



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :

Biologie & Santé

ÉTUDE DU PROFIL DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Présenté par : Mlle Meryem Boukaa

Encadré par :

- structure d'accueil : Pr OUMOKHTAR.B
- FST de Fès : Pr BENCHEMSI.N

Soutenu le 13 /06/2013

Devant le jury composé de :

- Pr BENCHEMSI.N : Présidente
- Pr OUMOKHTAR.B : Encadrante
- Pr. BENKHEIKH.R : Examineur

Année Universitaire : 2012-2013

REMERCIEMENT

Mes premiers mots de remerciements seront à l'égard de Madame le professeur Bouchra OUMOKHTAR, de m'avoir donné l'occasion de faire un stage au sein de l'laboratoire de Microbiologie à la Faculté de Médecine et de pharmacie de Fès, pour m'avoir encouragé, encadré, conseillé et pour son énorme soutien durant cette période.

Je tiens également à exprimer mon grand respect à mon encadrant Madame Najoua BENCHÉMSI, professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès pour sa disponibilité, ses conseils et son aide si précieux.

Nous exprimons également notre gratitude aux membres du jury, qui nous ont honorés en acceptant de juger ce modeste travail.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance au personnel du laboratoire Btissam, Nawar et Asmae, ayant contribué à la réussite de cet humble projet de fin d'études.

La liste des figures

Figure1 : les différents mécanismes de résistance à l'antibiotique

Figur2 : résultat de test catalase.

Figur3 : résultat de test coagulase

Figure 4 : fréquence de la résistance des isolats de *S .aureus* d'origine clinique

Figure 5: la fréquence de résistance de SNC d'origine clinique

Figure 6: la fréquence de résistance de *S. aureus* d'origine alimentaire

Figure7 : Comparaison entre le profil de résistance les isolats d'origine clinique et alimentaire

Liste des abréviations

S.aureus : staphylocoque aureus

SARM : Staphylocoque aureus résistant à la métiline

SNC : staphylocoque coagulase négative

CASFM : Comite de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

MH : milieu Mueller-Hinton

BHI : milieu Bouillon cœur-cervelle

CMI : concentration minimale d'inhibition

RESUME

En médecine vétérinaire comme en médecine humaine, l'utilisation irrationnelle des antibiotiques a conduit à l'apparition de résistances de bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etc.). Ces antibiotiques peuvent en effet favoriser la sélection de bactéries résistantes à ces molécules qui peuvent se disséminer dans l'environnement ou la chaîne alimentaire, et être à l'origine d'échecs thérapeutiques parfois mortels. L'objectif du présent travail a été d'étudier le profil de résistance aux antibiotiques des isolats de *S. aureus* d'origine cliniques et d'autres d'origine alimentaire.

Ainsi, des prélèvements nasaux ont été réalisés sur des nouveau-nés hospitalisés pour la recherche de *S. aureus* cliniques. Les isolats d'origine alimentaires (n=43) ont été récupérés dans la collection du laboratoire de Microbiologie (faculté de médecine, Fès). Un antibiogramme est réalisé sur tous les isolats de *Staphylococcus aureus* (n=13), et des isolats de staphylocoque coagulase négatif n=20 (SNC) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller Hinton. Les antibiotiques testés et les valeurs critiques définies pour les diamètres des zones d'inhibition sont recommandés par le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie).

Les résultats ont montré que les taux de résistance aux antibiotiques étaient plus faibles chez les Staphylocoques d'origine alimentaire que ceux d'origine clinique. Les antibiotiques pour lesquels des résistances ont été observées chez les isolats de *S. aureus* d'origine clinique sont: la pénicilline G (37.5%), teicomycine (25%), érythromycine et l'acide fusidique (12.5%). Les SNC ont été résistants à la pénicilline G (40%), à la gentamycine et à l'érythromycine (35%), et à l'acide fusidique FD (25%), fosfomycine (20%), lincomycine et teicomycine (5%). La résistance à la méticilline a été observée dans 35% des cas. Les *S. aureus* d'origine alimentaire ont été dans la plus part résistants à la pénicilline (80%) et à la teicomycine TEC (60%).

Les profils de résistances aux antibiotiques des Staphylocoques analysés ont montré des résistances assez importantes. Des mesures de prévention de la dissémination de cette résistance doivent être mise en place afin de lutter contre la diffusion de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Etude bibliographique

CHAPITRE 1 : LES ANTIBIOTIQUES

1. Généralités	2
2. Critères de Classification	2
3. Mode d'action	3
4. Les principales familles	3

CHAPITRE 2 : LES STAPHYLOCOQUES

1. Définition	5
2. Les facteurs de virulence	5
3. Classification	5
4. Habitat	6
5. Les infections à <i>S.aureus</i> chez l'homme	6
6. Les infections à <i>S.aureus</i> chez.....	7

CHAPITRE 3 : LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

I. La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	8
1. Définition	8
2. Les types de résistance	8
3. Mécanismes bactériens de la résistance.....	9
4. Résistance aux antibiotiques chez <i>S .aureus</i>	10
4.1-Résistance à la pénicilline G	10
4.2-Résistances aux fluoroquinolones.....	10
4.3-Résistances aux glycopeptides	10
II. Epidémiologie de l'antibioresistance de <i>S.aureus</i>	11
II.1. En médecine vétérinaire	11
a) Usage abusif des antibiotiques en production animal.....	11
b) Prévalence de SARM en médecine vétérinaire.....	11
II.2.En médecine humaine.....	12
a) les staphylocoques résistant à la méticilline (SARM).....	12
b) la transmission de la résistance de l'animal à l'homme.....	12

Etude expérimentale

Matériels et méthode.....	14
Résultats.....	19
Discussion.....	23
Conclusion.....	25
Références bibliographiques.....	26
Annexes.....	27

INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques est un phénomène en constante évolution. Depuis quelques années, la dissémination de la résistance bactérienne, que ce soit en milieu hospitalier ou en médecine vétérinaire, est une préoccupation majeure en santé publique. En effet elle s'est développée très rapidement atteignant presque toutes les espèces pathogènes et qu'aucune classe nouvelle d'antibiotiques n'est attendue dans les prochaines années. Elle représente ainsi une menace pour la santé et donc un enjeu de sécurité sanitaire [1].

La découverte de la pénicilline a eu un effet spectaculaire sur le pronostic de ces infections mais les premières souches de *S. aureus* résistant à la pénicilline ont été décrites dès 1942, initialement à l'hôpital puis en milieu communautaire. La résistance de *S. aureus* à la pénicilline est liée à la production d'une pénicillinase [2]. Le *Staphylocoque aureus* est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve fréquemment sur la peau et dans les narines des personnes. C'est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que des syndromes liés à l'action des toxines. Le traitement de ces infections est devenu de plus en plus difficile à cause de l'émergence de souches multirésistantes, phénomène observé à l'hôpital mais aussi en ville [3].

Dans le domaine vétérinaire l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation des bétails s'est progressivement développée à partir du début des années 50 et a permis d'améliorer les conditions sanitaires des animaux et d'accroître la productivité des élevages en réduisant les coûts de production. Cependant, l'utilisation des antibiotiques chez les animaux d'élevage a entraîné une sélection de bactéries résistantes, les mêmes classes d'antibiotique (glycopeptides, fluoroquinolones) étant utilisées en élevage et en médecine humaine [4].

Ce travail a pour objectif d'étudier le profil de résistance aux antibiotiques chez des souches de *S. aureus* d'origine clinique et d'autres d'origine alimentaire.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

LES ANTIBIOTIQUES

1. généralités

L'utilisation des antibiotiques pour le traitement des infections bactériennes est un des progrès majeurs de la médecine au XXe siècle. Un **antibiotique** (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») est une molécule naturelle ou semi-synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée.

La notion de résistance aux antibiotiques découle de la découverte même des antibiotiques comme celle de la pénicilline G en 1940, inactive à l'égard des bacilles à Gram-négatif tel *Escherichia coli*. En fonction du mode d'action de l'antibiotique et de la capacité d'atteinte de cette cible au sein de la bactérie, la sensibilité à l'antibiotique varie d'une espèce bactérienne à l'autre. Son spectre d'activité est défini par la liste des espèces bactériennes sensibles et celles ayant une résistance naturelle à l'antibiotique.

2. Critères de Classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

Origine : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

Mode d'action : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques

Spectre d'activité : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)

Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse. La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles (β lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.)

3. Mode d'action

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie.

Ils agissent par :

➤ **Toxicité sélective au niveau de la :**

- Synthèse de la paroi bactérienne
- Membrane cytoplasmique
- Synthèse des protéines
- Acides nucléiques

➤ **Inhibition compétitive :** dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie

4. Les principales familles

➤ Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane

Bêta-lactamines: Elles sont réparties en trois sous familles : les pénicillines, les céphalosporines, et les carbapénèmes.

Elles se fixent préférentiellement sur certaines des protéines de liaison aux pénicillines (PLP) qui sont des enzymes de la phase terminale de la synthèse du peptidoglycane catalysant les liaisons entre les chaînes peptidiques dans la paroi des bactéries. Les bêta-lactamines jouent le rôle d'un substrat formant une liaison stable avec certaines PLP et bloquent l'action de ces dernières.

- Pénicillines:(pénicilline G-, pénicilline V: oxacilline, pénicilline M: Meticilline pénicilline A: Ampicilline, Amoxicilline, carboxy et uréido pénicillines: Pipéracilline)

- Céphalosporines: 1ère génération, 2ème génération, 3ème génération et 4^{ème} génération.

- carbapénèmes

Les glycopeptides : Vancomycine, Teicoplanine

La fosfomycine : Elle inhibe une des phases cytoplasmiques de la synthèse de la paroi

- Antibiotiques agissant sur la membrane

Les antibiotiques de nature polypeptidique : les polymyxines, les gramicidines et tyrosidine.

- Antibiotiques agissant sur les ribosomes

Aminosides : Néomycines, Gentamicine : Liaison a la sous unité 30S du ribosome bactérien et arrêt de la synthèse des protéines, entraînant généralement la mort de la bactérie.

Macrolides (Erythromycine, Spiramycine), Lincosamides, et synergistines : Ces produits se fixent sur la sous-unité 50 S du ribosome

Tétracyclines (Doxycycline et la sidéfusidique) : Ils se fixent sur le ribosome au niveau du site aminoacyl et inhibent l'élongation de la chaîne peptidique.

- Antibiotiques agissant sur l'ADN

Quinolones : Elles agissent sur des enzymes réglant la conformation de l'ADN

Fluoroquinolones: Péfloxacine, Norfloxacine

- Antibiotiques agissant sur l'acide folique

Sulfamides : inhibition de la synthèse de l'acide folique

Triméthoprim : inhibition de tetrahydrofolate

CHAPITRE2 : LES STAPHYLOCOQUES

1. Définition

Les Staphylocoques sont des Cocci à Gram positif classiquement disposés en amas, immobiles, non sporulés (Taille de 0,8 à 1 micron) Actuellement, on distingue 44 espèces.

L'espèce *S. aureus* (plus communément appelé staphylocoque doré) se distingue généralement des autres staphylocoques appelés staphylocoques à coagulase négative (SCN) par la présence d'une coagulase positive, DNase thermostable positive, colonies jaunes sur milieu Chapman (fermentation du mannitol, caractère de pathogénicité). *S. aureus* est un germe très important aussi bien dans les infections communautaires que nosocomiales.

2. Les facteurs de virulence des *S.aureus*

Les facteurs de virulence sont :

- Les Toxines (Hémolysines, Leucocidine, Exfoliatine, Entérotoxines : Il y a sept sérotypes différents (A, B, C1, C2, C3, D, E))
- Les Antigènes : La paroi des staphylocoques contient 2 antigènes principaux: une protéine A vis-à-vis de laquelle tout le monde a des Anticorps, et l'acide teichoïque.
- Enzymes : Coagulase, Lipase, Hyaluronidase, Staphylokinase, Nucléase

3. Classification

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococcaceae* qui comprend quatre genres : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* et *Planococcus*.

Le genre *Micrococcus*

Comprend les microcoques qui sont également des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme et par conséquent souvent présents dans les prélèvements.

Le genre *Staphylococcus*

Comprend une trentaine d'espèces : certaines sont des hôtes de l'homme, d'autres des animaux, d'autres sont rencontrées à la fois chez l'homme et l'animal.

Chez l'homme, les espèces les plus couramment isolées sont :

- *Staphylococcus aureus*, le plus pathogène,
- *Staphylococcus epidermidis*, souvent considéré comme un opportuniste,
- *Staphylococcus saprophyticus*, responsable d'infections urinaires chez la femme jeune,
- et à une fréquence moindre, *St. haemolyticus*, *St. hominis*, *St. capitis* et *St. auricularis*.

Le genre *Stomatococcus* : comprend *Stomatococcus mucilaginosus* qui fait partie de la flore buccale.

Le genre *Planococcus* : Comprend des bactéries du milieu marin.

4. Habitat

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud, éliminées ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement, le site de colonisation préférentielle de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. En effet, 30% des adultes hébergent *S. aureus* de façon permanente, 50% de façon intermittente et 20% ne sont jamais porteurs. A partir des sites de portage, *S. aureus* colonise les territoires cutanés en particulier, les zones humides (aisselles, périnée) et les mains [5].

Les SCN représentent les principaux germes commensaux de la peau. La densité de colonisation est plus importante au niveau des zones humides comme la partie antérieure des narines, le périnée, les creux axillaires et les plis inguinaux. Ils peuvent aussi être isolés des muqueuses. La transmission intra ou interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage). Plus rarement, elle peut être indirecte à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériels médicaux).

5. Les infections à *S.aureus* chez l'homme

Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Elle partage avec la bactérie *Escherichia coli* le triste privilège d'être au premier rang des germes responsables d'**infections nosocomiales** (infections contractées à l'hôpital). *S. aureus* est également au deuxième rang des bactéries responsables en France d'**intoxications alimentaires**, après les salmonelles [6].

Les infections cutanées : provoquées par le staphylocoque doré peuvent prendre de multiples formes (furoncles, folliculites, panaris, impétigo, abcès mammaires chez les femmes qui allaitent).

Les infections des muqueuses sont également fréquentes et peuvent atteindre les yeux (conjonctivites), les oreilles (otites), la sphère génitale (endométrite, salpingite) ou les voies respiratoires (pneumonies, pleurésies).

Toutes ces **infections cutanéomuqueuses** sont susceptibles de se compliquer et d'aboutir à des **septicémies**. L'évolution peut alors être fulminante, aiguë et associée à des localisations secondaires multiples et variées (valves cardiaques, os, articulations, rein, cerveau).

Le choc toxique staphylococcique (rare mais souvent mortel), avec sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique, sont dus à des souches productrices de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) ou d'Entérotoxines. Le **syndrome d'exfoliation généralisée**, et sa forme mineure localisée, l'impétigo bulbeux, sont dus à des souches productrices d'exfoliatines. Des anticorps sériques peuvent bloquer l'action de ces toxines hautement immunogènes (superantigènes).

6. Les infections à *S.aureus* chez l'animale

Staphylococcus aureus, ainsi que d'autres espèces apparentées telles que *Staphylococcus intermedius* et *Staphylococcus hyicus*, sont des **pathogènes majeurs du monde animal** : Les mammites des vaches, brebis et chèvres (*S. aureus* le plus souvent), la maladie des abcès du mouton (*S. aureus* sous-espèce *anaerobius*) [6]. D'autres pathologies ont été décrites: pneumonie, infections musculaires, ostéomyélite et septicémie chez les **volailles**; abcès sous-cutanés, mastite et pododermatite chez le **lapin**; dermatite et cellulite chez le **cheval**.

Les Staphylocoques résistants retrouvés chez les animaux de consommation sont maintenant devenus un enjeu majeur en matière de santé publique car la transmission à l'humain a été rapportée dans la littérature scientifique [7]. De plus, les Staphylocoques résistants représentent un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. Les Staphylocoques résistants d'origine aviaire ont été isolés dans un bon nombre de pays à la ferme et à l'abattoir.

CHAPITRE 3 : LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

I. La résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Définition

La résistance est la capacité que possède une bactérie de s'opposer à l'action d'un antibiotique. Par définition, une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique si la concentration minimale de cet antibiotique capable d'inhiber sa croissance est supérieure aux concentrations obtenues dans le sérum d'un malade traité à doses standards par cet antibiotique.

2. Les types de résistance

➤ Résistance naturelle

Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes sur lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. On parle d'espèces bactériennes naturellement résistantes et de mécanismes de résistance intrinsèques.

➤ Résistance acquise

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un antibiotique. Cette acquisition peut être la conséquence d'un transfert horizontal, y compris entre espèces éloignées phylogéniquement. Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être portés par des chromosomes (résistance chromosomique) ou par des éléments extrachromosomiques appelés plasmides (résistance plasmidique).

Résistance chromosomique :

La résistance chromosomique résulte généralement d'une mutation au niveau de l'ADN chromosomique, affectant spécifiquement le mécanisme d'action d'un antibiotique ou d'un groupe d'antibiotiques. Cette résistance se caractérise par :

- ✓ Sa faible fréquence d'apparition de l'ordre du milliardième au millionième. Ainsi, la résistance chromosomique à plusieurs antibiotiques à la fois, à une très infime probabilité d'apparition;
- ✓ Sa spontanéité car elle apparaît en absence d'antibiotique;

- ✓ Sa stabilité et son aspect héréditaire : lors de la division bactérienne, la bactérie mutée transmet son caractère antibiorésistant aux bactéries filles.

Résistance extrachromosomiques ou plasmidique :

Les plasmides sont des structures extrachromosomiques constituées d'ADN bicaténaire circulaire, se répliquant de façon autonome. Leur transmission, stable au cours des générations, peut se faire entre des bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes. L'une des conséquences de cette facilité de transmission intra et interspécifique est que la résistance plasmidique peut intéresser plusieurs antibiotiques à la fois (BMR multirésistance).

3. Mécanismes bactériens de la résistance :

Quatre mécanismes peuvent expliquer l'apparition d'une résistance à un antibiotique (figure 1):

- ✓ Une modification des enveloppes bactériennes qui empêche l'antibiotique de traverser la paroi et donc d'atteindre sa cible.
- ✓ La production d'enzymes inactivatrices qui modifient l'agent antibactérien et le rendent inactif.
- ✓ Une modification de la cible qui ne reconnaît donc plus l'antibiotique.
- ✓ Une substitution de la cible: dans ce cas une nouvelle cible insensible à l'action de l'antibiotique est apportée par un ADN exogène (plasmide).

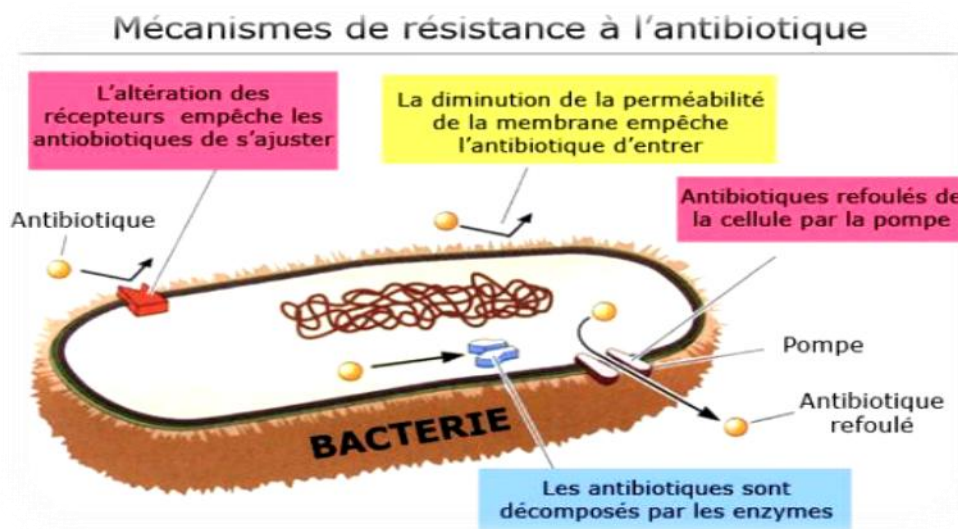


Figure1 : les différents mécanismes de résistance à l'antibiotique

5. Résistance aux antibiotiques chez *S .aureus*

Les staphylocoques peuvent être sensibles à divers antibiotiques mais se caractérisent par une aptitude remarquable à acquérir de multiples caractères de résistance.

4.1-Résistance à la pénicilline G

La sécrétion de pénicillinases est présente chez 70 à 90 % des *S. aureus*. Lorsque le laboratoire de bactériologie signale une résistance à la pénicilline (sans résistance à l'oxacilline), celle-ci implique aussi une résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline, la ticarcilline et à la pipéracilline. En revanche, les pénicillines associées à un inhibiteur de pénicillinase (acide clavulanique, sulbactam ou tazobactam) ou les bêtalactamines insensibles aux pénicillinases (céphalosporines, imipenem) restent actives. Fait important en pratique, les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, ceftriaxone) sont dix fois moins actives que l'oxacilline sur le staphylocoque, ce qui rend leur utilisation illogique en dehors des cas d'infections mixtes.

4.2-Résistances aux fluoroquinolones

Les résistances du staphylocoque aux fluoroquinolones sont liées à des mutations dans les cibles, qui sont l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV bactériennes, impliquées dans la synthèse de l'ADN bactérien. La résistance est croisée entre les diverses fluoroquinolones actuellement disponibles (péfloxacin, ofloxacine, ciprofloxacine, lévofloxacine).

4.3-Résistances aux glycopeptides

Les glycopeptides ne sont pas des bons antibiotiques qui malgré leur activité sur les souches multirésistantes présentent plusieurs défauts. Leurs CMI sont élevées (1 à 2 mg·L⁻¹), leur vitesse de bactéricidie est lente (48 heures), leur diffusion intracellulaire et tissulaire est faible. La bactéricidie lente est peut-être liée à la volumineuse taille de ces molécules qui gêne probablement l'action des autolysines produites par staphylocoque sous l'effet de l'antibiotique et responsable de sa mort.

Toute résistance à la vancomycine implique une résistance à la teicoplanine. Un niveau intermédiaire de résistance à la vancomycine apparaît souvent associé à un échec thérapeutique de cet antibiotique.

II. Epidémiologie de l'antibiorésistance de *S.aureus*

II.1. En médecine vétérinaire

a) Usage abusif des antibiotiques en production animal

Les animaux élevés pour la production de viande reçoivent, dans leur grande majorité, des aliments supplémentés avec un antibiotique, les bovins à l'herbage, les vaches laitières, et les poules pondeuses. Les antibiotiques, administrés à faibles doses (environ 20 ppm, de 5 à 100 g/t) dans l'alimentation animale ont un effet préventif sur certaines infections bactériennes et modifient la composition de la microflore intestinale entraînant une meilleure assimilation des aliments par les animaux. Ces effets protecteurs entraînent un effet zootechnique sous forme d'une augmentation de la vitesse de croissance de quelques pour cent [9].

Effets zootechniques des additifs antibiotiques

L'addition de doses minimales d'antibiotique aux aliments des animaux améliore les performances zootechniques de ceux-ci. L'apport d'antibiotique augmente la vitesse de croissance des animaux, de quelques pour-cent. Le gain moyen quotidien (GMQ) s'améliore en moyenne de +3 à +7 %. De plus, les antibiotiques améliorent l'efficacité alimentaire: l'indice de consommation (IC) diminue de quelques pour-cent (-2 à -9 %). Il faut donc moins d'aliment pour produire autant de viande.

b) Prévalence de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) en médecine vétérinaire

La première description d'une résistance à la méticilline chez une souche de *S. aureus* animale remonte à 1972, isolée en Belgique d'une infection mammaire bovine. Depuis, d'autres souches de SARM ont été décrites dans l'espèce bovine au Pakistan (2004), en Corée (2007), en Hongrie (2007) ou aux Pays-Bas (2008) pour les plus récentes [10].

D'autres résistances ont été identifiées en Belgique, vis-à-vis des tétracyclines, plus rarement des macrolides et du Triméthoprime [11]. Cette résistance est surtout observée chez le poulet de chair plutôt que chez la poule pondeuse.

II.2. En médecine humaine

Le *Staphylococcus aureus* est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que des syndromes liés à l'action des toxines, Le traitement de ces infections est devenu de plus en plus difficile à cause de l'émergence de souches multirésistantes, phénomène observé à l'hôpital mais aussi en ville [8].

a) les staphylocoques résistant à la méticilline (SARM)

S. aureus commence à poser un véritable problème pour la santé humaine au niveau mondial. Trois raisons expliquent les nouvelles préoccupations : l'apparition de pandémies à (SARM) en milieu hospitalier, l'apparition de souches à sensibilité diminuée aux glycopeptides et l'émergence de souches de SARM en médecine communautaire. En Algérie par exemple, une augmentation importante du taux des SARM, qui est passé de 10 % en 1997 aux environs de 40 % en 2005. Comparée aux autres pays du Maghreb, le taux de SARM en Algérie, avoisinait les 44 % alors qu'il était de 18 et 19 % dans chacun des deux pays voisins, la Tunisie et le Maroc [9]. En France, la fréquence de la résistance à la méticilline au sein de l'espèce est l'une des plus élevée des pays de la Communauté européenne.

Les recommandations pour le contrôle des SARM mettent l'accent sur les mesures « hygiéniques » visant à prévenir la transmission croisée par manutention. Certains auteurs estiment que le contrôle de l'utilisation des antibiotiques, s'ajoutant aux précédentes mesures, est la meilleure approche pour contrôler la pandémie à SARM [11].

b) La transmission de la résistance de l'animal à l'homme

La chaîne alimentaire permet aux bactéries de passer d'un hôte à un autre. C'est, du coup, l'occasion de transmettre le matériel génétique, incluant les gènes de résistance aux antibiotiques. Les bactéries se retrouvent alors dans les excréments, puis contaminent les eaux usées et les sols. Si les règles d'hygiène sont faibles, la bactérie peut même contaminer les aliments destinés aux humains. Une autre voie de contamination est plus directe. Certaines bactéries présentes dans la viande et les œufs peuvent survivre à la cuisson. Elles parviendront alors à notre tube digestif. Après un certain temps, les bactéries se multiplieront et provoqueront des infections alimentaires. Puis, en contact avec les autres bactéries du tube digestif, elles pourront transmettre le gène de résistance. Cette voie directe est plus rare. Les fèces animales contaminent également les végétaux. La résistance viendrait de

l'environnement entier et non seulement de l'animal traité aux antibiotiques. La résistance chez l'humain peut aussi apparaître à cause de l'effet direct d'antibiotiques encore présents dans les aliments. Ceux-ci laissent des traces, des résidus, dans la viande et le lait. Lorsque l'animal consomme une trop forte dose d'antibiotiques, comme lors d'un traitement vétérinaire, les résidus sont en plus grande quantité. Il y a alors un délai d'abattage à respecter sinon les résidus se retrouvent dans la viande.

MATERIEL & METHODES

Matériel et méthodes

Dans le cadre de préparation de notre projet fin d'étude (Biologie et santé) et sur une période de deux mois (avril et mai/2013), ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté de Médecine et de Pharmacie Fès. Différent prélèvement ont été réalisé sur des nouveaux nés hospitalisés pour la recherche de *S. aureus* et l'étude du profil de résistance de ces souche cliniques. En parallèle des isolats de *S. aureus* d'origine alimentaire ont fais l'objet également d'un antibiogramme pour l'étude de la résistance aux antibiotique.

I. Technique de prélèvement

Pour les nouveaux nés hospitalisés :

Des écouvillons à tiges stériles additionnés de l'eau physiologique stérile ont été prélevés au niveau nasal par introduction de l'écouvillon dans chaque narine le plus profond possible suivie de rotations sur les parois narinaires. Chaque écouvillon est placé dans son étui, rebouché et identifié clairement. Les renseignements suivants sont notés: identification du Nom, date, heure, site de prélèvement.

Pour les souches d'origine alimentaire :

Les échantillons ont été prélevés au niveau de la peau de poitrine de la viande crue de la dinde chair.

II. Technique d'analyse

Le matériel de laboratoire comprend, de boîtes de pétri, ensemenceur, des tubes, de béchers, d'Erlens etc., de divers milieux de culture (Chapman, Mueller Hinton, bouillon BHI), plasma de lapin de l'eau physiologique, étuve, autoclave ...

1) L'isolement des souches

Pour les isolats cliniques, les écouvillons ont été sortis de leur étui et ensemencés directement sur gélose Chapman puis incubées à 37°C pendant 24h. Les colonies suspectes de *Staphylococcus* sur gélose Chapman sont des colonies blanchâtres et des colonies jaunâtres

Les 43 souches d'origine alimentaire ont été une autre fois repiquées sur la gélose Chapman et puis incubées à 37°C pendant 24h.

2) Les tests d'identification

Les tests effectués sont : coloration de gram, catalase(+), coagulase(+).

Coloration de gram

- Principe

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

- Méthode

Réalisation de frottis :

Elle nécessite d'avoir un frottis fixé, Classiquement en effectuant une fixation simple à l'eau : sur une lame, déposer une goutte d'eau distillée, ajouter à l'anse une colonie, étaler et fixer à la chaleur.

Réalisation de la coloration :

-Coloration par le cristal violet, laissez agir pendant 1 minute, et rincer à l'eau distillée

-Coloration par le lugol, laissez agir pendant 1 minute, et rincez à l'eau distillée.

-Décoloration (rapide) à l'alcool, laissez agir 15s, rincez abondamment avec de l'eau distillée pour stopper la décoloration.

-Recoloration à la fuchsine , laissez agir pendant 1 minute, rincez doucement à l'eau distillée. Séchez la lame.

-Observez avec une goutte d'huile à immersion.

Le test de catalase :

- Principe

La catalase est une enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

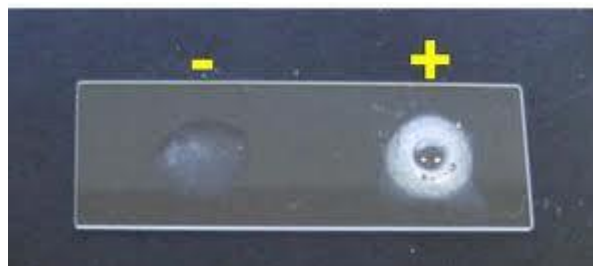
Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence d'oxygénée, Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase.

- Méthode

-Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.

- Déposer, à l'aide de l'anse de platine, une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester.

-Observer l'apparition de bulles.



Figur2 : résultat de test catalase.

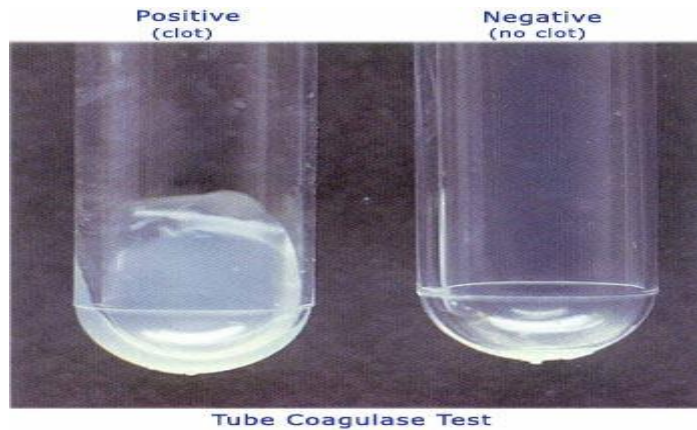
Le test de coagulase :

- Principe

La staphylocoagulase est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin.

- Méthode

On ensemence quelques colonies dans du bouillon BHI et puis on incube à 37°C pendant 24h, après 24h on ajoute 300µl de plasma de lapin, et on incube à 37°C pendant 24h. Si le fibrinogène, soluble dans le plasma, se transforme en fibrine solide, un caillot se formera au fond du tube.



Figur3 : résultat de test coagulase

Les isolats ont été conservées sur la gélose nutritive inclinée et scellées avec un parafilm et conservées à +4°C pou l'étude de l'antibiogramme.

3) L'antibiogramme

- Principe

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action des antibiotiques sur une souche bactérienne .Des disques de papier, imprégnés des antibiotiques a testés, sont déposés à la surface d'un milieu gélose, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Après une incubation ; les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de croissance.

Il a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton (MH), Les antibiotiques testés sont : pénicilline (**P**), cefoxitine tine (**FOX**), fosfomycin (**RD**), gentamicine (**CN**), lincomycin (**MY**), fusidicacid (**FD**), erythromycin (**E**), vancomycin (**VA**), teicoplanin (**TEC**). La résistance à la méticilline a été recherchée avec un disque de cefoxitine.

- Protocole

Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture de 24 h sur milieu gélosé nutritive, on prépare une suspension en solution de l'eau physiologique stérile.

Milieu : gélose Mueller-Hinton

Ensemencement des boites: par la méthode d'écouvillonnage

la solution est prélevée avec un coton-tige et passée sur le bord de la boîte puis ensemencée en stries sur toute la surface d'une gélose Mueller-Hinton à 3 reprises avec une rotation de 60° en respectant les mesures de sécurité nécessaires et, après dépôt des disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile, on appuie doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu, la boîte est incubée à 37°C pendant 24h.

Lecture :

Est faite qualitativement après cette incubation en mesurant le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne, qui se matérialise par un halo clair autour du disque d'antibiotique et en comparant, pour chaque disque d'antibiotique, ce diamètre au standard fourni par le CA-SFM

RESULTATS & DISCUSSION

RESULTATS

1. Etude du profil de résistance des souches *S. aureus* d'origine clinique

Durant la période d'étude, nous avons isolé et identifié 28 souches de Staphylocoques: 20 staphylococcus à coagulase négative et 8 de *S. aureus*.

Sur les 8 isolats de *S. aureus* d'origine clinique, 62.5% ont été résistantes à au moins un antibiotique, et 5 antibiotiques pour lesquels aucune résistance n'a été observée (cefoxitine FOX, lincomycine MY, gentamicine CN vancomycine VA, fosfomycine RD).

Les antibiotiques pour lesquels des résistances ont été observées sont: la pénicilline G (37.5%), teicomycine TEC (25%), érythromycine E, et l'acide fusidique FD (12.5%). La figure présente la fréquence de résistances observées chez les isolats de *S. aureus* d'origine clinique (le tableau 1 détaillé est présenté en annexe1).

La figure4 représente la fréquence de la résistance des isolats de *S. aureus* d'origine clinique.

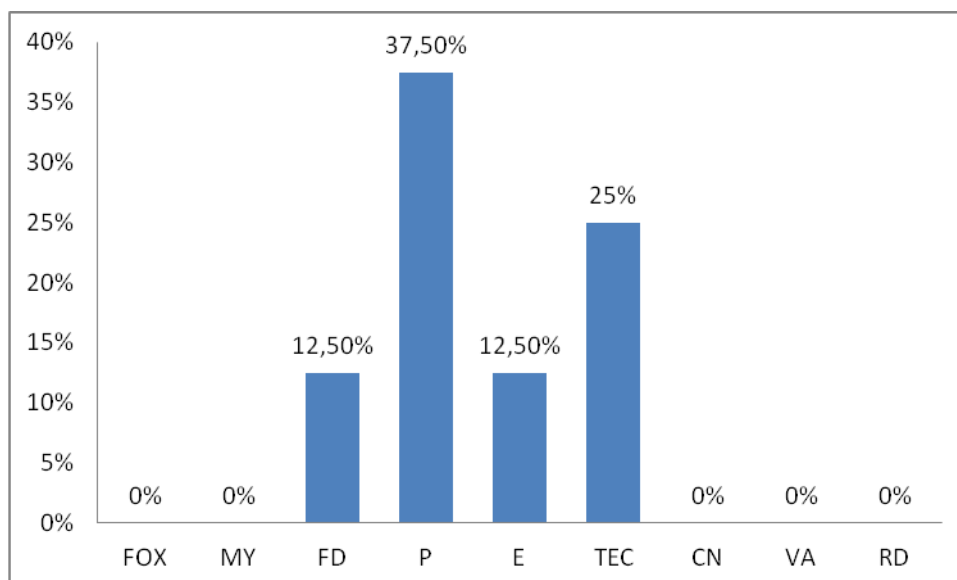


Figure 4 : fréquence de la résistance des isolats de *S. aureus* d'origine clinique

2. Etude du profil de résistance des souches SNC d'origine clinique

Sur les 20 isolats de SNC d'origine clinique, 65% ont été résistantes à au moins un antibiotique. Les SNC ont été résistants à la pénicilline G (40%), à la gentamycine et à l'érythromycine E (35%), alors qu'elle est rarement résistante à l'acide fusidique FD (25%), fosfomycine (20%), lincomycine MY et teicomycine TEC (5%). La résistance à la méticilline a été observée dans 35% des cas. Toutes les souches ont été sensibles à la vancomycine VA. (Le tableau 2 détaillé est présenté en annexe1)

La figure 5 représente la fréquence de résistance de SNC d'origine clinique.

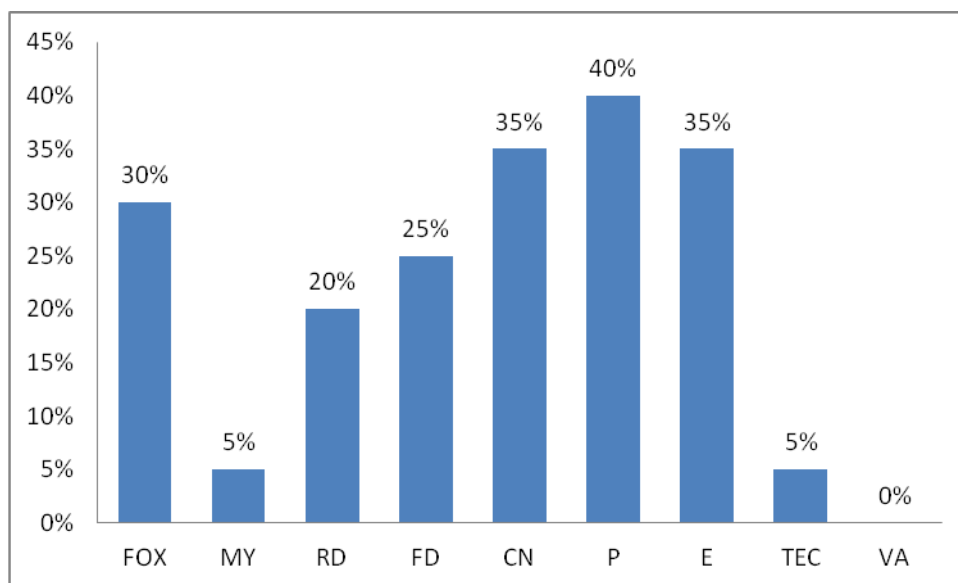


Figure 5: la fréquence de résistance de SNC d'origine clinique

3. Etude de profil de résistance des souches *S. aureus* d'origine alimentaire

Parmi les 43 isolats d'origine alimentaire qui ont été conservés au laboratoire, 15 souches qui présentent des colonies à aspect jaunâtre sur le milieu Chapman, ces isolats ont été positifs au test de coagulase, l'apparition d'un caillot a été observé pour seulement 5 souches.

Sur les 5 isolats de *S. aureus* d'origine alimentaire, 80% ont été résistantes à au moins un antibiotique. Aucune résistance n'a été observée pour 6 antibiotiques (gentamicine CN, cefoxitine FOX, lincomycin MY, l'acide fusidique FD, l'érythromycine E, et la fosfomycine). Les antibiotiques pour lesquels des résistances ont été observées sont, la pénicilline G (80%), teicomycine TEC (60%) et vancomycine VA (20%). (Le tableau 3 détaillé est présenté en annexe2). La figure 6 représente la fréquence de résistance de *S. aureus* d'origine alimentaire

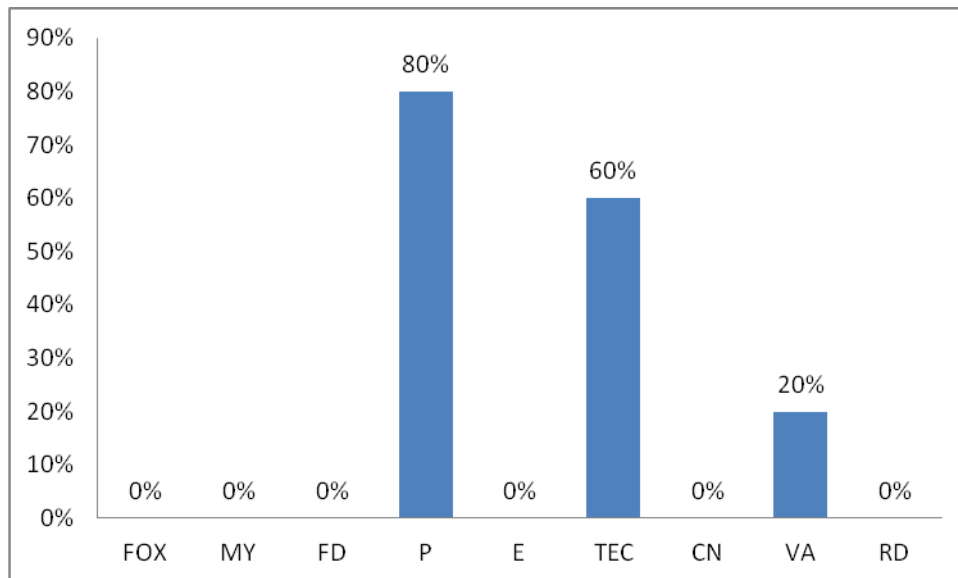


Figure 6: la fréquence de résistance de *S. aureus* d'origine alimentaire

4. Comparaison entre le profil de résistance les isolats d'origine clinique et alimentaire

Les isolats d'origine cliniques présentent une fréquence de la résistance aux antibiotiques plus élevée que ceux d'origine alimentaire, avec une faible fréquence de la résistance à l'acide fusidique FD de (12,5%). Par contre aucune résistance n'a été observée chez les isolats d'origine alimentaire pour le même antibiotique, ainsi une faible fréquence de la résistance à la vancomycine VA (20%) est observée juste pour les isolats d'origine alimentaire. (le tableau 4 détaillé est présenté en annexe2)

La figure 7 représente la prévalence de la résistance des *S.aureus*

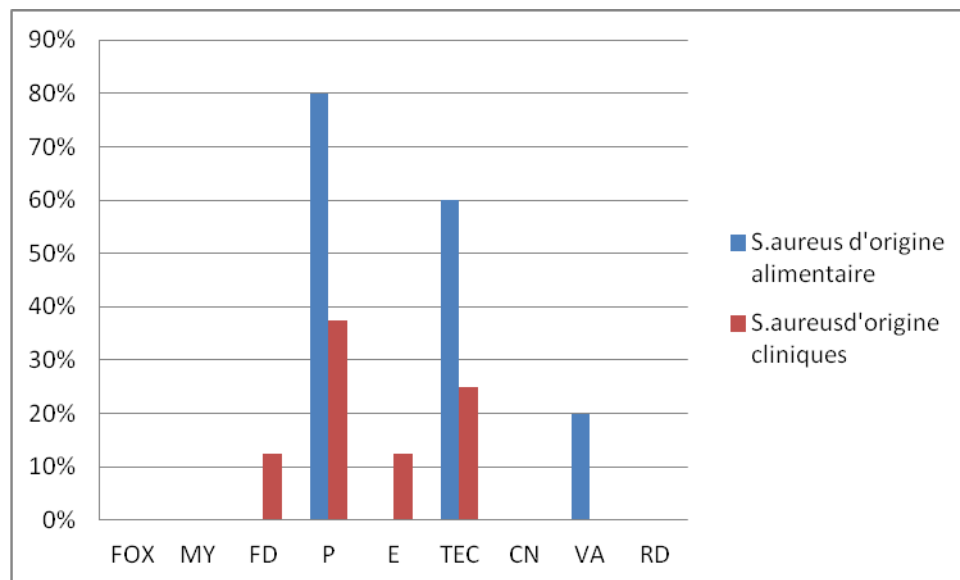


Figure7 : Comparaison entre le profil de résistance les isolats d'origine clinique et alimentaire

Discussion

La présence *S. aureus* est une menace potentielle pour la santé des consommateurs, et le développement de la résistance aux antibiotiques par ces agents pathogènes courants est un sujet de préoccupation en matière de sécurité alimentaire. Concernant les isolats de *S. aureus* d'origine clinique. Nous avons révélé une fréquence élevée de la résistance à la pénicilline G de la famille des β lactamine. Concernant les isolats de SNC d'origine clinique, une résistance est observée dans la famille des β lactamine (pénicilline G) et céphalosporine(C2G). Les β lactamine constituent le traitement de première intention des infections staphylococciques et la résistance à ces molécules a évolué par vagues successives au gré de l'acquisition de mécanismes de résistance spécifiques. Dès les années 1950, la résistance à la pénicilline G par production de pénicillinases plasmidique est apparue rapidement dans les hôpitaux avant de diffuser largement dans la communauté (>90% de résistance à l'hôpital en 2012, >80% en ville). Chez l'enfant, il a été démontré que les Staphylocoques coagulase négative sont le plus souvent en cause dans les bactériémies particulièrement chez les enfants de petit poids, chez qui ils sont responsables de 45 à 65 % des cas de bactériémie. Environ 80 % de ces bactériémies sont associées à la présence d'un cathéter, les traitements antibiotiques préalables, l'alimentation parentérale était un facteur de risque de survenue des bactériémies nosocomiales à staphylocoque coagulase négative et en particulier les lipides par voie intraveineuse comme l'ont démontré [15].

Concernant les isolats d'origine alimentaire qui ont été prélevés sur différents points de vente dont les marchés traditionnels (souk), au niveau des abattoirs, au niveau de boucheries et au niveau de supermarché, au sein des différentes familles d'antibiotiques, les résistances ne s'expriment pas toujours vis-à-vis de toutes les molécules. Ainsi, pour les β -lactamines, des résistances sont observées pour les pénicillines G (pénicilline G), mais pas pour la cefoxitine (FOX) qui été utilisé pour la détection de la résistance à la meticilline. Dans la famille des glycopeptides, une résistance est observée pour la teicomycine(TEC).

Une étude similaire à notre travail a rapporté que sur un total de trente-huit isolats de *S.aureus* d'origine alimentaire, trois ont montré une résistance à la méticilline SARM (7,89%). Le même pourcentage de *S. aureus* a été trouvé résistant à la ciprofloxacine, alors que la résistance à la gentamicine a été de 13,15%, la streptomycine et le chloramphénicol de 18,42% et 21,05% respectivement. Environ 28,94% des isolats ont montré une résistance au

sulfaméthoxazole/Triméthoprim. Les maximales 44,73% et 55,26% des isolats étaient résistants à la tétracycline et à l'ampicilline [16].

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les résistances observées dans les souches alimentaires notamment: Utilisation extensive de ces antibiotiques qui sont considérés comme la principale cause de la résistance chez les agents pathogènes d'origine alimentaire et l'acquisition de résistances croisées.

Notre résultat montre que les taux de résistance aux antibiotiques étaient plus faibles dans les isolats d'origine alimentaire que les isolats cliniques. Cela peut être dû à une utilisation plus fréquente de médicaments antimicrobiens en médecine humaine.

Conclusion

Dans ce travail nous avons testé la sensibilité aux antibiotiques des isolats de *S. aureus* d'origine cliniques et d'origine alimentaire, ainsi pour des isolats des SNC d'origine clinique

Notre travail nous a permis de mettre nos connaissances théoriques en pratique. Nous avons ainsi pu isoler des souches de bactéries *Staphylococcus* à partir d'un prélèvement nasal chez les nouveaux nés, et réaliser différents tests d'identification et des antibiogrammes sur les isolats identifiés. Au terme de ce travail, nous avons constaté que :

- ✓ Tous les isolats des *S. aureus* et SNC ont montrés une résistance pour les β lactamine (pénicilline G) (37,5% ;40% ;et80%) et une résistance pour (cefoxitine) chez les isolats des SNC d'origine clinique dans 30% des cas.
- ✓ Aucun SARM n'a été trouvé dans tous les isolats de *S. aureus* d'origine clinique ou d'origine alimentaire.
- ✓ les taux de résistance aux antibiotiques étaient plus faibles dans les isolats d'origine alimentaire que ceux des isolats cliniques.

La problématique de l'antibioresistance des bactéries concerne tous les acteurs de la santé humaine et vétérinaire. Une véritable prise de conscience est nécessaire pour réduire la consommation des antibiotiques pour l'homme et l'animal afin de préserver cet arsenal thérapeutique et éviter la diffusion et la transmission des résistances entre l'homme et l'animal.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Disponible sur : www.infectiologie.org.tn/pdf/revues/rti4/editorial
- [2] Tattevin P. Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'acquisition communautaire, *Médecine et maladies infectieuses* 41 (2011); 167–175
- [3] Mohamed Nour Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et bases moléculaires de la résistance, *Pathologie Biologie* 53 (2005) 334–340
- [4] Office Fédéral de la Santé Publique Service d'information 3003 Berne. Disponible sur: www.news.admin.ch/NSBSubscriber/message/attachments
- [5]. Les antibiotiques. Disponible: www.microbes-edu.
- [6] les infections à staphylocoques chez l'homme et l'animal. Disponible sur: www.pasteur.fr
- [7] 2012 ; Marie Archambault, Université de Montréal, Étude sur l'occurrence, la séroconversion et la résistance aux antibiotiques des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'origine aviaire, 811155
- [8] Guillot (1990)
- [9] CORPET D. E. Laboratoire de Sécurité et Hygiène des Aliments, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse Cedex 3. [10] Cuny et al. 2010
- [11] (Nemati et *al.*, 2008; Persoons et *al.*, 2009
- [12] Tattevin P. Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'acquisition communautaire, *Médecine et maladies infectieuses* 41 (2011); 167–175
- [13] BENOUDA A. *staphylococcus aureus* : epidemiologie et prevalence des souches résistantes a la meticilline (sarm) au Maroc, *Rev Tun Infectiol*, , Vol 3, N°1, 15 – 20
- [14] Hamze M., Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* au Nord du Liban : place de la résistance à la méticilline et comparaison des méthodes de détection, *Pathologie Biologie* 51 (2003) 21–26
- [15]. Gayvallet-Montredon N ; bactériémies nosocomiales en pédiatrie ; *Arch Pédiatr* 2002 ; 7 : 679-84
- [16]: Ali Akbar, Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat, *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(2): 163-168

ANNEXES(1)

antibiotique	FOX	MY	FD	P	E	TEC	CN	VA	RD
16s1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20s1	S	S	R	R	S	S	S	S	S
57s1	S	S	S	S	S	R	S	S	S
64s2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
80s1	S	S	S	R	S	S	S	S	S
81s1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
97s1	S	S	S	S	R	S	S	S	S
131s1	S	S	S	R	S	R	S	S	S

Tableau 1: Résistance de *S. aureus* d'origine clinique

antibiotique	FOX	MY	RD	FD	CN	P	E	TEC	VA
121s2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
123s1	R	S	R	S	R	R	R	S	S
130s1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
130s2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
132s1	S	S	S	S	R	R	S	S	S
133s1	R	R	S	R	R	S	R	S	S
133s2	R	S	R	S	R	R	R	S	S
134s1	S	S	S	R	S	S	R	S	S
135s1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
135s2	R	S	R	S	R	R	R	S	S
137s1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
136s1	S	S	S	R	S	S	S	S	S
138s1	R	S	R	R	R	R	R	S	S
140s1	S	S	S	S	S	R	S	S	S
140s2	S	S	S	S	S	S	S	R	S
141s1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
141s2	S	S	S	S	S	S		S	S
142s1	S	S	S	S	S	R	S	S	S
143s1	I	S	S	S	S	S	R	S	S
149s1	R	S	S	R	R	R	S	S	S

Tableau 2 Résistance de SNC d'origine clinique

ANNEXES(2)

antibiotique	FOX	MY	FD	P	E	TEC	CN	VA	RD
Z	S	S	S	R	S	R	S	S	S
23 /3	S	S	S	R	S	S	S	S	S
71/2	S	S	S	R	S	R	S	S	S
159/1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
161/2	S	S	S	R	S	R	S	R	S

Tableau 3: Résistance de S.aureus d'origine alimentaire

Les antibiotiques	La fréquence de la résistance de S.aureus d'origine clinique	La fréquence de la résistance de S.aureus d'origine alimentaire
FOX	0%	0%
MY	0%	0%
FD	12,5%	0%
P	37,5%	80%
E	12,5%	0%
TEC	25%	60%
CN	0%	0%
VA	0%	20%
RD	0%	0%

Tableau 4 : Comparaison entre le profil de résistance les isolats d'origine clinique et alimentaire

ANNEXES(3)

La composition des milieux de culture

Milieu Chapman

Peptones.....	11,0 g
Extrait de viande.....	1,0 g
Chlorure de sodium.....	75 g
Mannitol.....	10,0 g
Rouge de phénol.....	0,025 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Milieu BHI(Bouillon cœur-cervele)

Extrait cœur-cervele.....	17,5 g
Peptone pancréatique de gélatine. .	10,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Glucose.....	2,0 g
Eau distillée.....	1000 ml

La gélose nutritive

Tryptone.....	5,0 g
Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar agar bactériologique.....	12,0 g
Eau distillée.....	1000 ml