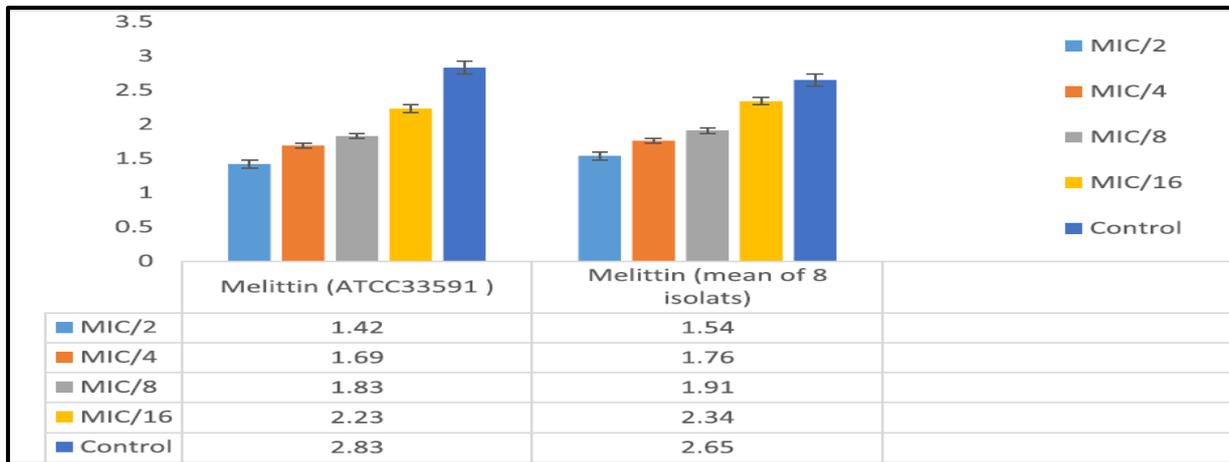


Figure 22 : Effet de la mélittine à différentes concentrations sur la formation du biofilm **Hakimi Alni et al., (2020).**

L'effet anti-biofilm du venin d'abeille vis-à-vis des isolats multirésistants (MDR) à Gram négatif et positif dans l'étude **Fadl, (2018)** a inhibé la formation des biofilms correspondants.

Les résultats obtenus dans cette étude (**Figure 23**) ont montré que la croissance planctonique d'*E.cloacae* n'a pas été affectée par les concentrations sous-CMI (CMI = 25 µg/mL) de venin d'abeille, tandis que la formation de biofilm a été fortement inhibée de 84%, 68% à CMI/2 et CMI/4 respectivement. Une atténuation modérée de 39% a été observée à CMI/8.

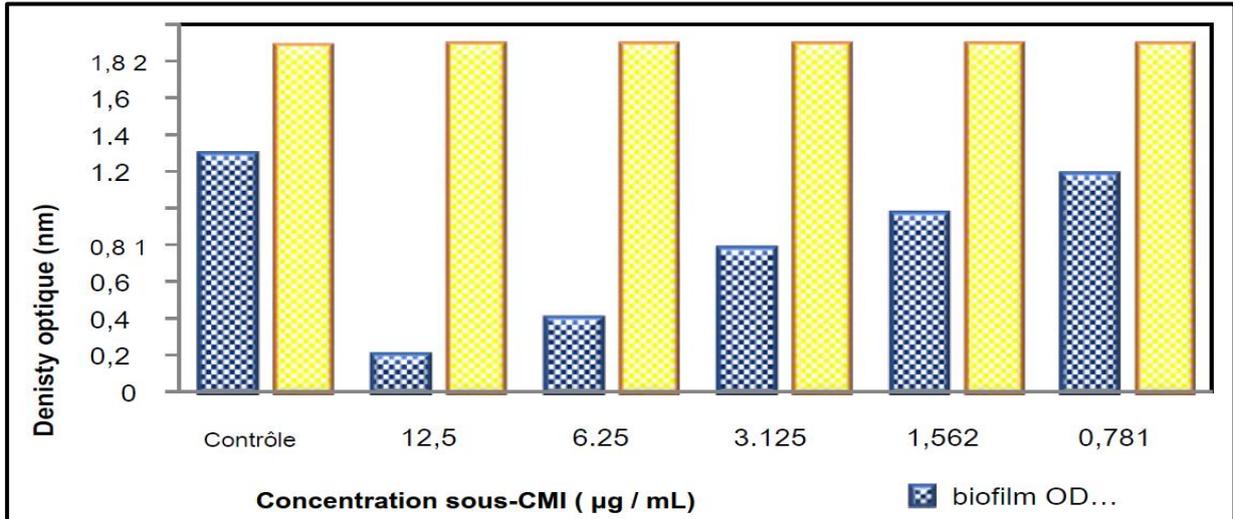


Figure 23 : Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm d'*Enterobacter cloacae* (MDR) (Fadl, 2018).

La formation du biofilm de *P. aeruginosa* considéré comme un facteur clé pour la survie et la résistance des microorganismes. Les sous-CMI (CMI=50µg/mL) du venin d'abeille ont presque inhibés totalement le biofilm de *P.aeruginosa* de 92% à CMI/2. D'autres sous-CMI ont montré un effet d'inhibition et anti biofilm modéré à fort compris entre 28% et 77% avec une augmentation de la concentration en sous-CMI (Figure 24).

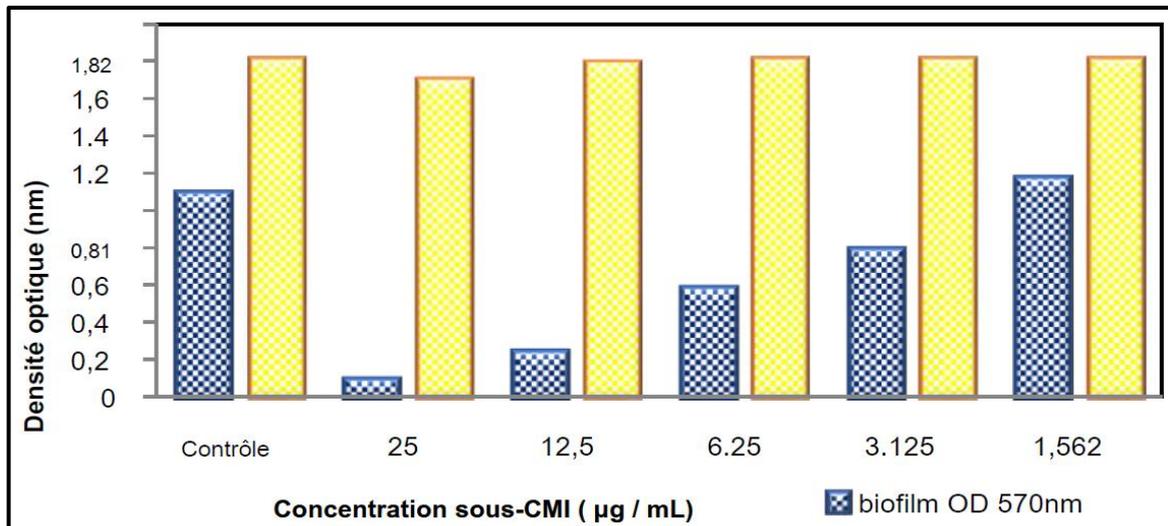


Figure 24 : Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (MDR) (Fadl, 2018)

La souche de *S.aureus* considérée comme une bactérie productrice du biofilm, la concentration sous-CMI (CMI=6.25 µg/mL) du venin d'abeille a éradiqué le biofilm à 63.8% avec une CMI/2. Alors que 37.8% et 18% d'éradication des biofilms ont été atteints à 1/4 et 1/8 de CMI. Le biofilm de *S.aureus* n'a pas été affecté à des faibles concentrations (**Figure 25**).

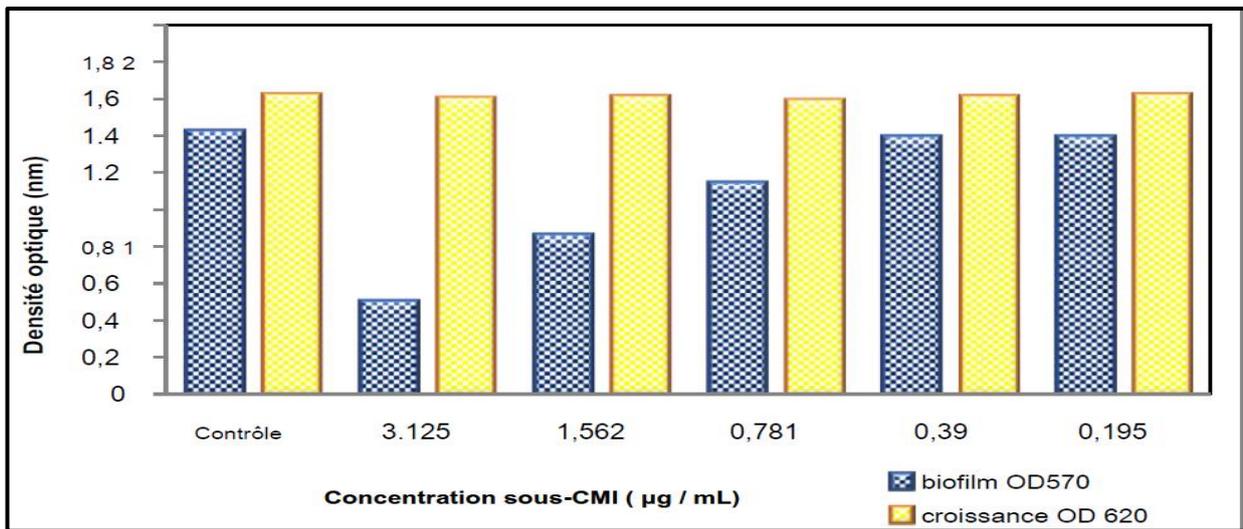


Figure 25 : Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* (MDR) (**Fadi, 2018**)

Le biofilm produit par un isolat multirésistant *S.aureus* résistant à vancomycine (MDR-VRSA) a pratiquement été éradiquée dans les puits de la microplaque avec des concentrations de sous-CMI (CMI=12,5 µg/mL) de venin d'abeille. Les doses de 1/2 de la CMI du venin d'abeille étaient responsables de 78% de l'épuisement du biofilm de cette bactérie. De plus, il a été constaté une réduction de 55% du biofilm à 1/4 de la CMI (**Figure 26**). Dans toutes ces expériences l'auteur précise que la croissance des cellules eucaryotiques n'était pas affectée.

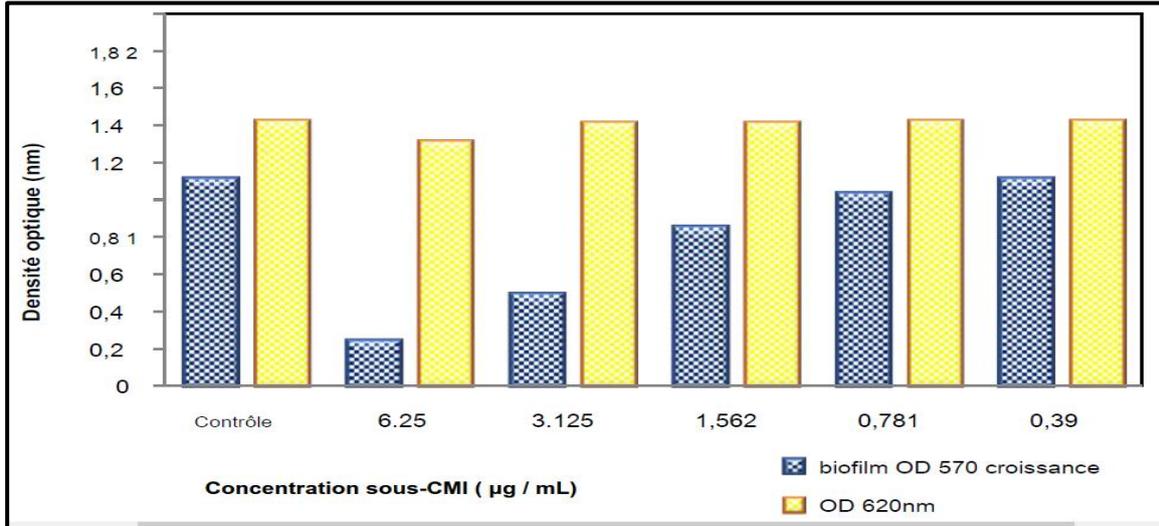


Figure 26 : Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm des souches multirésistantes *Staphylococcus aureus* résistante à la vancomycine (VRSA-MDR) (Fadl, 2018).

Les résultats obtenus par **Fadl, (2018)** ont montré que les concentrations sous-inhibitrices de venin d'abeille (CMI= 6.25µg/mL) étaient capables de diminuer la production de biofilm de *S. haemolyticus* respectivement de 68% et 35% à 1/2 et 1/4 CMI. Alors que les concentrations plus faible (1/8 ,1/16 et 1/32) ont donné des effets faibles à nuls (**Figure 27**).

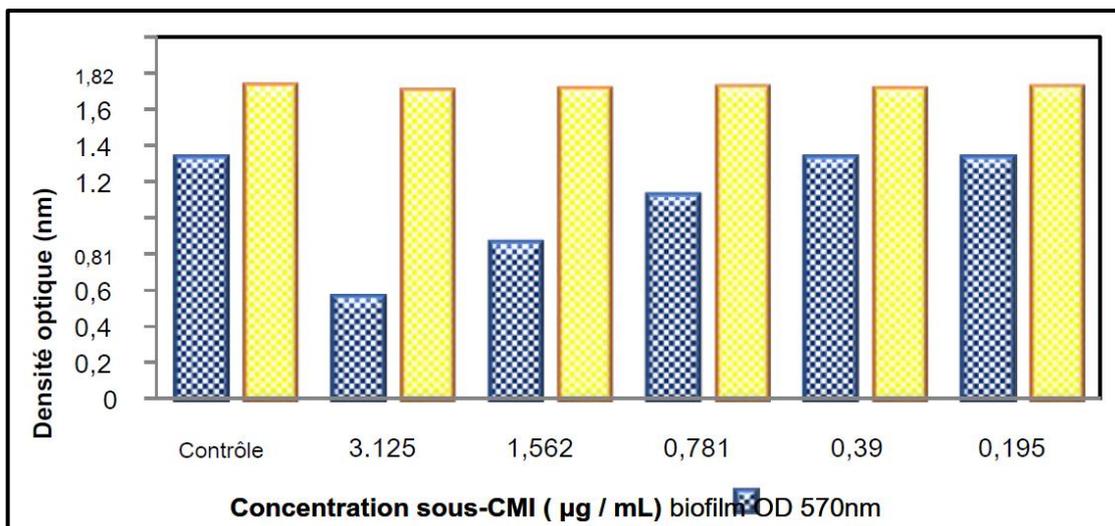


Figure 27 : Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm de *Staphylococcus haemolyticus* (MDR) (Fadl, 2018)

Il a été constaté dans cette étude que le biofilm *E. faecalis* bactérie à Gram+ était moins affecté à 1/2 CMI (CMI=3.125µg/mL), où seulement 39% des biofilms ont été inhibés par rapport aux biofilms des bactéries multirésistantes à Gram négatif et positif examinées préalablement dans cette étude à une concentration sous-inhibitrice de moitié. De plus, à 1/4 CMI un faible effet d'inhibition où seulement 19% du biofilm est éliminé. Les autres concentrations étaient complètement inefficaces (Figure 28).

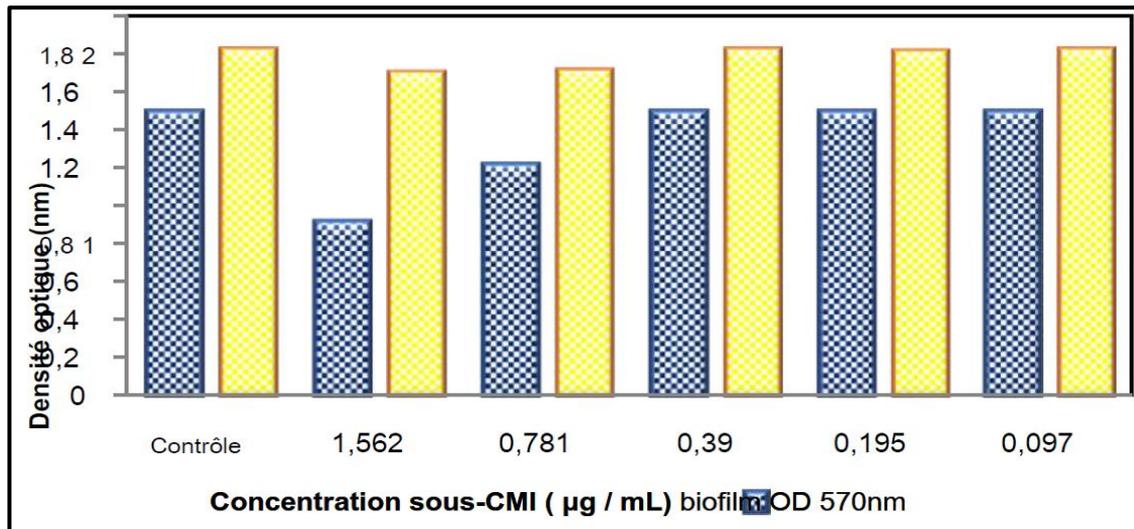


Figure 28 : Effet de la sous-CMI du venin d'abeille sur la formation de biofilm d'*Enterococcus faecalis* (MDR) (Fadl, 2018)

Tableau 11 : Résultats d'inhibition de formation de biofilm à des concentrations de sous CMI de venin d'abeille ou mélittine dans les articles étudiés.

Type	Bactéries	CMI (µg/mL)	Pourcentage d'inhibition de la formation de biofilm à des sous CMI de BV /Mel (%)				Références
			CMI/2	CMI/4	CMI/8	CMI /16	
Gram +	<i>S.aureus</i> ATCC33591	4	49.82	40.28	35.33	21.20	Hakimi Alni et al., 2020
	<i>S.aureus</i>	4.5	41.89	33.58	27.92	11.69	
	<i>S.aureus</i> (MDR)	6.25	63.8	37.8	18	/	Fadl, 2018
	<i>S.aureus</i> (VRSA)	12.5	78	55	/	/	
	<i>S. haemolyticus</i>	6.25	68	35	/	/	
	<i>E. faecalis</i>	3.125	39	19	/	/	
Gram-	<i>P. aeruginosa</i>	50	92	/	/	/	Fadl, 2018
	<i>E. cloacae</i>	25	84	68	39	/	

Les études de **Fadl, (2018)** et **Hakimi Alni et al ., (2020)**, ont montré que les concentrations sous CMI (CMI/2 ,CMI/4 et CMI/8) du venin d'abeille et la mélittine possédaient un effet inhibiteur sur la formation du biofilm.

Ces résultats sont en accord avec une autre étude menée en Italie par **Galdiero et al., (2019)** où l'effet de la mélittine vis-à-vis des souches de *K. pneumoniae*, *S. haemolyticus*, *P. aeruginosa* et *Aeromonas caviae* isolées de conduits laitiers après désinfection avait une activité réductrice du biofilm à des concentrations de sous-CMI. La mélittine avait une action inhibitrice de la formation précoce de biofilm polymicrobien dans les équipements industriels. De même **Picoli et al ., (2017)** ont signalé que l'activité de la mélittine à des concentrations de sous-CMI (CMI/10 et CMI/100) avaient un effet inhibiteur sur la formation de biofilm de souches d'origine alimentaire (*P.aeruginosa*, *E. coli* et *S.aureus*).

De manière générale et à travers ces études il semblerait que le venin d'abeille est plus efficace sur le biofilm des bactéries à Gram positif (*E. faecalis*, *S. haemolyticus* et *S. aureus*) à des concentrations variant entre (0.097-6.25µg/mL), contrairement aux biofilms des bactéries à Gram négative (*E. cloacae* et *P. aeruginosa*) où des concentrations sont plus élevés (0.781-25 µg/mL). Il est probable que la différence de la composition de la matrice extracellulaire du biofilm des bactéries à Gram positif et négatif influence l'activité antibiofilm de venin.

Les données expérimentales de ces études ont confirmé que le venin d'abeille a montré un fort effet antibiofilm contre les isolats testés, les peptides antimicrobiens du venin d'abeilles interagissent avec les phospholipides membranaires comme le décrit par **Jamashi et al ., (2016)**, ces peptides sont capable d'inhiber l'attachement initiale du biofilm par des interactions avec les adhésines bactériennes qui assurent l'adhésion intercellulaire des bactéries aux surfaces (**kim et al ., 2013**). Ce système d'intervention distinctif permet aux peptides antimicrobiens de travailler sur les bactéries à différents stades du biofilm, comme la structure, l'attachement et la dispersion (**Batoni et al., 2016**). Parmi ces peptides, la mélittine qui considérée comme un composant majeur responsable des propriétés antimicrobiennes du venin d'abeille. C'est une molécule phénolique amphipathique qui peut altérer la perméabilité des membranes plasmiques provoquant des agrégations peptidiques formant des pores, De plus des combinaisons lipidiques et peptidique génèrent des pores toroïdaux avec une perturbation directe de la membrane, celles-ci détruisent également l'adhésion bactérienne et réduisent par la suite la formation du biofilm [(**Ostroumova et al., 2015**) ; (**O'Brien-Simpson et al., 2018**)]. La perturbation de la matrice est liée à l'altération d'expression des gènes liés au biofilm, tels que la production de pili, le système quorum sensing, la membrane

cytoplasmique et l'assemblage de flagelle [(Park *et al.*, 2014) ; (Issam *et al.*, 2015) ; (Galdiero *et al.*, 2019)].

3.2. Elimination de formation de biofilm

Dans ces articles, les auteurs ont essayé de connaitre si la mélittine pouvait avoir un rôle dans d'élimination du biofilm préformé. **Khozani *et al.*, (2018)** ont montré que la quantité de 50 µg avait la plus grande activité pour dégrader la couche de biofilm par rapport à d'autres doses plus faibles (0,06 à 25 µg) comme le montre la **Figure 29**. La dose de 50 µg a éliminé toutes les bactéries examinées dans le biofilm après 48 h (**Figure 30**).

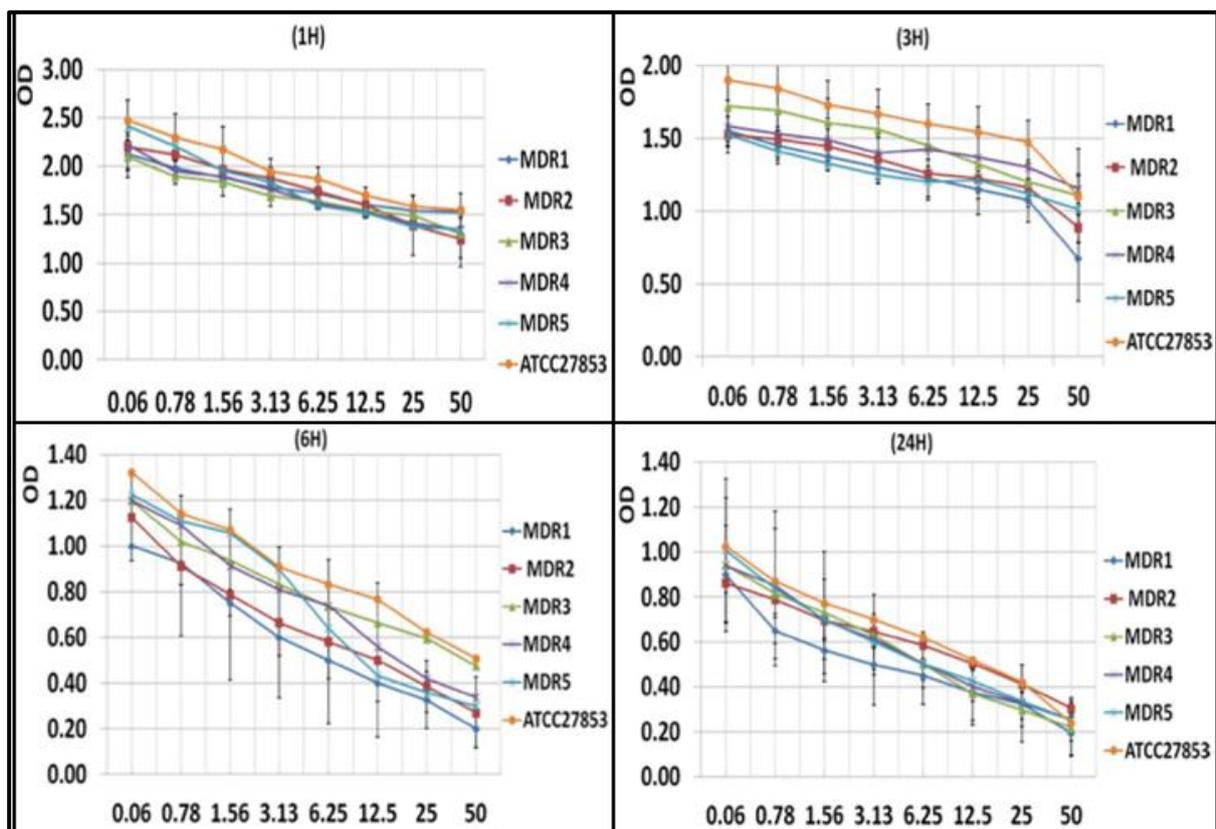


Figure 29 : Cinétique de la dégradation de biofilm par la mélittine (Khozani *et al.*, 2018).

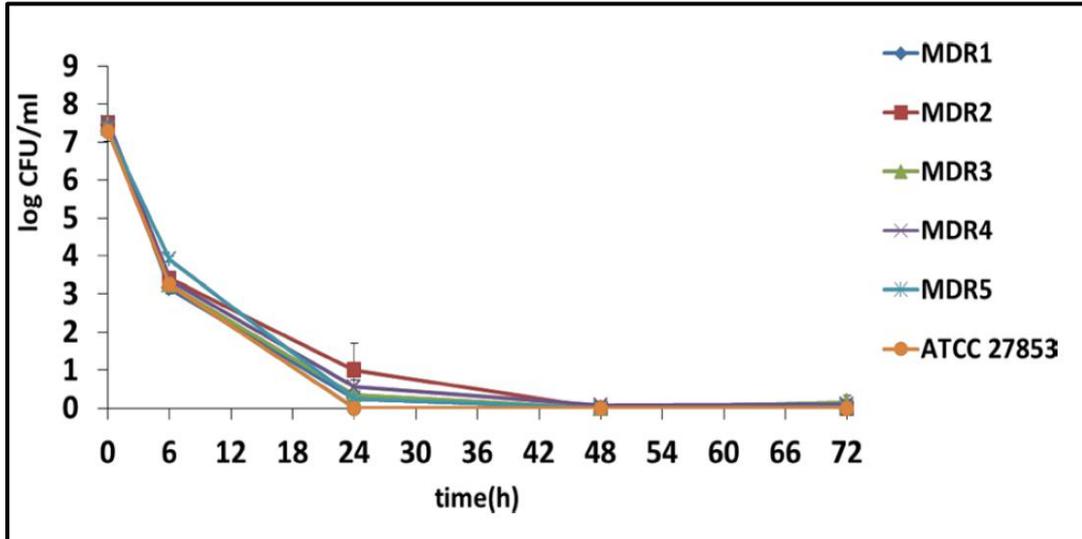


Figure 30 : La courbe cinétique de la capacité de la mélittine à tuer les bactéries examinées dans le biofilm (**Khozani et al ., 2018**).

Dans l'étude de **Bardbari et al ., (2018)** l'auteur estime qu'un traitement à des concentrations différentes de mélittine est plus efficace après 6h qu'après 24h où 40 à 60% de biofilm était éliminé pour des quantité variable entre 0.5à 32 µg (**Figure 31,32**). Effectivement la **Figure 32** montre que la quantité de 32 µg élimine 60% du biofilm pendant 6h et 40% pendant 24 h.

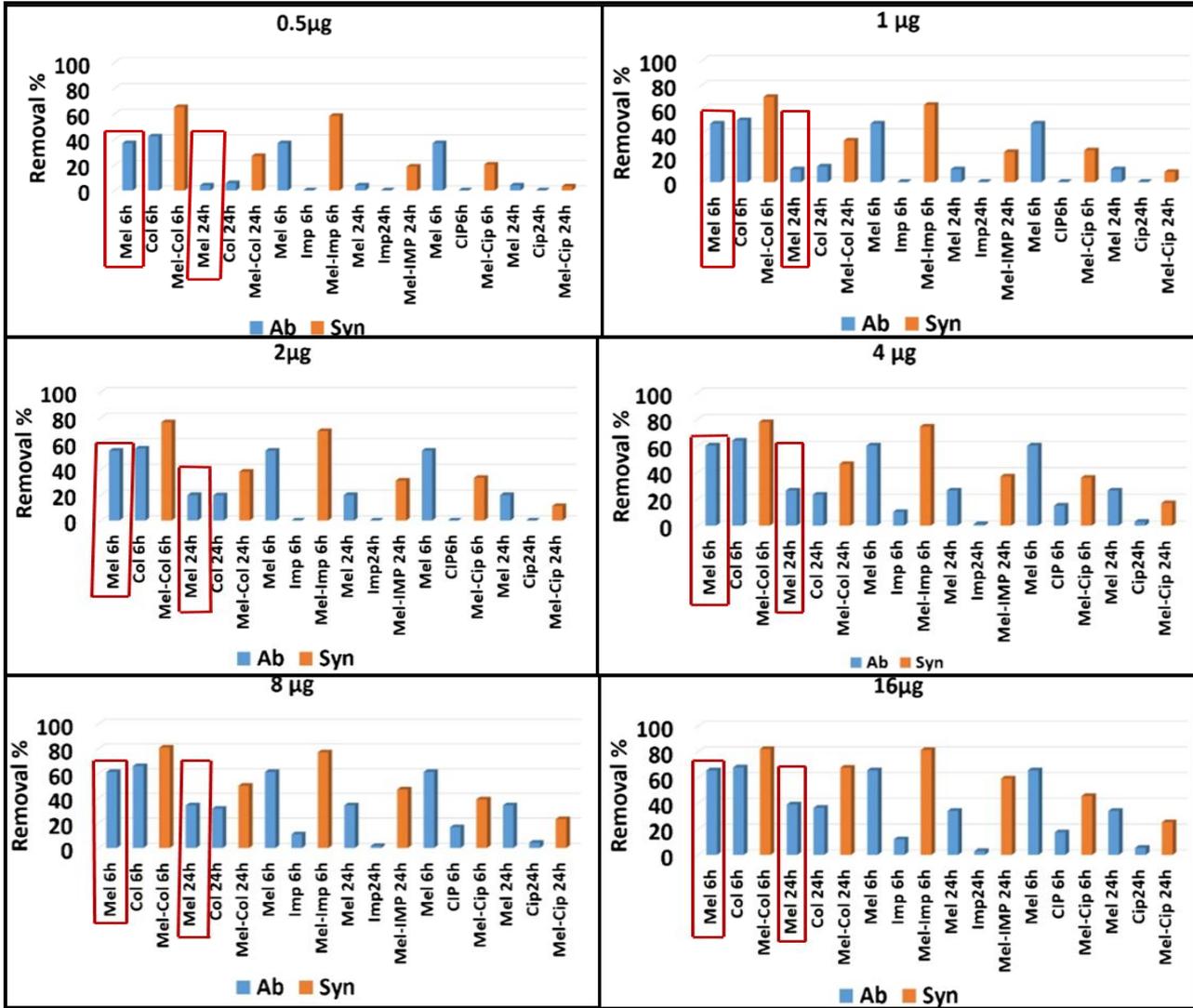


Figure 31 : Effet de la mélittine sur l'élimination de biofilm à des quantités de 0.5à 16µg pendant 6h et 24 h (Bardbari *et al.* , 2018)

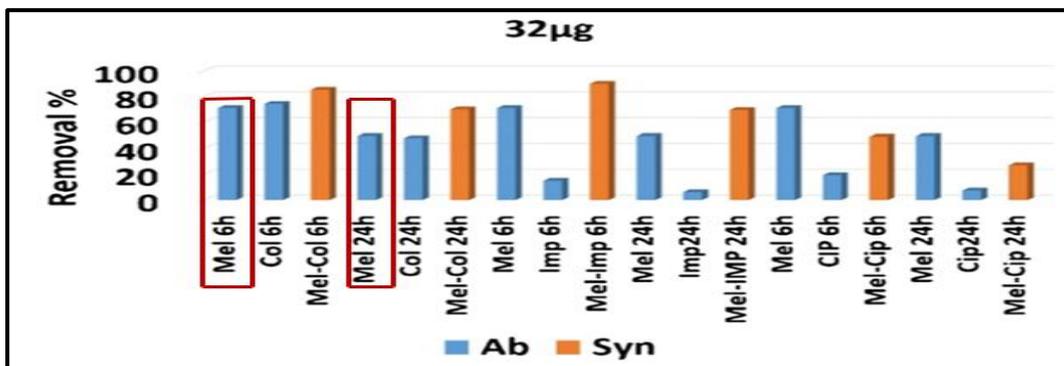


Figure 32 : Effet de la mélittine sur l'élimination de biofilm à une quantité de 32µg pendant 6h et 24 h (Bardbari *et al.* , 2018)

A travers ces études [Bardbari *et al.*, (2018) et Khozani *et al.* , (2018)] on constate que la cinétique de la formation de biofilm pourrait nous orienter pour trouver un moment idéal pour envahir la biomasse du biofilm et avoir un effet plus efficace. Galdiero *et al.* , (2019) confirme que quoi qu'il en soit, l'inhibition de la formation du biofilm aux premiers stades critiques est plus applicable que l'inhibition sur un biofilm mature.

La **Figure 33** dans l'étude de Karyne *et al.* , (2020) confirme l'effet de la mélittine sur la formation et l'inhibition de biofilm chez quelque souche d'*A.baumannii* d'origine hospitalière. L'auteur constate que la bactérie sessile (31852) sensible aux antibiotiques et traités par la mélittine à des concentrations sous-inhibitrices (142 µg / mL) a réduit de 30% la formation de son biofilm. Néanmoins cette même concentration de la mélittine n'a pas affecté les autres souches d'*A.baumannii* multirésistantes (100, 33677 et 96734) (**Figure 33**).

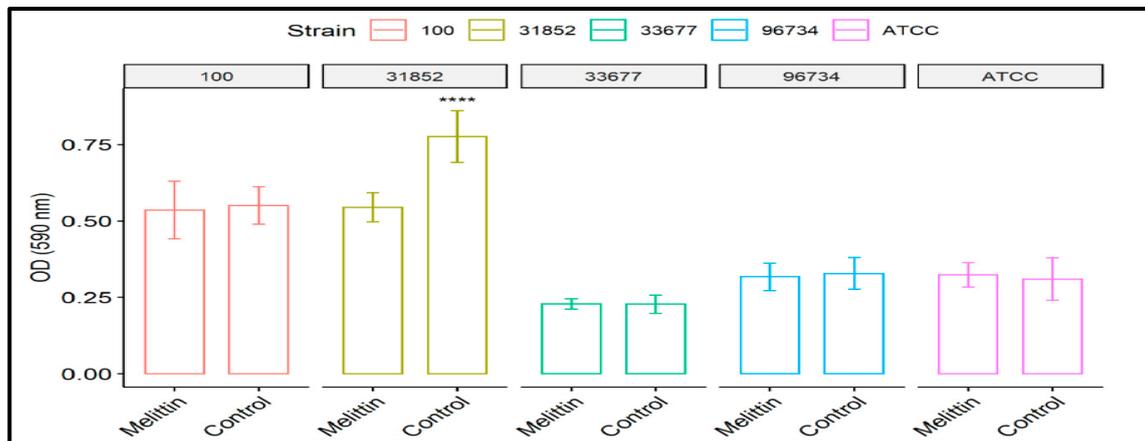


Figure 33 : Action de la mélittine sur les biofilms des souches d'*Acinetobacter Baumannii* (Karyne *et al.*, 2020).

La quantité et la durée d'exposition de la mélittine et le profil de résistance des souches jouent un rôle important pour assurer l'effet anti biofilm de ce peptide. La mélittine qui est un peptide antimicrobien (AMP) peut pénétrer facilement dans la matrice de biofilm mature préformée et réduire les populations cellulaires (Galdiero *et al.* , 2019).

La plupart des peptides antimicrobiens (AMPs) provoquent une perméabilité accrue et / ou la formation des pores non spécifiques à travers la membrane cytoplasmique des bactéries. Les AMPs ont un potentiel élevé pour agir sur les bactéries à croissance lente, y compris celles trouvées au centre des biofilms (Bardbari *et al.*, 2018). Ils peuvent agir sur les perméabilités membranaires, les cibles intracellulaires et la modulation de la réponse immunitaire (Kumar *et al.* , 2018).

Les résultats obtenus dans les articles de **Bardbari et al., (2018)** ; **Khozani et al., (2018)** ; **Hakimi Alni et al., (2020)** ont été confirmés par une microscopie électronique à balayage (FE-SEM) comme le montre dans les **Figures 34,35,36**.

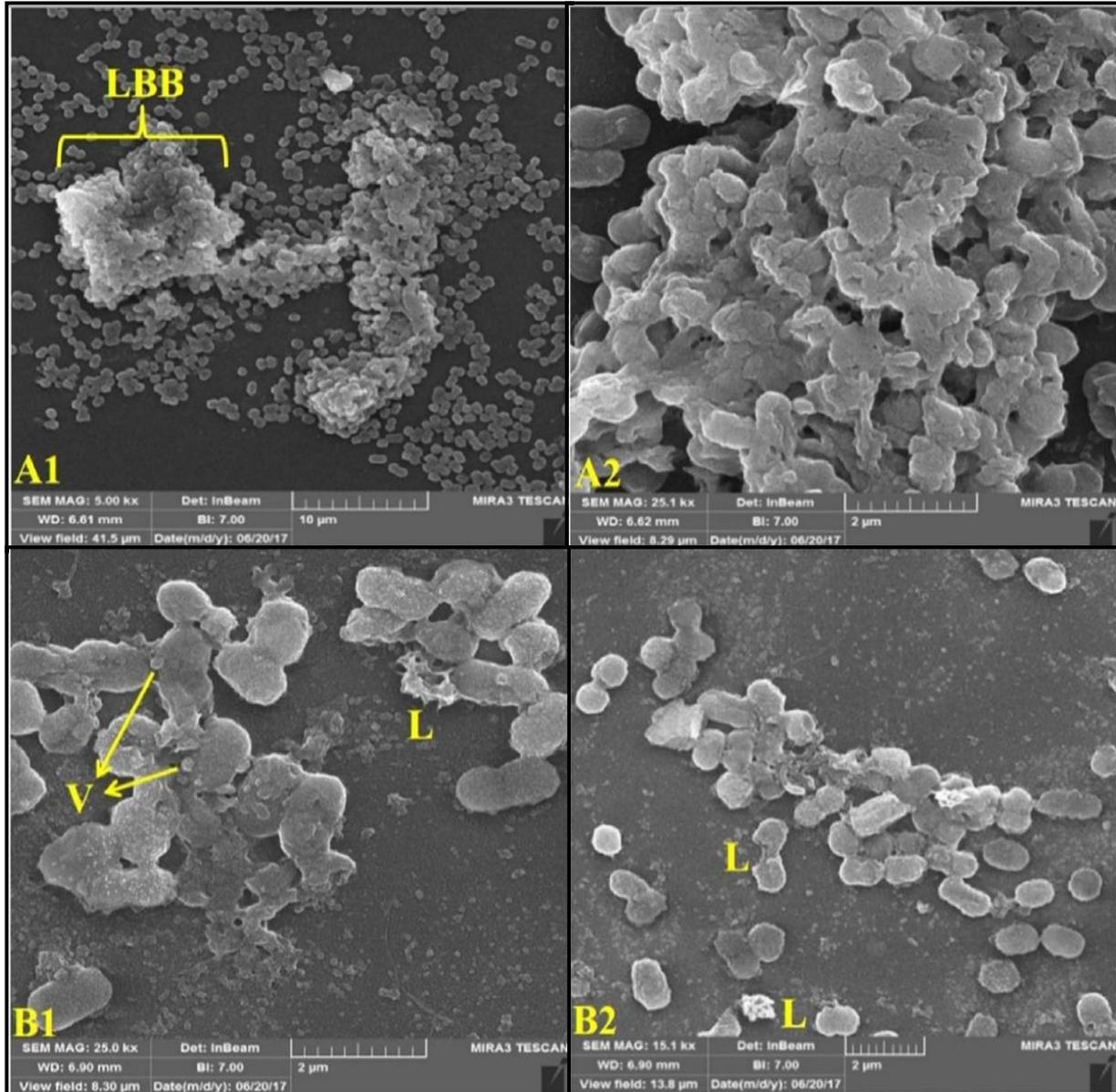


Figure 34 : Effet de la mélittine sur la biomasse du biofilm des souches *Acinetobacter baumannii*. **(A1)** et **(A2)** : groupe non traité. **(B1)** et **(B2)** : mélittine à 0,25 μ g. **LBB** : grande biomasse de biofilm, **V** : vésicule, **L** : lyse. **(Bardbari et al., 2018)**

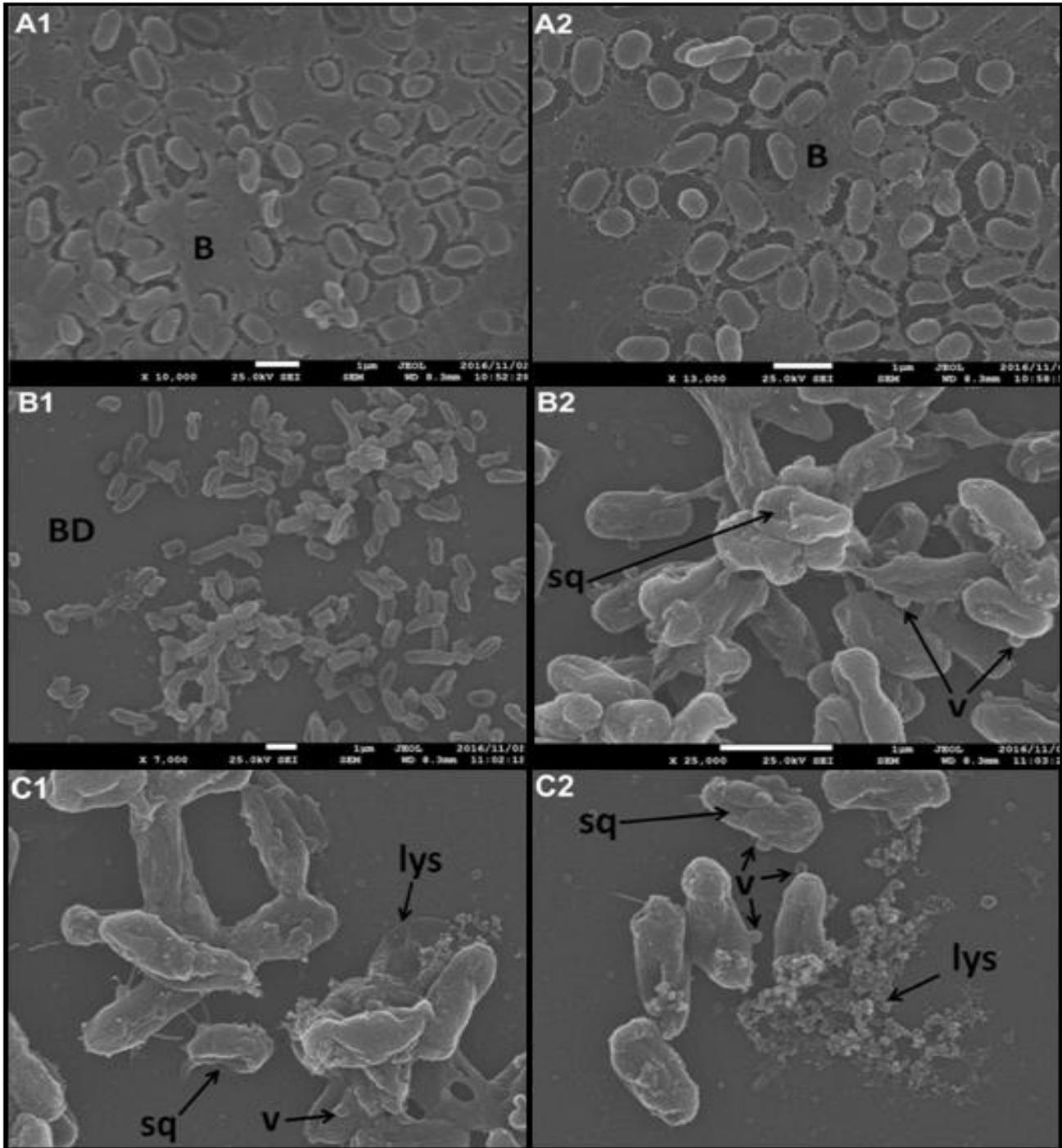


Figure 35 : La morphologie de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* le biofilm a été étudiée après 30 min de traitement avec 10 μ g de mélittine. **A1** et **A2** contrôle, **B1** et **B2** Formation de biofilm, **C1** et **C2** *Pseudomonas aeruginosa* biofilm traité à la mélittine pendant 30 et 60 min respectivement **B** biofilm **BD** dégradation du biofilm, **lys** : lyse, **v** : vésicule, **sq** : Cellules compressé (**Khozani et al., 2018**)

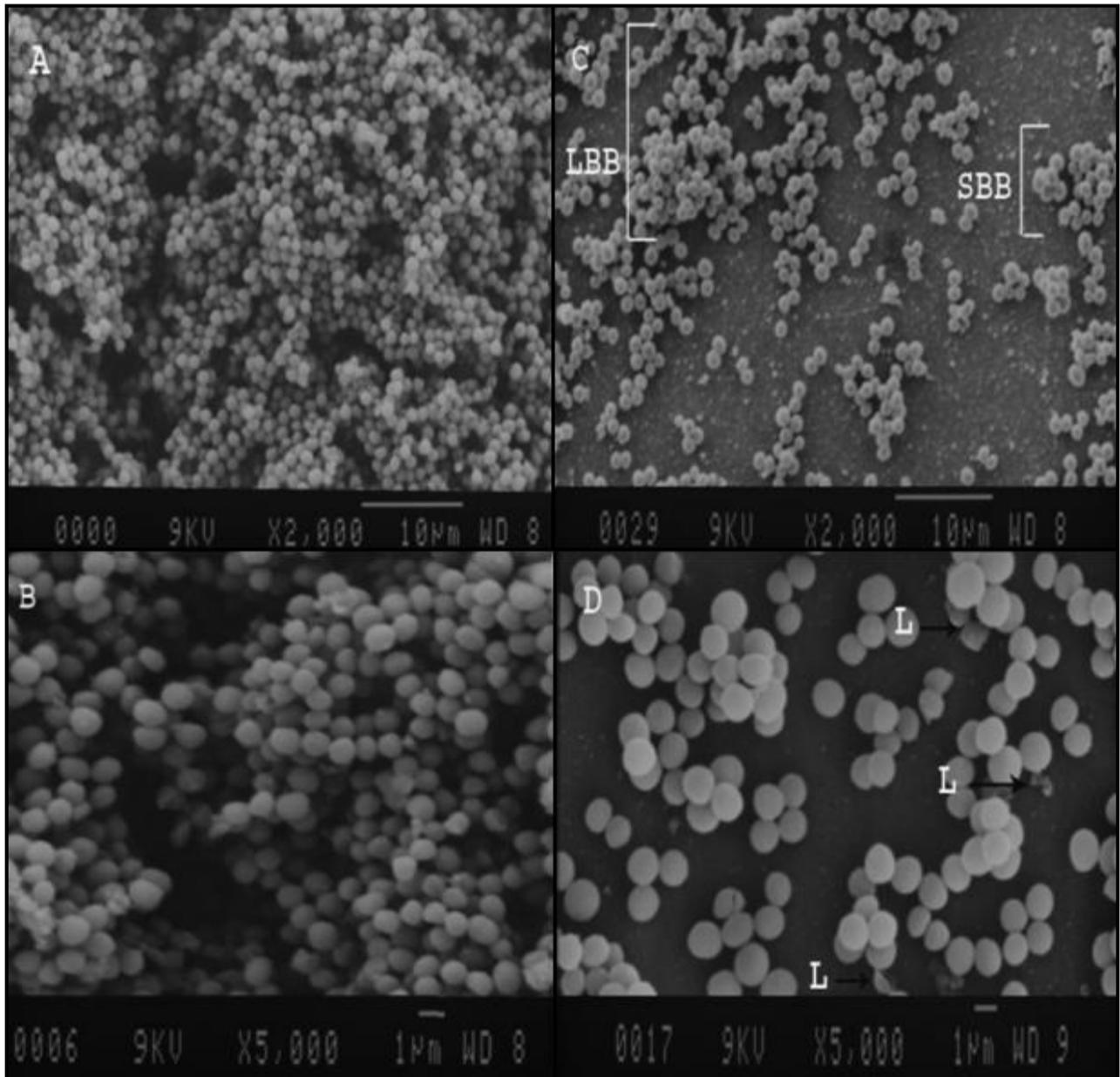


Figure 36 : Effet de la mélittine sur la formation du biofilm des souches *Staphylococcus aureus*. **A** et **B** : groupe non traité. Groupe traité **C** et **D**. **LBB** : Grande biomasse de biofilm, **SBB** : Petite biomasse de biofilm, **L** : Lyse (Hakimi Alni *et al.*, 2020)

Conclusion

Suite à la synthèse ces cinq articles étudiés, nous disons que la recherche de nouvelles substances à activités antibactériennes et particulièrement antibiofilm d'origine naturelle devient nécessaire et primordiale. A travers ces articles le venin d'abeille (substance naturelle) étudié par **Fadl, (2018)** où la mélittine (principal composé du venin d'abeille) utilisés dans les études de **Khozani et al .,(2018)** ; **Bardbari et al .,(2018)** ; **Hakimi Alni et al.,(2020)** et **Karyne et al ., (2020)** ont prouvé un effet inconditionné sur les bactéries au mode biofilm.

Les résultats obtenus dans l'étude **Fadl, (2018)** et **Hakimi Alni et al., (2020)** ont démontré que le venin et la mélittine peuvent inhiber la formation de biofilm bactérien à des concentrations inférieures à la CMI ,où il a été constaté que le venin d'abeille pouvait inhiber le biofilm des SARM , *S.aureus* (MDR),VRSA , *S. haemolyticus*, *E. faecalis* , *P. aeruginosa* et *E. cloacae* à des sous CMI de CMI/2 et CMI/4.

D'un autre coté, dans les études de **Khozani et al ., (2018)** et **Bardbari et al .,(2018)** la mélittine a réussi à dégrader le biofilm en fonction de la concentration et du temps. Elle était efficace après 6h qu'a après 24h, et pour le biofilm de *P.aeruginosa*. La quantité de 50 µg avait une activité importante afin d'éliminer son biofilm. Cela est probablement dû à la capacité de la mélittine de venin d'abeille à pénétrer le biofilm bactérien. En plus, l'effet inhibiteur de venin d'abeille et la mélittine est plus significatif sur un biofilm jeune et plus efficace sur les biofilms des bactéries à Gram positifs que sur des bactéries à Gram négatif. Le venin d'abeille peut réduire le nombre et/ou la viabilité des bactéries au sein du biofilm, et avoir également un effet sur la morphologie et la taille de biofilm (**Socarras et al ., 2017**).

Suite à tous ces résultats, nous souhaitons dans un avenir proche évaluer l'activité antibiofilm de venin de nos abeilles Algériennes sur des souches hospitalières multirésistantes isolées de C.H.U de Tlemcen et de valoriser ce produit naturel pour le traitement et élimination de biofilm en milieu hospitalier et autre.

Références bibliographiques

1. **Abd El-Wahed A.A., Khalifa S.A.M., Sheikh B.Y., Farag M.A., Saeed A., Larik F.A., Koca-Caliskan U., AlAjmi M.F., Hassan M., Wahabi H.A., Hegazy M.E.F., Algethami A.F., Büttner S., El-Seedi H.R. (2019).** Bee venom composition: from chemistry to biological activity. *In Studies in Natural Products Chemistry .Elsevier*, Vol. 60, pp. 459-484.
2. **Ali E.M. (2014).** Contributions of some biological activities of honeybee venom. *Journal of Apicultural Research*, Vol.53(4), pp.441- 451.
3. **Ali M.A.A.S.M. (2012).** Studies on bee venom and its medical uses. *Int J Adv Res Technol*, Vol .1(2), pp.69-83.
4. **Amigou M. (2016).** Les résidus de médicaments vétérinaires et de pesticides dans les produits alimentaires apicoles (miel, pollen, gelée royale et propolis).Th. doct : Vétérinaire : Faculté de médecine de Créteil : École Nationale Vétérinaire D'Alfort
5. **Aouati H., Bousseboua H. (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Thèse magistère : Microbiologie appliquée et Biotechnologies microbiennes : Faculté des sciences de la nature et de la vie département de biochimie et de microbiologie : Université Mentouri Constantine.
6. **Ayad A. (2016).** Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'Ouest algérien. Th. doct : Microbiologie : Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers : Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen
7. **Azam M.N.K., Ahmed M.N., Biswas S., Ara N., Rahman M.M., Hirashima A., Hasan M.N. (2018).** A review on bioactivities of honeybee venom. *Annual Research & Review in Biology*, Vol. 30 (2), pp. 1-13.
8. **Baek H., Park S.Y., Ku S.J., Ryu K., Kim Y., Bae H., Lee Y.S. (2020).** Bee Venom Phospholipase A2 Induces Regulatory T Cell Populations by Suppressing Apoptotic Signaling Pathway. *Toxins*, Vol. 12(3), p. 198.
9. **Baghian A., Kousouls K.G. (1993).** Role of the N^+ , K^+ Pompe in Herpes simplex type1-induced cell fusion : melittin causes specific reversion of syncytial mutants with the Syn1 mutation to Syn^+ (wild-type) phenotype. *Virologie*, Vol. 196, pp. 548-556
10. **Ballot-Flurin C. (2011).** Les bienfaits de l'apithérapie. Ed :Eyrolles.

11. Bardbari A.M., Arabestani M.R., Karami M., Keramat F., Aghazadeh H., Alikhani M.Y., Bagheri K.P. (2018). Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Vol.37(3), pp. 443-454.
12. Batoni G., Maisetta G., Esin S. (2016). Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Vol.1858(5), pp. 1044-1060.
13. Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Th. doct : Microbiologie : Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers : Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen.
14. Bellik Y. (2015). Bee venom : its potential use in alternative medicine. *Anti-infective agents*, Vol.13(1), pp. 3-16.
15. Biri M. (2010). Tout savoir sur les abeilles et l'apiculture. Ed :Vecchi.
16. Blair J. M., Webber M. A., Baylay A. J., Ogbolu D. O., Piddock L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, Vol. 13(1), pp. 42-51.
17. Blondelle S.E., Houghten R.A. (1991). Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogs of melittin. *Biochemistry*, Vol.30(19), pp. 4671-4678.
18. Bogdanov S. (2016). Bee Venom : production, composition and quality. *The bee venom Book*.
19. Bogdanov S. (2016). Biological and therapeutic properties of bee venom .*The bee venom Book*.
20. Boix-Lemonche G., Lekka M., Skerlavaj B. (2020). A rapid fluorescence-based microplate assay to investigate the interaction of membrane active antimicrobial peptides with whole Gram-positive bacteria. *Antibiotics*, Vol. 9(2), p. 92.
21. Boone L.R., Skalka A. (1980). Two species of full-length cDNA are synthesized in high yield by melittin-treated avian retrovirus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.77(2), pp. 847-851.
22. Ceremuga M., Stela M., Janik E., Gorniak L., Synowiec E., Sliwinski T., Sitarek P., Saluk-Bijak J., Bijak M. (2020). Melittin—A Natural Peptide from Bee Venom

- Which Induces Apoptosis in Human Leukaemia Cells. *Biomolecules*, Vol. 10(2), p. 247.
- 23. Chaalal W., Kihal M. (2013).** Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaires. Thèse magistère : Microbiologie fondamentale et appliquée : Université d'Es-Senia Oran.
- 24. Charpentier G. (2013).** Étude des effets létaux et sublétaux d'une intoxication au thymol sur le développement et l'immunité des larves d'*Apis mellifera* élevées in vitro. Th. doct : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition : Université de Toulouse, (Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- 25. Cherniack E.P., Govorushko S. (2018).** To bee or not to bee : The potential efficacy and safety of bee venom acupuncture in humans. *Toxicon*, Vol.154, pp. 74-78.
- 26. Choi J.H., Jang A.Y., Lin S., Lim S., Kim D., Park K., Han S.M., Yeo J.H., Seo H.S. (2015).** Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular medicine reports*, Vol.12(5), pp.6483-6490.
- 27. Collignon P., Beggs J.J., Walsh T.R., Gandra S., Laxminarayan R. (2018).** Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health*, Vol 2(9), pp. e398-e405.
- 28. Cousin L. (2014).** L'abeille et le conseil à l'officine. Th. doct : Pharmacie : Faculté de Médecine et de Pharmacie : Université de Poitiers.
- 29. Cuvillier A. (2015).** Miel, Propolis, Gelée royale : Les abeilles alliées de notre système immunitaire. Th. doct : Pharmacie. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille : Université de Lille 2
- 30. Deltombe A. (2018).** La zoothérapie : des animaux aux vertus thérapeutiques, une aide à la guérison. Th. doct : Pharmacie : Faculté de Pharmacie de Lille : Université de Lille
- 31. Desrochers A., Schmidt A.V. (2013).** Miel : L'art des abeilles, l'or de la ruche. Ed : *Homme*
- 32. Do N., Weindl G., Grohmann L., Salwiczek M., Koksich B., Korting H.C., Schäfer-Korting M. (2014).** Cationic membrane-active peptides—anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin. *Experimental dermatology*, Vol. 23(5), pp.326-331.

- 33. Dosler S., Gerceker A.A. (2012).** In vitro activities of antimicrobial cationic peptides ; melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against Gram positive bacteria. *Journal of Chemotherapy*, Vol.24 (3), pp.137-143.
- 34. Dosler S., Karaaslan E., Alev Gerceker A. (2016).** Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *Journal of Chemotherapy*, Vol. 28(2), pp. 95-103.
- 35. Douzi N. (2010).** Envenimation grave par piqûres d'abeilles (A propos d'un cas).Th. doct : Médecine : Faculté de médecine et de pharmacie : Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.
- 36. Draiaia R. (2016).** Caractérisation physico-chimique et appellation botanique des miels Algériens (Cas des ruches langstroth).Th. doct : Biochimie appliquée : Faculté des sciences departement de biochimie : Université Badji Mokhtar - Annaba
- 37. Ebbensgaard A., Mordhorst H., Overgaard M.T., Nielsen C.G., Aarestrup F.M., Hansen E.B. (2015).** Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. *PloS one*, Vol.10(12), p.e0144611.
- 38. Eddayab Y. (2012).** Detection des bacteries multirésistants au laboratoire de bacteriologie du chu de limoges.Th. doct : Pharmacie : Faculté de pharmacie : Universite de Limoges.
- 39. El Gendy A., Saber M.M., Daoud E.M., Abdel-Wahhab K.G., Abdel-Rahman E., Hegazi A.G. (2017).** Role of bee Venom Acupuncture in improving pain and life quality in Egyptian Chronic Low Back Pain patients. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol.7(08), pp.168-174.
- 40. Esser A.F., Bartholomew R.M., Jensen F.C., Müller-Eberhard H.J. (1979).** Disassembly of viral membranes by complement independent of channel formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.76(11), pp.5843-5847.
- 41. Eze O.B., Nwodo O.F., Ogugua V.N. (2016).** Therapeutic effect of honey bee venom. *Proteins (enzymes)*, Vol.1(2).
- 42. Fadl A.E.W. (2018).** Antibacterial and antibiofilm effects of bee venom from (*Apis mellifera*) on multidrug-resistant bacteria (MDRB). *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.58 (2), pp.60-80.

43. Falco A., Barrajon-Catalan E., Menendez-Gutierrez M.P., Coll J., Micol V., Estepa A. (2013). Melittin-loaded immunoliposomes against viral surface proteins, a new approach to antiviral therapy. *Antiviral research*, Vol.97(2), pp.218-221.
44. Fenard D., Lambeau G., Maurin T., Lefebvre J.C., Doglio A. (2001). A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Molecular pharmacology*, Vol. 60(2), pp. 341-347.
45. Frank J.F. (2001). Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol. 43, pp. 319-369.
46. Funke G., Funke-Kissling P. (2004). Evaluation of the new VITEK 2 card for identification of clinically relevant Gram-negative rods. *Journal of clinical microbiology*, Vol.42(9), pp.4067-4071.
47. Funke G., Funke-Kissling P. (2005). Performance of the new VITEK 2 GP card for identification of medically relevant Gram-positive cocci in a routine clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, Vol.43(1), pp.84-88.
48. Galdiero E., Siciliano A., Gesuele R., Di Onofrio V., Falanga A., Maione A., Liguori R., Libralato G., Guida M. (2019). Melittin inhibition and eradication activity for resistant polymicrobial biofilm isolated from a dairy industry after disinfection. *International journal of microbiology*, Vol.2019, p 7.
49. Gharbi M. (2011). Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles - Composition Propriétés thérapeutiques Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Th. doct : Vétérinaire : Université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie).
50. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Lukasiak J., Scalise G. (2003). Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA (1-7) M (2-9) NH2 against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides*, Vol.24(9), pp.1315-1318.
51. Gopal R., Lee J.H., Kim Y.G., Kim M.S., Seo C.H., Park Y. (2013). Anti-microbial, anti-biofilm activities and cell selectivity of the NRC-16 peptide derived from witch flounder, *Glyptocephalus cynoglossus*. *Marine drugs*, Vol.11(6), pp.1836-1852.
52. Gordon-Grossman M., Zimmermann H., Wolf S.G., Shai Y., Goldfarb D. (2012). Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse

- electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol.116(1), pp.179-188.
- 53. Hakimi Alni R., Tavasoli F., Barati A., Shahrokhi Badarbani S., Salimi Z., Babaekhou L. (2020).** Synergistic activity of melittin with mupirocin : A study against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- 54. Han S.M., Kim J.M., Hong I.P., Woo S.O., Kim S.G., Jang H.R., Pak S.C. (2016).** Antibacterial activity and antibiotic-enhancing effects of honeybee venom against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Molecules*, Vol. 21(1), pp. 79.
- 55. Hegazi A.G., El-Feel M.A., Abdel-Rahman E.H., Abed Al-Fattah M.A. (2015).** Antibacterial activity of bee venom collected from *Apis mellifera* carniolan pure and hybrid races by two collection methods. *Int J Curr Microbiol App Sci*, Vol.4(4), pp.141-149.
- 56. Hood J.L., Jallouk A.P., Campbell N., Ratner L., Wicklinc S.A.(2013).** Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antiviral Therapy*, Vol.18, pp.95-103.
- 57. Hossen M., Gan S. H., Khalil M. (2017).** Melittin, a potential natural toxin of crude bee venom : probable future arsenal in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of Chemistry*, Vol. 2017.
- 58. Hossen M., Shapla U.M., Gan S. H., Khalil M.I. (2017).** Impact of bee venom enzymes on diseases and immune responses. *Molecules*, Vol.22(1), p. 25.
- 59. Issam A.A., Zimmermann S., Reichling J., Wink M. (2015).** Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*, Vol. 22(2), pp.245-255.
- 60. Jamasbi E., Mularski A., Separovic F. (2016).** Model membrane and cell studies of antimicrobial activity of melittin analogues. *Current topics in medicinal chemistry*, Vol.16(1), pp.40-45.
- 61. Karyne R., Curty Lechuga G., Almeida Souza A. L., Rangel da Silva Carvalho J. P., Simões Villas Bôas M. H., De Simone S.G. (2020).** Pan-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*, but Not Other Strains, Are Resistant to the Bee Venom Peptide Mellitin. *Antibiotics*, Vol.9(4), pp.178.
- 62. Khozani R.S., Shahbazzadeh D., Harzandi N., Feizabadi M.M., Bagheri K.P. (2019).** Kinetics study of antimicrobial peptide, melittin, in simultaneous biofilm

- degradation and eradication of potent biofilm producing MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, Vol.25(1), pp.329-338.
- 63. Kim B.Y., Lee K.S., Zou F.M., Wan H., Choi Y. S., Yoon H. J., kwon H.W., Je H.Y., Jin, B.R. (2013).** Antimicrobial activity of a honeybee (*Apis cerana*) venom Kazal-type serine protease inhibitor. *Toxicon*, Vol. 76, pp. 110-117.
- 64. Kim Y.W., Chaturvedi P.K., Chun S.N., Lee Y.G., Ahn W.S. (2015).** Honeybee venom possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer cell line. *Oncology reports*, Vol.33(4), pp.1675-1682.
- 65. Kintz P., Villain M. (2011).** Usage thérapeutique du venin d'abeille : science ou escroquerie?. In *Annales de toxicologie analytique*. Vol. 23(1), pp. 37-39.
- 66. Kumar P., Kizhakkedathu J.N., Straus S.K. (2018).** Antimicrobial peptides : diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, Vol.8(1), p4.
- 67. Lashinsky J.N., Henig O., Pogue J.M., Kaye K.S. (2017).** Minocycline for the treatment of multidrug and extensively drug-resistant *A. baumannii* : a review. *Infectious diseases and therapy*, Vol.6(2), pp.199-211.
- 68. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A. K., Wertheim H. F., Sumpradit N., Greko C. (2013).** Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet infectious diseases*, Vol. 13(12), pp. 1057-1098.
- 69. Lee S.B. (2016).** Antifungal activity of bee venom and sweet bee venom against clinically isolated *Candida albicans*. *Journal of pharmacopuncture*, Vol. 19(1), pp. 45-50.
- 70. Lister J. L., Horswill A. R. (2014).** *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, Vol. 4, pp. 178.
- 71. Maiden M., Zachos M., Waters C. (2019).** Hydrogels embedded with melittin and tobramycin are effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in an animal wound model. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10, p. 1348.
- 72. Marcos J.F., Beachy R.N., Houghten R.A., Blondelle S.E., Perez-Paya E. (1995).** Inhibition of a plant virus infection by analogs of melittin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 92(26), pp. 12466-12469.

- 73. Matanic V.C.A., Castilla V. (2004).** Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *International journal of antimicrobial agents*, Vol. 23(4), pp. 382-389.
- 74. Matuszewski C. (2009).** *Evaluation de la carte Vitek® 2 ANC pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries d'intérêt médical.* Th. doct : Pharmacie : Faculté de pharmacie : Université Henri Poincaré – Nancy I.
- 75. Memariani H., Memariani M., Moravvej H., Shahidi-Dadras M. (2020).** Melittin : a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, pp. 1-13.
- 76. Memariani H., Memariani M., Shahidi-Dadras M., Nasiri S., Akhavan M.M., Moravvej H. (2019).** Melittin : from honeybees to superbugs. *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 103(8), pp. 3265-3276.
- 77. Mizrahi A., Lensky Y. (2013).** Bee products: properties, applications, and apitherapy. *Springer Science & Business Media*.
- 78. Mohamed M.F., Brezden A., Mohammad H., Chmielewski J., Seleem M.N. (2017).** Targeting biofilms and persisters of ESKAPE pathogens with P14KanS, a kanamycin peptide conjugate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Vol. 1861(4), pp. 848-859.
- 79. Moreno M., Giralt E. (2015).** Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use : melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, Vol. 7(4), pp. 1126-1150.
- 80. Nenni k. (2019).** les produit de la ruche et leur utilisation en médecine vétérinaire. Th. doct : vétérinaire : Université Saad-Dhlab-Blida1-
- 81. Nouvian M., Reinhard J., Giurfa M. (2016).** The defensive response of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 219(22), pp. 3505-3517.
- 82. O'Brien-Simpson N.M., Hoffmann R., Chia C.S., Wade J.D. (2018).** Antimicrobial and anticancer peptides. *Frontiers in Chemistry*, Vol. 6, p. 13.
- 83. Oh M.J., Song H.S. (2020).** Anti-Inflammatory Effects of Bee Venom on Phthalic Anhydride-Induced Atopic Dermatitis. *Journal of Acupuncture Research*, Vol. 37(1), pp. 42-48.

84. **Omar R.E. (2017)**. Effect of bee venom collection on the measurement of brood rearing activity of honey bee colony *Apis mellifera* L. *Middle East Journal of Agriculture Research*, Vol. 6(2), pp. 409-414.
85. **Oršolić N. (2012)**. Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, Vol 31(1-2), pp. 173-194.
86. **Ostroumova O.S., Efimova S.S., Malev V.V. (2015)**. Modifiers of membrane dipole potentials as tools for investigating ion channel formation and functioning. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. 315, pp. 245-297.
87. **O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. (2000)**. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, Vol. 54(1), pp. 49-79.
88. **Park C., Lee D.G. (2010)**. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 394(1), pp. 170-172.
89. **Park D., Jung J.W., Lee M.O., Lee S.Y., Kim B., Jin H.J., kim j., Ahn Y.J., Lee K.W., Song Y.S., Hong S., Womack J.E., Kwon H.W. (2014)**. Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Peptides*, Vol. 53, pp. 185-193.
90. **Pashaei F., Bevalian P., Akbari R., Bagheri K.P. (2019)**. Single dose eradication of extensively drug resistant *Acinetobacter* spp. in a mouse model of burn infection by melittin antimicrobial peptide. *Microbial pathogenesis*, Vol. 127, pp. 60-69.
91. **Peacock P. (2011)**. apiculture : mode d'emploi : [pour faire son miel maison : tout savoir sur : les abeilles, la ruche, l'équipement, le miel & la cire...]. *Marabout*.
92. **Pecault F. (2002)**. L'envenimation par les hyménoptères. Th. doct : vétérinaire : Université Paul-Sabatier de Toulouse.
93. **Percival S. L., McCarty S. M., Lipsky B. (2015)**. Biofilms and wounds: an overview of the evidence. *Advances in wound care*, Vol. 4(7), pp. 373-381.
94. **Picoli T., Peter C.M., Vargas G.D., Hübner S.O., Lima M.D., Fischer G. (2018)**. Potencial antiviral e virucida da melitina e apamina contra herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Vol. 38(4), pp. 595-604.
95. **Picoli T., Peter C.M., Zani J.L., Waller S.B., Lopes M.G., Boesche K.N., Vargas G.D., Hübner S.O., Fischer G. (2017)**. Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

- and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. *Microbial pathogenesis*, Vol. 112, pp. 57-62.
96. **Pucca M.B., Cerni F.A., Oliveira I.S., Timothy Jenkins T.P., Argemí L.M., Sørensen C.V., Ahmadi S., Barbosa J.E., Laustsen A.H. (2019).** Bee updated : Current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy. *Frontiers in immunology*, Vol. 10, p. 2090.
97. **Qi L., Li H., Zhang C., Liang B., Li J., Wang L., Du X., Liu X., Qiu S., Song H. (2016).** Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, Vol. 7, p. 483.
98. **Rady I., Siddiqui I.A., Rady M., Mukhtar H. (2017).** Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer letters*, Vol. 402, pp. 16-31.
99. **Rasolofoarivao H. (2014).** *Apis mellifera* unicolor (Latreille, 1804, Hymenoptera : Apidae) et *Varroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000, Acari : Varroidae) à Madagascar : diversité génétique, impact et comportement hygiénique. Th. doct : Biologie de population, Entomologie : Université de La Réunion Ecole Doctorale Sciences et Technologie Santé Et Université d'Antananarivo
100. **Rebiahi S.A. (2012).** Caractérisation de souches de *staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Th. doct : Microbiologie : Université de Tlemcen.
101. **Rossant A., (2011).** Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes Th. doct : Pharmacie : Faculté de pharmacie : Université de Limoges.
102. **Socarras K.M., Theophilus P.A., Torres J.P., Gupta K., Sapi E. (2017).** Antimicrobial activity of bee venom and melittin against *Borrelia burgdorferi*. *Antibiotics*, Vol. 6(4), p. 31.
103. **Soliman C., Eastwood S., Truong V.K., Ramsland P.A., Elbourne A. (2019).** The membrane effects of melittin on gastric and colorectal cancer. *Plos one*, Vol. 14(10), p. e0224028.
104. **Therrien A. (2016).** Étude des mécanismes d'extraction lipidique par le peptide mélittine et la protéine BSP1. Th. doct : *philosophiae doctor* en chimie : Faculté des études supérieures et postdoctorales : Université de Montréal.

- 105. Touaitia R. (2016).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : Emergence et mécanismes de résistance. Th. doct : Microbiologie Appliquée : Faculté des sciences : Université Badji Mokhtar – Annaba.
- 106. Trumbeckaite S., Dauksiene J., Bernatoniene J., Janulis V. (2015).** Knowledge, attitudes, and usage of apitherapy for disease prevention and treatment among undergraduate pharmacy students in Lithuania. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2015.
- 107. Uddin M.B., Lee B.H., Nikapitiya C., Kim J.H., Kim T.H., Lee H.C., Kim C. J., Lee J.S., Kim C.J. (2016).** Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. *Journal of Microbiology*, Vol. 54(12), pp. 853-866.
- 108. Wachinger M., Kleinschmidt A., Winder D., von Pechmann N., Ludvigsen A., Neumann M., Holle R., Salmons B., Erfle V., Brack-Werner R. (1998).** Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *Journal of General Virology*, Vol. 79(4), pp. 731-740.
- 109. Wachinger M., Saermark T., Erfle V. (1992).** Influence of amphipathic peptides on the HIV-1 production in persistently infected T lymphoma cells. *FEBS letters*, Vol. 309(3), pp. 235-241.
- 110. Wehbe R., Frangieh J., Rima M., El Obeid D., Sabatier J.M., Fajloun Z. (2019).** Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules*, Vol. 24(16), p. 2997.
- 111. Yasin B., Pang M., Turner J.S., Cho Y., Dinh N.N., Waring A.J., Lehrer R.I., Wagar E.A. (2000).** Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 19(3), pp. 187-194.
- 112. Yong W.H., Wyman S., Levy J.A. (1990).** Optimal conditions for synthesizing complementary DNA in the HIV-1 endogenous reverse transcriptase reaction. *AIDS (London, England)*, Vol. 4(3), pp. 199-206.
- 113. Yu A.R., Kim J.J., Park G.S., Oh S.M., Han C.S., Lee M.Y. (2012).** The antifungal activity of bee venom against dermatophytes. *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol. 55(1), pp. 7-11.
- 114. Zhang F., Li X., Ma Y., Wang C., Hu P., Wang F., Lu X. (2020).** Illustrating Interfacial Interaction between Honey Bee Venom Phospholipase A2 and Supported

- Negatively Charged Lipids with Sum Frequency Generation and Laser Scanning Confocal Microscopy. *Langmuir*, Vol. 36(11), pp. 2946-2953.
- 115. Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Louie T., Conly J.M. (2005).** Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 43(10), pp. 5026-5033.
- 116. Zhang S., Liu Y., Ye Y., Wang X.R., Lin L.T., Xiao L.Y., Liu C.Z. (2018).** Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon*, Vol. 148, pp. 64-73.
- 117. Zolfagharian H., Mohajeri M., Babaie M. (2016).** Bee venom (*Apis Mellifera*) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains: Bee venom an effective potential for bacteria. *Journal of pharmacopuncture*, Vol. 19(3), p. 225

Annexes

Annexe : Les cinq articles traités

ARTICLE IN PRESS

Saudi Journal of Biological Sciences xxx (xxxx) xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Saudi Journal of Biological Sciences

journal homepage: www.sciencedirect.com



Original article

Synergistic activity of melittin with mupirocin: A study against methicillin-resistant *S. Aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. Aureus* (MSSA) isolates

Reza Hakimi Alni^a, Fatemeh Tavasoli^b, Amirhomayoon Barati^b, Shaghayegh Shahrokhi Badarbani^b, Zahra Salimi^b, Laleh Babaeekhou^{b,*}

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

^bDepartment of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2019
Revised 10 May 2020
Accepted 11 May 2020
Available online xxxxx

Keywords:

Staphylococcus aureus
Biofilm
Antimicrobial activity
Melittin
Mupirocin

ABSTRACT

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms are involved in various nosocomial infections, being in the limelight of academic research. The current study aimed to determine the antimicrobial effects of melittin on planktonic and biofilm forms of *S. aureus*. Following the identification of MRSA and SCCmec types (using PCR method), Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and fractional inhibitory concentration index (FICI), for melittin and mupirocin were determined by broth microdilution assay. Melittin anti-biofilm activity was determined, using a microtiter-plate test (MTP) and scanning electron microscope (SEM) methods. The quorum sensing inhibitory activity of 1/2 MIC melittin was examined using a quantitative real-time RT-PCR method, and melittin cytotoxicity on Vero cells was examined by tetrazolium-based colorimetric (MIT) test. The Results of our study showed that Geometric means of MIC values of the melittin and mupirocin were 4.4 and 14.22 µg/ml respectively. The geometric mean of the FICI for both melittin-mupirocin was 0.75. No *S. aureus* biofilm was formed and *hld* gene (as a biofilm regulator) expression down-regulated. It seems that melittin can be useful in the treatment of *S. aureus* infections (especially MRSA) by reducing the *hld* expression. Furthermore, synergistic growth-inhibitory effects of mupirocin with melittin could be considered as a promising approach in the treatment of MRSA isolates.

© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is the greatest concern of all health-care-associated pathogens and causes hospital and community-acquired infection disease (Gordon and Lowy 2008). Resistant Staphylococcal infections have led to a higher mortality rate and have prolonged antibiotic therapy as compared with methicillin-sensitive Staphylococcal infection. MRSA strains have

acquired a mobile genetic element into their genome which harbors the genes encoding penicillin-binding protein gene (*mecA*) and other regulatory genes such as *mecR* and *mecI*. These mobile genetic elements termed the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) and are seen in MRSA strains (Ito et al. 2001, Ji 2007).

A variety of antimicrobial agents such as tetracycline, daptomycin, fluoroquinolone, and linezolid are used for the treatment of *S. aureus* infections (Tiwari and Sen 2006) but due to the ability of bacteria in neutral of them and biofilm formation, antimicrobial agents soon become ineffective (Lowy 2003; Alaouadi 2015). Biofilms are a community of bacteria that attach to biotic or abiotic surfaces via the production of an extracellular matrix called exopolysaccharide (Watnick and Kolter 2000). Biofilm formation and other processes including bioluminescence, sporulation, competence, and virulence factor secretion are usually controlled by a Quorum sensing (QS) system. QS is a bacterial cell-cell communication process and releases extracellular signaling molecules (autoinducers) that increase in concentration as a function of cell

* Corresponding author at: Department of Biology, Faculty of science, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran.

E-mail address: babaeekhou@iaau.ac.ir (L. Babaeekhou).

[†] Postal address: Department of Biology, Islamshahr branch Islamic Azad University, Sayyad Shirazi St., P.O.Box: 33135/369, Iran.

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.027>

1319-562X/© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article as: R. Hakimi Alni, F. Tavasoli, A. Barati et al., Synergistic activity of melittin with mupirocin: A study against methicillin-resistant *S. Aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. Aureus* (MSSA) isolates, Saudi Journal of Biological Sciences, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.027>



Article

Pan-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*, but Not Other Strains, Are Resistant to the Bee Venom Peptide Mellitin

Rangel Karyne ^{1,*} , Guilherme Curty Lechuga ^{1,2}, André Luis Almeida Souza ¹ ,
João Pedro Rangel da Silva Carvalho ¹, Maria Helena Simões Villas Bôas ³ and
Salvatore Giovanni De Simone ^{1,4,*} 

¹ FIOCRUZ, Center for Technological Development in Health (CDTS)/National Institute of Science and Technology for Innovation in Neglected Diseases (INCT-IDN), Rio de Janeiro 20000-000, Brazil; guilherme.lechuga@yahoo.com.br (G.C.L.); alsouza@ioc.fiocruz.br (A.L.A.S.); joaopedrorsc@gmail.com (J.P.R.d.S.C.)

² FIOCRUZ, Oswaldo Cruz Institute, Laboratory of Cellular Ultrastructure, Rio de Janeiro 20000-000, Brazil

³ FIOCRUZ, Microbiology Department, National Institute for Quality Control in Health (INCQS), Rio de Janeiro 20000-000, Brazil; maria.villas@incqs.fiocruz.br

⁴ FIOCRUZ, Federal Fluminense University, Biology Institute, Department of Molecular and Cellular Biology, Rio de Janeiro, Niterói 24000-000, Brazil

* Correspondence: karynercarvalho@gmail.com (R.K.); dsimone@cdts.fiocruz.br (S.G.D.S.)

Received: 6 November 2019; Accepted: 14 December 2019; Published: 14 April 2020



Abstract: *Acinetobacter baumannii* is a prevalent pathogen in hospital settings with increasing importance in infections associated with biofilm production. Due to a rapid increase in its drug resistance and the failure of commonly available antibiotics to treat *A. baumannii* infections, this bacterium has become a critical public health issue. For these multi-drug resistant *A. baumannii*, polymyxin antibiotics are considered the only option for the treatment of severe infections. Concerning, several polymyxin-resistant *A. baumannii* strains have been isolated over the last few years. This study utilized pan drug-resistant (PDR) strains of *A. baumannii* isolated in Brazil, along with susceptible (S) and extreme drug-resistant (XDR) strains in order to evaluate the in vitro activity of melittin, an antimicrobial peptide, in comparison to polymyxin and another antibiotic, imipenem. From a broth microdilution method, the determined minimum inhibitory concentration showed that S and XDR strains were susceptible to melittin. In contrast, PDR *A. baumannii* was resistant to all treatments. Treatment with the peptide was also observed to inhibit biofilm formation of a susceptible strain and appeared to cause permanent membrane damage. A subpopulation of PDR showed membrane damage, however, it was not sufficient to stop bacterial growth, suggesting that alterations involved with antibiotic resistance could also influence melittin resistance. Presumably, mutations in the PDR that have arisen to confer resistance to widely used therapeutics also confer resistance to melittin. Our results demonstrate the potential of melittin to be used in the control of bacterial infections and suggest that antimicrobial peptides can serve as the basis for the development of new treatments.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; multidrug resistance; pan drug resistance; melittin; biofilm; antimicrobial peptide

1. Introduction

The emergence of drug-resistant strains of major pathogenic bacteria is an increasingly critical public health issue [1,2]. One such pathogen is the Gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii*, which possesses both multidrug resistance (MDR) genes and an intrinsic natural resistance toward



Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*

Ali Mohammadi Bardbari¹ · Mohammad Reza Arabestani¹ · Manoochehr Karami² · Fariba Keramat^{3,4} · Hossein Aghazadeh⁵ · Mohammad Yousef Alikhani^{1,4} · Kamran Pooshang Bagheri⁵

Received: 20 November 2017 / Accepted: 8 January 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The rapid increase of drug resistance and failure of available antibiotics to treat biofilm-associated infections is of great health concern. Accordingly, our study aimed to evaluate the synergistic antibacterial, biofilm inhibitory, and biofilm removal activities of melittin in combination with colistin, imipenem, and ciprofloxacin against multidrug-resistant (MDR) strong biofilm producer *Acinetobacter baumannii* isolates. The kinetics of biofilm formation were evaluated for the isolates for 144 h. Minimum inhibitory concentrations (MICs), minimum bactericidal concentrations (MBCs), minimum biofilm inhibitory concentrations (MBICs), and biofilm removal activities for melittin and combinations with antibiotics were determined. Inhibition of biofilm-associated protein (*bap*) expression by melittin was evaluated with real-time polymerase chain reaction (PCR). Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) was used to visualize the effect of synergism on the inhibition of biofilm production. The geometric means of the fractional inhibitory concentration index (FIC_i) for melittin–colistin, melittin–imipenem, and melittin–ciprofloxacin combinations were calculated as 0.31, 0.24, and 0.94, respectively. Comparing the geometric means of the removal activity for melittin, colistin, imipenem, and combinations of them in both 6 and 24 h showed a significant difference between the groups (*p*-value < 0.05). Exposure to melittin induced a statistically significant downregulation of *bap* mRNA levels in all isolates at sub-MIC doses. Analysis of the FE-SEM results demonstrated that the synergism of melittin–colistin at 0.125–0.25 µg inhibited biofilm formation completely. In conclusion, our findings indicate that melittin possesses considerable potential for use in combination with colistin and imipenem to treat infections caused by MDR strong biofilm producer *A. baumannii* isolates.

Abbreviations

AMP Antimicrobial peptides
MDR Multidrug-resistant
bap Biofilm-associated protein
CFU Colony-forming units

Col Colistin
Cip Ciprofloxacin
FE-SEM Field emission scanning electron microscopy
FIC_i Fractional inhibitory concentration index
Imp Imipenem

✉ Mohammad Yousef Alikhani
alikhani43@yahoo.com; alikhani@umsha.ac.ir

✉ Kamran Pooshang Bagheri
k_bagheri@pasteur.ac.ir

Ali Mohammadi Bardbari
Alimoh2412@gmail.com

Mohammad Reza Arabestani
mohammad.arabestani@gmail.com

Manoochehr Karami
ma.karami@umsha.ac.ir

Fariba Keramat
faribakeramat@yahoo.com

Hossein Aghazadeh
aghazadehmb@gmail.com

¹ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

² Department of Epidemiology, School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

³ Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁴ Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁵ Venom and Biotherapeutics Molecules Lab., Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM EFFECTS OF BEE VENOM FROM (*APIS MELLIFERA*) ON MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA (MDRB)

BY

Ahmed R. Sofy¹, Mahmoud R. Sofy¹, Khalid A. El-DougDoug², Abdullah A. Zahra³, Abd El-Wahab I. Fadl¹ and Ahmed A. Hmed¹

FROM

¹ Botany and Microbiology Department, Faculty of Science, Al-Azhar University, 11884 Nasr City, Cairo, Egypt

² Virology Laboratory, Agricultural Microbiology Department, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, 11241 Cairo, Egypt

³ Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Al-Azhar University, Cairo, Egypt

Abstract

The prevalence of (MDRB) is increasing worldwide; therefore, this study aimed to identify the most common MDRB in clinical specimens and meet the urgent need to develop new antibacterial drugs to control their intractable infection. Additionally, due to the confrontation of the infection associated with bacterial biofilms, which are difficult to treat, and cause problems to public health, which require real solutions. Bee Venom produced by the glands of (*Apis mellifera*) is a complex mixture of active peptides, enzymes, and amines. So, it is considered a fertile environment for research to achieve the goal of this study. The results of the specimen's examination showed that, from a total of 500 clinical specimens, there are 224 specimens exhibited no growth, while 276 were positive. From 276 positive cultures, 317 isolates were obtained. Out of the 317 bacterial isolates, 169 (53.3%) were Gram-negative bacteria (GNB), and 148 (46.7%) were Gram-positive (GP). It was of this number 124 (39.1%) were multidrug-resistant (MDR) isolates of which 89 (71.77%) were Gram-negative type, including *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Pseudomonas aeruginosa* and 35 (28.23%) were Gram-positive including *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Enterococcus faecalis*. Antibacterial assays showed that Bee Venom possesses strong potential effect against MDR isolates including both GNB and GPB. with a wide range of MICs and MLCs concentration-spacing between 3.125 – 50 µg/mL and 6.25 – 100 µg/mL, respectively against all MDR-GNB and GPB. It was found that GPB was more sensitive at lower concentrations of Bee Venom than GNB. In addition, Bee Venom sub-MICs values against the most biofilm bacterial produces namely; *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, VRSA, *S. haemolyticus* and *E. faecalis* exhibited sharp reduction in their biofilms ranged between (63.8- 92%) especially at ½ MICs according to each bacterium, exclude *E. faecalis* biofilm was moderately affected (39%). While, at another tested sub-MICs showed moderate, weak, and no antibiofilm effects.

Keywords: Multi-drug resistant, MDR, Bacteria, GNB, GPB, MRSA, VRSA, Antibacterial, MIC, MLC, Biofilm, Bee Venom.



Kinetics Study of Antimicrobial Peptide, Melittin, in Simultaneous Biofilm Degradation and Eradication of Potent Biofilm Producing MDR *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Reyhaneh Shams Khozani¹ · Delavar Shahbazzadeh² · Naser Harzandi¹ · Mohammad Mehdi Feizabadi³ · Kamran Pooshang Bagheri²

Accepted: 10 January 2018

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Biofilm associated *Pseudomonas aeruginosa* infections are of major clinical concern due to treatment failure by conventional antibiotics. Referring to many reports, antimicrobial peptides (AMPs) would be act as a new promising agent to overcome the issue. In this regard, our study was aimed to evaluate the kinetics of melittin as a natural AMP, in simultaneously degrading and killing potent biofilm producing multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* isolates. The sensitivity of *P. aeruginosa* clinical isolates against routinely prescribed antibiotics was evaluated using disc diffusion and micro-dilution broth methods. Biofilm formation ability of the isolates was determined by colorimetric method. The biofilm formation kinetics was evaluated in five highly biofilm producer MDR isolates during 48 h. The efficiency of melittin to degradation of biofilm biomass and killing the bacteria within the biofilm were kinetically performed. The degradation activity of melittin on preformed biofilm and also its effect on the morphology of *P. aeruginosa* within the biofilm was investigated by field emission-scanning electron microscopy (FE-SEM). Melittin at the amount of 2 and 4 µg inhibited or killed all the examined strains in planktonic state while at 50 µg degraded the biofilm layer and killed all embedded bacteria after 24 and 48 h, respectively. FE-SEM results confirmed the biofilm removal and killing activities of melittin. Linear regression analysis verified the trend of melittin's activities in a concentration and time dependent manner. In conclusion, it seems plausible that melittin should be further investigated in an animal model of biofilm associated burn infection as a new drug lead.

Keywords Antimicrobial peptides · Biofilm degradation · *Pseudomonas aeruginosa* · Melittin

Introduction

In recent years, the development of multidrug-resistant (MDR) bacteria particularly in burn infections has led to increased interest for new antibiotics from natural sources (Davies and Davies 2010).

Pseudomonas aeruginosa as a highly versatile opportunistic pathogen worldwide, is the major cause of morbidity and mortality in burn patients (Turner et al. 2014). Reference to many documented reports in many countries, the incidence of MDR *P. aeruginosa* is being increased (Falagas et al. 2006; Aloush et al. 2006; Hirsch and Tam 2010). Recent reports on the antibiotic sensitivity patterns of *P. aeruginosa* have highlighted the problem of antibiotic resistance in burn infection strains in comparison with other hospital isolates (Klockgether and Tümmler 2017; DiMuzio et al. 2014).

Pseudomonas aeruginosa persists in a biofilm, which further enhances the high antibiotic tolerance of the organism (Dean et al. 2011; Wood 2017). Heavy prescription of antibiotics has led to the worldwide spread of antibiotic-resistant bacteria in hospitals and communities which poses as a serious danger to human health (Ventola 2015).

✉ Kamran Pooshang Bagheri
k_bagheri@pasteur.ac.ir

¹ Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

² Venom and Biotherapeutics Molecules Lab, Medical Biotechnology Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³ Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran