

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE CONSTANTINE
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département De Microbiologie

N° d'ordre :67/DS/2019

N° de série :02/MB/2019



THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES
BIOLOGIQUES

Option Microbiologie

Présentée par

Mme ADOUI Mounira

Thème :

Caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) et évaluation de leur sensibilité à la propolis

Soutenue le :08/04/2019

Devant le jury :

Président: DEHIMAT. L

Rapporteur: LAHOUEL. M

Examinateur : ARHAB. R

Examinateur : HAMIDECHI. M.A

Examinateur : SIFOUR. M

Professeur Univ. Mentouri Constantine

Professeur Univ. JIJEL

Professeur Univ. Oum El Bouaghi

Professeur Univ. Mentouri Constantine

Professeur Univ. JIJEL

Année Universitaire 2018-2019

Remerciements

A mon encadreur Monsieur le Professeur **LAHOUEL MESBAH**

Pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Votre compétence et votre efficacité m'inspirent le plus grand respect. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur **DHIMAT ELAID**

Vous avez bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Soyez assurée de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur **ARHAB RABEH**

Un merci tout spécial collègue, ami et frère Rabeh vous êtes et vous resterez in Challah parmi mes proches les plus chers .Aujourd'hui encore, je me rappelle des bons moments qu'on a vécu depuis une vingtaine année. Je suis ravi que vous ayez accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur **HAMIDECHI ABD ELHAFIDH**

Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de rejoindre ce jury. Je vous en suis très reconnaissante. Vous êtes et vous resterez pour moi l'exemple type de l'enseignant universitaire. Vous avez été une inspiration pour moi.

A Monsieur le Professeur **SIFOUR MOHMED**

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse et d'apporter vos connaissances à la critique de ce travail. Veuillez recevoir l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Un grand merci à mon frère le Dr **ADOUI NADIR** du Centre Hospitalier
Compiègne Noyon France.

Remerciements

Je vous remercie infiniment pour toute l'aide que tu m'as apportée pour mener à bien cette thèse dans lequel tu t'es beaucoup impliquée. Sans votre soutien, cette thèse n'aurait pu exister. **Je vous remercie énormément cher frère.**

A mon mari et collègue le Professeur **BELAIDI ABD EL HAKIM**

Merci sans vous, je ne serais pas ou je suis aujourd'hui.

Un merci tout spécial aussi à ma chère amie et collègue Professeur

BOULAHBEL SOUAD

Ton soutien, tes conseils m'ont énormément apporté pour rédiger cette thèse. Merci pour tous ces moments géniaux qu'on a vécu depuis ces dernières années.

A tous les membres du **laboratoire de Bactériologie et biologie moléculaire** du **Centre de Recherche de Biotechnologie CRBt** de Constantine.

Merci de m'avoir accueillie en stage au sein de vos laboratoires. Je remercie vivement **Dr Boudchicha Rima** et **Mr Boumegoura Ali** du laboratoire de Biologie moléculaire, qui ont mis à ma disposition tous les équipements de leur laboratoire. Un merci spécial à **Mr Boumegoura Ali** qui m'a beaucoup aidé, merci pour tout le temps que vous m'avez accordée. Votre aide a été indispensable.

A tous les responsables des **laboratoires de bactériologie clinique** de **Oum El Bouaghi (Ibn Sina)**, **Ain Fakroun**, **Ain Baidha** et **CHU de Constantine** et **labo privés Constantine.**

Merci beaucoup pour toutes les souches de Staphylocoques et les milieux de culture que je vous m'avez fournies.

Remerciements

A tous mes **étudiants** qui ont bossé en même temps que moi dans l'isolement et la sélection des souches SARM (Sarah, Abdelrahmane, Zahra, Rahima, Nour, soumeya, Ilhem...).

Merci à toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A la Mémoire de mon cher père ;

A ma mère avec toute ma reconnaissance ;

A ma sœur, qui a toujours été à mes côtés ;

A mes enfants, Taki, Aymen, Lamis, Abdelrahmane, Meriem, Yahia et Taha vous êtes mes raisons de vivre et de vouloir rendre ce monde meilleur.

A mes frères et belles sœurs ;

A tous les membres de ma famille et belle famille ;

A tous mes proches, pour leur présence et leur fidélité, en particulier mes amis et collègues de travail de l'université de Oum El Bouaghi : Besma, Saliha, Wided Hinda, Karima, Fareh, Lilia, Karim, Djalila, Soumeya, Ahmed, Chamsse, Aziz, Nadhira et de l'université de jijel Leila, Lamia, Mr Idoui, Fares.

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photographies

Liste des tableaux

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

Chapitre 1: Revue bibliographique

1. Etude de l'espèce *Staphylococcus aureus*

1.1 Historique	3
1.2 Caractères morphologiques et culturels	3
1.3 Caractères biochimiques.....	4
1.4 Portage de <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.5 Pouvoir pathogène.....	5
1.6 Facteurs de virulence.....	6

2. Résistance aux antibiotiques

2.1 Définition	7
2.2 Mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	7
2.3 Résistances de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques.....	7
2.3.1 Résistance aux β -lactamines.....	8
A. Résistance par production de β -lactamases.....	9
B. Résistance par modification d'une protéine de liaison	9
C. Autres mécanismes.....	10
D. La cassette staphylococcique SCC mec	10
E. SARM d'origine communautaire et hospitalière.....	11
2.3.2 Résistance aux aminosides.....	11
2.3.3 Résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS B).....	12
A. Résistance par modification de la cible de l'antibiotique.....	12
B. Résistance par efflux.....	12
C. Résistance par enzymes inactivatrices.....	13
2.3.4. Résistance aux fluoroquinolones.....	13
2.3.5 Résistance aux glycopeptides.....	13
2.4	

3. Propolis

3.1 Définition	15
----------------------	----

3.2Rôle dans la ruche.....	16
3.3 Récolte de la propolis.....	16
3.3.1Récolte par les abeilles.....	17
3.3.2Récolte par l’homme.....	17
3.4 Propriétés physico-chimique de la propolis.....	18
3.4.1 Propriétés physiques.....	18
A. Consistance.....	18
B. Couleur	18
C. Saveur.....	18
D. Odeur.....	18
E. La solubilité.....	19
F. Le point de fusion.....	19
G. Densité.....	19
3.4.2Composition chimique.....	19
3.4.3 Substances bioactives de la propolis.....	20
A. Les flavonoïdes.....	21
B. Les composés phénoliques et acides aromatiques.....	21
C. Acides organiques.....	21
D. Les terpènes antiseptiques.....	22
E. Les huiles essentielles.....	22
F.Les oligo-éléments.....	22
3.5 Propriétés thérapeutiques de la propolis.....	22
3.5.1Activitéantibactérienne.....	22

Chapitres 2: Matériel et méthodes

1. Objectif de l’étude.....	24
2. Matériel.....	25
2.1 Souches.....	25
2.2 Propolis.....	25
3. Méthodes.....	26
3.1Isolement des souches <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.2 Identification.....	26
3.2.1 La catalase.....	26
3.2.2La coagulase.....	26

3.2.3 Recherche de la DNase (Désoxyribonucléase).....	27
3.2.4 Système d'identification biochimique API Staph	29
3.3 Antibiogramme.....	30
3.3.1 Détection de la résistance à la Métilcilline chez <i>S. aureus</i>	30
3.3.2 Détermination de la CMI des antibiotiques par Etest.....	32
3.3.3 Recherche de la résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux glycopeptides	33
3.3.4 Recherche des phénotypes de résistance MLSB.....	36
3.4 Détection du gène <i>mecA</i> par PCR.....	37
3.4.1 Extraction de l'ADN.....	37
3.4.2 Mesure des concentrations et puretés des extraits d'ADN.....	37
3.4.3 Amplification du gène de résistance <i>mecA</i>	38
3.4.4 Détection des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	40
3.5 Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne de la propolis.....	43
3.5.1 Méthode de diffusion sur milieu solide.....	43
3.5.2 Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne des flavonoides.....	44
3.5.3 Détermination de la CMI et CMB de l'EEP.....	45
A. Préparation de la gamme de concentration de la propolis.....	45
B. Détermination de la CMI par macro-dilution (diffusion sur milieu solide).....	47
C. Détermination de la CMI et la CMB par micro-dilution.....	47
3.6 Etude de la synergie antibiotique propolis.....	49
3.7 Analyses statistiques.....	50
Chapitre 3 : Résultats et discussion	
1. Etude bactériologique.....	51
1.1 Examen microscopique.....	51
1.2 Culture.....	51
1.3 Identification biochimique.....	52
2. Répartition des souches <i>S. aureus</i> en fonction des prélèvements.....	53
3. Détection des SARM.....	54
4. Prévalence des SARM.....	54
4.1 Répartition des souches SARM en fonction des prélèvements.....	57
4.2 Répartition des souches SARM selon le sexe.....	58
4.3 Répartition des souches SARM selon l'âge.....	59
5. Résistance des SARM aux antibiotiques.....	59
5.1 β -lactamines.....	60

5.2 Aminocyclitolides.....	61
5.3 Macrolides.....	63
5.3.1 Détection du phénotype MLSb chez les souches SARM	64
5.4 Fluoroquinolones.....	65
5.5 Glycopeptides.....	67
5.6 Autres antibiotiques.....	68
5.7 Détermination des CMI des antibiotiques testés.....	70
6. Détection du gène de résistance <i>mecA</i> par PCR.....	71
6.1. Mesure des concentrations et purités des extraits d'ADN.....	71
6.2. Détection du gène <i>mec A</i>	72
7. Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis.....	74
6. 1 Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis vis-à-vis des souches <i>S. aureus</i> ...	74
6.2 Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoides de la propolis.....	77
6.3 Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis vis à vis des souches SARM.....	78
6.4Détermination de la CMI et la CMB de la propolis.....	80
7. Synergie entre la propolis et des antibiotiques antistaphylococciques.....	84
Conclusion	90
Références bibliographiques	
Résumé	
Annexe	

ADN: Acide désoxyribonucléique

agr: Accessory gene regulator

ANT : Aminosides-nucléotidyl transférase

ADH : Arginine dihydrolase

APH : Phosphotransférase

ATCC: American Type Culture Collection

CA-SFM: Comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CMB: Concentration minimale bactéricide

DNase : Désoxyribonucléase

DO : Densité Optique

EARSS: European Antimicrobial Persistence Surveillance System

EEP : Extrait Ethanolique de la Propolis

GISA: *Glycopeptide Intermediate-sensitive Staphylococcus aureus*

mecA : Gène de résistance à la méticilline.

MH : Muller Hinton

MLSB: Macrolides, Lincosamides et Streptogramine Bismuth

Pb : Paires de bases

PLP: Protéines liants pénicillines

PCR: Polymerase Chain Reaction

PM: Poids moléculaire

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SARM-H : SARM hospitalier

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline

SCC *mec*: Cassette chromosomique staphylococcique *mec*

SCN : Staphylocoques à coagulase négative.

TSST-1: Toxic shock syndrome toxin 1

UFC: Unité formant une colonie

VISA: Vancomycin Intermediate-sensitive *Staphylococcus aureus*

VRSA: Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*

Figure N°1: Aspects caractéristiques en amas de coques de <i>S. aureus</i>	3
Figure N°2: Fréquence du portage de <i>S. aureus</i> par site corporel, chez l'adulte porteur ou non porteur au niveau nasal.....	5
Figure N°3: Expression temporelle des facteurs de virulence chez <i>S. aureus</i>	6
Figure N°4: Émergence de la multi-résistance de <i>S. aureus</i>	8
Figure N°5: Récolte de la propolis par l'apiculture.....	18
Figure N°6: Composition chimique de la propolis.....	20
Figure N°7: Organigramme d'identification de <i>S. aureus</i>	28
Figure N°8: Détermination de la CMI par Etest.....	33
Figure N°9: Recherche des phénotypes de résistance MLSB (zone D).....	36
Figure N°10: Détermination de la (CMI) et la (CMB) en milieu solide.....	49
Figure N°11: Pourcentage de <i>S. aureus</i>	53
Figure N°12: Répartition des souches <i>S. aureus</i> en fonction des prélèvements.....	53
Figure N°13: Taux des SARM.....	55
Figure N° 14 : Prévalence mondiale des SARM acquises en établissement de soins.....	56
Figure N°15: Répartition des souches SARM en fonction des prélèvements.....	57
Figure N°16: Répartition des SARM selon le sexe.....	58
Figure N°17 : Répartition des SARM selon l'âge.....	59
Figure N°18: Profil de résistance des SARM aux antibiotiques.....	60
Figure N°19 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR du gène mecA (533 bp).....	74
Figure N°20 : Activité antibactérienne de la propolis vis-à-vis des souches <i>S. aureus</i>	75
Figure N°21 : Activité antibactérienne des flavonoïdes de la propolis.....	77
Figure N°22: Activité antibactérienne de la propolis vis à vis des souches SARM selon deux méthodes puits et disques.....	79
Figure N°23 : Effet antibactérien de 12 antibiotiques seuls et l'effet combiné de l'antibiotique avec EEP vis-à-vis de 9 souches SARM.....	88
Figure N°24 : Fiche de lecture API STAPH.....	
Figure N°25 : Mise en évidence des caractères biochimique par APISTAPH.....	
Figure N° 26: étapes du lavage des mains.....	

Photographie N°1: Spectrophotomètre NanoDrop 8000.....	38
Photographie N°2: Thermocycleur utilisé de type BIO-RAD C1000.....	40
Photographie N°3: Cuve d'électrophorèse après dépôts d'ADN.....	42
Photographie N°4: Trans-illuminateur de type Gel Doc TM XR ⁺ BIO-RAD TM	43
Photographie N°5: Coloration de GRAM Staphylocoques.....	51
Photographie N°6 : Croissance sur gélose Chapman avec acidification du milieu	52
Photographie N°7: Détection des SARM (OX, P, FOX).....	54
Photographie N°8: Aspect caractéristique d'une pénicillinase.....	61
Photographie N°9: Détection du phénotype MLSb chez les souches SARM.....	65
Photographie N°10 : Profil de resistance d'une souche multirésistantes SARM.....	69
Photographie N°11: Détermination de la CMI des souches SARM par E-test SARM	71
Photographie N°12: Activité antibactérienne de la propolis comparée à celle de certains antibiotiques.....	80
Photographie N°13: CMI de l'EEP vis-à-vis des mesurée par macrodilution.....	83
Photographie N°14: CMB de l'EEP vis-à-vis d'une souche SARM mesurée par microdilution.....	83
Photographie N°15 : Effet synergique de la propolis et antibiotiques.....	85
Photographie N°16 : Effet synergique de la propolis et antibiotiques.....	

Tableau N°1: Souches de référence testées au cours de notre étude.....	25
Tableau N°2: Préparation des solutions de la VA et la Tei pour la mesure de la CMI.....	35
Tableau N°3: Préparation du mix en volume pour l'amplification.....	39
Tableau N°4: Préparation de la gamme de concentration de la propolis.....	46
Tableau N°5: Phénotypes de résistance de SARM aux aminosides.....	62
Tableau N°6: Phénotypes de résistance des SARM aux macrolides.....	64
Tableau N°7: CMI des antibiotiques testés.....	70
Tableau N°8: Concentrations et puretés des extraits d'ADN.....	72
Tableau N°9: CMI et CMB de l'EEP testé sur les souches SASM.....	81
Tableau N°10: CMI et CMB de l'EEP testé sur les souches SARM.....	81
Tableau N° 11: Antibiotiques testés pour <i>S. aureus</i> et leurs valeurs critiques selon CA-SFM 2017.....	

**« L'avancement des sciences dépend de notre capacité à
transmettre nos connaissances » anonyme**

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positif, ubiquitaire commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Appelé aussi staphylocoque doré ou staphylocoque à coagulase positive est un agent pathogène fréquemment retrouvé dans de multiples infections d'origine nosocomiale et communautaire (**Le Minor, 1990**).

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) représente un défi majeur en santé publique dans de nombreux établissements de soins à travers le monde. Les SARM sont une cause fréquente d'épidémies et sont devenus endémiques dans beaucoup de régions où ils alourdissent le bilan de la morbidité, de la mortalité et le coût des soins associés aux infections nosocomiales (**Levesque et al., 2012 ; Battard et al., 2005**).

Ils ont été décrits, la première fois en 1961, en Europe continentale, puis en Amérique et ailleurs dans le monde, comme étant une menace surtout dans les hôpitaux. Mais aux alentours des années 2000, de nouveaux clones ont été décrits comme responsables d'infections communautaires. L'émergence de ces souches communautaires a été décrite initialement aux USA et maintenant dans plusieurs pays du monde (**Donnio et al., 2010**). Comparée aux autres pays du Maghreb, l'Algérie enregistre la plus forte prévalence de SARM (44 %) par rapport aux deux pays voisins que sont la Tunisie (18 %) et le Maroc (19 %) (**Zouagui et al., 2015**).

De surcroît, les SARM sont très souvent résistants à de nombreuses autres familles d'antibiotiques que celle des β -lactamines, rendant plus complexe le choix de la meilleure option thérapeutique. Leur résistance est liée à leur grande plasticité génomique qui peut être acquise ou apportée par un plasmide ou d'autres éléments mobiles (cassette chromosomique staphylococcique, transposons, bactériophages, Séquences d'insertion) (**Dumitrescu et al., 2010**).

Il existe donc un réel intérêt thérapeutique dans la recherche de composés ou d'extraits naturels capables de limiter cette résistance. Dans ce contexte nous proposons un mystérieux produit de la ruche riche de principes actifs aux propriétés pharmacologiques intéressantes notamment antioxydante, anti-inflammatoire mais surtout antibiotiques naturelles. C'est la propolis, encore méconnue du grand public, mais appelée à un grand avenir.

La propolis est un mastic végétal, fabriqué par les abeilles à partir de résines récoltées sur les écorces et les bourgeons de certains arbres et de plantes balsamiques. Les abeilles les apportent à la ruche, les additionnent et les modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement) (**Donadiou, 2008**).

Sa composition est extrêmement complexe et variable plus de 300 différents composants de la propolis qui ont été identifiés (**Sauvager, 2014**). Cependant on retrouve toujours de façon constante et relativement stable : résines (50 à 55%), cires (30 à 40%), huiles chargées en composés volatils (5 à 10%), pollen (5%), acides aminés, vitamines, oligo-éléments, acides gras et flavonoïdes (dont le principal est la galangine).

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antibactérienne de la propolis vis à vis des souches multirésistantes SARM et l'étude de la synergie entre la propolis et des antibiotiques antistaphylococciques.

Trois thèmes distincts, mais complémentaires ont été étudiés, soit :

- Isolement, détection et étude du profil de résistance des souches *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline SARM;
- Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) vis-à-vis des souches sélectionnées comme étant SARM ;
- Evaluation de l'effet combiné de l'EEP et des antibiotiques antistaphylococciques.

1. Etude de l'espèce *Staphylococcus aureus*

1.1 Historique

Observés par Pasteur en 1879 dans un pus de furoncle, les staphylocoques doivent leur nom à OGSTON (1881) qui les a mis en évidence dans des abcès aigus et chroniques.

En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de staphylocoques et les a scindés en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (Avril et al., 2000).

1.2 Caractères morphologiques et culturels

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, catalase positive.

Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des **Firmicutes**, à la classe des **Bacilli** à l'Ordre des **Bacillales** et la famille des *Staphylococcaceae* (Le Loir et Gantier, 2010). Il comprend actuellement 53 espèces et sous espèces, isolées chez l'homme et l'animal. Les principales espèces sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus* (Le Loir et Gantier, 2010).

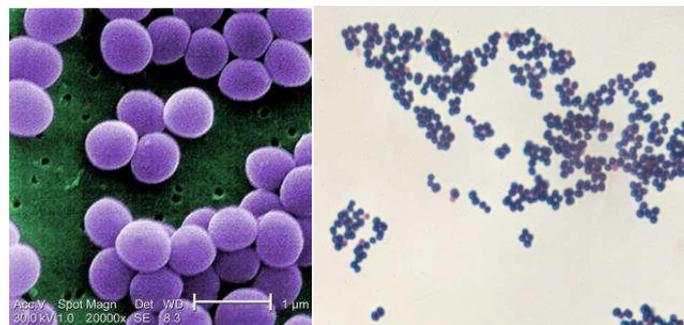


Figure N°1: Aspects caractéristiques en amas de coques à Gram positif de *S. aureus*.

Staphylococcus aureus est de 0,5 à 1 µm de diamètre, immobile, non sporulé, parfois encapsulé (Denis et al., 2007).

Elle se cultive plus facilement sur les milieux usuels et sur les milieux sélectifs contenant des fortes concentrations en sels (NaCl 7,5% Chapman,) dans des conditions de pH et de température variables. C'est une bactérie relativement résistante aux inhibiteurs bactériens

comme le cristal violet et le tellurite de potassium et tolère une activité en eau très réduite ($A_w = 0,83$) (Winn et al., 2006).

S. aureus est très résistant dans le milieu extérieur, sa survie à l'extérieur de l'hôte est de 7 jours (surfaces sèches) à plusieurs mois (milieu humide) (Le Minor et Veron, 1990).

Il est sensible à de nombreux désinfectants tels que l'hypochlorite de sodium à 0,5% de chlore actif (eau de javel reconstituée diluée au $1/5^e$), les solutions d'iode et d'alcool, le glutaraldéhyde et le formaldéhyde (Allion, 2004).

1.3 Caractères biochimiques

S. aureus est aéro-anaérobie facultative, à catalase positive et à oxydase négative. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le tellurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Denis et al., 2007).

La production d'une coagulase libre, d'un pigment caroténoïde jaune doré (d'où le nom de staphylocoque doré), la présence d'une Dnase et de la protéine A dans la paroi caractérisent *S. aureus* (Winn, et al., 2006).

1.4 Portage de *Staphylococcus aureus*

S. aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhinopharynx). Chez l'adulte, *S. aureus* est présent dans les zones cutanées humides et colonise surtout les muqueuses des fosses nasales et de l'oropharynx mais aussi le périnée (Figure N°2). La peau, particulièrement celle des mains, est régulièrement colonisée (Werthein et al., 2005).

La fréquence du portage nasal varie de 20 à 30% dans la population générale. On distingue trois cas : **les porteurs permanents** qui concernent 20% de la population, **les porteurs intermittents ou occasionnels** qui concernent 60% de la population, et enfin ceux qui ne sont jamais porteurs, soit 20% de la population (Kluytmans et al., 1997).

Des facteurs d'adhésion préférentielle aux cellules épithéliales des porteurs ont été évoqués ainsi que des prédispositions génétiques (système HLA) (Werthein et al., 2005). Les mains représentent le site le plus colonisé par *S. aureus* après le nez, impliquant leur rôle primordial dans la transmission de ce germe (Werthein et al., 2005).

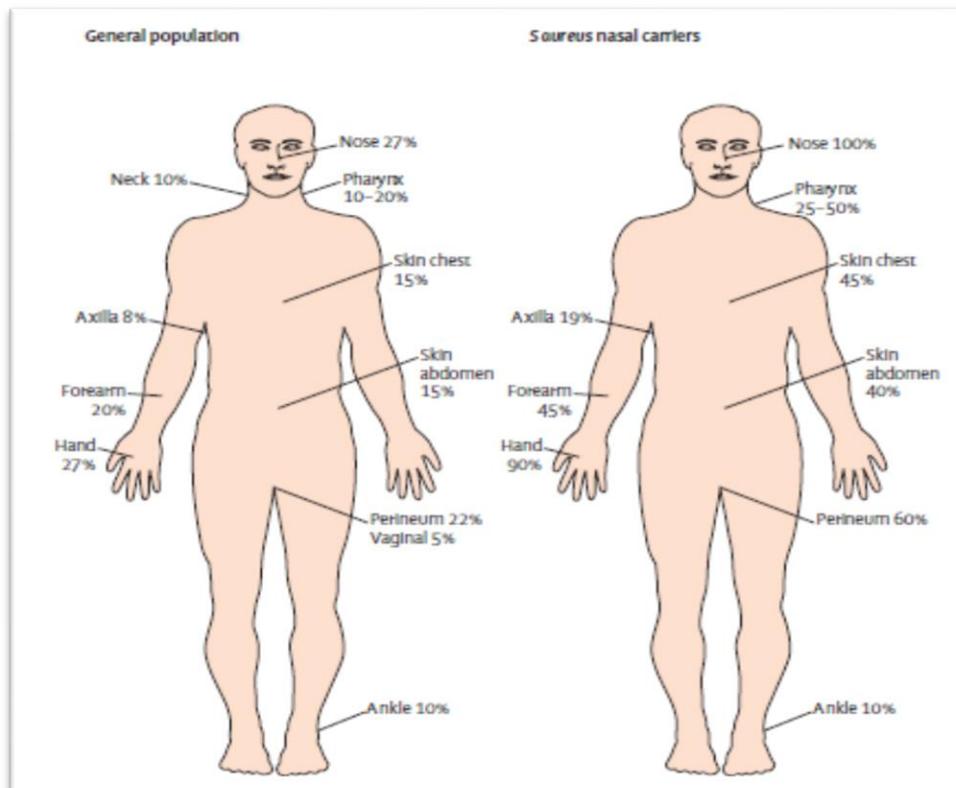


Figure N°2: Fréquence du portage de *S. aureus* par site corporel, chez l'adulte porteur ou non porteur au niveau nasal d'après (Wertheim *et al.*, 2005).

La transmission de *S. aureus* est essentiellement manu-portée et le réservoir nasal en contaminant sans cesse les mains assure la pérennité de la transmission. Ainsi, *S. aureus* est aussi un agent pathogène fréquemment retrouvé dans de multiples infections d'origine nosocomiale et communautaire (Wertheim *et al.*, 2005).

1.5 Pouvoir pathogène

Le *Staphylococcus aureus* cause principalement des infections de la peau et des tissus mous : abcès, furoncle, folliculite, impétigo, cellulite. Le *Staphylococcus aureus* peut également causer des infections profondes : endocardite, péritonite, pneumonie nécrosante, bactériémie, méningite, ostéomyélite, arthrite septique et infections des os, des articulations et des organes. Plus rarement, il est responsable de syndromes liés aux effets des toxines produites par la bactérie, par exemple le syndrome du choc toxique et l'intoxication alimentaire (Winn *et al.*, 2006).

1.6 Facteurs de virulence

La pathogénie de *S. aureus* est liée à la synthèse de nombreux facteurs de virulence et on peut compter principalement quatre classes de facteurs de virulence : les facteurs de virulence associés à la paroi, les facteurs d'échappement au système immunitaire (capsule, protéine A), les facteurs de virulence sécrétés comme les exotoxines et les facteurs de persistance. L'expression de l'ensemble de ces facteurs est régulée temporellement en particulier par le système à 2 composants Agr et permet la dissémination des bactéries dans l'organisme (**Figure N°3**).

On peut expliquer la diversité de ces facteurs de virulence par le fait que la bactérie a une très grande plasticité génomique grâce aux plasmides, aux transposons et aux bactériophages. En effet ces facteurs sont soit directement codés par un chromosome présent ou codés par des éléments génétiques mobiles (transposons, plasmides ou bactériophages) (**Vincenot et Saleh, 2008**).

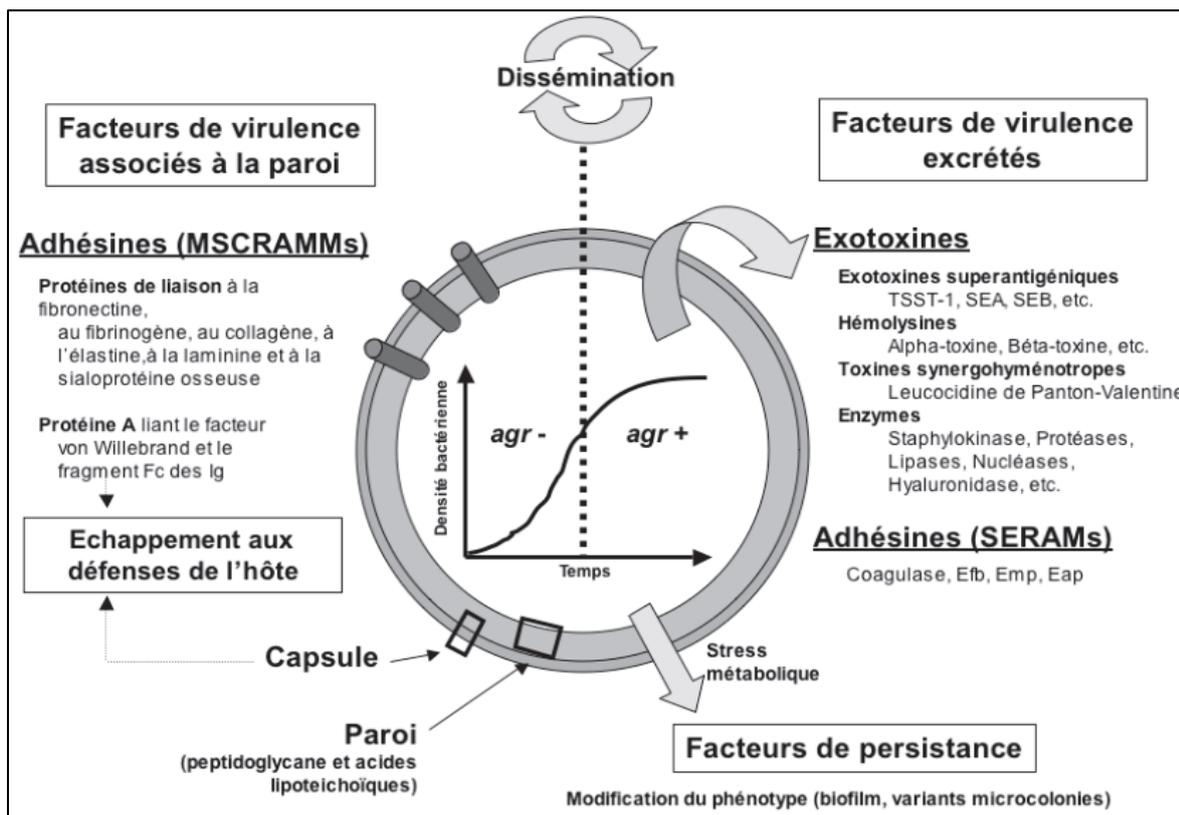


Figure N°3 : Expression temporelle des facteurs de virulence chez *S. aureus* (d'après Ferry *et al.*, 2005).

2. Résistances aux antibiotiques

2.1 Définition

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques : la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

La résistance intrinsèque (ou naturelle ou insensibilité) est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques.

Par l'inverse, la résistance acquise n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre, dans certains cas, elle peut concerner la grande majorité de ces souches comme, par exemple, la production de pénicillinase chez le staphylocoque qui intéresse plus de 90 % des souches (Courvalin, 2007).

2.2 Mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Les bactéries ont su développer des mécanismes divers et variés afin d'inhiber l'action des antibiotiques utilisés en thérapeutique.

Les principaux mécanismes élucidés à ce jour sont l'inactivation enzymatique, la modification de la cible de l'antibiotique, la diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne, et la mise en place ou la multiplication de systèmes d'efflux.

Une même souche bactérienne peut cumuler plusieurs de ces mécanismes (Mainardi et al., 1996).

2.3 Résistances de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques

La grande plasticité du génome de *S. aureus* est associée à la constante évolution des caractéristiques épidémiologiques des clones de *S. aureus* responsables d'infections chez l'homme. Schématiquement, chaque décennie amène l'émergence de nouveaux clones. Ainsi avant les années 40, les souches de *S. aureus* étaient sensibles à la pénicilline G, dix années après 90 % étaient sécrétrices de β -lactamases. En 1960, la première souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) est apparue en Angleterre, puis les SARM se sont répandus de façon épidémique dans les hôpitaux à partir des années 70, pour devenir vers 1980 multirésistants aux antibiotiques et pandémiques. Les années 90 ont vu la description des souches de SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Aux alentours des années 2000,

les SARM n'ont plus été limités au secteur hospitalier, mais de nouveaux clones ont été décrits comme responsables d'infections communautaires (**Dondemont et al., 2014**). Enfin le gène *vanA* de résistance à la vancomycine des entérocoques a été retrouvé dans trois souches de *S. aureus* aux USA (**Lina et Cattoir, 2014**).

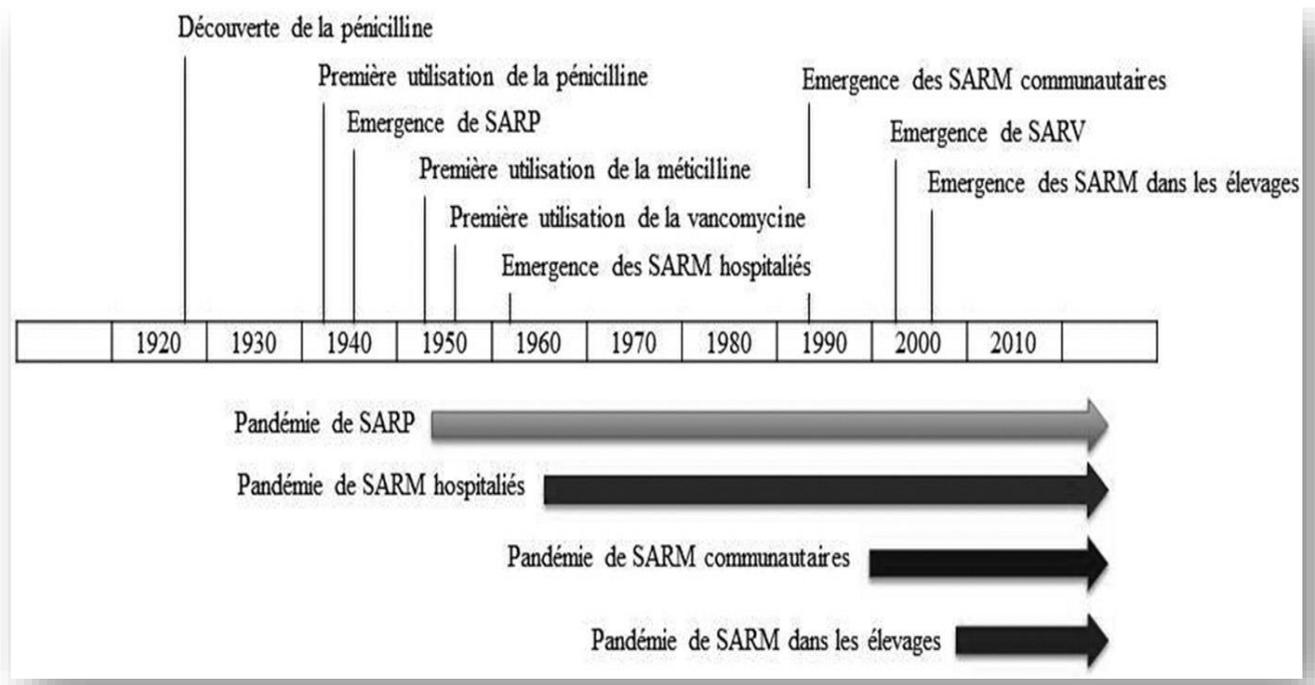


Figure N°4 : Émergence de la multi-résistance de *Staphylococcus aureus* (d'après Lina et Cattoir, 2014)

2.3.1 Résistance aux β -lactamines

Les β -lactamines regroupent plusieurs familles d'antibiotiques : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes ainsi que les monobactames, Elles ont une structure chimique commune correspondant à un mécanisme d'action commun : elles inhibent la biosynthèse du mucopeptide (ou peptidoglycane) de la paroi bactérienne, du fait de leur analogie structurale avec le dipeptide substrat d-Ala-d-Ala. Les bêtalactamines sont les antibiotiques les moins toxiques (mais les plus allergisants) (**Buy, 2005**).

La résistance aux β -lactamines chez les staphylocoques repose sur deux grands types de mécanismes qui sont identiques pour les *S. aureus* et pour les *Staphylococcus* à coagulase négative.

A. Résistance par production de β -lactamases

Une β -lactamase est une enzyme qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines, les rendant inactives. L'existence d'une pénicillinase entraîne une résistance à la pénicilline G et aux pénicillines A (ampicilline, amoxicilline, etc.), aux carboxypénicillines (ticarcilline), et aux uréidopénicillines (pipéracilline).

Ce mode de résistance est présent chez 90 % des isolats cliniques de *S. aureus* (Mainardi et al., 1996).

Le gène *bla_Z* codant pour les pénicillinases de staphylocoque peut être porté soit par un transposon soit être chromosomique. La production de β -lactamases peut être constitutive ou, le plus souvent, inductible. L'activité des β -lactamines est restaurée en présence d'un inhibiteur de β -lactamases de type acide clavulanique, tazobactam ou sulbactam (Quincampoix et Mainardi, 2001).

B. Résistance par modification d'une protéine de liaison la PLP2a (SARM)

Les PLP sont des protéines possédant une activité enzymatique (transpeptidases, carboxypeptidases ou glycosyltransférases) impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne et possédant une affinité pour les β -lactamines.

La résistance à la méticilline, qui entraîne une résistance à toutes les β -lactamines, est déterminée par la présence d'un gène chromosomique (*mecA*) qui code pour la PLP2a. Cette PLP additionnelle a moins d'affinité pour les β -lactamines et en particulier pour la méticilline. Ce mécanisme est présent chez les *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) et chez les *Staphylococcus* à coagulase négative (Dumitrescu et al., 2010).

La résistance conférée par le gène *mecA* peut être :

- **homogène** : résistance exprimée par toutes les souches ;
- **hétérogène** : résistance exprimée seulement par une proportion des colonies filles issues d'une colonie mère exprimant la résistance. Actuellement, la résistance hétérogène est la plus fréquente et ce caractère est évocateur de la présence du gène *mecA* (Hamdad et al., 2006).

Quatre autres gènes chromosomiques impliqués dans la biosynthèse du peptidoglycane influencent la résistance à la méticilline. Ces gènes dénommés *fem* A, B, C, D (factors essential for methicillin-resistance) sont présents chez toutes les souches de *S. aureus* indépendamment de la présence du gène *mecA*. L'inactivation de ces gènes contribue, soit à

une diminution du niveau de résistance aux β -lactamines, soit à un retour à la sensibilité. Certains d'entre eux, sont probablement indispensables à l'expression de la résistance aux β -lactamines codée par le gène *mecA* (Quincampoix et Mainardi, 2001).

➤ La cassette staphylococcique SCC*mec*

La cassette SCC*mec* comporte deux éléments essentiels : le complexe du gène *mecA* et un complexe de gènes codant des recombinaisons *ccr* (*cassette chromosome recombinase*) qui assurent les phénomènes d'intégration et d'excision de la cassette. La cassette SCC*mec* comporte également des éléments dits accessoires comme des séquences d'insertion, des transposons ou des copies de plasmide portant des gènes de résistance à des métaux lourds ainsi qu'à des antibiotiques autres que les β -lactamines (Dumitrescu et al., 2010).

Plusieurs types de SCC*mec* furent décrits. Jusqu'à maintenant, onze types de SCC*mec* ont été répertoriés chez *S. aureus* (IWG-SCC, 2009). L'origine de la cassette de résistance demeure inconnue (Dumitrescu et al., 2010).

➤ Le gène *mecA*

Le temps zéro de l'évolution des SARM est l'acquisition du gène *mecA*, fragment d'ADN de 2,1 kb codant une protéine liant la pénicilline additionnelle (PLP2a). Les souches de *S. aureus* possédant le gène *mecA* sont donc résistantes à toute la famille des β -lactamines, notamment à la méticilline ou à l'oxacilline. Le gène *mecA* est inclus dans un élément génétique mobile : la cassette staphylococcique (SCC*mec*, *staphylococcal cassette chromosome mec*) (Hiramatsu et al., 2001; Dumitrescu et al., 2010).

C. Autres mécanismes

D'autres mécanismes de résistance beaucoup plus rares ont également été décrits, parmi lesquels :

- **l'hyperproduction de pénicillinase** : les souches dénommées **BORSA** (BORderline *S aureus*) ne possèdent pas de gène *mecA*. Les inhibiteurs de pénicillinases restaurent *in vitro* l'activité des β -lactamines sur ces souches ;
- **la résistance par diminution de la synthèse et/ou de l'affinité d'une des PLP**, les souches sont dénommées **MODSA** (MODified *S aureus*). Une modification de

l'affinité des PLP1 et des PLP2 élève le niveau des CMI, qui ne sont pas modifiées en présence d'inhibiteur de β -lactamase ;

- **la résistance par production de méticillinase ou oxacillinase** qui a comme substrat privilégié la méticilline et l'oxacilline (**Dodémont et al., 2014 ; Hamami et Mezghani, 2016**).

2.3.2. Résistance aux aminosides

Ces antibiotiques agissent en inhibant la synthèse d'ARN. Ils se répartissent en deux groupes chimiquement distincts :

- **le groupe de la streptidine** (comprenant la streptomycine) et
- **le groupe de la 2-désoxystreptamine** (kanamycine, gentamicine, amikacine, nétilmicine). Cette classe d'antibiotique a naturellement une action bactéricide sur les staphylocoques (**Quincampoix et Mainardi, 2001**).

L'activité bactéricide *in vitro* des aminosides sur *Staphylococcus spp* est rapide, plus rapide en particulier que celle des glycopeptides. La survenue de mutations diminuant la pénétration intracellulaire des aminosides contre indique leur administration en monothérapie.

En pratique, le principal mécanisme de résistance de *Staphylococcus spp* aux aminosides est enzymatique (**Batard et al., 2005**).

Les enzymes inactivant les aminosides APH(3'), ANT(4') et APH(2')-AAC(6') sont codées par des gènes plasmidiques ayant un fort potentiel de dissémination. Les trois phénotypes engendrés sont :

- **phénotype K** : résistance de haut niveau à la kanamycine et à l'amikacine due à une phosphorylase (APH-3');
- **phénotype KT** : résistance de haut niveau à la kanamycine, l'amikacine, et à la tobramycine, due à une adénylase (ANT-4');
- **phénotype KTG** : résistance de haut niveau à kanamycine, amikacine tobramycine, nétilmicine et gentamicine, induit par la présence d'une enzyme bi-fonctionnelle ayant des activités de phosphorylation et d'acétylation (APH-2''-AAC-6).

La gentamicine et la nétilmicine apparaissent comme les aminosides les plus souvent bactéricides sur *Staphylococcus aureus* (**Batard et al., 2005**).

2.3.3 Résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)

Ces trois familles, malgré leurs structures différentes, partagent le même mécanisme d'action : ils bloquent la «lecture» de l'ARN messager par le ribosome donc inhibent la synthèse protéique.

Les macrolides et les lincomycines ont une activité bactériostatique, alors que les streptogramines ont, en l'absence de résistance aux streptogramines B, une activité bactéricide **(Daurel et Leclercq, 2008)**.

Trois mécanismes de résistance sont impliqués : une modification de la cible de l'antibiotique, un mécanisme d'efflux et une modification enzymatique de l'antibiotique **(Daurel et Leclercq, 2008)**.

A. Résistance par modification de la cible de l'antibiotique

Le mécanisme repose sur l'action d'une enzyme (méthylase) réalisant la méthylation d'une adénine de la sous-unité 23s de l'ARN ribosomique. Ces méthylases sont codées par les gènes *erm* dont il existe au moins 20 variants. Le support des gènes *erm* peut être chromosomique ou plasmidique **(Lina et al., 1999)**.

Les gènes *erm* confèrent une résistance croisée aux macrolides, lincomycines et streptogramines B. Leur expression peut être soit inductible soit constitutive. Seuls les macrolides à 14 et 15 atomes peuvent induire l'expression du gène *erm* chez *Staphylococcus aureus* **(Battard et al., 2005 ; Daurel et Leclercq, 2008)**.

B. Résistance par efflux

Trois gènes codant pour des systèmes d'efflux ont été décrits chez les cocci à Gram positif. Leur produit forme un transporteur protéique qui diminue l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule.

Les gènes *msrA* et *msrB* sont responsables d'un phénotype de résistance de type MS, c'est-à-dire d'une résistance inductible vis-à-vis des macrolides dont le noyau comporte 14 et 15 carbones (C14 et C15) et au composé B des streptogramines, après induction par l'érythromycine **(Lina et al., 1999)**.

Le gène *mef* entraîne un phénotype de résistance nommé M, caractérisé par une résistance limitée aux macrolides en C14 et en C15. Il est localisé sur des éléments chromosomiques transférables par conjugaison et n'a jamais été retrouvé sur un plasmide (**Lina et al., 1999**).

C. Résistance par enzymes inactivatrices

Ces enzymes, qui modifient l'antibiotique lui-même, peuvent appartenir à la classe des hydrolases (gènes *vgb* et *vgbB*), des acétyltransférases (gènes *linA* et *vat*) ou des phosphotransférases (gène *mphC*). Le support de ces gènes est souvent plasmidique (**Daurel et Leclercq, 2008**).

2.3.4 Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la réplication de l'ADN. Ces molécules ont une action ciblée sur les topo-isomérases. Les topo-isomérases regroupent les topo-isomérases de classe II, les gyrases, constituées de deux sous-unités GyrA et GyrB (codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*) et impliquées dans le relâchement de l'ADN, et par les topo-isomérases de classe IV (composées de deux sous-unités codées par les gènes *griA* et *griB*) qui entraînent un dés enchevêtrement de l'ADN à la fin de la réplication (**Batard et al., 2005**).

Trois mécanismes sont impliqués essentiellement :

- **la modification de la cible** qui implique une mutation au niveau des gènes chromosomiques *griA* ou *griB* de la topo-isomérase IV ;
- **l'altération des sous-unités A ou B de la gyrase** par introduction d'une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*;
- **l'efflux de l'antibiotique** grâce à une protéine transmembranaire codée par le gène *norA*, chromosomique (**Mainardi et al., 1996**).

Chez les bactéries à Gram positif, la topo-isomérase de classe IV constitue la cible primaire, et une mutation de cette cible est nécessaire pour entraîner l'apparition d'un premier niveau de résistance aux fluoroquinolones (**Quincampoix et Mainard, 2001**).

2.3.5 Résistance aux glycopeptides

Les glycopeptides, vancomycine et teicoplanine, sont des antibiotiques qui comme les bêta-lactamines inhibent la synthèse de la paroi bactérienne (**Buys, 2005**).

Ces molécules de taille importante forment des complexes délétères avec le dipeptide terminal (D-alanyl-D-alanine) des précurseurs du peptidoglycane. Le dipeptide ainsi fixé ne peut s'intégrer de manière normale au peptidoglycane déjà formé.

Les glycopeptides représentent le traitement de première intention en cas de résistance à la méticilline SARM ou d'allergie aux pénicillines (**Lina et Cattoir, 2014**).

Alors que la résistance à la téicoplanine a été décrite dès les années 1980 chez divers staphylocoques à coagulase négative puis chez *S. aureus*, la première souche de *Staphylococcus aureus* intermédiaire à la vancomycine n'a été décrite qu'en 1997, et la première souche résistante à la vancomycine en 2002. Ce phénomène relativement nouveau et inquiétant justifie une surveillance attentive (**Battard et al., 2005**).

Le mécanisme de résistance lié à l'apparition de GISA (*S. aureus* intermédiaire à la vancomycine) n'est pas connu. Il s'agit d'un mode de résistance hétérogène, c'est-à-dire concernant une fraction seulement de la population bactérienne (**Lina et Cattoir, 2014**). Cette résistance intermédiaire n'est pas associée à des plasmides ou à des transposons, et est attribuée à une surproduction du peptidoglycane, responsable d'une augmentation de l'épaisseur de la paroi bactérienne, et donc du nombre des sites de fixation des glycopeptides que sont les dimères D-ala-d-ala (**Battard et al., 2005**).

L'acquisition du gène *vanA* à l'origine des *S. aureus* résistants à la vancomycine (VRSA) est un phénomène rare (**Dumitrescu et al., 2010**). Selon des données cliniques, l'exposition prolongée aux glycopeptides (vancomycine et téicoplanine) semble constituer l'élément essentiel de l'acquisition du phénotype de résistance GISA. Le mécanisme implique très probablement une altération de la liaison des molécules de l'antibiotique à la paroi de la bactérie et une perturbation de la synthèse de certains de ses composés (**Mainardi, 1997; Dumitrescu et al., 2010**).

2.4 SARM d'origine hospitalière et d'origine communautaire

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) est l'un des majeurs agents impliqués dans les infections nosocomiales, l'acquisition de SARM étant liée à une hospitalisation récente ou à l'exposition prolongée et récurrente aux antibiotiques (**Djoudi et al., 2014**).

Néanmoins, depuis les années 1990, des infections à SARM se sont multipliées chez des patients n'ayant aucun facteur de risque traditionnel d'acquisition de SARM : il s'agit des infections à **SARM-C** (communautaire). L'émergence de ses souches communautaires a été décrite initialement aux USA maintenant dans plusieurs pays du monde (**Djouidi et al., 2014 ; Lina et Cattoir, 2014**).

Les SARM communautaires, différent des souches en circulation hospitalière **SARM-H (hospitalière)** par leur fond génétique, le type de *SCCmec* et leur plus faible niveau de multi-résistance (**Elhani, 2011; Lina et Cattoir 2014**).

Les cassettes *SSCmec* des SARM-H comprennent, en plus du complexe du gène *mecA*, des éléments génétiques dits accessoires portant des gènes de résistance à des antibiotiques autres que les β -lactamines, responsables du profil de multirésistance aux antibiotiques des souches hospitalières. Les allèles *SCCmec* de types IV à VIII portés par les SARM-C sont de plus petite taille et contiennent moins de gènes additionnels de multirésistance aux antibiotiques que les SARM-H (**Dumitrescu et al., 2010**).

En plus de la cassette *SCCmec*, les souches de SARM-C présentent une autre particularité, un facteur de virulence rarement retrouvé dans d'autres souches de *S. aureus*, la leucocidine de Panton Valentine (PVL) (**Katayama et al., 2003**).

3. Propolis

3.1 Définition

Nommée « cire noire » dans les textes anciens, la propolis est connue est utilisée depuis des millénaires. Hippocrate recommandait son application pour traiter les ulcères et les plaies. Les égyptiens l'utilisaient pour traiter plusieurs affections fébriles et cutanées et pour momifier les cadavres. Les grecs de l'antiquité, quant à eux furent les premiers à l'appeler **propolis**, se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche, « pro » signifiant avant et « polis » désignant la cité de la ruche (**Darrigol, 2007**).

L'usage de la propolis à des fins thérapeutiques modernes est quant à lui récent, il remonte à une trentaine d'année grâce aux avancées de l'apithérapie. Aujourd'hui les scientifiques du monde entier considèrent la propolis comme un « **Antibiotique naturel** » et une alternative

potentielle devant l'émergence des germes multirésistants aux antibiotiques (**Darrigol, 2007 ; Donadieu, 2008**).

La propolis désigne toute une série de substances résineuse, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies par les abeilles sur certaines parties de végétaux (essentiellement les bourgeons et les écorces de certains arbres). En rapportant cette substance à la ruche, les abeilles la modifient avec leurs propres sécrétions : cire et enzymes salivaires principalement (**Darrigol, 2007; Donadieu, 2008; Sauvager, 2011; Bogdongov et Bancova, 2016**).

3.2 Rôle dans la ruche

La propolis est un produit très précieux pour la ruche : en tapissant ses parois de propolis, les abeilles créent dans la ruche un environnement défavorable au développement des micro-organismes. Les conditions de vie de la ruche seraient propices à la pullulation microbienne: population nombreuse, chaleur, humidité, présence de sucre et d'éléments nutritifs pourtant l'intérieur de la ruche est stérile grâce à la propolis. Elle est considérée donc comme un vrai ciment antiseptique qui inhibe la croissance bactérienne, fongique. (**Darrigol, 2007**).

Cette matière permet aussi de colmater les fissures de la ruche et d'en fixer les parties mobiles (**Donadieu, 2008**).

La propolis est également utilisée pour embaumer le corps des prédateurs gourmands de miel (petits rongeurs...) tués par les abeilles et qu'elles ne peuvent pas évacuer compte tenu de leur poids. Leur putréfaction, source de maladies, est ainsi évitée. Les cellules de cire dans lesquelles la reine va déposer ses œufs sont elles aussi tapissées d'une pellicule de propolis qui forme un milieu stérile pour le développement harmonieux de l'œuf. En conclusion, la propolis assure la sante de l'abeille (**Donadieu, 2008**).

3.3 Récolte de la propolis

La récolte de la propolis s'effectue d'abord par les abeilles et ensuite par l'apiculteur. Elle a lieu soit en début de printemps, mais le plus souvent à la fin d'automne au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage (**Donadieu, 2008**).

3.3.1 Récolte par les abeilles

La récolte de propolis est faite par un nombre relativement restreint d'abeilles ouvrières butineuses, qui se trouvent dans la dernière partie de leurs existences. Ces ouvrières sont certainement très spécialisée dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie. Ce sont les abeilles les plus âgées et les plus expérimentées (**Donadieu, 2008**). Cette récolte s'effectue schématiquement de la façon suivante :

- ❖ La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source, qu'elle attaque alors avec ses mandibules ;
- ❖ Ensuite, tête redressée, elle se recule afin d'étirer la particule saisie jusqu'à ce qu'elle soit transformée en un fil et que celui-ci se rompe ;
- ❖ Elle entasse alors cette propolis dans l'une des corbeilles de ses pattes postérieures (3ème paire) à l'aide de ses autres pattes pour accumuler ainsi progressivement une pelote qu'elle rapportera à la ruche.

Au retour à la ruche, la butineuse de propolis est déchargée de sa récolte par d'autres ouvrières, soit au trou de vol, soit plus souvent à l'endroit même où la substance sera utilisée (opération longue qui peut durer d'une à plusieurs heures (**Darrigol, 2007**)).

3.3.2 Récolte par l'homme

La propolis peut être récoltée par des techniques diverses.

- Raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche (**figure N° 5**), de préférence par température assez basse, la Propolis, alors dure et friable, se détachant mieux ;
- Utilisation de différents dispositifs: grille moulée en matière plastique ou en métal. On pose cette grille comme couvre cadres. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis.

Le moment idéal se situe après la récolte d'été, les abeilles se consacrent plus facilement à cette tâche, sachant l'hiver proche. Cette dernière technique est meilleure (**Donadieu, 1993**)



Figure N°5 : Récolte de la propolis par l'apiculture.

3.4 Propriétés physico-chimique de la propolis

3.4.1 Propriétés physiques (Krell, 1996 ; Sauvager, 2011; Bogdongov et al., 2016).

A. Consistance

La propolis est de consistance variable en fonction de la température :

- dure et friable à 15°C,
- elle devient molle et malléable aux alentours de 30°C,
- entre 30 et 60 °C elle est collante ou gluante jusqu'à fondre en moyenne vers 60-70°C.

B. Couleur

Elle varie selon sa provenance, allant de jaune claire au brun très foncé, presque noir. Il existe principalement trois sortes de propolis : verte, rouge et brune. Elles possèdent globalement les mêmes propriétés, mais la brune est spécialement anti-microbienne, et la verte principalement utilisée en cancérologie (propolis le super aliment de la ruches).

C. Saveur

Elle est âcre et parfois amère.

D. Odeur

D'odeur variable selon son origine botanique, mais en général agréable et douceâtre, et si elle est brûlée elle dégage une odeur très délicate liée aux résines aromatiques qu'elle contient.

E. La solubilité

La propolis est insoluble dans l'eau mais elle est soluble partiellement dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, etc . Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants.

C. Le point de fusion

Le point de fusion est autour **70°C** mais peut aller jusqu'à 100°C et au-delà. Chauffée doucement au bain-marie, elle se divise en deux parties bien distinctes : l'une qui tombe au fond du récipient, l'autre liquide qui surnage à la surface qui correspond à la cire de propolis et qui trouve de nombreux usages dans le domaine apicole.

D. Densité

La densité de la propolis est de 1,2.

3.4.2 Composition chimique

L'origine botanique dont sera issue la propolis constitue le principal facteur responsable de sa composition spécifique. L'autre facteur sera les modifications générées à travers les sécrétions hypopharyngiennes de l'abeille qui vont apporter d'autres éléments spécifiques en plus de certaines transformations (hydrolyse des hétérosides de flavonoïdes en aglycone) (**Cardinault et al., 2012; Bogdongov et Bancova, 2016**).

Sa composition est extrêmement complexe et variable. Cependant on retrouve toujours de façon constante et relativement stable :

- **résines** (50 à 55%) ;
- **cires** (30 à 40%) ;
- **huiles chargées en composés volatils** (5 à 10%) ;
- **pollen** (5%) ;
- **substances organiques et minérales diverses** (5%) : acides aminés, vitamines, oligo-éléments, acides gras (**Cardinault et al., 2012; Sauvager, 2014**).

La composition de la propolis est riche et unique, en effet elle renferme plus de 300 composés chimiques agissant en complémentarité et en synergie (**Marcucci, 1995; Sauvager, 2014**) (**figure N° 6**).

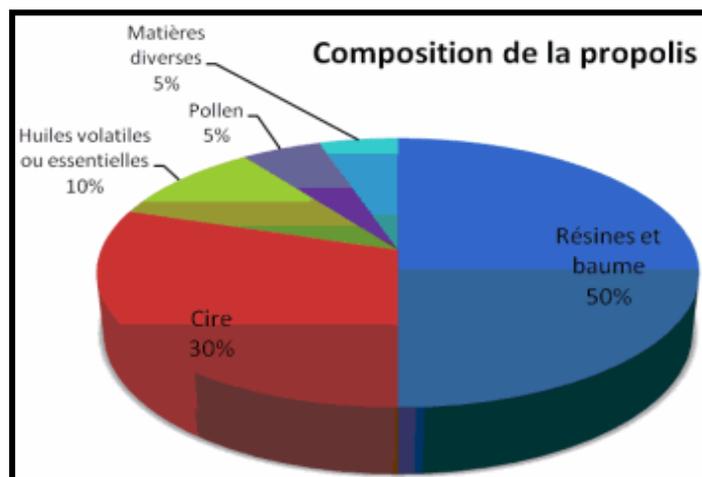


Figure N°6 : Composition chimique de la propolis
(Sauvager, 2014).

Dans une revue sur la normalisation de la propolis, différents types de résine ont été proposés: propolis de peuplier (*Populus sp*) principalement le peuplier noir (*Populus nigra*), verte du Brésil issue de *Baccharis dracunculifolia* et rouge dont la source est *Dalbergia ecastophyllum* (Bankova, 2000).

La propolis de type peuplier très courant dans les zones tempérées est sans doute la plus étudiée, mais il existe de nombreux autres types de propolis. Des études récentes ont révélé un nouveau type de propolis européen: la propolis méditerranéenne. Ce type de propolis se distingue par la forte concentration de diterpénoïdes et se retrouve dans de nombreuses régions comme la Grèce, la Suisse, Malte, la Turquie et l'Algérie (Piccineli *et al.*, 2013).

La fraction polyphénolique est très différente d'une propolis à une autre et constitue ainsi une sorte d'empreinte spécifique qui permet d'identifier l'origine botanique de cette propolis (Cardinault *et al.*, 2012).

3.4.3 Substances bioactives de la propolis

Les constituants de la propolis au point de vue de l'activité pharmacologiques sont les **flavones**, **flavonols**, et les **flavanones** (les flavonoïdes), les **phénols** et les **substances aromatiques** (Bankova *et al.*, 2000).

A. Les flavonoïdes (antimicrobiens, antifongique et antispasmodiques)

Composés phénoliques d'origine strictement végétale, généralement présents dans les végétaux à l'état d'hétérosides (glucosides). Ils constituent l'une des grandes familles des pigments non azotés, provoquant la coloration. On les trouve en abondance dans les sécrétions résineuses qui protègent les bourgeons des plantes (**Donadieu, 2008**).

Les flavonoïdes possèdent une énorme propriété dans l'activité biologique de la propolis (**Grange et Davey, 1990; Cardinault et al., 2012**). On dénombre dans la propolis pas moins de **60 flavonoïdes**, comme la galangine, kaempferol, quercétine, pinostrombine et pinobanksine (**Darrigol, 2007**).

Ces substances ont une action anti-inflammatoire et anti-microbienne à large spectre. Ils agissent au niveau systémique en luttant contre les pathogènes. Ces molécules protègent du stress oxydatif en empêchant les agressions de l'oxygène (**Grange et Davey, 1990**).

B. Les composés phénoliques et acides aromatiques (antibactériens et antifongiques)

Chacun ayant une activité thérapeutique bien spécifique. Il s'agit des acides caféique, férulique, benzoïque, cinnamique, coumarique etc....

L'acide caféique stimule l'immunité et de nombreuses études sont en cours afin de montrer son activité probable contre le développement de certaines cellules cancéreuses (**Marcucci, 1995**). L'acide ferrulique antioxydant et anti-inflammatoire puissant, il possède aussi une activité améliorant la régénération cellulaire et peut agir rapidement sur les problèmes de lésion du système circulatoire (**Marcucci, 1995**).

C. Acides organiques (conservateurs, antiseptiques, analgésiques, anti-inflammatoires, anti-coagulants)

La propolis est extrêmement riche en acides aromatiques et aliphatiques (l'acide benzoïque et salicylique) et en esters d'acides. Les acides et surtout leurs esters jouent un rôle primordial dans le rôle thérapeutique de la propolis.

L'acide benzoïque caractérisé par ses propriétés conservatrices, joue un rôle antiseptique sur les muqueuses et permet de lutter contre la croissance de nombreux micro-organismes.

Les quantités présentes dans la propolis sont infimes et ne permettent aucune accumulation toxique (**Marcucci, 1995**).

D. Les terpènes (antiseptiques, aromatisants)
Anéthol, eugéno, alpha-pinène, géraniol... sont des dérivés terpéniques d'origine végétale et possèdent sensiblement les mêmes propriétés à savoir antiseptiques et aromatisantes principalement (**Bankova et al., 2000**).

E. Les huiles essentielles (antiseptiques)

Telles le guaïacol, l'eugéno, l'anéthol, le pinène etc..., aux vertus antiseptiques (**Bankova et al., 2000**).

F. Les oligo-éléments

A peu près tous représentés. On trouve même des traces d'or, et plus couramment de magnésium, zinc, aluminium, fer, cuivre, silicium, strontium, nickel.....(**Donadieu, 2008**).

3. 5 Propriétés thérapeutiques de la propolis

La propolis a tout d'abord une forte action antimicrobienne grâce à la présence de flavonoïdes et de composés aromatiques (galangine, pinocembrine...). Cette action protège la ruche de la pourriture (**Sauvager, 2014**).

De plus, elle possède des propriétés anesthésiantes locales dues aux huiles essentielles ou encore des propriétés cicatrisantes. Elle lutte aussi contre les caries dentaires, les gingivites, réduit l'inflammation, le risque de thrombose, aide à soigner les troubles ORL, les aphtes, les ulcères gastriques, l'hypertension, les affections pulmonaires, la tuberculose...

Des études réalisées au Japon montrent l'intérêt de la propolis dans le traitement de maladies comme le cancer grâce à certaines substances à activité antitumorale comme les flavonoïdes et à l'action immuno-stimulatrice de celle-ci. (**Cardinault et al., 2012**).

3.5.1 Activité antibactérienne

L'activité bactéricide de la propolis et/ou de ses constituants est la plus largement documentée. Cette activité à large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram+ et Gram- (de type anaérobie et aérobie) mais avec une plus grande efficacité sur les souches Gram+ (**Cardinault et al., 2012**).

Parmi les bactéries inhibées, on retrouve *Staphylococcus (aureus et mutans)* (Lu et al., 2005 ; Dolci et Ozino, 2003), des *Streptococcus (mutans et sanguinis)* (Koo et al., 2002), des *Bacillus (cereus et subtilis)* , des *Proteus (vulgaris et mirabilis)*, des *Pseudomonas* , des *Listeria*, des *Salmonella* (Uzel et al., 2005), des *Clostridium*, *E.coli* et *Helicobacter pylori* , autant les souches qui sont impliquées dans les troubles rihnopharyngées, gastro-intestinale, génitale ou buccale (Silici et Kutluca, 2005; Kujumgiev et al., 1999).

Les différentes études suggèrent que la propolis et/ou ses composés pourraient inhiber la croissance bactérienne :

- ❖ par blocage de la division cellulaire ;
- ❖ par désorganisation de cytoplasme ;
- ❖ par une inhibition de la synthèse protéique ;
- ❖ ou par une inhibition du processus d'adhésion (Scazzocchio et al., 2006).

D'après une étude japonaise, la propolis inhiberait la croissance bactérienne en bloquant la division cellulaire et en détruisant la paroi bactérienne ceci est principalement sur les bactéries à Gram + (Donadieu, 2008 ; Sauvager, 2014).

Certaines études ont montré que des souches résistantes, voire multirésistantes aux antibiotiques, étaient sensibles à la propolis (Raghukumar et al., 2010). Il a également été montré que la propolis, lorsqu'elle est prise en association avec certains antibiotiques, augmente leur efficacité (streptomycine, ampicilline, gentamycine, cloxacilline...) (Speciale et al., 2006 ; Stepanovic et al., 2003).

L'association avec des antibiotiques classique permettrait de réduire les phénomènes de résistance et de baisser les dosages de ces produits. Son spectre antibactérien est très large, en agissant sur SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la meticilline) (Raghukumar et al., 2010).

1. Objectif de l'étude

Le principal objectif de cette étude est l'identification de nouveaux produits naturels ayant des propriétés antibiotiques pour traiter les bactéries multirésistantes (SARM). Afin d'atteindre cet objectif, on a choisi un mystérieux produit de la ruche riche de principes actifs aux propriétés antibiotiques naturelles. C'est la propolis, encore méconnue du grand public, mais appelée à un grand avenir.

Pour se faire, plusieurs objectifs spécifiques devaient être réalisés :

- Sélection de souches *Staphylococcus aureus* isolées cliniquement ;
- Détection des souches *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline SARM;
- Etude du profil de résistance des SARM vis-à-vis différentes familles d'antibiotiques ;
- Recherche du gène de résistance à la méticilline (gène *mecA*) par PCR ;
- Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) vis-à-vis des souches sélectionnées comme étant SARM ;
- Evaluation de l'effet combiné de l'EEP et des antibiotiques antistaphylococciques.

Les souches bactériennes étudiées ont été isolées de différents hôpitaux de l'Est Algérien : CHU de Constantine, Oum el Bouaghi (Ain Fakroun, Ain Mlila et Ain Baidha), Skikda et Sétif sur une durée de 3 ans : de Mai 2015 à Mai 2018.

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie faculté des sciences exactes et biologie, Université de Oum el Bouaghi.

La détermination des CMI par (E-TEST et microdillution) des différents antibiotiques testés a été réalisée au sein du service de bactériologie du centre hospitalier de Compiègne-Noyon, France.

La détection du gène *mecA* codant pour la résistance à la méticilline est effectuée au niveau du laboratoire de bactériologie et de biologie moléculaire du Centre de Recherche en Biotechnologie CRBt de Constantine.

2. Matériel

2.1 Souches

L'étude est menée sur un total de 211 souches de Staphylocoques et 2 souches ATCC (American Type Culture Collection). Ces souches ont été isolées de divers produits pathologiques:

- pus;
- sang;
- prélèvements vaginaux ;
- Liquide d'ascite et matériels

Tableau N° 1 : Souches de référence testées au cours de notre étude.

Souches de référence	Code	Caractéristiques et utilisations
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Sensible à la pénicilline
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	Résistante à la pénicilline et à l'oxacilline

2.2 Propolis

La propolis étudiée est d'origine de JIJEL. L'extrait éthanolique de la propolis (EEP) est réalisé au niveau du laboratoire de phytopharmacologie du département de biologie Université de JIJEL.

La propolis coupée en petits morceaux est plongée dans l'éthanol 95% pendant 15 jours. Après filtration elle est évaporée à 79°C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporator E100). Le résidu est repris dans le méthanol 70% en macération une nuit. Après évaporation l'extrait obtenu est appelé **extrait brut de la propolis**.

3. Méthodes

3.1 Isolement des souches *Staphylococcus aureus*

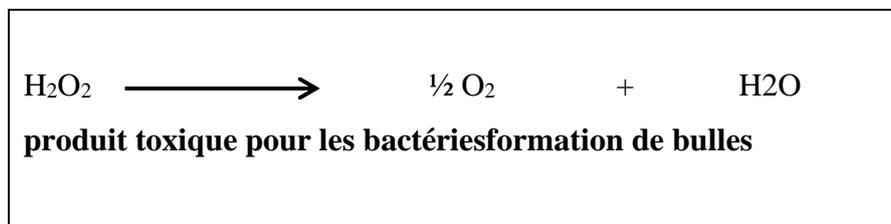
L'isolement des souches s'effectue par repiquage successif sur leurs milieux sélectif **Chapman**. L'incubation des bactéries se fait à 37°C pendant 18 à 24 h. *S. aureus* donne des colonies jaunes crémeuses bombées de 1 à 2 mm de diamètre dégradant le mannitol en acide lactique sur Chapman (acidification du milieu).

3.2 Identification

La pureté des souches est vérifiée par la coloration de Gram pour sélectionner des cocci en grappe de raisin à Gram positif. Toutes les souches sont ensuite identifiées grâce aux méthodes bactériologiques classiques (production de catalase, coagulase et DNase), et par les caractères biochimiques à l'aide des galeries *API Staph* (Bio Mérieux) (**figure N°7**).

3.2.1 La catalase

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (aérobie strict et aérobie anaérobie facultatif) qui peuvent détruire les peroxydes H₂O₂.



➤ Technique

Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Win et al., 2006**).

➤ Lecture

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d'O₂.

3.2.2 La coagulase

Test spécifique des Staphylocoques permet de différencier *Staphylococcus aureus* (Staphylocoque doré) des Staphylocoques coagulas négative.

La coagulase libre est une exo-enzyme coagulant le plasma d'homme ou de lapin. C'est une protéine thermostable active la prothrombine en thrombine. La thrombine ainsi activée agit sur le fibrinogène qu'elle transforme en fibrine (**Vandepitte et al., 1994**).

C'est un facteur primordial dans le pouvoir pathogène en coagulant le plasma autour descoques et en les protégeant de la phagocytose (**Win et al., 2006**).

➤ **Technique**

- Réaliser une culture jeune en bouillon agité des souches *Staphylococcus* testées ;
- Incuber 24h à 37°C ;
- Mettre dans un tube à hémolyse 4 gouttes de bouillon et 4 gouttes de plasma de

Lapin oxalaté ;

- Placer le tube au bain marie à 37°C durant 2 à 4h, observer toutes les heures.

➤ **Lecture**

Une coagulation pourra être observée par une prise en masse du liquide (**Win et al., 2006**).

3.2.3 Recherche de la DNase (Désoxyribonucléase)

Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'acide désoxyribonucléique grâce à une enzyme : la DNase. La mise en évidence chez *Staphylococcus* d'une DNase thermostable suffit à l'identification de l'espèce *S. aureus*. La réaction catalysée est la suivante :



Les deux réactifs utilisés pour la recherche d'une DNase sont :

1. L'acide chlorhydrique HCl 1mol/dm³, qui précipite les molécules d'ADN combinées à des protéines.
2. Le bleu de toluidine qui se colore en rose en présence des composés d'hydrolyse de l'ADN (**Denis et al., 2007**).

➤ **Technique à l'acide chlorhydrique**

Les bactéries sontensemencées en réalisant une strie à la surface de la gélose. Il est possible d'étudier simultanément 4 ou 5 souches différentes sur une même boîte de Pétri.

- Incuber à 37°C pendant 24 h. jusqu'à obtention d'une culture suffisante ;

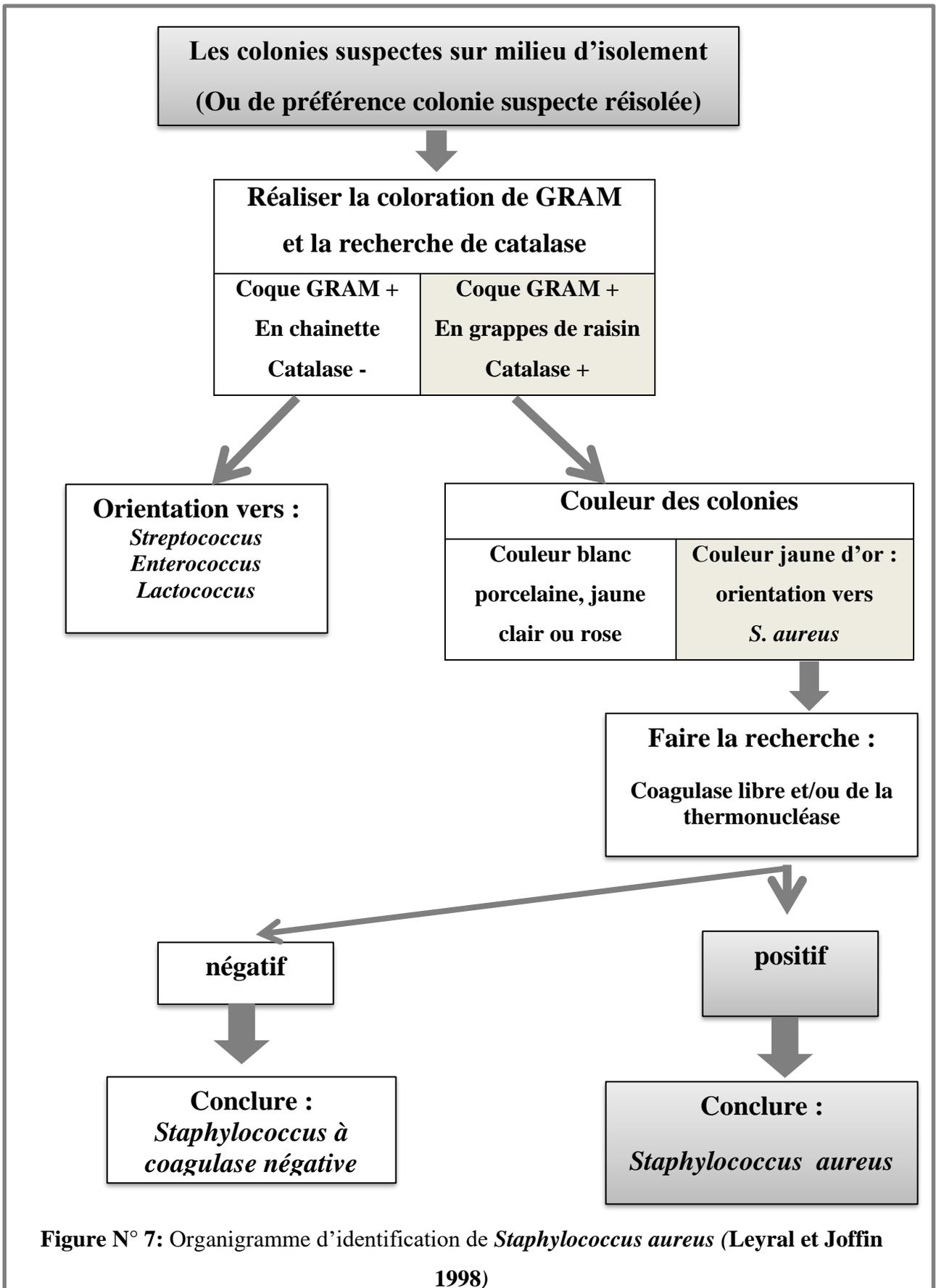


Figure N° 7: Organigramme d'identification de *Staphylococcus aureus* (Leyral et Joffin 1998)

- Après l'incubation, inonder la surface du milieu avec quelques millilitres d'HCl 1mol/dm³, et réaspirer l'excès ;
- Attendre 10 à 15 min.

➤ *Lecture*

La lecture se fait sur un fond noir. Lorsque l'ADN est hydrolysé, un halo clair est visible au pourtour de la strie (Denis et al., 2007).

3.2.4 Système d'identification biochimique API Staph

C'est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

Les galeries API staph comportant 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs (Win et al., 2006; Leyral et Joffin, 1998).

➤ *Technique*

1. Préparation de la galerie

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

2. Préparation de l'inoculum

- Réaliser une pré-culture sur gélose au sang 18-24 h à 35-37°C ;
- Préparer une suspension bactérienne homogène d'opacité égale à 0,5 de Mc Farland.

3. Inoculation de la galerie

- A l'aide d'une pipette remplir les tubes de la galerie avec l'eau physiologiqueensemencée : (remplir que les tubes et non les cupules), sans dépasser le niveau du tube tout en évitant la formation de bulles au fond des tubes.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine
- Renfermer la boîte d'incubation
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24 h

➤ Lecture de la galerie

Lire les réactions conformément au Tableau de Lecture (annexe I) en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

Test VP : VP 1 et VP 2

Attendre 10 minutes. Une couleur **rosé franche ou violette** indique une réaction **positive**. Une couleur **rosé pâle** ou **rosé claire** obtenue après 10 minutes doit être considérée **négative**.

Test NIT : NIT 1 et NIT 2

Attendre 10 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive**.

La lecture peut s'effectuer, soit directement par rapport aux résultats du tableau d'identification, ou bien après transformation de ces résultats en codes chiffré dont la signification est donnée par un index numérique (API web) (**Leyral et Joffin, 1998; Murray, 2003**) (**Annexe 1**).

3.3 Antibiogramme

3.3.1 Détection de la résistance à la méticilline chez *S. aureus*

La sensibilité des souches *S. aureus* a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (**CA-SFM2017**).

La résistance des souches de *S. aureus* à la méticilline (oxacilline) est recherchée à l'aide d'un disque de céfoxitine (30µg), en plus du disque d'oxacilline (5µg) lui-même dans les conditions standard (**Felten et Casin, 2003**).

La résistance à la méticilline est définie par des diamètres d'inhibition : < à 22 mm et < à 20 mm à la céfoxitine et à l'oxacilline respectivement.

Cette méthode est complétée par la détection de la protéine PLP2a ou du gène *mecA* dans les cas où la zone d'inhibition autour du disque de la céfoxitine mesure de 23 à 24 mm (**CA-SFM2017**).

La sensibilité antibactérienne a été déterminée pour 22 antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie pour les antibiotiques suivants : pénicilline G (1U), oxacilline (5µg), céfoxitine (30µg), cefazoline (30 µg), ceftaroline (5 µg), kanamycine (30 µg), tobramycine (10µg), gentamicine (10µg), érythromycine (15 µg), clindamycine (2 µg), quinupristine+dalfopristine (15 µg), pristinamycine (15 µg), rifampicine

(5 µg), vancomycine (30µg), teicoplanine (30µg), tétracycline (30), fosfomycine (200µg), ciprofloxacine 5 levofloxacine 5 norfloxacine (10 µg) ,acide fusidique (10µg) trimethoprime+sulfamides (1.25-23.75µg), chloramphénicol (30µg), rifampicine (30µg), (15µg), linezolid 10 et daptomycine (CA-SFM 2015).

➤ Techniques

1. Préparation de l'inoculum

- ✓ A partir d'une culture pure et jeune (18-24h) sur milieu gélosé non sélectif, prélever deux colonies de *S. aureus* ;
- ✓ Transvaser dans un tube contenant 2,5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%, émulsionner les colonies et bien agir;
- ✓ Ajuster la densité de l'inoculum à celle de l'étalant 0,5% Mac Farland jusqu'à l'obtention la même opacitéaux environs 5×10^6 UFC/ml.

2. Ensemencement par écouvillonnage (CA-SFM, 2015)

- ✓ Couler la gélose de Mueller-Hinton dans les boîtes de pétri (4 mm) ;
- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum;
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum;
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ✓ laisser sécher de 3 à 5 minutes ;

3. Application des disques d'antibiotiques

- ✓ déposer les disques d'antibiotiques (au maximum 6 antibiotiques par boîte);
- ✓ Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application;
- ✓ incubé 24 h à 37°C.

➤ Lecture

La lecture est faite par la mesurer avec précision des différents diamètres des zones d'inhibition, en comparaison ces résultats aux valeurs critiques figurant dans le **(Tableau N°11) (annexe 2)**. Les bactéries sont classées dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance **(Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 2014 ; CA-SFM 2015)**.

3.3.2 Détermination de la CMI des antibiotiques par E-test

Les CMI vis-à-vis de des antibiotiques suivants : Pénicilline G (1U), Ceftaroline (5 µg), Kanamycine (30 µg), Tobramycine (10µg), Gentamicine (10µg), Erythromycine (15 µg), Clindamycine (2 µg), Quinupristine+dalfopristine (15 µg), Tétracycline (30), Norfloxacine (10 µg), Acide fusidique (10µg) , Trimethoprime+sulfamides (1,25-23,75µg), Linezolid (10 µg) et Daptomycinesont réalisées par la méthode E-test.

Le E-test est une méthode précise, rapide et simple à réaliser. Il combine les concepts de dilution et de diffusion.

➤ Technique

La détermination des CMI des souches étudiées est réalisée sur milieux MH ensemencées par écouvillonnage selon les recommandations de la **CA-SFM (2015)**. Après une incubation de 24 à 48 h, la valeur de la CMI correspond à l'intersection des deux ellipses où l'inhibition de la croissance est complète **(Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 2014)**.

Le système E-test consiste en une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient pré-établi de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé.

Le gradient couvre une gamme de concentrations allant de 0,016 à 256 µg/ml ou 0,002 à 32 µg/ml selon l'antibiotique. L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 Mac Farland.

L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose Muller Hinton. Lorsqu'une bandelette Etest est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose.

Un gradient continu est exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support.

Après 18 à 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance bactérienne visible. Une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en $\mu\text{g/ml}$.

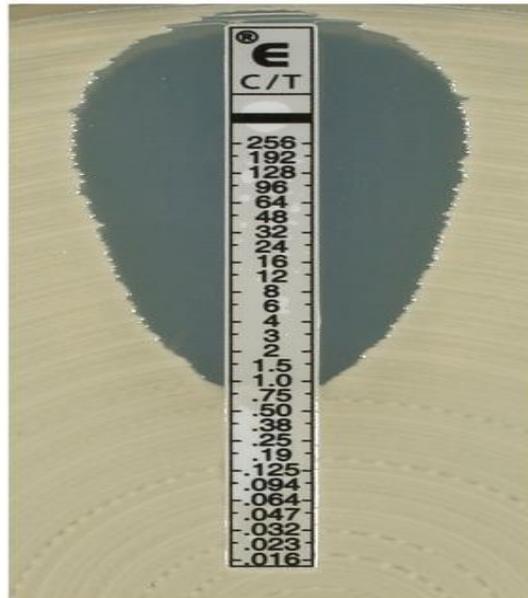


Figure N°8: Détermination de la CMI par Etest.

3.3.3 Recherche de la résistance des SARM aux glycopeptides

La recherche d'une sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) a été réalisée pour toute souche de *S. aureus* résistante à la méticilline. Cette détection a été réalisée par la détermination de la CMI à la Vancomycine par microdilution en milieu liquide selon le (CASFM, 2017).

a. Souches suspectes

En cas d'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion en gélose avec disques (après 24 h d'incubation) :

- diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de l'un des deux glycopeptides < 17 mm ;

- diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de vancomycine inférieur d'au moins 3 mm à celui autour du disque de teicoplanine ;
- présence de colonies dans la zone d'inhibition de l'un des deux glycopeptides.

La méthode de diffusion des disques ne permet pas de différencier les souches de *S. aureus* sensibles à la vancomycine des souches de sensibilité diminuée (intermédiaire).

b. Détermination de la CMI sur microplaque

Cette méthode est réalisée en microplaque à fond en U (plaque à microtitration). L'inoculum bactérien est distribué dans une série de cupules contenant différentes concentrations de l'antibiotique. Après incubation la CMI est indiquée par la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance n'est visible (**Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 2014; CA-SFM 2017**).

La gamme de concentration de l'antibiotique est préparée selon la méthode de la double dilution en milieu liquide avec une progression géométrique des concentrations de l'antibiotique en de raison $\frac{1}{2}$ (**Tableau N°2**).

➤ **Technique**

1. préparation de la gamme des dilutions d'antibiotique

- Dissoudre 20,48 mg de poudre titrée d'antibiotique dans le volume adéquat du solvant correspondant, pour obtenir une solution mère à 2048 µg/ml ;
- Réaliser à partir de la solution mère, les dilutions semi-logarithmiques de raison 2 ; on obtient des concentrations intermédiaires allant de 512 µg/ml à 0,063 µg/ml ;
- Répartir dans chaque puits les dilutions d'antibiotiques, à raison de 25 µl par cupule.

2. Préparation de l'inoculum bactérien

- Préparer à partir d'une culture pure de bactéries en phase exponentielle, une suspension de la souche à étudier, dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile (ou de bouillon MH), d'une densité équivalente à 0,5 MF (108 CFU/ml)
- Diluer la suspension d'opacité 0,5 MF au 1/10ème.

- Inoculer les cupules de la microplaque avec 5 µl de suspension bactérienne afin d’obtenir une concentration finale de 5.10^5 CFU/ml.
- Pour chaque série, réaliser un témoin sans antibiotique.

Tableau N°2 : Préparation des solutions de la VA et la Tei pour la mesure de la CMI.

Etape	Concentration (µg/ml)	ATB (ml)	Diluant (ml)	Concentration Intermédiaire	Concentration finale (µg/ml)
Solution mère	5120			5120	512
1	5120	2	2	2560	256
2	5120	1	3	1280	128
3	5120	1	7	640	64
4	640	2	2	320	32
5	640	1	3	160	16
6	640	1	7	80	8
7	80	2	2	40	4
8	80	1	3	20	2
9	80	1	7	10	1
10	10	2	2	5	0,5
11	10	1	3	2,5	0,25
12	10	1	7	1,25	0,125

3. Distribution du milieu MH

- Répartir dans les cupules 70 µl de bouillon MH, la concentration d’antibiotique obtenue va ainsi de 512 µg/ml à 0.125µg/ml.

4. Incubation

Recouvrir la plaque d’un couvercle en plastique et incuber.

➤ Lecture

Lire l'opacité ou le dépôt au fond de la cupule.

La CMI de chaque antibiotique correspond à la 1ère cupule 'claire' (pas de culture par rapport au témoin sans antibiotique).

Comparer la CMI lue, aux CMI critiques correspondantes à chaque antibiotique testé.

3.3.4 Recherche des phénotypes de résistance MLSB

Les phénotypes de résistance MLSB ont été évalués en utilisant le test de la zone D avec les disques d'érythromycine (15 ug) et de la clindamycine (02 ug) dans toutes les souches présentant une résistance à l'érythromycine selon les recommandations de la (CASFM, 2015).

➤ *Technique*

- Préparer une suspension bactérienne de 0,5 Mc Farland ;
- Ensemencer les boîtes de MH ;
- Appliquer les disques de clindamycine (2 µg) et d'érythromycine (15 ug) d'environ 15 mm d'intervalle (bord mesurée à bord) ;
- Incuber pendant 24 heures à 37 °C.

➤ *Lecture*

L'apparition d'une zone d'inhibition claire en forme de D autour du disque clindamycine est désignée comme le phénotype D (**Figure N° 9**).

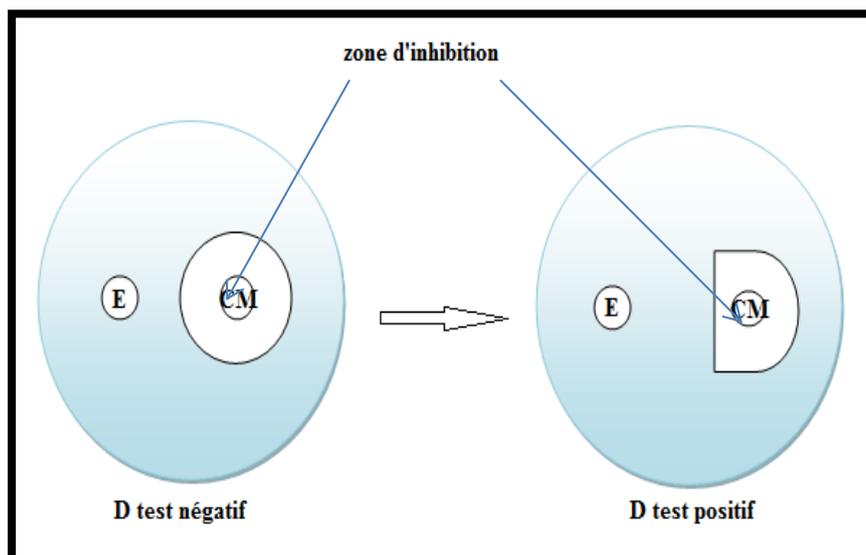


Figure N° 9: Recherche des phénotypes de résistance MLSB (zone D).

3.4 Détection du gène *mec A* par PCR

Principe de la PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisi.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute) (Jaton et Greub, 2007).

3.4.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée sur 24 souches SARM.

➤ Technique

Préparation de l'échantillon

- Préparer une culture bactérienne de 24 h de 24 souches SARM;
- Selon la densité de la culture, prendre 10 colonies de la culture bactérienne et mettre dans 1 ml d'eau ultra pure ;
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4°C à vitesse maximale (13000 g) ;
- Jeter le surnageant et récupérer le culot ;
- Rajouter 300 µl d'eau ultra pure et passer dans un bloc chauffant à 100°C pendant 10 min ;
- Faire un choc thermique en mettant les extraits dans de la glace ;
- Centrifuger pendant 10 min à vitesse maximale ;
- Récupérer l'extrait d'ADN dans le surnageant (Hamdad *et al.*, 2006).

3.4.2 Mesure des concentrations et puretés des extraits d'ADN

La méthode la plus répandue pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbent dans l'ultraviolet). Parallèlement on détermine leur pureté en mesurant l'absorbance à 280 nm, 230 nm et 320 nm.

Les extraits d'ADN obtenus sont ramenés au laboratoire de biologie moléculaire pour quantifier l'ADN en utilisant une NanoDrop 8000 Spectrophotomètre.

Elle permet de réaliser des spectres d'absorbance pour microvolume. C'est une mesure sur une large gamme de longueurs d'onde pour l'analyse des spectres dans le visible et l'UV afin d'identifier les contaminants et calculer les concentrations réelles pour des résultats fiables (Desjardins et Conklin, 2010).



Photographie N°1: Spectrophotomètre NanoDrop8000

R : 260/280 bonne indication de la pureté

260 max d'absorption des ADN ; 280 max d'absorption des protéines.

R 1,8- 2 pureté ; R < 1,7 contamination par les protéines ; R > 2 contamination par l'ARN

3.4.3 Amplification du gène de résistance *mecA*

Le mélange réactionnel de l'amplification est préparé pour un échantillon et un volume final de 18 μ l dont le volume d'ADN est de 2 μ l selon le **tableau (N° 3)** puis réparti dans des tubes PCR.

Les amorces utilisées sont le **mecA1** :5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' et le **mecA2** 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' (Wojtyczka et al., 2013; Saddiq et Abouwarda, 2016).

La PCR comprend 35 cycles composés chacun d'une étape de dénaturation à 95 °C pendant 60 secondes, d'une étape d'hybridation à 57 °C pendant 60 secondes et d'une étape d'élongation à 72 °C pendant 60 secondes. Les 35 cycles sont précédés par une étape préliminaire de dénaturation à 95°C pendant cinq minutes. Le gène amplifié a un poids moléculaire de 533 paires de bases.

Tableau N °3 : Préparation du mix en volume pour l'amplification.

Réactifs (Eurobio)	Quantité pour une réaction	Nombre de réaction*	Quantité dans le mix
Tampon 10X	2 µl		45
DNTPsmM	0,4µl		9
Enzyme Concentration : 5U/µl	0,2µl	22,5	4,5
Amorce 1 10µM	0,8 µl		18
Amorce 2 10µM	0,8 µl		18
MgCl₂ 25 Mm	1,6 µl		36
H₂O	12,2 µl		274,5
Volume	18 µl		405

Volume d'ADN utilisé : 2 µl

*pour N réactions, prévoir un mix pour N+2 réactions

A partir du mélange mix, répartir dans chaque tube 18 µl.

- Ajouter 2 µl de chaque extrait ADN dans chacun des tubes;
- Mettre dans l'appareil PCR de type Bio Rad Thermal Cycler C1000 ;
- Réaliser 35 cycles PCR.



Photographie N°2: Thermocycleur utilisé de type BIO-RAD C1000.

3.4.4 Détection des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

- **Principe de l'électrophorèse d'ADN**

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et leur forme. Elle est utilisée de façon standard pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN.

L'agarose, un colloïde naturel extrait d'une algue, est un polysaccharide linéaire de masse moléculaire moyenne : ~12 000 Da. Les gels d'agarose ont de grands « pores » et sont utilisés essentiellement pour séparer les grandes molécules d'une masse moléculaire supérieure à 200 kDa.

En milieu basique, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Soumises à un champ électrique, elles migrent, dans un gel conducteur, de la cathode (borne négative) vers l'anode (borne positive). La distance de migration par rapport à la ligne de dépôt est caractéristique de la taille et de la charge de la molécule (**Jaton et Greub, 2007**).

- **Matériel d'électrophorèse**

- Agarosesigma ;
- Gel star (nucleic acid gel Stain 10.000X) ;
- Tampon d'électrophorèse tampon TBE: Tris Borate EDTA ;
- Tampon de chargement bleu de bromophénol ;
- ADN marqueur de taille 50 pb (sigma step ladder).

➤ Technique

Préparation du gel à 1,5%

1. Préparer une quantité adéquate de tampon TBE (1X) (**Annexe N°5**) pour remplir le réservoir d'électrophorèse et préparer le gel ;
2. Peser 1,5 g d'agarose dans un Erlen de 500 ml ;
3. Ajouter 100 ml de tampon TBE 1X ;
4. Dissoudre la poudre d'agarose en faisant bouillir la solution. Chauffer la solution sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète. S'assurer que l'agitation est maintenue constante afin de permettre une bonne homogénéisation du produit et d'éviter la formation de bulles dans le gel. Continuer à chauffer jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissolue (la solution doit être clair comme l'eau) ;
5. Laissez refroidir le mélange jusqu'à une température de 50-60 °C, puis ajouter rapidement 2,5 µl d'un révélateur fluorescent le gel Star et mélanger le tout convenablement ;
6. préparer le support (moule de coulage) et positionner un peigne muni de 16 dents pour la réalisation des puits pour le dépôt des échantillons d'ADN ;
7. Couler le gel lentement et à vitesse constante au centre du plateau de moulage ;
8. Laisser refroidir, 15 à 20 minutes à température ambiante en couvrant le support avec papier aluminium (pour ne pas laisser passer la lumière)

Préparation de la cuve

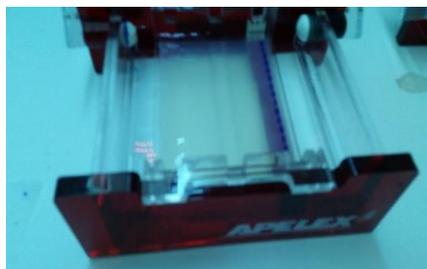
9. Lorsque le gel est complètement figé, retirez soigneusement le peigne et placez le gel dans un réservoir ou cuve d'électrophorèse. Les puits devant être du côté de la cathode (borne négative)
10. Ajoutez le tampon TBE (1X) en quantité suffisante dans l'unité d'électrophorèse pour recouvrir le gel d'une épaisseur de 2 à 5 mm.

Préparation des échantillons et du marqueur de taille de 50 pb

11. Prélever 1 µl du tampon de charge (bleu de bromophénol) (**Annexe N°5**) et le mélanger convenablement à 5 µl de chaque échantillon (produits PCR et marqueur de taille 50 pb). Le bleu de bromophénol ajoute de la couleur à l'échantillon, simplifiant ainsi le processus de chargement et augmente la densité de l'échantillon en faisant en sorte que les gouttes d'ADN tombent de façon harmonieuse dans le puits.

Dépôt de l'ADN

12. À l'aide d'une micropipette, déposer 6 μ l d'ADN dans chaque puits en évitant que le puits ne déborde. Veiller à ne pas perforer le fond des puits.



Photographie N°3: Cuve d'électrophorèse après dépôts d'ADN.

Mise en route et migration (la migration doit avoir lieu juste après les dépôts)

13. Brancher la cuve au générateur et faire migrer à 100 volts. Le pôle négatif (cathode) doit être du côté du dépôt;

14. Vérifier le bon déroulement de l'électrophorèse : de la buée doit apparaître sur le couvercle dans les cinq premières minutes si le générateur et la cuve sont bien alimentés;

15. Une fois l'électrophorèse est terminée (\pm 40 à 60 minutes) couper le courant, et retirer le gel de la cuve, et le déposer sur un trans-illuminateur de type Gel DocTM XR⁺ BIO-RADTM pour une visualisation.

Révélation

Une photographie du gel peut être prise avec un appareil (**BIO-RAD**). Le gel est éclairé sous UV afin d'observer des bandes ADN fluorescentes. L'estimation de la taille des fragments d'ADN est faite grâce à la comparaison avec le marqueur de taille (DNA ladder 50pb).



Photographie N°4: Trans-illuminateur de type Gel Doc™ XR+ BIO-RAD™

16. Jetez le gel dans la poubelle pour déchets solides.

3.5 Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de l'EEP

3.5.1 Méthode de diffusion sur milieu solide

L'activité antibactérienne de la propolis a été évalué sur les toutes les souches *S. aureus* y compris les 34 souches SARM sélectionnées et les deux souches de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La sensibilité des souches SARM vis-à-vis de la propolis est appréciée par la technique de diffusion en milieu gélosés de Muller Hinton en boîtes de pétri (Wojtyczka *et al.*, 2013; Saddiq *et Abouwarda*, 2016).

➤ Technique

- L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 h sur milieu gélosé non sélectif dans 2,5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% ;
- La suspension bactérienne est ensuite homogénéisé son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland ou à une DO de 0,08 à 0,10 à 625 nm ;

- Deux supports de l'EEP de 6 mm de diamètre ont été utilisés : disques et puits recevaient chacun 15 µl d'EEP ou 15 µl d'éthanol utilisé comme contrôle.
- Les boîtes ont été incubées dans une étuve à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 h.

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance bactérienne autour du puits et les disques contenant l'EEP. Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont mesurés en mm. L'effet a été calculé en tant que moyenne des déterminations en triple (Stepanovic *et al.*, 2003; Boisard *et al.*, 2016).

3.5.2 Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des flavonoïdes extraites de la propolis

A. Extraction des flavonoïdes de la propolis

L'extraction des flavonoïdes de la propolis est réalisée selon le protocole décrit par (Bruneton, 1996) en utilisant l'éthanol et le méthanol pour extraire les polyphénols parmi eux les flavonoïdes, l'éther de pétrole pour se débarrasser des cires et des graisses.

Les génines libres ou aglycones sont extraits par l'éther diéthylique et les hétérosides par l'acétate d'éthyle.

Pour cela, la propolis est coupée en petits morceaux lavés dans l'éthanol pendant deux heures pour éliminer les impuretés, est laissée macérer pendant 15 jours dans l'éthanol 95% (1g de propolis pour 10ml d'éthanol).

Après filtration sur du Cotton le filtrat est exposé à 79°C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporator E100).

Le résidu est repris dans le méthanol 70% est laissé à macération pendant une nuit, après évaporation l'extrait obtenu est appelé extrait brut de la propolis.

L'extraction est poursuivie afin d'extraire les aglycones flavoniques et les hétérosides. Pour cela l'extrait brut (40g) est suspendu dans 1l de (méthanol/eau V/V).

Cette solution hydro alcoolique subit une série d'affrontements par 3 solvants différents:

a. Affrontement par l'éther de pétrole:

Nous avons ajouté 500 ml d'éther de pétrole à la phase hydro alcoolique. Après agitation énergique et repos de 10mn dans une ampoule à décantation, deux phase sont obtenues: Phase organique de l'éther de pétrole en haut contenant les cires et les graisses, et la phase hydroalcoolique en bas.

b. Affrontement par l'éther diethyl

Sur la phase hydroalcoolique obtenue après affrontement par l'éther de pétrole, on répète les mêmes opérations que précédemment mais avec un autre solvant qui est l'éther diethyl. Deux phases sont obtenues: phase éther diethyl en haut et phase hydrométhanolique en bas qui subit trois autres affrontements par le même solvant afin d'extraire le maximum de substances bioactives.

c. Affrontement par l'acétate d'éthyle

Même technique que précédemment mais avec l'acétate d'éthyle de même deux phases sont obtenues : une phase acétate d'éthyle en haut et une phase hydro alcoolique en bas résiduelle. Les deux phases: acétate d'éthyle et éther diethyl ont subi une évaporation à sec dans rotavapeur à 45° C.

3.5.3 Détermination de la CMI et CMB de l'EEP

Les concentrations minimales inhibitrices CMI ont été déterminées pour les souches SARM sensibles à l'EEP. Deux méthodes sont utilisées :CMI en milieu solide macro-dilution et CMI en milieu liquide micro-dilution.

A.Préparation de la gamme de concentration de la propolis

La gamme de concentration de la propolis est préparée selon la méthode de la double dilution en milieu liquide avec une progression géométrique des concentrations des extraits de propolis de raison $\frac{1}{2}$ en utilisant l'éthanol comme solvant. Elles varient de 0,3125 mg/ml à 100 mg/ml.

- Mettre l'EEP dans une étuve à 37°C pendant une nuit (évaporation de l'éthanol) ;
- Transvaser le contenu dans un tube (peser vide) ;
- Evaporation à sec dans le nouveau tube ;
- Peser 1g de EEP dans 1ml d'éthanol absolu 1g/ml c'est la solution mère **SM**.

Tableau N° 4: Préparation de la gamme de concentration de la propolis.

Solutions	SM	S1	S2 1/10	S3 1/10	S4 1/20	S5 1/40	S6 1/80
Dilutions	–	1/10 SM	1/10 S1	1/10 S2	1/2 S3	1/2 S4	1/2 S5
Concentrations mg/ml	1000	100	10	1	0,5	0,25	0,125
Solvant	Et-OH	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O / 1% Et-OH	H₂O / 1% Et-OH	H₂O / 1% Et-OH
% d'éthanol (Et-OH)	100	10	10	1	1	1	1
Préparation	1g propolis dans 1ml	100µ1SM + 900µ1H₂O	100µ1S1 + 900µ1H₂O	100µ1S2 + 900µ1H₂O	500µ1S3 + 500µ1solvant	500µ1S4 + 500µ1solvant	500µ1S5 + 500µ1solvant

SM : solution mère 1g /ml

S1 : Solution de départ 100mg/ml

A partir de cette solution mère, une série de dilution est réalisée. Le protocole est expliqué dans le (**Tableau N°4**).

B. Détermination de la CMI par macro-dilution (dilution sur milieu solide)

Les boîtes de petri sont préparées simultanément en déposant 2 ml de chaque dilution de la gamme de propolis dans une boîte, en allant de la concentration la plus faible à la concentration la plus forte. Une boîte témoin contenant 2 ml d'eau distillée est ajoutée. 18 ml de la gélose M-H sont ensuite ajoutés à chaque boîte en agitant légèrement pour bien mélanger.

Après refroidissement et séchage, les boîtes sontensemencées avec 10 ul de la suspension bactérienne des SARM et incubé à 35 ° C pendant 48 h.

Après incubation la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée comme la plus faible concentration de propolis pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible (**Stepanovic et al., 2003 ; Darwich et al., 2009**).

C. Détermination de la CMI et la CMB par dilution en milieu liquide

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) sont déterminées en utilisant la technique de dilution en milieu liquide avec le bouillon Muller Hinton.

➤ Technique

Des cultures jeunes des souches à étudier sont préparées sur une gélose ordinaire ensuite incubée à 37°C durant 18 à 24 h afin d'avoir des colonies isolées. Après ce temps d'incubation, 3 à 5 colonies ont été prélevées, délayées dans 10 ml de bouillon de MH puis incubées à 37°C pendant 3 à 5h. Deux séries de tubes sont préparées :

✓ Série test

Pour chaque concentration l'EEP, 0,2 ml a été prélevé puis déposé dans un tube précis d'une série de tubes expérimentaux. Dans cette série appelée série test, un tube a servi de témoin de contrôle de croissance (contenant 0,2 ml d'eau distillée stérile).

Après 3 à 5 h d'incubation, 0,2 ml du bouillon inoculé a été prélevé, puis homogénéisé à l'aide d'un agitateur vortex dans 20 ml de bouillon Mueller- Hinton stérile. Ensuite, 1,8 ml de

ce dernier bouillon ont été prélevés pour compléter le volume des tubes de la série test à 2 ml (Okou *al.*, 2018).

✓ Série de référence

A côté de la série test, une série de référence a été préparée. Dans cette dernière, les tubes expérimentaux ont contenu chacun, 0,2 ml de chaque concentration d'EEP et le tube témoin 0,2 ml d'eau distillée stérile. A l'ensemble des tubes de la série de référence, 1,8 ml de bouillon stérile ont été ajoutés.

L'ensemble des tubes expérimentaux de la série test et les tubes expérimentaux de la série de référence ont été homogénéisés à l'aide d'un agitateur vortex puis incubés à 37°C pendant 18 à 24 h (Okou *et al.*, 2018).

Après incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par lecture directe, à l'oeil nu, à la lumière du jour. Pour la détermination de ce paramètre, nous avons comparé concentration par concentration, les tubes de la série test avec ceux de la série de référence à la recherche d'absence de turbidité (Okou *et al.*, 2018).

Cette détermination de la CMI a été répétée pendant trois tests expérimentaux successifs.

Après la détermination de la CMI, le tube témoin de contrôle décroissance d'une souche bactérienne donnée a été dilué de 10 en 10 jusqu'à 10^{-4} selon une progression géométrique de raison 10^{-1} . Puis les diverses dilutions sont ensemencées sur une boîte gélosée de Mueller-Hinton, sur des stries de 5 cm (**Boîte A**).

Les tubes n'ayant montré aucune croissance microbienne visible à partir de la CMI, sont réisolés sur la gélose Muller-Hinton. L'ensemencement est fait par stries parallèles de 5 cm de long à la surface de la gélose (**Boîte B**). Les boîtes A et B sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 h.

Après incubation, le nombre de colonies sur les stries a été comparé à celles de la boîte témoin ensemencée avec des stries des dilutions de l'inoculum bactérien (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}).

La plus faible concentration pour laquelle on n'observe aucune colonie microbienne (99,99% de destruction) correspond à concentration minimale bactéricide (CMB). Un rapport CMB/CMI est calculé pour chaque souche SARM étudiée. Selon (Marmonier, 1990):

- si le rapport CMB/CMI <4, la substance testée est bactéricide.
- si le rapport CMB/CMI > 4, la substance testée est bactériostatique.

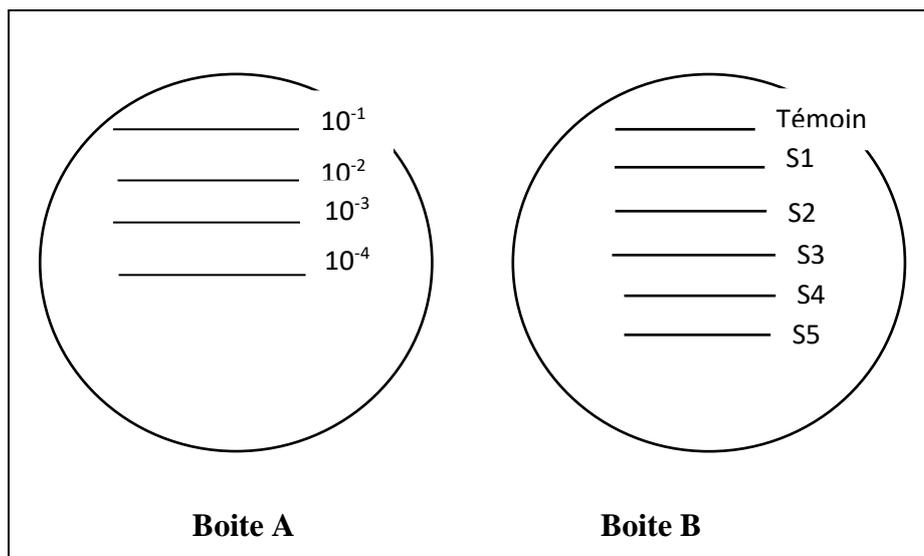


Figure N°10 : Détermination de la (CMI) et la (CMB).

3.6 Etude de la synergie antibiotique propolis

L'action synergique d'EEP et 10 antibiotiques est évaluée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé de MullerHinton. La concentration de l'EEP testée est de 0,25 mg/ml (varie généralement de 4 à 5 concentrations en dessous de la CMI (**Saddiq et Abouwarda, 2016**)).

➤ Technique

- ✓ L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 h sur milieu gélosé non sélectif dans 2,5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland.
- ✓ 2 ml de l'EEP sont mélangés à 18 ml du milieu pour obtenir une concentration d'EEP qui n'inhibe pas la croissance des souches bactériennes.
- ✓ Les boîtes contenant des concentrations sous-inhibitrices d'EEP, ainsi qu'une boîte contrôle contenant 2ml d'éthanol à la place de l'EEP, étaientensemencées avec les souches bactériennes.
- ✓ Après séchage des disques d'antibiotiques de différentes familles ont été placés sur les boîtes:

famille des β -lactamines : oxacilline (5 μ g), cefoxitine (30 μ g) ;

famille des aminosides : kanamycine (30 μ g), tobramycine (10 μ g), gentamicine (10 μ g) ;

famille des macrolides : érythromycine (15 µg), clindamycine (2 µg), pristinamycine (15 µg) ;

famille des glycopeptides : vancomycine (30µg) ;

tétracyclines (30µg) ;

Autres : triméthoprim + sulfaméthoxazole (1,25 + 23,75 µg).

- ✓ Les boîtes sont incubées à 35 °C pendant 48h. Les zones d'inhibition pour l'antibiotique testé seul ou combiné à l'EEP sont également comparées (**Stépanovic et al., 2003; Wojtyczka et al., 2013**).

3.7 Analyses statistiques

Nos résultats ont été analysés par une comparaison de moyenne (Student) pour évaluer les différences entre les deux méthodes utilisées (disques et puits) dans l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'EEP.

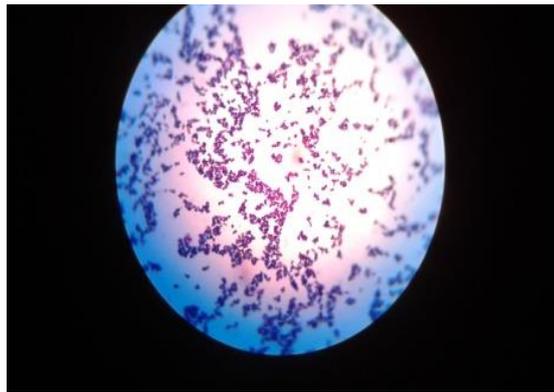
Les résultats du test de synergie ont été soumis au test de Wilcoxon Signed-Rank comparant les valeurs (mm) de la zone inhibitrice de l'antibiotique seul et après incorporation de l'EEP dans la gélose de Muller Hinton selon la méthode de diffusion. Tous les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SPSS Statistics 20, en supposant que le niveau de signification statistique de $p < 0,05$ (**Annexe 4**).

1. Etude bactériologique

L'identification de nos souches a été faite sur la base de leurs caractères morphologiques, culturels et biochimiques.

1.1 Examen microscopique

La coloration de GRAM a montré la présence de cocci à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin (**photographie N°5**).



Photographie N°5 : Coloration de GRAM Staphylocoques.

1.2 Culture

Les souches bactériennes ont donné plusieurs aspects culturels en fonction du milieu de cultureensemencé.

- **Bouillon**

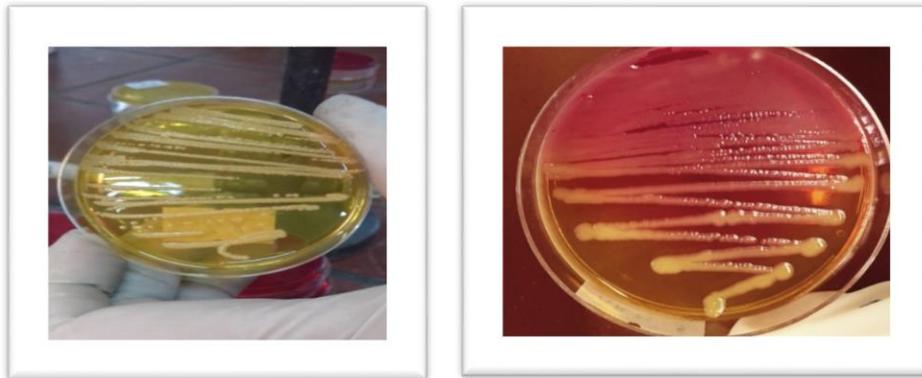
S. aureus donne un trouble uniforme en quelques heures.

- **Sur gélose ordinaire**

Les colonies sont lisses, rondes, bombées, brillantes, opaques, de 1 mm de diamètre. Elles se pigmentent habituellement en jaune doré (aureus), parfois en jaune citron, et parfois sont non pigmentées.

- **Sur la gélose Chapman**

Les colonies de *S. aureus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre après 24 h d'incubation à 37°C. L'utilisation du mannitol se traduira par une acidification du milieu (**photographie N° 6**).



Photographie N°6: Croissance sur gélose Chapman avec acidification du milieu (mannitol +).

- **Sur gélose au sang frais et gélose au sang cuit**

Les colonies de *S. aureus* sont circulaires, volumineuses, opaques éventuellement pigmentées et de couleur jaune doré et légèrement bombées ou aplaties; elles présentent une surface luisante et humide.

L'étude bactériologique nous a permis d'isoler 211 souches de Staphylocoques.

1.3 Identification biochimique

L'identification biochimique nous a permis de détecter 161 souches *S. aureus* possédant une catalase, une coagulase et une thermonucléase.

L'identification par la galerie API Staph a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de *S. aureus* et a révélé trois différents biotypes avec prédominance du biotype 6736153 chez (120) 74,53% des souches suivie par le biotype 6336153 chez (25) 15,52 % des souches et 6736113 chez (16) 9,93 %.

Nos résultats ont révélé une prédominance de *S. aureus* par rapport aux staphylocoques à coagulase négative (**figure N°11**).

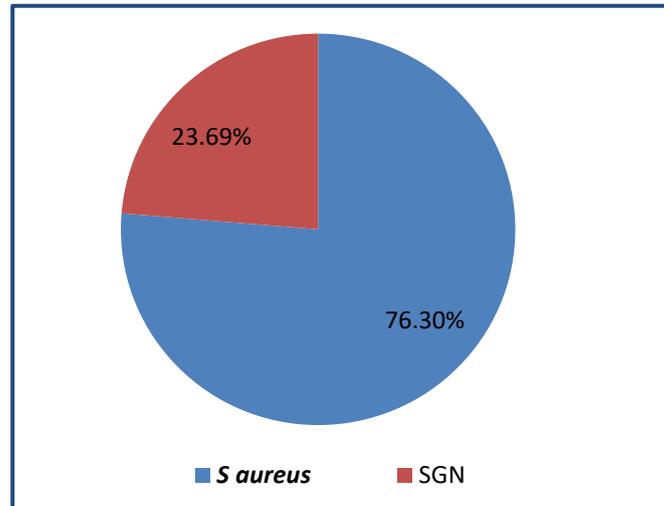


Figure N° 11: Pourcentage de *Staphylococcus aureus*.

2. Répartition des souches *S. aureus* en fonction des prélèvements

Les taux les plus élevés des *Staphylococcus aureus* ont été isolés du pus et hémoculture respectivement (50, 81% et 19,67%) (Figure N°12). En effet le *S. aureus* est une espèce bactérienne importante en pathologie humaine. C'est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes (Hart et Shears, 1999).

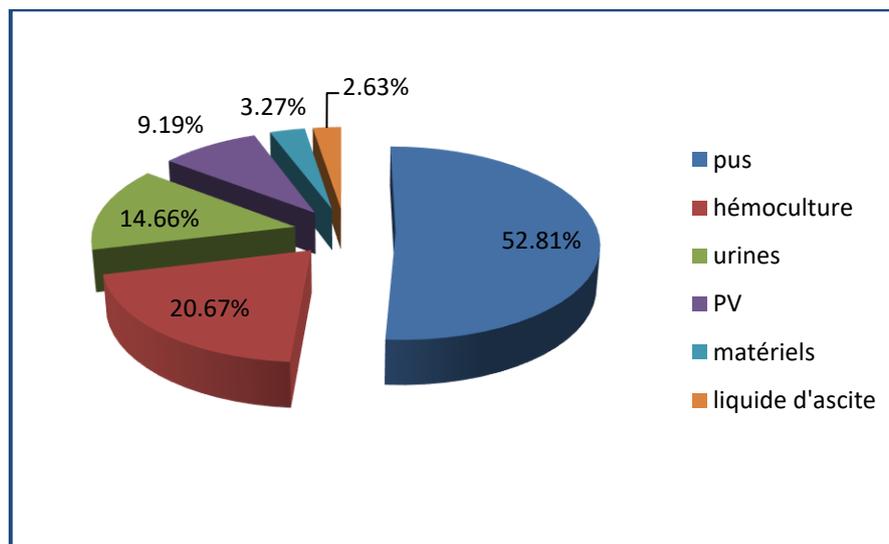


Figure N° 12: Répartition des souches *S. aureus* en fonction des prélèvements.

3. Détection des SARM

Toutes les souches résistantes à la céfoxitine et l'oxacilline sont considérées comme des SARM (**photographie N°7**). Cette résistance est définie par des diamètres d'inhibition : < à 22 mm et < à 20 mm à la céfoxitine et à l'oxacilline respectivement (**CASFM, 2017 ; Hammami et Mezghani, 2016**).



Photographie N° 7:Détection des SARM (OX, P, FOX).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a permis de détecter **34** souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline **SARM** parmi les 161 souches de *S. aureus* isolées.

4. Prévalence des SARM

Sur l'ensemble des *S. aureus* isolées le nombre des **SARM** retrouvé était de 34 soit 21,11% (**figure N° 13**).

Le taux de SARM enregistré dans cette étude (21,11 %) est plus faible que celui signalé par le 13^{ème} et 16^{ème} rapport d'évaluation du réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques pour les deux années respectivement 2011 et 2016. Selon les deux rapports l'analyse globale des données concernant l'espèce *Staphylococcus aureus* aboutit à un pourcentage de résistance des SARM de 32,56 % et 36,65%. Ce taux est relativement stable d'une année à l'autre (entre 35% et 45% depuis 2005).

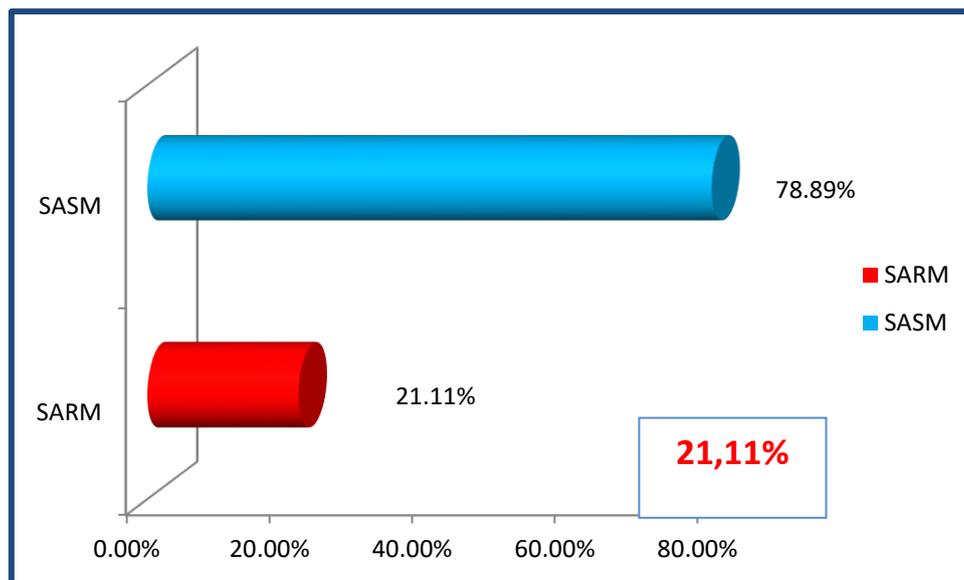


Figure N°13: Taux des SARM.

Selon (**Djennane et al., 2015**) le taux des SARM est resté stable sans dépasser 41% au cours des 3 années de surveillance (2012-2014) des principales BMR au CHU Mustapha Bacha d'Alger. (**Antri et al., 2010**) ont signalé une prévalence globale des SARM de 42 %, avec un taux de 35 % en communautaire et 49 % au même hôpital.

Plusieurs études ont montré des taux différents témoignant de la variabilité des résultats en fonction du pays, de la région et de l'hôpital.

En Afrique, la situation concernant la prévalence des SARM est très hétérogène. Les fréquences varient d'un pays à un autre mais restent en général élevés : 16 % au Sénégal et au Niger (**Breurec et al., 2011**), de 20 à 47 % au Nigeria de 36 % au Benin et de 35,7 % au Togo (**Ouedraogo et al., 2017**). En Côte d'Ivoire une étude dans trois hôpitaux de référence a rapporté un taux de 39 % témoignant de l'ampleur du problème des SARM dans la région Ouest africaine (**Ouedraogo et al., 2017 ; Breurec et al., 2011**).

Concernant les pays du Maghreb, l'Algérie enregistre la plus forte prévalence de SARM (44 %) par rapport aux deux pays voisins que sont la Tunisie (18 %) et le Maroc (19 %) (**Zouaghi et al., 2015 ; Stefani et al., 2012**) (figure N°14).

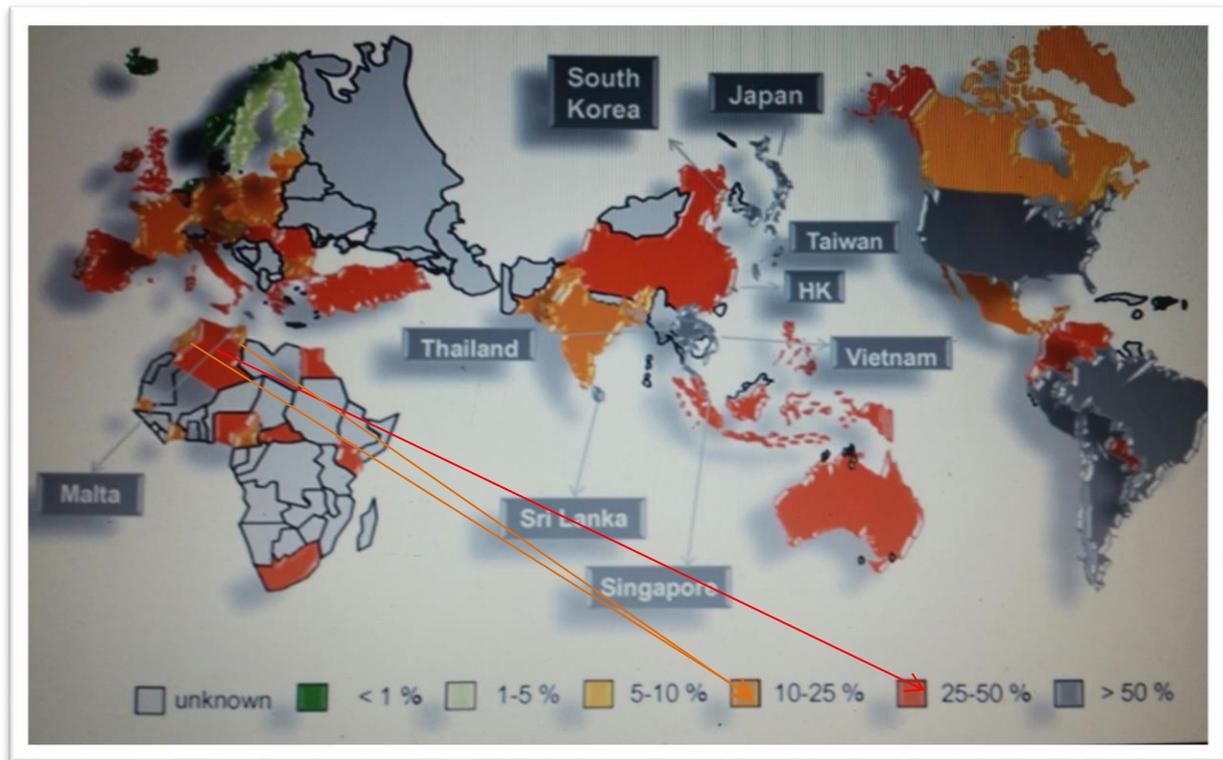


Figure N° 14 : Prévalence mondiale des SARM acquises en établissement de soins. HK : Hong Kong. Selon (Stefani *et al.*, 2012).

Les prévalences des SARM isolés d'hémocultures, rapportées dans les pays du Sud et de l'Est de la méditerranée, varient entre 12 et 56 % avec des prévalences maximales observées en Jordanie (56 %) et en Egypte (52 %) et une prévalence minimale observée au Liban (12 %). La prévalence des SARM aux États-Unis a continuellement augmenté atteignant 52,8 % en 2008 (Elhanni, 2011 ; Bordon *et al.*, 2010).

En Europe, le pourcentage moyen de SARM a diminué de façon significative au cours des dernières années, témoignant d'une tendance à la baisse dans de nombreux pays européens. En France, par exemple, la proportion de SARM est passée de 26,7% en 2006 à 21,6% en 2010 (EARS-Net, 2011).

En 2010, le rapport annuel de surveillance des résistances aux antibiotiques en Europe publié par le centre européen de prévention et de contrôle des maladies révèle que 9 des 28 pays inclus dans la surveillance ont une proportion de SARM comprise entre 25 et 50 %, il s'agit principalement des pays d'Europe du Sud ainsi que le Royaume Uni et l'Irlande. En revanche,

c'est en Europe du Nord que l'on retrouve les pays avec la plus faible proportion de SARM isolés, ainsi au Danemark, en Finlande, en Suède, cette proportion est inférieure à 5% (**figure N°14**).

Le taux des SARM enregistré dans notre étude reste élevé par rapport à celui enregistré dans plusieurs pays africains et européens. Ceci se justifie par la capacité de résistance des SARM aux antibiotiques mais aussi par un déficit en matière d'hygiène hospitalière facilitant ainsi leur diffusion manuportée de façon endémique dans nos hôpitaux voire même dans la communauté.

4.1 Répartition des souches SARM en fonction des prélèvements

Les types de prélèvements positifs étaient, par ordre de fréquence décroissante, le pus (47,05%), les hémocultures (35,29%), les urines (11,76%), les prélèvements vaginaux (2,94%) et matériels (cathéters) (2,94%) (**Figure N°15**).

Les SARM ont été majoritairement isolées des prélèvements purulents, des hémocultures et des urines. Ceci est dû au fait qu'ils sont essentiellement retrouvés dans les infections cutanées, ce sont les principales responsables des bactériémies en milieu hospitalier et ce sont aussi incriminés dans les infections urinaires (**Win et al., 2006 ; Avril et al., 2000**). En effet les SARM ne cause pas plus d'infections que *Staphylococcus aureus* mais il limite le choix du traitement (antibiothérapie).

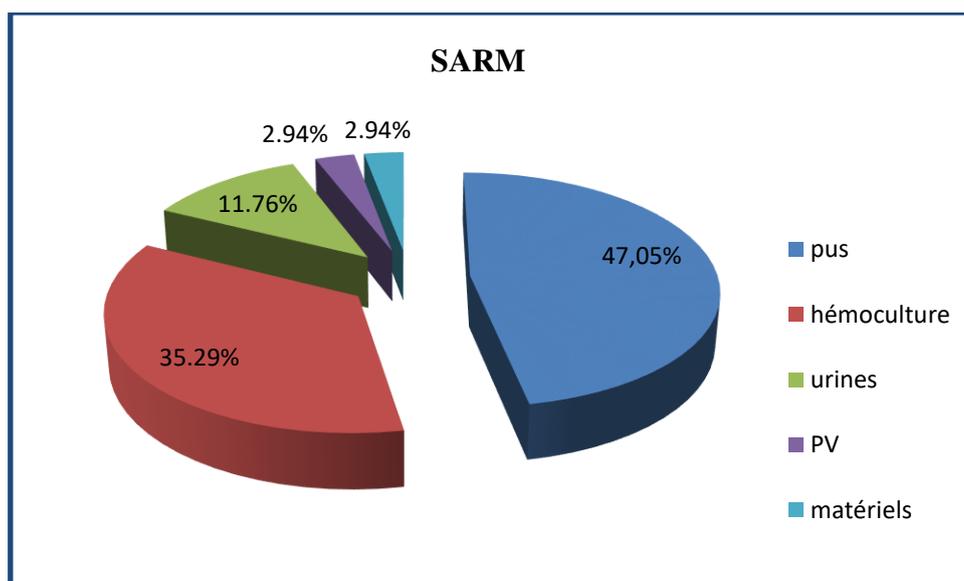


Figure N°15: Répartition des souches SARM en fonction des prélèvements.

4.2 Répartition des souches SARM selon le sexe

La **figure N° 16** représente la répartition des souches SARM selon le sexe.

Dans notre étude, le taux des SARM était plus élevé chez les hommes (66,66 %) que les femmes (33,33%). Ce résultat est similaire à celui trouvé dans des études précédentes (**Lebon et al., 2008 ; Herwardt et al., 2004 ; Morgan, 1999**). Plusieurs études cliniques suggèrent que le sexe constitue un facteur de risque d'infection.

Le sexe masculin et l'âge supérieur à 75 ans sont considérés comme des facteurs de risque de bactériémie et de méningite à SARM. (**Bone, 1992**) a examiné rétrospectivement quatre études de sepsis sévères et ont noté une prédominance des patients du sexe masculin (60%-65%).

Selon le rapport de surveillance de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (2011-2012) isolées des bactériémies dans la province de Québec, 265 souches sur les 300 cas (88,3 %) de bactériémies ont été rapportées dans le système de surveillance. La moyenne d'âge est de 68 ans, avec la majorité des cas se situant dans le groupe d'âge des 60 ans et plus. Une plus grande proportion d'hommes avec un ratio d'environ 2 pour 1 ait développé une bactériémie à SARM (**Levesque et al., 2012**).

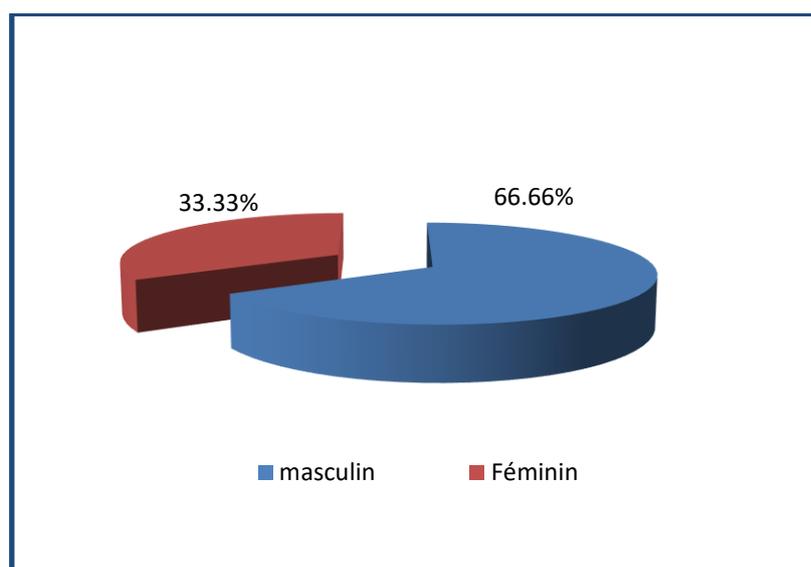


Figure N° 16: Répartition des SARM selon le sexe.

4.3 Répartition des souches SARM selon l'âge

La **figure N°17** montre que les SARM sont plus fréquents chez les patients ayant un âge supérieur à 65 ans. Les prévalences les plus élevées ont été notées chez les patients dont l'âge est compris entre 45 et 65 ans suivi de ceux ayant un âge supérieur à 65 ans. Aucune souche n'a été isolée chez les enfants de 0 à 15ans.

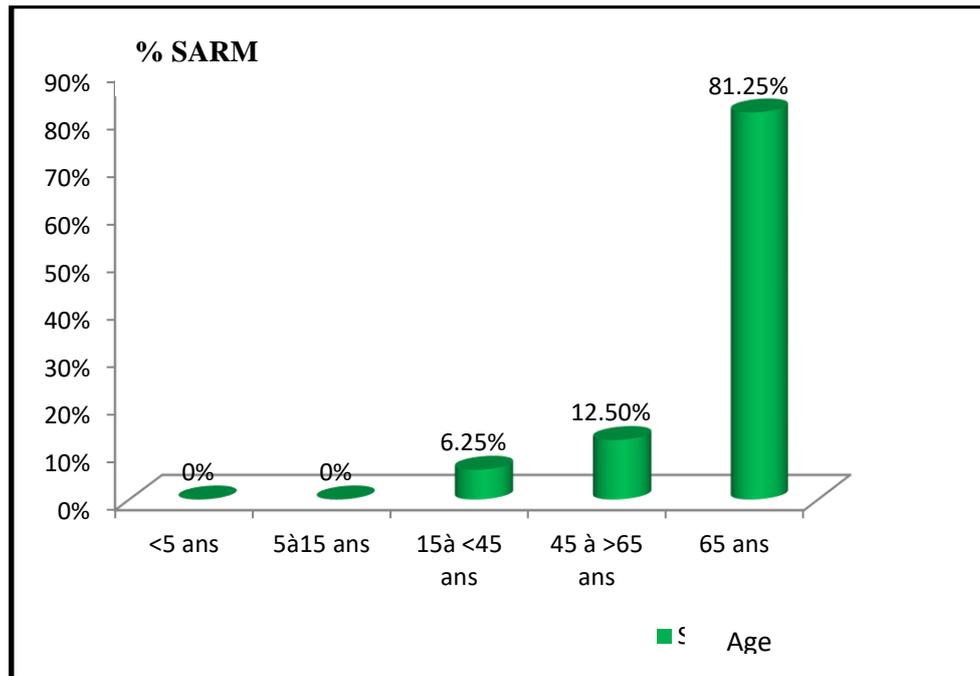


Figure N° 17: Répartition des SARM selon l'âge.

Ce résultat corrobore avec celui de plusieurs auteurs qui signalent que l'âge avancé est un facteur de risque de colonisation par les SARM (Lebon *et al.*, 2008 ; Mc Dougal *et al.*, 2003). Ceci pourrait s'expliquer par la diminution des défenses immunitaires et l'existence des co-morbidités présentes à cet âge. Ainsi que l'augmentation de leur dépendance et de la demande de soin qui s'accompagne d'un risque accru de transmission manuportée.

5. Résistance des SARM aux antibiotiques (profil de résistance)

L'histogramme (**figure N° 18**) illustre le profil de résistances des souches SARM et SASM aux différentes familles d'antibiotiques.

Toutes les souches SARM isolées présentaient une résistance croisée aux β -lactamines qui s'étend à d'autres familles d'antibiotiques : aminoside, macrolides, lincosamides, fluoroquinolones, tétracyclines et acide fusidique. Ce qui reflète un état de multi résistance.

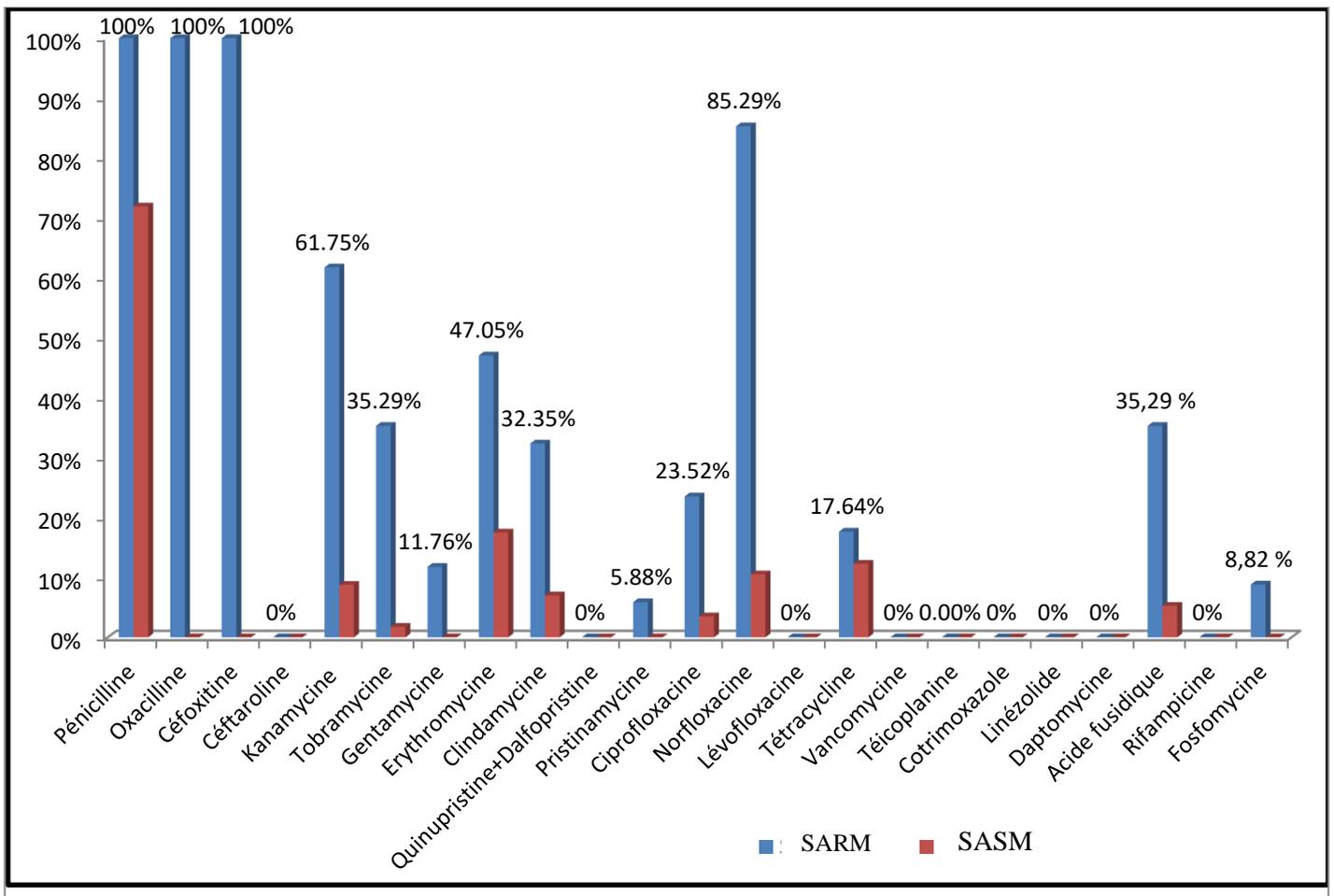


Figure N° 18: Profil de résistance des SARM et SASM aux antibiotiques.

5.1 β -lactamines

Les souches SARM isolées ont été totalement résistantes (100%) à la pénicilline G, à oxacilline et la céfoxitine.

La résistance aux β -lactamines chez les staphylocoques repose sur deux grands types de mécanismes qui sont identiques pour les *S aureus* et pour les *Staphylococcus* à coagulase négative: un mécanisme de résistance extrinsèque par production d'enzymes inactivant l'antibiotique et un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP2a (Quincampoix et Mainardi, 2001).



Photographie N° 8: Aspect caractéristique d'une pénicillinase
Zone d'inhibition bordure nette

Les souches productrices de pénicillinase sont résistantes à la pénicilline G, aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux ureidopénicillines (CASFM, 2017).

S.aureus a développé différents mécanismes de résistance aux antistaphylococciques. Plus de 90 % des souches produisent une pénicillinase (Dumitrescu et al., 2010 ; Daurel et Leclercq, 2008).

Les souches *S. aureus* résistantes à la méticilline ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M (méticilline, oxacilline) et les autres β -lactamines par la production d'une protéine, la PLP2a, liant les pénicillines (PLP) et ayant une faible affinité pour ces composés.

Cependant nos souches restent totalement sensibles à la céftaroline. Selon (CASFM 2017) les souches de staphylocoques résistantes à la céfoxitine ou possédant un gène *mec* additionnel (*mecA*) ou exprimant une PLP2 additionnelle (PLP2a) après induction par une β -lactamine, doivent être interprétées résistantes à toutes les β -lactamines (pénicillines associées ou non à un inhibiteur de β -lactamase, céphalosporines et carbapénèmes), sauf à la ceftaroline et au ceftobiprole qui possèdent une activité sur les staphylocoques résistants à l'oxacilline.

5.2 Aminosides

La résistance de nos souches SARM aux aminosides montrait trois phénotypes différents, impliquant trois enzymes inactivatrices (tableau N°5).

61,75 % des SARM étaient résistantes à la kanamycine. 5 souches avaient un phénotype K soit (14,70%), dû à la production de l'enzyme Aminosides-phosphotransférases APH (3')-III. (35,29 %) des souches étaient résistantes à la kanamycine et à la tobramycine, soit le phénotype KT exprimé par la production de l'enzyme Aminosides-nucléotidyltransférases ANT(4')(4'')-I. Alors que (11,76%) des souches exprimaient le phénotype KTG et étaient résistantes aux trois antibiotiques (kanamycine, tobramycine, gentamicine) due à l'enzyme Aminosides-acétyltransférases (AAC) APH (2'')- AAC (6') – APH (2'').

Tableau N°5: Phénotypes de résistance de SARM aux aminosides.

Kanamycine	Tobramycine	Gentamicine	Mécanisme	% SARM n=34
S	S	S	Sensible	13 (38,23%)
R	S	S	APH (3')-III	5 (14,70%)
R	R	S	ANT (4') (4'')	12 (35,29%)
R	R	R	APH(2'') - AAC (6')	4 (11,76 %)

Selon la (CASFM, 2017) et le **rapport d'évaluation national 2016** toutes les souches résistantes à la tobramycine sont résistantes à la kanamycine et à l'amikacine et les souches résistantes à la gentamicine sont résistantes à l'ensemble des aminosides (sauf streptomycine).

(35,29%) de nos souches SARM était de phénotype KT, suivie par le phénotype K (14,70%). Cependant un bas niveau de résistance à la gentamycine de phénotype KTG (11,76%) est enregistré. Ce résultat corrobore avec celui de plusieurs auteurs qui signalent que le phénotype (KT) est le plus répandu et que la fréquence de la résistance à la gentamicine parmi les SARM a augmenté au cours des années 1970 et 1980, pour atteindre environ 90 % des souches vers 1990 (Aubry-Damon, 1997). Depuis le début des années 1990, la tendance s'est inversée, avec des fréquences de résistance à la gentamicine de 50-60 % dans les années 1995-1998, de 11 à 20 % en 1999 et 2000. Ainsi, la gentamicine est l'aminoside le plus souvent actif sur le *S. aureus* (Dumitrescu et al., 2010 ; Battard et al., 2005).

Bien que notre taux de SARM résistant à la gentamycine soit nettement inférieur à celui signalé par (Alioua, 2011) (82,6%), il se rapproche du taux enregistré par le 16^{ème} rapport

national d'évaluation de la résistance aux antibiotiques (19%). Cependant il est supérieur de celui enregistré par (Djoudi et al., 2014) dans une étude portant sur les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline chez des mères et des enfants hospitalisés à Alger où aucune résistance n'a été enregistrée pour cet antibiotique.

5.3 MacrolidesLincosamidesStreptograminesb (MLSb)

Selon (figure N°18) la résistance croisée aux β -lactamines de nos souches SARM s'étend à celle des macrolides.

En effet 47,05% de nos souches SARM sont résistantes à l'érythromycine, 32,35% à la clindamycine et 5,88% à la pristinamycine.

Ces taux sont plus élevés que ceux rapportés par le 16^{ème} rapport national d'évaluation 2015 qui a noté des taux de 31,75%, 15,75 %, 2,32% respectivement pour l'érythromycine, clindamycine et pristinamycine.

Cependant toutes nos souches SARM restent sensibles à la combinaison des deux antibiotiques quinupristine–dalfopristine (streptogramines). Selon (CASFM, 2017) les macrolides et les lincosamides (lincomycine et clindamycine) n'ont qu'une activité bactériostatique sur les staphylocoques alors que les streptogramines (quinupristine–dalfopristine), qui résultent de l'association de deux composés A et B agissant en synergie et possédant une activité bactéricide.

Selon plusieurs auteurs trois mécanismes de résistance aux MLSb sont impliqués : une modification de la cible de l'antibiotique, un mécanisme d'efflux et une modification enzymatique de l'antibiotique (Quincampoix et Mainardi, 2001). Elle est surtout liée à la production de méthylase qui modifie le ribosome, cible de ces antibiotiques.

Deux phénotypes, inductible et constitutif, sont distingués par la méthode de diffusion en gélose (Daurel et leclercq, 2008).

Plusieurs gènes de résistance ont été décrits chez *S. aureus*. Les plus fréquents sont les gènes *erm* confèrent une résistance croisée aux macrolides, lincomycines et streptogramines B. Leur expression peut être soit inductible soit constitutive (Battard et al., 2005).

La pristinamycine a conservé une activité bactériostatique sur nos souches SARM, 94,11% étaient sensibles à cette antibiotique. Cependant le taux de résistance de nos souches à cet

antibiotique (5,88%) reste un peu élevé par rapport à celui enregistré à l'échelle national (2,70 %) et celui rapporté dans une étude tunisienne qui n'a détecté aucune résistance à cet antibiotique (Saïdani *et al.*, 2006).

Nos résultats montrent que la résistance à la clindamycine est associée à celle de l'érythromycine. Deux phénotypes sont détectés :

- Le phénotype MLSB inductible correspond aux souches résistantes à l'érythromycine et sensibles à la clindamycine (Lincosamides) et à la pristinamycine;
- Le phénotype MLSB constitutif correspond aux souches résistantes à l'érythromycine, à la clindamycine et sensibles à la pristinamycine.

Cependant aucune souche n'appartient au phénotype LSA qui correspond aux souches résistantes à la lincomycine (clindamycine) et à la pristinamycine mais sensibles à l'érythromycine.

Le **tableau (N°6)** illustre les phénotypes de résistances de nos souches SARM aux MLS. Globalement, (32,35%) des souches résistantes à l'érythromycine démontraient une résistance constitutive à la clindamycine et (14,70%) des souches démontraient une résistance inductible tel que déterminée par la méthode phénotypique du D-test (**photographie N°9**).

Tableau N°6: Phénotypes de résistance des SARM aux macrolides.

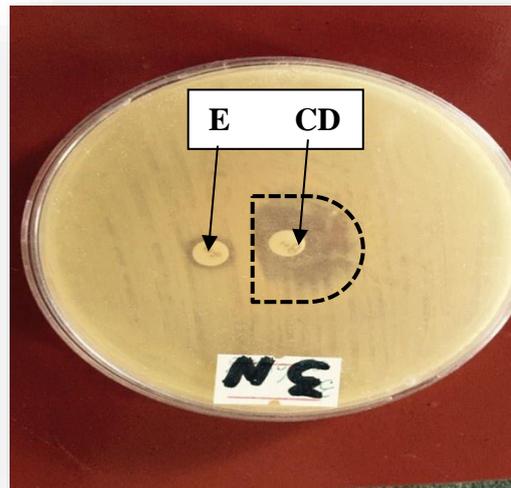
Erythromycine	Clindamycine	Pristinamycine	Mécanisme	SARM% n=34
S	S	S	Sensible	52,94%
R	S	S	MLSb inductible	14,70%
R	R	S	MLSb constitutive	32,35%

5.3.1 Détection du phénotype MLSb chez les souches SARM

La résistance inductible à la clindamycine ne peut être détectée qu'en présence d'un macrolide. Elle est mise en évidence sur l'antibiogramme par une image d'antagonisme entre la

clindamycine et l'érythromycine (D-test) (**photographie N°9**). En cas de résistance à la clindamycine, l'activité de la pristinamycine est diminuée.

Selon **CASFM 2017** devant une souche résistante à l'érythromycine et sensible à la clindamycine, on doit rechercher le caractère inductible de cette résistance (antagonisme érythromycine clindamycine).



Photographie N° 9:Détection du phénotype MLSb chez les souches SARM

zone en forme de D.

Seuls les macrolides à 14 et 15 atomes peuvent induire l'expression de *erm* chez *S. aureus*. Ainsi une souche résistante à l'érythromycine et sensible à la clindamycine porte-t-elle généralement un gène *erm* inductible, tandis que les souches résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine ont habituellement un gène *erm* d'expression constitutive (**Lina et Cattoir, 2014 ; Lina et al., 1999 ; Battard et al., 2005 ; Quincampoix et Mainardi, 2001**).

5.4 Fluoroquinolones

85,29% de nos souches SARM sont résistantes à la norfloxacine et 23,52% sont résistantes à la ciprofloxacine. Ces résultats sont plus élevés par rapports à ceux rapportés par le 16^{ème} rapport national d'évaluation 2015 qui a noté une résistance de 21,34% et 17,92% respectivement pour ofloxacine et la ciprofloxacine.

Cependant toutes nos souches SARM restent sensibles à la levofloxacin (fluoroquinolones 3^{ème} génération) contrairement au 16^{ème} rapport national d'évaluation 2015 où un taux de résistance de 14,06 % a été enregistré pour le même antibiotique. En effet, la lévofloxacin a été signalé en littérature comme étant très active contre le *S. aureus* (**Donnio et al., 2010**).

La résistance des SARM aux fluoroquinolones est liée à des mutations chromosomiques qui entraînent une modification de la cible affectant l'ADN gyrase (mutation dans les gènes *gyrA* ou *par c*) ou une diminution de la perméabilité liée à une modification des porines. Chez les bactéries à Gram positif, la topo-isomérase de classe IV constitue la cible primaire, et une mutation de cette cible est nécessaire pour entraîner l'apparition d'un premier niveau de résistance aux fluoroquinolones (**Mainardi et al., 1996**).

Les fluoroquinolones présentent l'avantage d'une bonne activité bactéricide, d'une bonne diffusion tissulaire et d'une excellente biodisponibilité permettant leur utilisation *per os*. Malheureusement, leur forte capacité à sélectionner des mutants résistants a fait apparaître en quelques années des taux de résistance très élevés chez le staphylocoque (**Battard et al., 2005**).

(**Couderc et al., 2014**) suggère que la consommation de fluoroquinolones est un facteur de risque d'acquisition de SARM. Une étude réalisée en 2001-2002 sur plusieurs CHU française montré que lorsque l'on réduisait l'usage de fluoroquinolones de 85 %, le nombre d'infections par des SARM diminuait très significativement. Les résultats extrapolés au niveau national permettent d'affirmer que chaque année, environ 20 000 infections à SARM (sur 140 000 au total) sont directement imputables aux traitements par fluoroquinolones. Ce problème a poussé depuis 2003 les autorités belges à lutter contre la surprescription de fluoroquinolones, accusées également de coûter trop cher au contribuable alors qu'aucune efficacité supérieure aux traitements classiques n'a pu être mise en évidence dans les infections des voies aériennes.

Une étude canadienne, publiée en 2006, vient confirmer l'implication majeure des fluoroquinolones dans les infections par le SARM. L'étude montre que la prise de fluoroquinolones multiplie le risque d'infection par un facteur 2,5 pour la souche bactérienne concernée, alors que les autres antibiotiques n'influent pas sur le risque (**LeBlanc et al., 2006**). Il faut donc éviter de prescrire une fluoroquinolones dans les situations où d'autres antibiotiques peuvent être utilisés.

5.5 Glycopeptides

100 % de nos souches SARM ont démontré une sensibilité à la vancomycine et à la téicoplanine. Cette sensibilité a été confirmée par la mesure de la CMI des deux antibiotiques par microdilution (**tableau N°7**).

Vu l'expression souvent hétérogène de cette résistance, une vigilance accrue est préconisée pour leur détection. Selon (**Battard et al., 2005**) la mesure de la CMI de la vancomycine et de la téicoplanine permet la classification des souches en deux classes : sensible ($CMI \leq 2$ mg/l), ou résistante ($CMI > 2$ mg/l).

Nos résultats confirment que toutes les souches SARM étudiées sont sensibles à la vancomycine avec des CMI qui varient de 0,25 – 1 mg/ml et à la téicoplanine avec des valeurs de la CMI varient de 0,25 à 0,5 mg/ml.

Les glycopeptides (vancomycine et téicoplanine) représentent le traitement de première intention en cas de résistance à la méticilline ou d'allergie aux pénicillines. La résistance à ces antibiotiques est un phénomène relativement inquiétant et il justifie une surveillance attentive (**Battard et al., 2005**).

La vancomycine et la téicoplanine gardent toujours une bonne activité sur les souches SARM dans notre étude. Même constatation a été faite par (**Djoudi et al., 2014**) lors d'une étude réalisée sur une collection de souches de SARM, impliquées dans des infections chez des mamans, enfants et des nouveau-nés, et isolées par le laboratoire central « Mère et Enfant » du centre hospitalo-universitaire de Beni-messous d'Alger et celle réalisée au laboratoire de bactériologie de Koléa (Tipaza) (**Boukhatem et al., 2015**).

Aucune résistance aussi n'a été enregistré par l'équipe de (**Saidani et al., 2006**) lors d'une étude concernant le profil bactériologiques des bactéries à germe multi résistants à l'hôpital Charles-Nicolle de Tunis.

Selon le 6^{ème}, le 11^{ème}, le 13^{ème} et le 15^{ème} rapport d'évaluation aucune souche de sensibilité diminuée aux glycopeptides n'a été observée dans aucun des hôpitaux Algériens bien que cela commence à être rapporté. Cependant le 16^{ème} rapport d'évaluation a enregistré 3 cas de résistance à la téicoplanine chez des patients extra hospitaliers avec un taux de 0,14% mais aucune souche intermédiaire ou résistante à la vancomycine n'a été isolée.

En effet l'augmentation des SARM dans les hôpitaux algériens a favorisé l'intégration des glycopeptides dans les schémas thérapeutiques et donc leur utilisation abusive ce qui a abouti ces dernières années, à l'apparition de résistance.

Rappelant que la vancomycine a été mise sur le marché depuis 30 ans mais elle reste le médicament de choix pour le traitement des infections graves causées par les SARM dans de nombreux hôpitaux.

(**Elhamzaoui et al., 2009**) ont démontré que la teicoplanine et la vancomycine sont deux à huit fois plus actives que les autres antibiotiques testés contre la majorité des staphylocoques, en particulier les SARM. Cette situation jusqu'au là rassurante, incite à une surveillance continue de la sensibilité des SARM aux glycopeptides.

5.6 Autres antibiotiques

Pour les autres antibiotiques, les taux étaient de 35,29 % pour l'acide fusidique, (17,64%) pour la tétracycline et un faible taux pour la fosfomycine (8,82%).

En opposition, 100% de SARM ont démontré une sensibilité totale au linézolide, au cotrimoxazole (triméthoprime+ sulfamides), à la rifampicine et à la daptomycine.

La daptomycine est un lipopeptide en cours de développement ayant une activité bactéricide sur les bactéries à GRAM +, et notamment le SARM. Plusieurs études ont confirmé cette efficacité (**Donnio et al., 2010 ; Battard et al, 2005**).

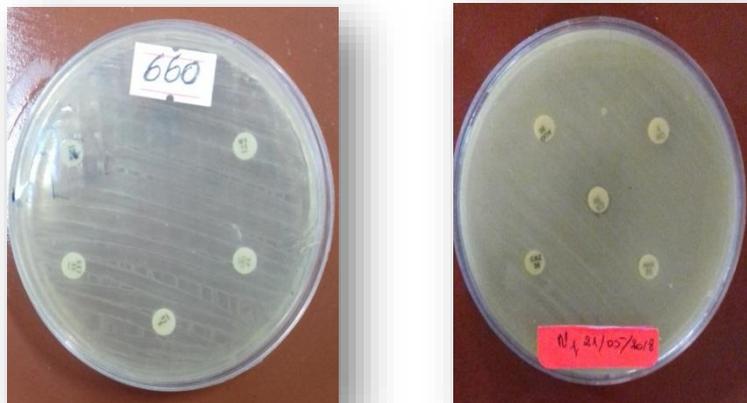
Une étude multicentrique, comprenant l'efficacité du linézolide (oxazolidinones) et de la teicoplanine dans le traitement des infections à SARM. Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre les 2 groupes en terme de succès clinique et microbiologique. La fréquence des effets secondaires et le taux de mortalité étaient également identiques. L'éradication du portage de SARM a été obtenue plus souvent avec le linézolide qu'avec la teicoplanine (**Donnio et al.,2010**).

La rifampicine a été efficace contre les souches SARM isolées. Ce résultat corrobore avec celui signalés par (**Alioua, 2011**). En effet, l'utilisation de cet antibiotique en Algérie a été relativement délaissée au profit de nouvelles molécules, ce qui pourrait expliquer la restauration de son efficacité. Cette molécule qui peut réduire de façon significative le portage nasal (**Bryskier, 1999**), est connue pour son efficacité sur le SARM.

Toutes nos souches SARM étaient sensibles à la daptomycine, au linézolide, la rifampicine, au thriméthoprime-sulfaméthoxazole. Pour toutes ces souches, aucune résistance à la vancomycine ne fut observée et aucune n'a montré une CMI intermédiaire (VISA). Il est

donc rassurant de constater que plusieurs antibiotiques de choix pour le traitement des infections à SARM demeurent toujours actifs.

Nos SARM présentent des résistances associées à plusieurs familles d'antibiotiques : aminosides, macrolides, lincosamides, fluoroquinolones (**photographie N°10**). Ce résultat pourrait être expliqué selon plusieurs auteurs par le fait que le gène codant la PLP2a, *mecA*, est porté par un élément chromosomique qui contient également d'autres gènes de résistance à d'autres antibiotiques (**Dumitrescu et al., 2010 ; Battard et al., 2005**).



Photographie N° 10: Profil de résistance d'une souche multirésistante SARM.

En effet l'élément principal favorisant l'émergence de ces bactéries résistantes est bien la surconsommation et la mauvaise utilisation des antibiotiques. Les indications inappropriées, la durée de traitement inadaptée, des posologies insuffisantes ou l'usage de molécules à large spectre comme les céphalosporines de 3ème ou 4ème génération et les fluoroquinolones, sans désescalade thérapeutique sont autant de situations que l'on doit pouvoir corriger.

Ce problème est encore pire dans les pays où les antibiotiques sont délivrés sans ordonnance pour l'homme ou l'animal cas de notre pays. A cet égard, une étude publiée dans la revue américaine Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) (**Klein et al., 2015**), a révélé que le niveau de consommation d'antibiotiques a particulièrement augmenté dans les pays à revenu intermédiaire ou faible. L'Algérie a été citée parmi le top 5 des pays dans le monde, derrière respectivement la Turquie, la Tunisie, l'Espagne et la Grèce et juste devant la Roumanie, la Belgique et la France.

5.7 Détermination des CMI des antibiotiques testés

Le **tableau (N°7)** illustre les valeurs des CMI de différents antibiotiques mesurées par E-test (**photographie N°11**) et des glycopéptides qui ont été mesurées par micro-dilution). Les résultats des CMI sont également compatibles avec ceux obtenus par diffusion sur milieu solide (antibiogramme).

Tableau N° 7 : CMI des antibiotiques testés.

Antibiotiques	Souches sensibles CMI mg/l	Souches résistantes CMI mg/l
CN	0,38-1	/
K	6-8	128
TOB	≤1	>1
GEN	≤ 1	>1
E	0,04- 0,08	6-32
CM	0,01-0,25	0,63-10
QDF	0,1-0,31	/
PR	0	/
RIF	0	/
Tet	0,04-0,08	40
Nor	>0	/
FA	≤1	≥1
SXT	0,04- 0,1	/
*VA	0,25-1	/
*TEC	0,25-1	/
LNZ	≤4	/
DA	0,094 -0,75	/

*CMI mesurée par microdilution

La prévalence des résistances des souches SARM aux glycopeptides, linézolide et rifampicine reste faible. Notons que ces antibiotiques conservent des CMI basses et restent une option thérapeutique très intéressante dans les infections à SARM.



Photographie N° 11: Détermination de la CMI des souches SARM par E-test.

6. Détection du gène *mec A* par PCR

6.1. Mesure des concentrations et puretés des extraits d'ADN

Le **tableau N° 8** enregistre les concentrations d'ADN et celui du ratio **260/280**.

La pureté d'une solution d'acide nucléique est considérée comme acceptable lorsque le ratio A260 nm/A280 nm est compris entre 1,8 – 2,0. Un ratio supérieur à 2 révèle une contamination par ARN (**Desjardins et Conklin, 2010**).

Selon les résultats enregistrés nos extraits ont des ratios A260 nm/A280 nm compris entre 1,8 – 2,47 ce qui révèle une contamination peu importante par ARN.

Tableau N° 8: Concentrations et puretés des extraits d'ADN.

Echantillon	Concentration ng/ul	A260	A280	260/280
1	157	3,141	1,444	2,18
2	130	2,6	1,12	2,32
3	80,29	1,606	0,717	2,24
4	105,1	2,102	0,989	2,12
5	268,1	5,363	2,302	2,33
6	65,99	1,32	0,589	2,24
7	150,3	3,006	1,354	2,22
8	121,3	2,426	0,984	2,47
9	116,2	2,324	1,098	2,12
10	153,9	3,077	1,38	2,23
11	188,7	3,773	1,645	2,29
12	94,46	1,889	0,802	2,35
15	52,94	1,059	0,466	2,27
16	261,1	5,221	2,41	2,17
S1	153,7	3,073	1,366	2,25
S3	326	6,521	2,954	2,21
S4	59,24	1,185	0,507	2,34
S6	87,03	1,741	0,752	2,32
660	100,8	2,016	0,863	2,34
681	75,95	1,519	0,649	2,34
P18	81,59	1,632	0,874	1,87
Z	233,6	4,673	2,061	2,27
14	189,4	3,788	1,602	2,36
S2	172,5	3,451	1,432	2,41

6.2. Détection du gène *mec A*

La résistance à la méticilline détectée par les disques d'oxacilline et de céfoxitine est confirmée par la mise en évidence du gène *mec A* par PCR.

Parmi les 24 souches SARM étudiées, 21 souches (soit 87,5%) ont pu exprimer la présence du gène *mecA* indiquant que ce gène est responsable de la méticillino résistance chez ces souches (**Figure N°18**).

Cependant trois souches (soit 12,5 %) ne possèdent pas le gène *mecA*. Il s'agissait d'une résistance intermédiaire à la méticilline. D'autres mécanismes de résistance rares sont

impliqués, soit : une hyperproduction de pénicillinase pour les souches BORSA (BORderline SA), ou une résistance par diminution de la synthèse et/ou de l'affinité d'une des PLP pour les souches MODSA (MODified SA) ou bien une résistance par production de méticilline ou oxacilline qui a comme substrat privilégié la méticilline et l'oxacilline (**Hamdad et al., 2006 ; Quincampoix et Mainardi, 2001**).

L'expression phénotypique du gène *mecA* peut être variable et dépend d'autres gènes. Une particularité de la résistance à la méticilline est son expression phénotypique hétérogène. En effet, dans une population bactérienne présentant une résistance hétérogène, toutes les cellules possèdent les gènes de résistance à la méticilline, mais seules quelques bactéries parmi des milliers expriment cette résistance à la méticilline. L'inactivation des gènes auxiliaires *fem* dans les souches de SARM transformerait l'expression phénotypique de la résistance homogène à la méticilline en résistance hétérogène. De plus, de nombreux facteurs expérimentaux influencent le phénomène de la résistance hétérogène comme le PH, la concentration de NaCl, la température, l'osmolarité et la bétalactamine utilisée, ce qui complique la détection de la résistance en laboratoire par les méthodes traditionnelles (**Hamdad et al., 2006 ; Battard et al., 2005 ; Quincampoix et Mainardi, 2001**).

Vu l'expression de la méticillino résistance qui peut être hétérogène et dépendante des conditions de réalisation de la culture, plusieurs auteurs signalent que les techniques phénotypiques peuvent alors surestimer ou sous-estimer la fréquence ou le niveau de résistance. Or, toutes les souches de SARM produisent une protéine liant la pénicilline (PLP2a) dont le gène chromosomique est *mecA*. Ce gène n'est pas présent dans les souches sensibles à la méticilline (**Hammami et Mezghani, 2016 ; Hamdad et al., 2006 ; Battard et al., 2005 ; Quincampoix et Mainardi, 2001**).

Par conséquent, la détection génotypique du gène *mecA* est devenue le test référence pour la détection et la confirmation de la résistance à la méticilline (**Hamdad et al., 2006**).

Actuellement, les recommandations en matière de détection moléculaire de résistances importantes chez les Staphylocoques sont établies par la (CA-SFM 2017), qui note que la détection génotypique des gènes *mecA* par PCR doit être entreprise.

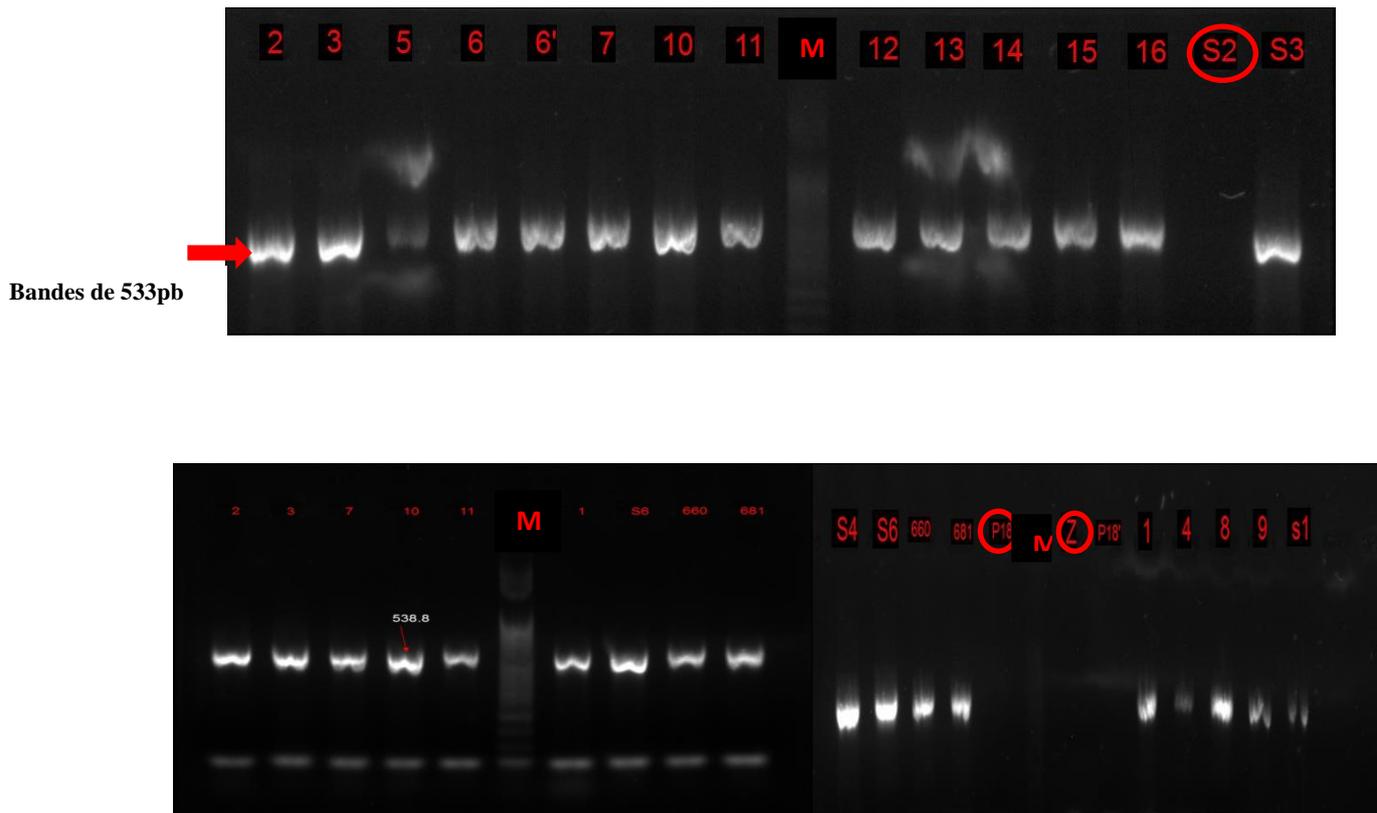


Figure N° 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification par PCR du gène *mecA* (533 bp).

7. Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis

7. Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis vis-à-vis des souches *S. aureus*

L'étude de l'activité antibactérienne de la propolis vis à vis de nos souches *S. aureus* a montré que EEP présentait une bonne activité antibactérienne vis à vis toutes les souches étudiées SASM et même les multirésistantes SARM.

L'**histogramme (N°20)** illustre les zones d'inhibition obtenues avec les souches SASM par les deux techniques : puits et disques.

Selon les résultats enregistrés (**figure N°20**) on a noté des zones d'inhibition avec la méthode de puits plus importants que celles des disques.

Ce résultat corrobore les travaux de (**Eshraghi et Valafar, 2008**) qui a noté une activité antibactérienne plus importante avec la méthode des puits car elle permet une meilleure diffusion de l'EEP.

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'action antibactérienne de la propolis (**Wojtyczka et al., 2013 ; Darwish et al., 2009 ; Uzel et al., 2005 ; Stepanovic et al., 2003**). Cette activité à

large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram positif et Gram négatif (de type anaérobie et aérobie) mais avec cependant une plus grande efficacité sur les souches Gram (+) Parmi les bactéries dont la croissance est inhibée, on retrouve principalement des *Staphylococcus* (le plus généralement *aureus*) (Lu LC et al., 2005 ; Dolci et Ozino, 2003).

De nombreuses études concernant les propriétés antibactériennes de la propolis confirment l'action de la propolis contre les bactéries à Gram positives et afficherait une activité beaucoup plus faible, voire nulle contre les bactéries à Gram négatives (Stepanovic et al., 2003).

Cette propriété est principalement due aux flavonoïdes et aux acides phénols, et particulièrement grâce à la galangine, à la pinocembrine, mais aussi aux acides caféique, férulique et salicylique (Saddiq etAbouwarda, 2016 ; Nallahalli et al., 2012 ; Muli et al., 2008 ; Stepanovic et al., 2003).

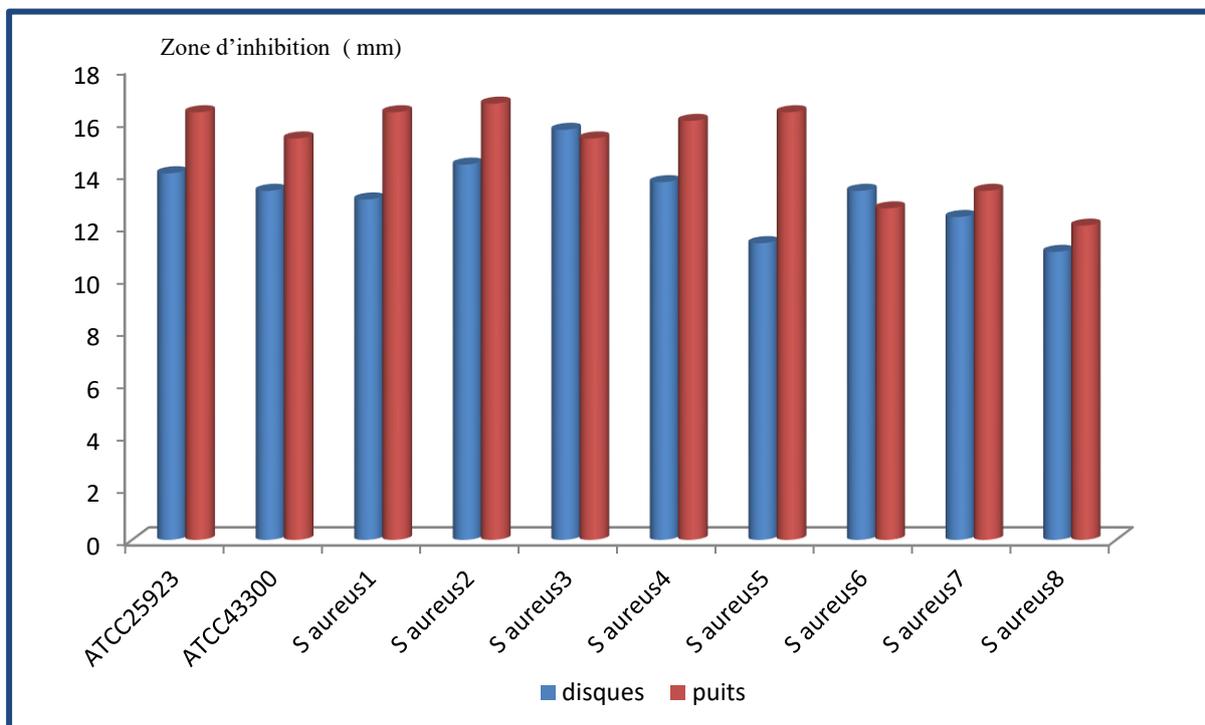


Figure N° 20 : Activité antibactérienne de la propolis vis-à-vis des souches *S. aureus*.

Plusieurs auteurs attribuent l'activité antimicrobienne de la propolis à sa composition hautement complexe et variable. (**Cardinault et al., 2012**) montrent que l'origine botanique dont sera issue la propolis constitue le principal facteur responsable de sa composition spécifique qui sera à l'origine de son activité antibactérienne.

Une étude algérienne a comparé la composition et l'activité de la propolis récoltée de quatre régions :Seraïdi, Chetaïbi, Berrahal et El-Bouni. Les résultats ont révélé une variabilité dans les teneurs des composés phénoliques et de l'activité antimicrobienne de la propolis en fonction des régions. En effet, la propolis des régions de Seraïdi et de Chetaïbi présentent les plus fortes teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux et par voie de conséquence les activités antimicrobiennes les plus élevée comparativement à celles des régions de Berrahal et El-Bouni. Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux varient en fonctions des régions et des pays (**Nedji et Loucif, 2014**).

Différentes études mécanistiques suggèrent que la propolis et/ou ses composés pourraient inhiber la croissance bactérienne par blocage de la division cellulaire, par une désorganisation du cytoplasme, par une inhibition de la synthèse protéique ou par une inhibition du processus d'adhésion (**Cardinault et al., 2012 ; Farooqui et Farooqui, 2010**).

D'après une étude japonaise, la propolis inhiberait la croissance bactérienne en bloquant la division cellulaire et en détruisant la paroi bactérienne, et ceci principalement sur les bactéries à GRAM + (**Cardinault et al., 2012**).

En plus de son activité antibactérienne très intéressante la propolis a une activité immuno-modulatrice par la production de macrophages. C'est le CAPE, acide phénéthylcaféique, qui seraient à l'origine de cette activité immuno-modulatrice. La propolis permet de stimuler la réponse immunitaire en activant certains gènes qui contribuent à la reconnaissance de micro-organismes.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont tenté d'évaluer cette activité. Il s'est avéré que la propolis permet de moduler la synthèse des cytokines, l'activité et la mobilité des macrophages et des lymphocytes. Les chercheurs ont supposé plusieurs mécanismes et voies d'induction. D'une manière générale, la propolis stimule l'immunité innée par activation des

macrophages, mais diminue une partie de l'immunité acquise par diminution de la différenciation des lymphocytes (Sforcin, 2007).

7.2 Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoides de la propolis

L'histogramme (N°21) illustre les zones d'inhibition de l'EEP et des flavonoides extraites de ce dernier.

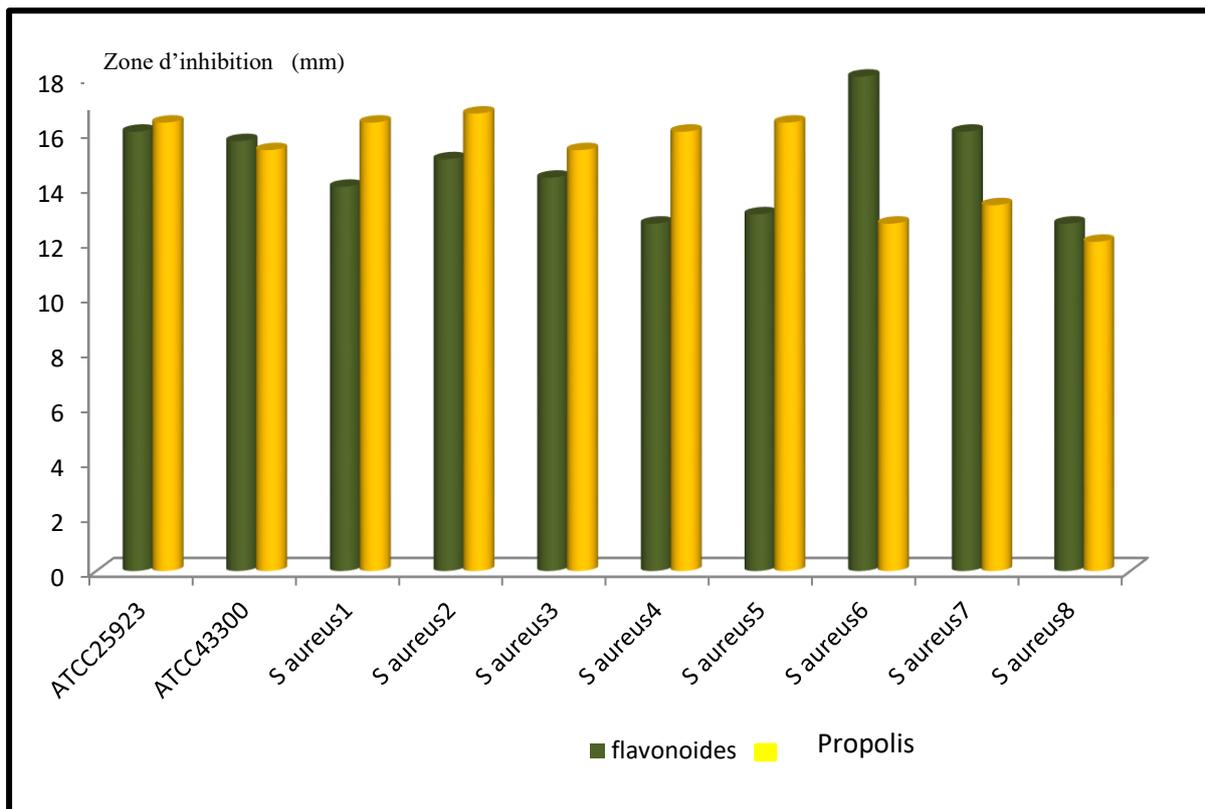


Figure N° 21: Activité antibactérienne des flavonoides de la propolis.

On a noté des zones d'inhibition assez importantes à similaires à celles enregistrées avec EEP par les deux techniques (puits et disques) mais les valeurs atteignent pas la signification statistique.

(Bonvehi *et al.*, 1994) signale que jusqu'à présent, aucun composant de propolis n'a montré une activité antibactérienne supérieure à celle de l'extrait brut. Certains auteurs attribuent l'activité antimicrobienne de la propolis à sa composition hautement complexe et variable, et les données recueillies jusqu'à présent suggèrent qu'elle peut être liée à de multiples cibles, avec plusieurs constituants agissant en synergie (Scazzocchio *et al.*, 2006).

Les auteurs s'attendaient en réalité à mesurer des activités beaucoup plus importantes pour des composés purs, ce qui suggère que l'activité antibactérienne de la propolis est certainement due à une interaction synergique de ces constituants.

Ces précédents résultats sont en accord avec ceux de **(Kujumgiev et al., 1993)** pour lesquels un seul constituant ou une seule famille de constituants ne peuvent à eux seuls expliquer l'activité antibactérienne d'une propolis. Les combinaisons de composés, qui agissent de façon synergique, observées dans ce type de mélanges complexes, sont donc essentielles pour leurs propriétés biologiques. **(Kujumgiev, 1999)** relève aussi jusqu'à ce jour, aucune recherche sur l'activité antibactérienne des propolis, ne peut démontrer qu'un seul constituant posséderait une activité supérieure à celle de l'extrait total.

7.3 Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis vis à vis des souches SARM

L'histogramme (N°22) illustre les résultats de l'activité antibactérienne de la propolis vis-à-vis des souches SARM selon les deux techniques puits et disques.

Les résultats enregistrés montrent que la propolis testée a un effet antibactérien significatif vis-à-vis de toutes les souches multirésistantes SARM étudiées.

Nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont enregistré une activité antibactérienne de la propolis vis-à-vis des SARM **(Saddiq et Abouwarda, 2016 ; Wojtyczka et al., 2013 ; Darwish et al., 2009 ; Sepanovic et al., 2003)**.

Certaines études ont montré que des souches résistantes, voire multirésistantes aux antibiotiques, étaient sensibles à la propolis **(Raghukumar et al., 2010)**. Il a également été montré que la propolis, lorsqu'elle est prise en association avec certains antibiotiques, augmente leur efficacité (streptomycine, ampicilline, gentamycine, cloxacilline...) **(Sforcin, 2011 ; Fernandes Junior et al., 2005)**.

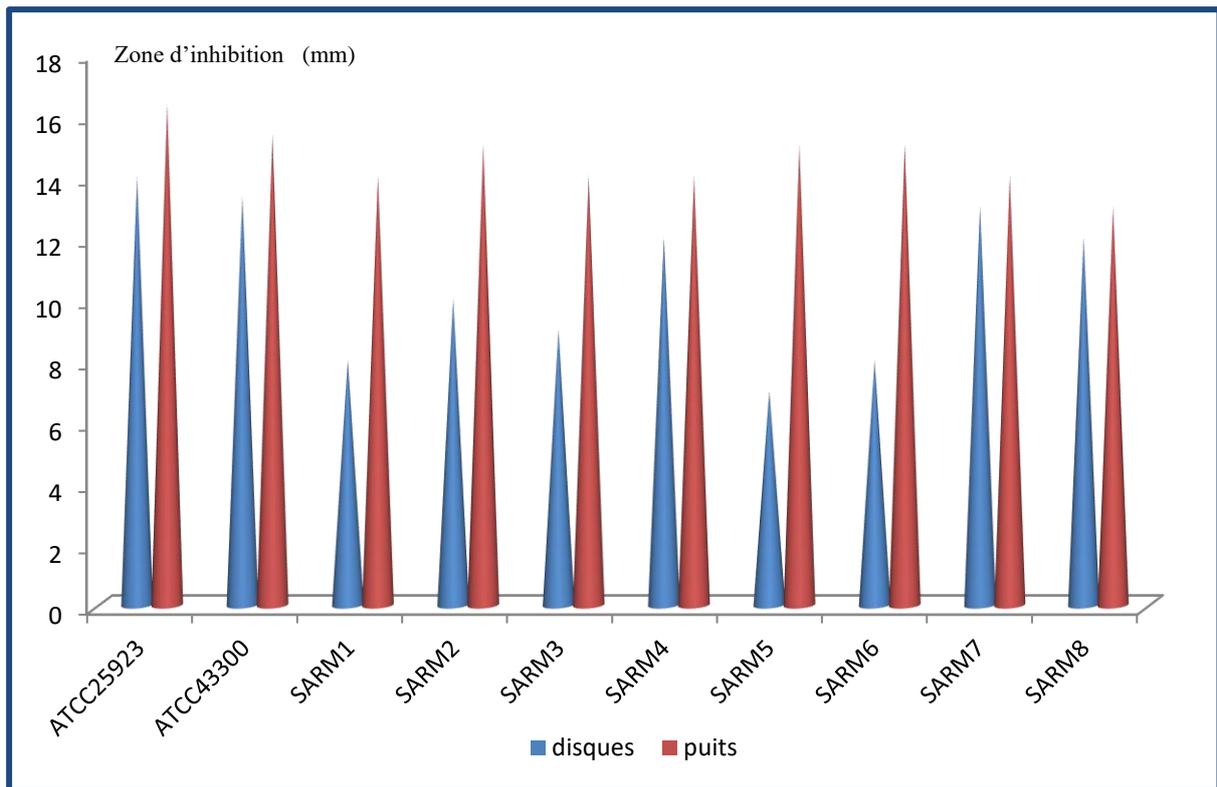
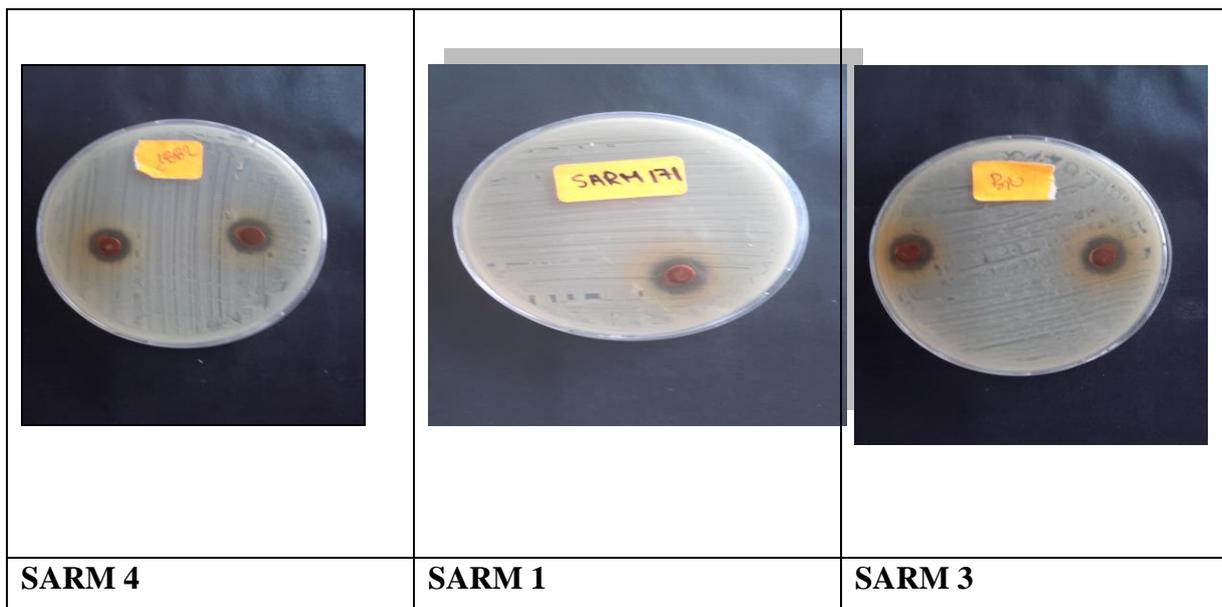
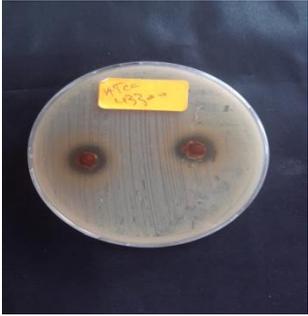
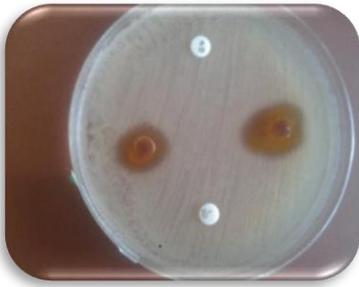
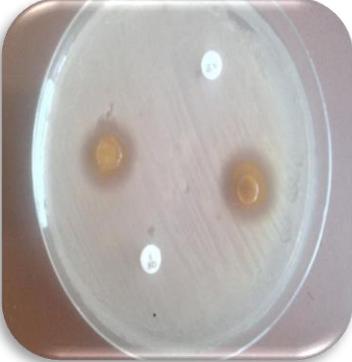


Figure N°22: Activité antibactérienne de la propolis vis à vis des souches SARM selon deux méthodes puits et disques.

Plusieurs auteurs signalent que la propolis stimule l'activité des phagocytes et dégrade la paroi des bactéries cibles, notamment les *S. aureus* et SARM (Alwali et al., 2012 ; Farooqui et Farooqui , 2010).



		
ATCC43300	ATCC43300	ATCC 252923.
		
SARM 6 ATB: P OX Propolis	SARM 1 ATB: P OX E propolis	SARM 3 ATB: AMP OX Propolis

Photographie N° 12 : Activité antibactérienne de la propolis comparée à celle de certains antibiotiques.

7.4 Détermination de la CMI et la CMB de la propolis

L'évaluation des pouvoirs bactéricides et bactériostatiques de la propolis, a été effectuée en utilisant la technique de micro-dilution sur microplaque et macrodilution sur milieu gélosé. Les CMI sont déterminées après observation des cultures (**photographie N°13**). La CMB a été déterminée par comparaison à une boîte témoin ensemencée avec différentes dilutions de l'inoculum bactérien (**photographie N°14**).

Tableau N° 9: CMI et CMB de l'EEP testé sur les souches SASM.

Souches	SASM 1	SASM 2	SASM 3	Contrôle
CMI mg/ml	0,1	1	1	0,1
CMB mg/ml	1	10	10	1

Contrôle souche ATCC25923

SASM : *S. aureus* sensible à la méticilline

Tableau N° 10 : CMI et CMB de l'EEP testé sur les souches SARM.

Souches	CMI mg/ml	CMB mg/ml
SARM1	1	10
SARM3	1	10
SARM4	1	10
SARM6	0,1	1
SARM8	1	10
SARM11	0,1	1
SARM 12	0,1	1
SARM13	1	10
SARM15	0,1	1
SARM16	1	10
Contrôle	1	10

Contrôle ATCC 433300

Les deux **tableaux (N°7 et 8)** donnent les valeurs des CMI et CMB de la propolis pour les souches SASM et SARM testées. Le pouvoir bactéricide ou bactériostatique est confirmé à partir du rapport CMB/CMI.

La comparaison du nombre de colonies sur la strie, à la dilution 10^{-4} de la boîte A avec celle d'une strie de la boîte B, a permis de déterminer les CMB de l'EEP pour les souches SASM et SARM.

Les valeurs moyennes des CMI et CMB contre les souches de SASM étaient successivement de $0,55 \pm 0,45$ mg / ml et de $5,5 \pm 4,5$ mg / ml. Dans le cas des souches de SARM, la CMI et la CMB étaient les suivantes: $0,67 \pm 0,41$ mg / ml et $6,72 \pm 4,16$ mg / ml.

Ces valeurs d'activité antibactérienne vis-à-vis des SASM semblent conformes à celles décrites par plusieurs auteurs. Dans une étude portée sur deux types de propolis algérienne récoltés de deux régions (**Segueni et al., 2006**) a enregistré une CMI de 60 à 1200 $\mu\text{g/ml}$ pour une propolis récolté de Benibelaid.

Mais en ce qui concerne les SARM, la propolis étudiée semble moins active que celles rapportées pour une propolis française (**Boisard et al., 2016**) (CMI entre 30 et 97 $\mu\text{g/ml}$) et (**Grange et Davey, 1990**) (CMI = 188-375 $\mu\text{g/ml}$).

L'activité antibactérienne de la propolis étudiée contre les SARM et les SASM peut être comparée à celle attribuée à une propolis polonaise montrant des CMI de $0,59 \pm 0,21$ mg/ml pour les SASM et $0,52 \pm 0,2$ mg / ml pour les SARM (**Wojtyczka et al., 2013**).

Par ailleurs elle semble plus importante que celle d'un extrait similaire obtenu à partir d'une propolis jordanienne (CMI = 4,7 mg/ml contre les SARM) (**Darwish et al., 2009**).

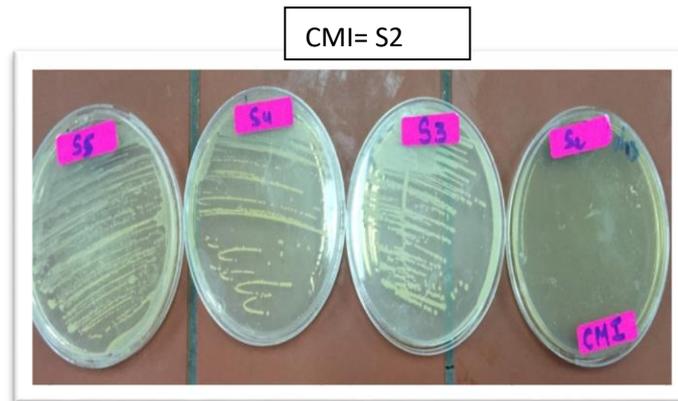
Nos résultats de la CMI de propolis sur *S. aureus* (0,585 mg /ml) sont meilleurs que ceux rapportés par (**Hegazi et Abd El Hady, 2002**) en Egypte qui étaient 2,2 et 2,6 mg / ml, respectivement. Cependant, (**Moreno et al., 1999**) ont signalé que la propolis collectée en Argentine avait une valeur de CMI inférieure à 0,04 mg /ml contre la même souche.

La différence est liée aux différents constituants de propolis collectées dans différentes régions géographiques (**Darwish et al., 2009**).

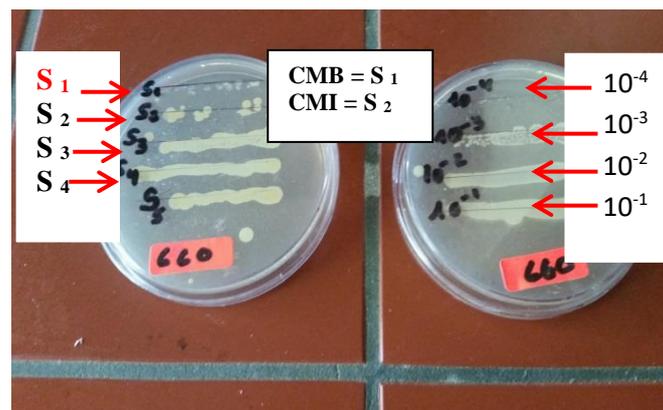
La composition chimique de la propolis est très complexe et dépend de la flore dans les zones où il a été recueilli (**Bankova et al., 2000**).

Bien que les propriétés antibactériennes de la propolis ont fait l'objet de nombreuses études, il est difficile de comparer les résultats, en raison des différentes compositions de propolis et / ou différentes méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de la propolis (**Stepanovic et al., 2003 ; Drago et al., 2000**).

Selon (Traoré *et al.*, 2012), lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance antibactérienne est inférieure ou égal à quatre (≤ 4) cette dernière est qualifiée de substance bactéricide. Cependant si ce rapport est supérieur à quatre (> 4), alors elle est dite bactériostatique. Ainsi, EEP étudié a effet bactériostatique sur toutes les souches SASM et SARM étudiées.



Photographie N° 13: Exemple de CMI de l'EEP vis-à-vis d'une souche SARM mesurée par macrodilution.



Photographie N° 14: CMB de l'EEP vis-à-vis d'une souche SARM

8. Synergie entre la propolis et des antibiotiques antistaphylococciques

L'effet combiné *in vitro* de l'EPP et 12 antibiotiques (FOX, OX, K, TOB, GEN, E, PR, CD, VA, CIP, TE, SXT) appartenant à différentes familles a été testé pour déterminer s'il existe une éventuelle synergie.

Les résultats obtenus sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition pour les différentes combinaisons d'EPP et antibiotiques vis-à-vis des souches testées comparées aux diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques testés isolément (**photographie N°15**).

Cette analyse a révélé une synergie entre EPP et tous les antibiotiques testés pour toutes les souches SARM étudiées.

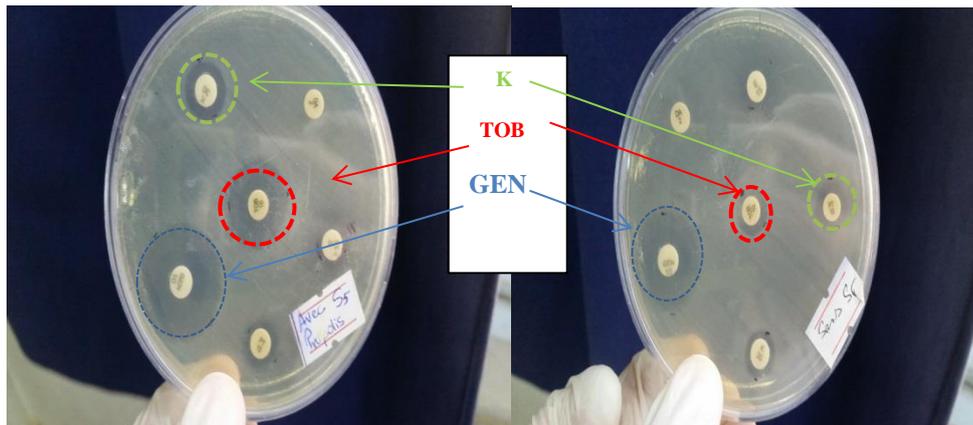
Dans notre étude, l'ajout d'EPP à une concentration égale à (0,25 mg /ml) dans le milieu a augmenté la sensibilité des souches de SARM à tous les antibiotiques.

La différence entre les zones d'inhibition de l'antibiotique seule et celle de l'antibiotique additionné à l'EPP est significative ($p < 0,05$) (**annexe N°3**) avec tous les antibiotiques testés sauf la clindamycine ($P^* = 0,109$) (**figure N° 24**). En revanche aucun cas d'antagonisme entre l'EPP et tous les antibiotiques testés n'a été enregistré.

Le meilleur effet combiné entre la propolis et les antibiotiques a été observé dans le cas de la TOB et FOX qui appartiennent aux β -lactamines et aminosides, pour lesquels les diamètres des zones d'inhibition de la croissance sur milieu MH avec addition d'EPP étaient plus grands de 3 à 4 mm que mesurés sur milieu MH sans EPP. L'effet le plus faible est enregistré avec la vancomycine (1mm) (glycopeptides).

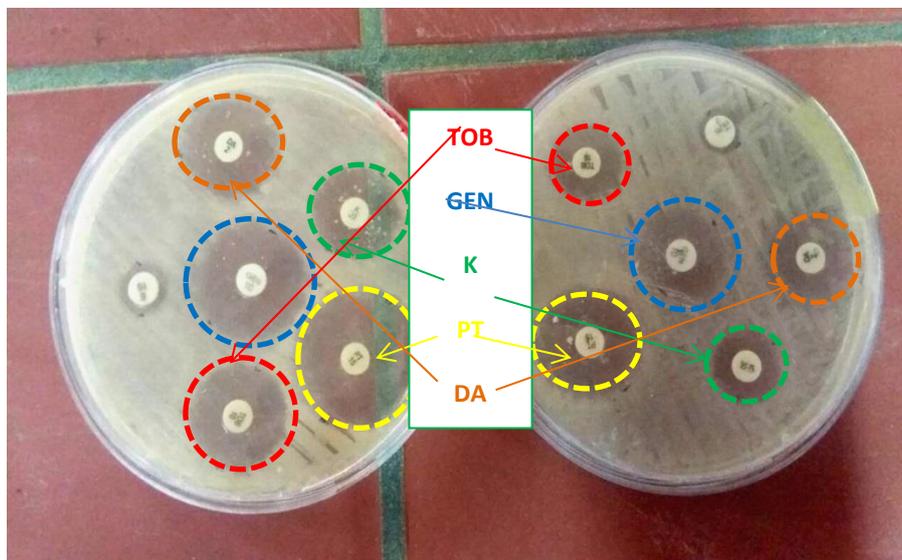
Selon (**Santos et al., 2002 ; Mirzoeva et al., 1997 ; Krol et al., 1993**) le mécanisme de l'activité antibactérienne de la propolis est complexe et peut être attribué à l'effet synergique de ses différents constituants actifs comme les composés phénoliques et les flavonoïdes. En effet, ces composés auraient la capacité d'augmenter la perméabilité de la membrane et d'inhiber la mobilité des bactéries, ce qui contribuerait à l'action antibactérienne de la propolis et à son synergisme avec les antibiotiques.

La galagine et l'acide caféique d'EEP sont des agents d'inhibition enzymatiques dans les bactéries (Koo et al., 2002). L'inhibition de l'ARN polymérase par les composés de la propolis a été vérifiée (Takaisi-Kikuni et Schilcher, 1994) et peut expliquer en partie la synergie de l'EEP avec les médicaments qui agissent en inhibant la synthèse protéique observée (Fernandes Junior et al., 2005).



a : avec EEP

b : sans EEP



a : avec EEP

b : sans EEP

Photographie N°15: Exemple de l'effet synergique de la propolis et antibiotiques.

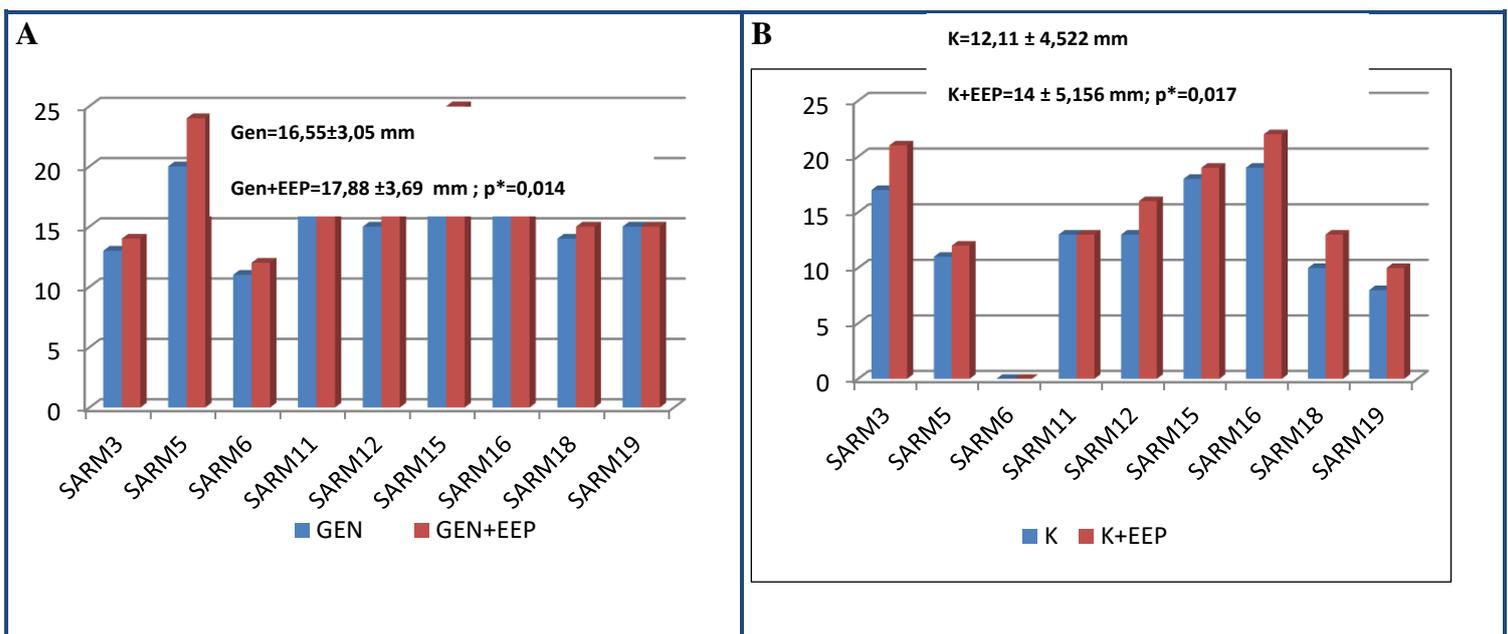
D'autres études *in vitro* confirment le synergisme entre la propolis et les antibiotiques : (Krolet *et al.*, 1993) ont décrit un effet synergique entre la propolis et les antibiotiques sur la croissance de *S. aureus*, mais qui était significative uniquement à une concentration de 600 µg/ml.

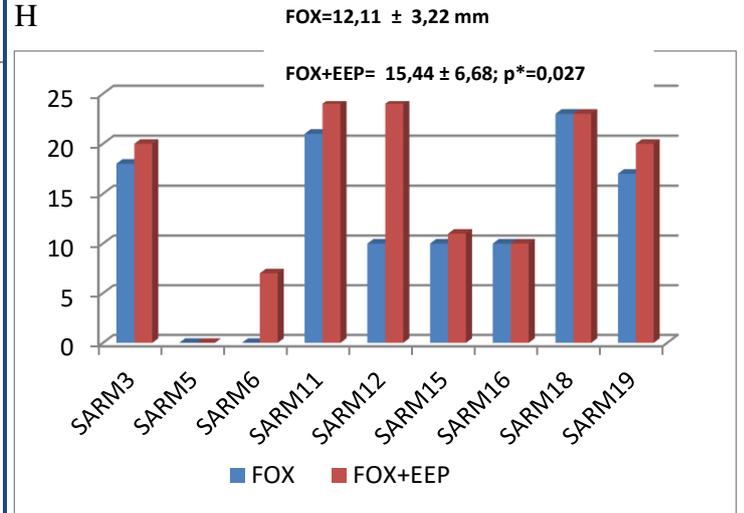
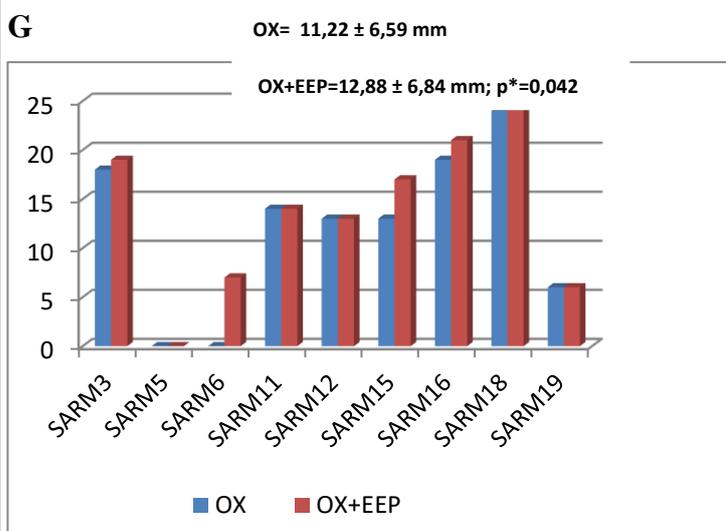
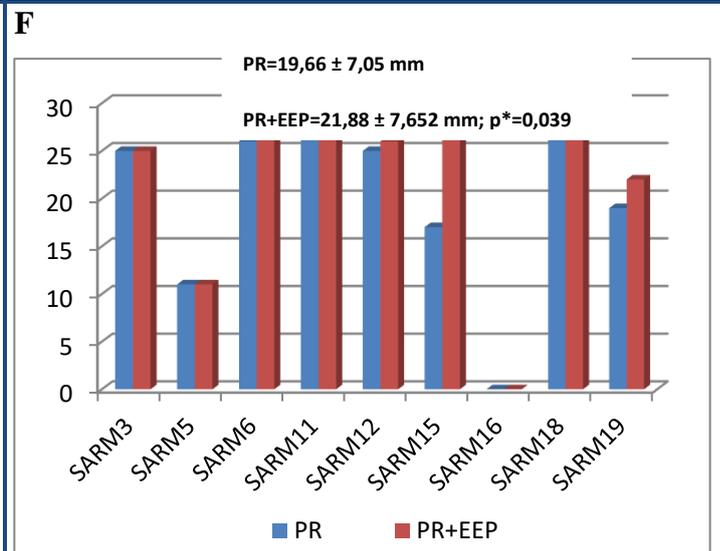
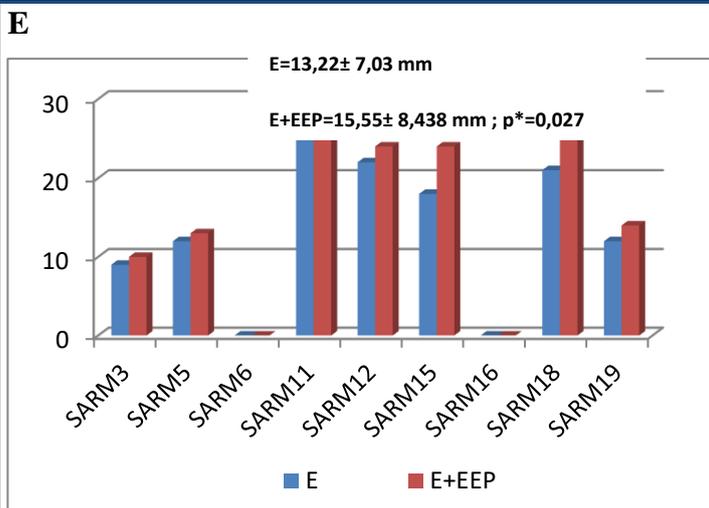
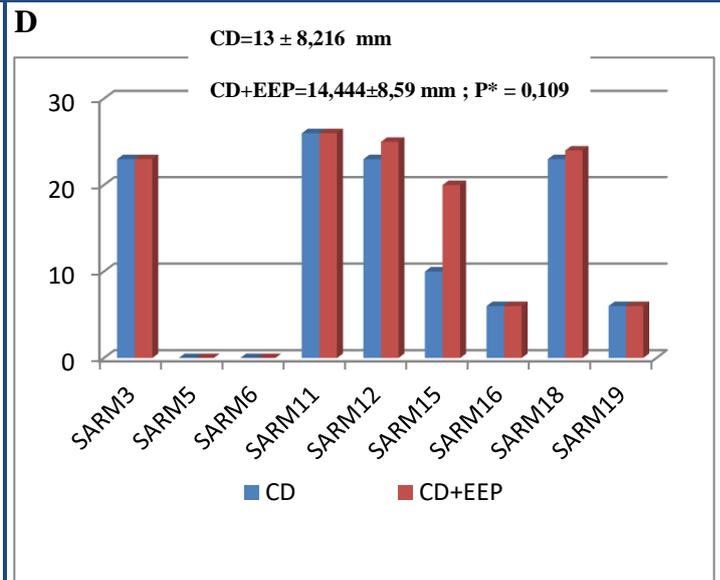
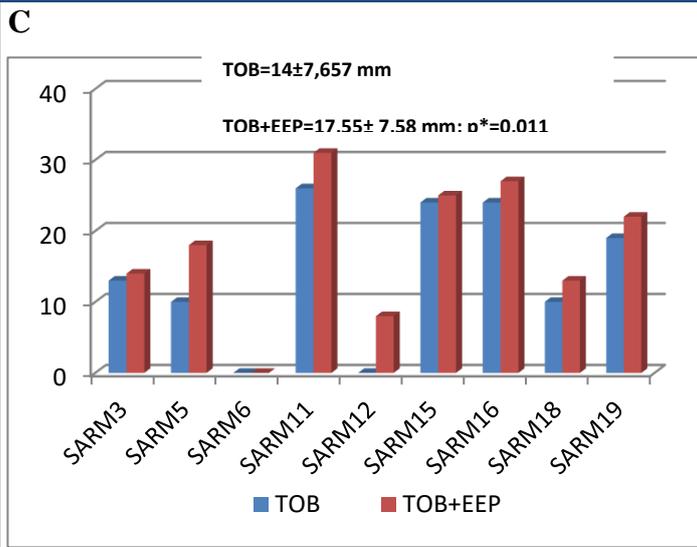
(Stepanovic *et al.*, 2003) ont montré qu'il existait des actions antibactériennes synergiques de la propolis avec l'ampicilline, la ceftriaxone et la doxycycline contre *S. aureus* et que la résistance des souches bactériennes aux antibiotiques n'avait pas d'influence sur leur sensibilité vis à vis de l'extrait de la propolis.

La synergie entre l'EEP et les antibiotiques, avec une réduction nette des valeurs de CMI pour plusieurs souches, a également été rapportée (Stepanovic *et al.*, 2003; Scazzocchio *et al.*, 2006).

Des études de synergisme *in vitro*, menées par (Fernandes Junior *et al.*, 2005) ont révélé des effets synergiques des EEP avec le chloramphénicol, la gentamicine, la netilmicine, la tétracycline, la vancomycine et la clindamycine.

L'EEP est connu pour contenir un certain nombre de composés antimicrobiens, tels que les polyphénols et les flavonoïdes. Ceci suggère que la synergie avec les antibiotiques observée dans cette étude pourrait être attribuée à de tels composés. Certains de ces composés, comme les polyphénols, se sont avérés exercer leur action antibactérienne par le biais de perturbations membranaires. Cette perturbation de la membrane cellulaire couplée à l'action des β-lactames sur la transpeptidation de la membrane cellulaire pourrait conduire à un effet antimicrobien accru (Wojtyczka *et al.*, 2013).





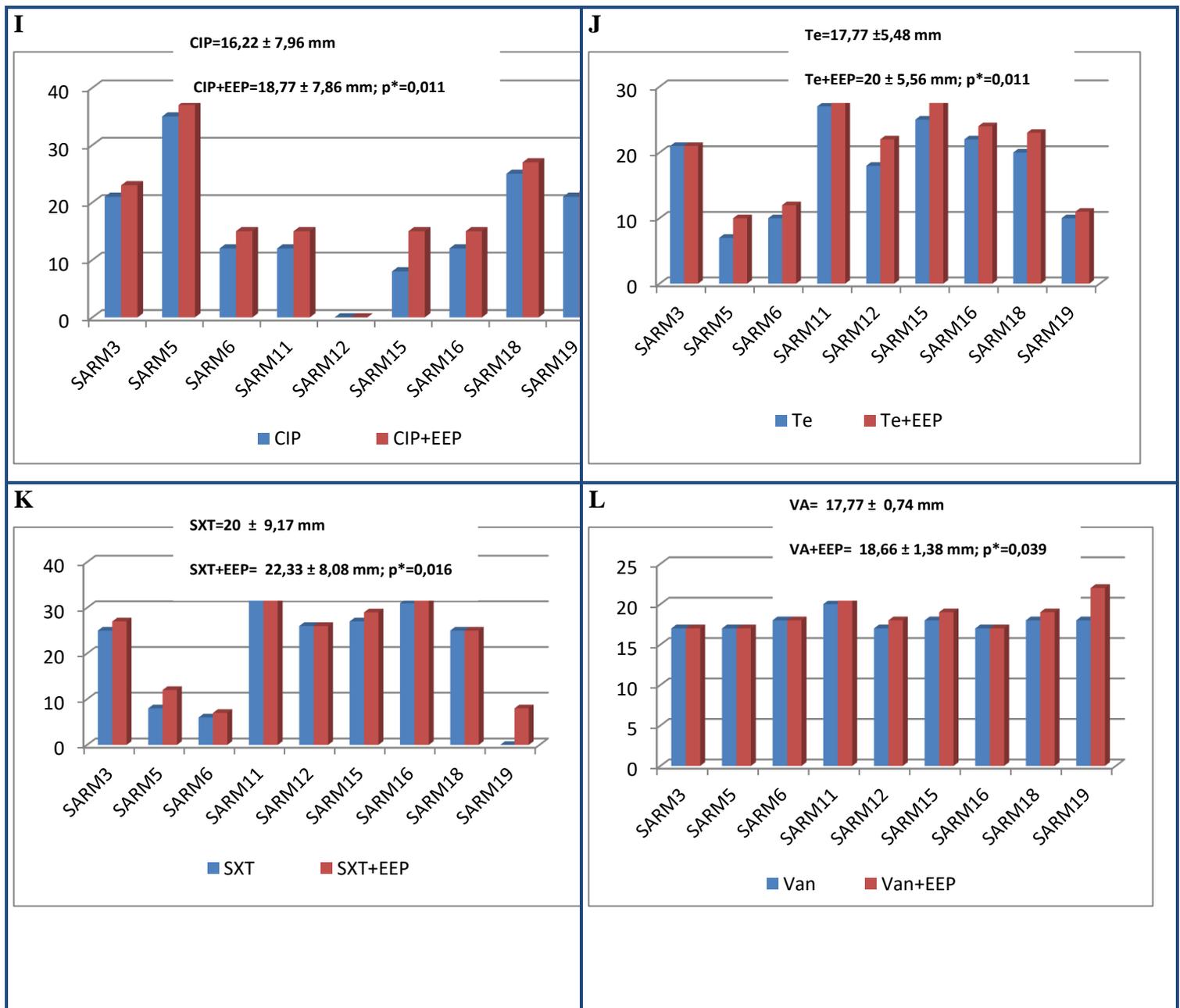


Figure N° 23 : Effet antibactérien de 12 antibiotiques seuls et l'effet combiné de l'antibiotique avec EEP vis-à-vis de 9 souches SARM

(A) Gen et Gen+EEP

(B) K et K+EEP

(C) TOB et TOB+EEP

(D) CD et CD+EEP

(E) E et E+EEP

(F) PR et PR+EEP

(G) OX et OX+ EEP

(H) FOX et FOX+EEP

(I) CIP CIP+EEP

(J) Te et Te+EEP

(K) SXT et SXT+EEP

(L) VA et VA+EEP

* Test de rang signé de Wilcoxon avec $p < 0,05$.

La synergie avec tous les antibiotiques testés et l'absence d'antagonisme entre l'EEP et tous les antibiotiques testés sont des observations importantes de la présente étude. Cependant, nous considérons que ceux-ci sont des résultats préliminaires mais on doit mesurer la CMI de EEP en combinaison avec l'antibiotique.

Ainsi, les résultats enregistrés dans la présente étude étaient encourageants bien que des études cliniques contrôlées soient nécessaires pour définir l'efficacité réelle. Ces études pourraient déterminer l'utilisation médicale potentielle de la propolis en combinaison avec certains antibiotiques contre les *Staphylococcus aureus*. Puisque les bactéries peuvent être résistantes à plusieurs antibiotiques, la synergie rapportée ici est pertinente et la propolis peut constituer une alternative pour le traitement de ces pathogènes.

Une mauvaise utilisation des antibiotiques a mené à l'apparition de bactéries résistantes, notamment les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM). Il est donc important de développer de nouvelles classes d'antibiotiques ayant de nouvelles cibles, afin de contrer la résistance bactérienne.

Le principal objectif de cette thèse visait à évaluer l'activité antibactérienne de la propolis vis à vis les bactéries résistantes (SARM). Pour ce faire, nous avons sélectionné des souches SARM isolées cliniquement puis étudié leur profil de résistance.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a permis de détecter **34** souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline **SARM** soit (21,11 %) provenant de différents prélèvements : pus, hémocultures, urines, prélèvements vaginaux et matériels (cathéters). L'âge avancé et le sexe sont des facteurs de risque d'acquisition des SARM.

L'analyse globale du profil de résistance des SARM aux antibiotiques confirme le caractère multirésistant de ces bactéries aux différentes familles d'antibiotiques surtout : aminosides, macrolides et fluoroquinolones.

L'analyse des extraits d'ADN de 24 souches SARM testées par amplification révèle la présence du gène *mecA* chez 21 souches indiquant que ce gène est responsable de la méticillino-résistance chez ces souches.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la propolis a montré que l'EPP présente une bonne activité antibactérienne vis à vis toutes les souches étudiées SARM et même les multirésistantes SARM. Ceci est due probablement à sa composition hautement complexe et variable. En effet la propolis a de multiples cibles, avec plusieurs constituants agissant en synergie.

L'ajout de l'EPP à une concentration égale à (0,25 mg /ml) dans le milieu a augmenté la sensibilité des souches de SARM à tous les antibiotiques testés (la différence est significative $p < 0,05$). Cette analyse a révélé une synergie entre EPP et tous les antibiotiques testés pour toutes les souches SARM étudiées. En revanche aucun cas d'antagonisme entre l'EPP et tous les antibiotiques testés n'a été enregistré.

La synergie rapportée ici est pertinente et la propolis pourrait être utilisée pour augmenter la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Ces résultats sont très importants car la résistance aux antibiotiques continue à augmenter alors que le développement de nouveaux agents antibiotiques, lui, ralenti.

Dans le même ordre d'idée, il serait pertinent de développer des extractions alternatives, faisant recours à des solvants non toxiques, permettant d'obtenir des extraits adaptés à un usage thérapeutique.

Ainsi, les résultats obtenus dans la présente étude étaient encourageants bien que des études cliniques contrôlées soient nécessaires pour définir l'efficacité réelle. Ces études pourraient déterminer l'utilisation médicale potentielle de la propolis seul ou en combinaison avec certains antibiotiques contre les infections à staphylocoques.

En fin la surconsommation d'antibiotique et la diffusion de ces bactéries par le non-respect des règles d'hygiène sont les deux principaux facteurs de cette résistance. Pour cela on doit prendre des mesures à tous les niveaux de la société pour réduire l'impact et limiter la propagation des résistances.

Au niveau individuel

- ✓ n'utiliser les antibiotiques que s'ils sont prescrits par un professionnel de santé qualifié;
- ✓ toujours respecter les conseils du soignant lorsque vous utilisez des antibiotiques;
- ✓ prévenir les infections en vous lavant régulièrement les mains (**figure N° 26**) (**annexe N° 6**) et en évitant les contacts proches avec des malades.

Au personnel de la santé

- ✓ Prendre des mesures d'hygiène : lavage des mains, stérilisation et désinfection correcte du matériel, renouvellement des sondes urinaires et des cathéters périphériques ;
- ✓ Adapter l'antibiothérapie à un antibiogramme tout en respectant la durée du traitement et la dose d'antibiotique.

A la population

- ✓ Eviter l'automédication en vue d'une diminution de la fréquence des souches de SARM en milieu communautaire ;
- ✓ Consulter les médecins en vue d'une antibiothérapie correcte ;

- ✓ Respecter la prise des antibiotiques et les doses prescrites et la durée.

Les responsables politiques

- ✓ Veiller à mettre en place un plan d'action national robuste pour endiguer la résistance aux antibiotiques;
- ✓ Améliorer la surveillance des infections résistantes aux antibiotiques;
- ✓ Renforcer les politiques, les programmes et la mise en œuvre des mesures de prévention et de lutte contre les infections;
- ✓ Diffuser les informations sur l'impact de la résistance aux antibiotiques.

A

Alioua M. 2015. Les Staphylocoques : Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la méticilline. Thèse de doctorat université Badji Mokhtar p136.

Allion A., 2004. Environnement des bactéries et sensibilités aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer *in situ* l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agroalimentaires.

AL-Waili N. 2012. Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans*. Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *International Journal of Medical Sciences*, 9, 793–800.

Antri K., Rouzic N., Boubekri I., Dauwalder O., Beloufa A., Ziane H., Djennane F., Neggazi M., Benhabyles B., Bes M., Tazir M., Étienne J., Ramdani-Bouguessa N. 2010. Forte prévalence des infections communautaires et nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et portant le gène de la leucocidine de Panton-Valentine dans l'Algérois. *J.Patbio*. Vol 58, n° 2 : e15-e20.

Aubry-Damon H., Legrand P., Brin-Buisson P., et al. (1997). Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: roles of an infection control program and changes in aminoglycoside use. *Clin Infect Dis*. 25: 647-53.

Avril J.L., Dabernath H., Denis F. et al.(2000). Bactériologie clinique. Paris : Ellipses, p 602.

B

Bankova V.S., de Castro S.L., Marcucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31: 3–15.

Batard E., Ferron-Perrot C., Caillon J., Potel G. (2005). Antibiothérapie des infections causées par *Staphylococcus aureus*. *Médecine thérapeutique*. 11 (6):395-403.

- Bogdanov S., Gallmann P., Stangaciu S., Cherbuliez T. (2016).** La propolis: un antibiotique naturel. ALP forum N° 41f. Produits apicoles et santé, p31-35.
- Bogdanov S., Bankova V. (2016).** Propolis: Origin, Production, Compostion. The Propolis Book, Chapter 1. Bee Product Science, www.bee-hexagon.net, April 2016.
- Boisard S., Le Ray A.M., Kempf M., Cassisa V., Flurin C., Richomme P. (2016).** Propriétés antibactériennes d'extraits de propolis contre des souches de *Staphylococcus aureus* sensibles ou résistantes à la méticilline. Journées Bac Tou Bac, l'innovation face au défi bactérien.
- Bone R. C. (1992).** Toward an epidemiology and natural history of sirs (systemic inflammatory response syndrome). JAMA. 268: 3452–5.
- Bonvehí J. S., Coll F. V., Jordà R. E. (1994).** The Composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics. Journal of the American Oil Chemists' Society.71: 529–532.
- Bordon J., Master R. N., Clark R. B., Duvvuri P., Karlowsky J. A., Ayesu K., et al. (2010).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistance to non-beta-lactam antimicrobials in the United States from 1996 to 2008. Diagn Microbiol Infect Dis. 67 : 3
- Boukhatem M. N., Ferhat M. A., Hadj Mohamed R., Lalaoui N. (2015).** Prevalence and antibiotic resistance of Staphylococci isolated from Kolea hospital (ALGERIA). J Fundam Appl Sci, 7(2): 260-270.
- Breurec S., Zriouil S. B., Fall C., et al. (2011).** Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: emergence and spread of atypical clones. Clin Microbiol Infect. 17 : 160-5.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3 ème édition, Techniques & Documentation, Paris.
- Bryskier A. (1999).** Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses Edition Marketing S.A, p 947-970.

Buys H. (2005). Antibactériens (Antibiotiques). Module de Base 4. Pharmacologie générale, bases de thérapeutique générale.

C

CA-SFM 2017. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations 2017. V.2.0 Mai. CA-SFM EUCAST /2017. P 52-60.

CA-SFM 2015. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations 2015. V.2.0 Mai. CA-SFM EUCAST /2017. P 55-63.

Cardinault N., Cayeux M.O., Percie du Sert P. (2012). La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*. 10: 298–304.

Couderc C., Jolivet S., Thiébaud A. C.M., Ligier C., RemyL., Alvarez A. S., Lawrence C., Salomon J., Herrmann J.L., Guillemot D. 2014. Consommation de fluoroquinolones et risque d'acquisition de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline en service de Médecine Physique et Réadaptation : une étude cas-cas-témoins nichée. *Symptaph : Des infections staphylococciques à la biologie du microorganisme* .Colloque à l'ENS Lyon les 20 et 21 octobre 2014. P 46.

Courvalin P. (2007). La résistance des bactéries aux antibiotiques : Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull. Acad. Vét. France*. Tome. 161 N° 1, p7 -12.

D

Darrigol J. (2007). L'apithérapie miel –pollen- propolis- gelée royale.

Darwish R. M., Abu Fares R. J., Abu Zarga M. H., Nazer I. K (2009). Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 9 (36): p 5966-5974.

Daurel C., Leclercq R. (2008). L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires*. Vol 38, N°407, p 81-90.

Denis F., Cécile P., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2007). *Bactériologie Médicale technique usuelles*. Edition Masson. p 252-264.

Desjardins P., Conklin, D., (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of NucleicAcids. J. Vis. Exp. Nov 22(45), p 2565.

Djennane F., Bachtarzi M. A., Benbouzide D., Abdelaziz N., Ziane H., Ahnia S., Tazir M. (2015). Evolution des bactéries multi-résistantes au CHU Mustapha: Bilan 2012-2014. 8ème journée Nationale d’Hygiène Hospitalière et de lutte contre les infections associées aux soins. P 36.

Djoudi F., Benallaoua S., Bonurab C., Touatia A., Mammina C. (2014). *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline chez des mères et des enfants hospitalisés à Alger : prédominance du clone virulent européen. Médecine et maladies infectieuses. 44 : p 232–237.

Dodémont M., Vandendriessche S., Deplano A., Nonhoff C., De Mendonca R., Roisin S., Denis O. (2014). Epidémiologie moléculaire de *Staphylococcus aureus* portant les gènes codant pour la leucocidine de Panton Valentine en Belgique de 2010 -2014. Sympostaph : Des infections staphylococciques à la biologie du microorganisme.Colloque à l’ENS, Lyon les 20 et 21 octobre 2014. p15.

Dolci P., Ozino O.I. (2003). Study of the *in vitro* sensitivity to honey bee propolis of *Staphylococcus aureus* strains characterized by different sensitivity to antibiotics. Ann Microbiol 53: 233–243.

Donadieu Y. (2008). La propolis. Paris : Ed Dangles. P 90.

Donadieu Y. (1993). La propolis thérapeutique naturelle. 4ème Edition, Paris, Maloine Edit., p 61.

Donnio P. Y., Gaschet A., Cady A. (2010). Actualités du traitement antibiotique des infections à *Staphylococcus aureus*. mt, vol. 16, N° 3, p 244-251.

Drago L., Mombelli B., De Vecchi E., Fassina M.C.,Tocalli, L., Gismondo M.R. (2000). *In vitro* antimicrobial activity of propolis drug extract. J. Chemother. 12, p 390–395.

Dumitrescu O., Dauwalder O., Boisset S., Reverdy M.E., Tristan A., Vandenesch F. (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. Les points-clés en 2010. Med Sci (Paris). 26 : 943–949.

E

EARS-Net. (2011). Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARSNet/database/Pages/table_reports.aspx

Elhamzaoui S., Benouda A., Allali F., Abouqual R., Elouennass M. (2009). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated in two university hospitals in Rabat, Morocco. *Med Mal Infect.* Dec;39(12):891-5.

Elhani D. (2011). L'émergence de la résistance aux antibiotiques annonce-t-elle le retour des âges sombres?. *Ann BiolClin2011 ; 69 (6) : 637-46.*

Eshraghi S., ValafarS. (2008). Evaluation of inhibitory effects of Iranian propolis against filamentous bacteria. *Pak j Med Sci.* Vol 24, N° 1. p56-60.

F

Farooqui T., Farooqui A. (2010). Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Curr Nutr Food Sci* 6: p186–199.

Felten A., Casin I. (2003). Détection simple des staphylocoques résistants à la méticilline grâce à un disque de céfoxitine ou de la tamoxef. *Revue française des laboratoires.* Vol 2003, N° 352, p 27-30.

Fernandes Júnior A., Balestrin E.C., Betoni J.E.C., Orsi R.O., Cunha M. L. R., Montelli A.C. (2005). Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100 (5): p 563-566

Ferry T., Perpoint T., Vandenish F., Etienne J. 2005. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr infect Dis Rep.* 7 : 420-428.

G

Grange J. M., Davey R. W. (1990). Antibacterial Properties of Propolis (bee Glue). *Journal of the Royal Society of Medicine.*83: p159–160.

H

Hamdad F., Donda F., Laurans G., Canarelli B., Rousseau F., Biendo M., Thomas D., Eb F. (2006). Performances des différentes méthodes de détection de la résistance à l'oxacilline de souches atypiques de *Staphylococcus aureus*. Pathologie Biologie. Vol 54, n°8-9 : p447-452

Hammami A., Mezghani S. (2016). Antibiogramme CAS N°1. 1erworkshop Franco-Tunisien Tunis 11 et 12 novembre 2016.

Hart T., Shears P. (1999). Atlas de Microbiologie. Medicine-Sciences Flammarion. p 87-92.

Hegazi A.G., Abd El Hady F.K. (2002). Egyptian propolis: antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. Z Naturforsch. 57: P 395-402.

Herwardt L.A., Cullen J.J., French P., et al. (2004). Preoperative risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. Infect Control Hosp Epidemiol. 25: p481-484.

Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M., et al. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 9 : p486-93.

I

IWG-SCC.2009. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosomes element, *Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53(12): p. 4961-4967.

J

Jaton K., Greub G. (2007). PCR en microbiologie de l'amplification de l'AND à l'interprétation du résultat. RevMed. Suisse. Vol3: p 32181.

K

Katayama Y., Takeuchi F., Ito T., et al. (2003). Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the

staphylococcal cassette chromosome mec of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol.185 : p2711-22.

Klein E. Y., Van Boeckel T. P., Martinez E. M., Suraj Pant., Sumanth Gandra., Levin S. A., Herman Goossens., Ramanan Laxminarayan. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. PNAS Vol, 115 (15), E 3463-E3470.

Kluytmans J. A., Van Belkum H., Verbrugh. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* epidemiology underlying mechanisms and associated risks.Clin Microbial Rev. p505-520.

Koo H., Rosalen P. L., Cury J. A., et al. (2002). Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. Antimicrob Agents Chemother 46: p1302–1309.

Krell R. (1996). Value Added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin, N° 124. p55.

Krol W., Scheller S., Shani J., Pietsz G., Czuba Z. (1993). Synergistic Effect of Ethanolic Extract of Propolis and Antibiotics on the Growth of *Staphylococcus aureus*. Arzneimittel-Forschung Journal. 43: p 607–609.

Kujungiev A., Bankova V.I., Gnatova A., Popov S. (1993). Antibacterial Activity of Propolis, Some of Its Components and Their Analogs. Die Pharmazie An International Journal of Pharmaceutical Sciences.48 :p 785–786.

Kujungiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S. (1999). Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin.Journal of Ethnopharmacology.64: p 235–240.

L

Lebon A., Labout J.A., Verbrugh H.A., Jaddoe V.W.V., Hofman A., Wamel W., Moll H.A., Belkum A. (2008). Dynamics and Determinants of *Staphylococcus aureus* Carriage in Infancy: the Generation R Study. J. Clin. Microbiol. 46: p 3517-21.

LeBlanc L., Pépin J., Alary M.E. 2006. Fluoroquinolones and Risk for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Canada. Emerging Infectious Diseases Journal, Vol 12, N° 9, p 1398- 1405.

Leclercq R., Soussy C.J., Weber P., et al. (2003). Activité *in vitro* de la pristinaamycine vis-à-vis des staphylocoques isolés dans les hôpitaux français en 1999-2000. Pathol Biol. 51: p400-404.

Le Loir Y et Gantier M. (2010). *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. 1-3.

Le Minor L., Veron M. (1990). Bactériologie Médicale. Edition Médecine-Sciences Flammarion, Paris. p773-794.

Lévesque S. et al. (2012). Surveillance des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline isolées des bactériémies dans la province de Québec : rapport 2011-2012 , QINSP, p1-57.

Leyral G., Joffin J.N. (1998). Microbiologie technique 2 : Documentation technique. 2^{ème} Ed.- Bordeaux : CRDP d'Aquitaine. p 61-94, p137- 145.

Lina G., Cattoir V. (2014). Les bactéries à Gram positives multirésistantes : probabilités de résistance ? Que craindre ? Bull. Acad. Natle Méd. 198, N°3: p427-438

Lina G., Quaglia A., Reverdy M.E., Leclercq R., Vandenesch F., Etienne J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother .43 : p 1062-6.

Lu L.C., Chen Y.W., Chou C.C. (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. Int J Food Microbiol. 102 (2) : p213–220.

M

Mainardi J. L. (1999). La résistance des bactéries à Gram positif aux glycopeptides : mythe ou réalité ? *Actu Réanim Urg* 1999 :p150-8.

Mainardi J.L. (1997). Résistance des staphylocoques aux glycopeptides. *Méd Mal Inf.* 27: p940-2.

Mainardi J.L., Goldstein F.W., Gutmann L. (1996). Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. *Encycl. Méd. Chir (Elsevier, Paris). Maladies infectieuses*, 8-006-N-10. p8.

Marcucci M.C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: p83–99.

Marmonier A. 1990. Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. *Bactériologie Médicale, technique usuelles*, p 227–236.

Mc Dougal L.K., Steward C.D., Killgore G.E., Chaitram J.M., Mc Allister S.K., Tenover F.C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin Microbiol.* 41(11): p 5113-20.

Mirzoeva O. K., Grishanin R. N., Calder P. C. (1997). Antimicrobial Action of Propolis and Some of Its Components: The Effect on Growth, Membrane Potential and Motility of Bacteria. *Microbiological Research.* 152: p 239–246.

Moreno M. I., Isla M. I., Cudmani N. G., Vattuone M. A., Sampietro A. R. 1999. Screening of antibacterial activity of Amaicha de Valle (Tucuman, Argentina) propolis. *J Ethnopharmacol* 15; 68 (1-3). P 97-102.

Morgan M. (1999). All wales surveillance of MRSA : the first year's result ; *J Hosp Infect.* 41(3): p173-9.

Muli E. M., Maingi J. M., Macharia J. (2008). Antimicrobial Properties of Propolis and Honey from the Kenyan Stingless bee, *Dactylurina Schimidti*. *APIACTA.* 43: p 49 – 61.

Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M.A., Tenover R. H. (2003). *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed.). Herdon, VA, United States of America: American Society for Microbiology.

N

Nallahalli S. S., Musaiah B., Hemagirigowda R. (2012). Antimicrobial Activity of Propolis of *Trigona sp.* and *Apis mellifera* of Karnataka, India. Prime Journal of Microbiology Research (PJMR). 2(2): p 80-85.

Nedji N., Loucif ayad W. (2014). Antimicrobial activity of Algeria propolis in foodborne pathogènes and its quantitative chemical composition. Asian Pac. J. Trop Dis. 4 (6) : p 433-436

O

Ouedraogo A. S., Jean Pierre H., Banuls A. L., Ouedraogo R., Godreuil S. (2017). Émergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest : facteurs favorisants et évaluation de la menace. Medecine et Sante Tropicales. 27 : p147-154.

Okou O. C., Yapo S. E. S., Kporou K. E., Baibo G. L., Monthaut S., Djaman A. J. 2018. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de *Solanumtorvum Swartz* (Solanaceae) sur la croissance *in vitro* de 3 souches d'entérobactéries. Journal of Applied Biosciences 122: p 12282-12290.

P

Piccinelli, A., L., Mencherini, T., Celano R., (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (21), 5080-5088.

Q

Quincampoix J. C., Mainardi J. L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Réanimation. 10 : p 267-75.

R

Raghukumar R., Vali L., Watson D., et al. (2010). Antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of pacific propolis and isolated prenylflavanones. Phytother Res. 24: p 1181–1187

S

Saddiq A. A., Abouwarda A. M. (2016). Effect of propolis extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Main Group Chemistry. 15: p75–86

Saïdani M., Boutiba I., Ghozzi R., Kammoun A., Ben Redjeb S. (2006). Bacteriologic profile of bacteremia due to multi-drug resistant bacteria at Charles-Nicolle Hospital of Tunis. Med Mal Infect. 36 (3): p 163-6.

Santos F. A., Bastos E. M. A., Uzeda M., Carvalho M. A. R., Farias L.M., Moreira E. S. A., Braga F. C. (2002). Antibacterial Activity of Brazilian Propolis and Fractions against Oral Anaerobic Bacteria. Journal of Ethnopharmacology. 80: p 1–7.

Sauvager F. (2011). Propolis : le « super aliment de la ruche ». BS N°131, p 92- 93.

Sauvager F. (2014). La propolis : définition, récolte, propriétés et utilisation. Tounefeuille, p 1-66.

Scazzocchio F., D’Auria F.D., Alzssandrini D., Pantanella F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. Microbiological Research. 161 (4): p327-333..

Seguni N., Rhouati S., Lahouel M., Benlabed M., Bousseboua H. (2006). Etude de la propolis: Profil chimique et activité antibactérienne. N° 1 Vol (XIV) janvier- février.

Sforcin J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. Journal of Ethnopharmacology. 113 (1): p 1-14.

Sforcin J. M., Bankova V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs. J .Ethnopharmacol. 133: 253–260

Silici S., Kutluca S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. J. Ethnopharmacol 99: p 69–73.

Speciale A., Costanzo R., Puglisi S., et al. (2006). Antibacterial activity of propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, beta-lactams and

fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. J. Chemother 18: p 164–171.

Stepanovic S., Antic N., Dakic I., Svabic Vlahovic M . (2003). *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. Microbiol. Res. 158: p 353–357.

Stephani S., Chung D.R., Lindsay J.A., Friedrich A.W., Westh H et al. (2012). Methicilin resistant *Staphylococcus aureus* MRSA : global epidemiology and harmonization of typing methods. Int J Antimicrobio Agents. 2012; 39: p 273-282.

Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) 2014. 7^{ème} Edition p 25- 58.

Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2017. 16^{ème} rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2015). P 68-93.

Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2016. 15^{ème} rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2014). P 44-69.

Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2012. 13^{ème} rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2011). P 65-91.

Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2010. 11^{ème} rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2009). P 65-91.

Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2004. 6^{ème} rapport d'évaluation (octobre 2004). P 70-90.

T

Takaisi-Kikuni N.B., Schilcher H. (1994). Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Planta Medica, 60: p 222-227.

Traoré Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I., Coulibaly A. (2012). Recherche des activités antifongiques et antibactériennes des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). Journal of Applied biosciences. 58: p 4234-4242.

U

Uzel A., Sorkun K., Onçag O., Cogulu D., Gençay O., Salih B. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*.160 (2): p 189-195.

V

Vandepitte V., Engaek k., Piot P., Heuk C.C. (1994). Bactériologie clinique : techniques de base pour le laboratoire. Ed Organisation Mondiale de la Santé. Genève. p 84-94.

Vincenot F., Saleh M., Prévost G. (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*. 38 (407): p 61-69.

W

Wertheim H. F. L., Melles D. C., Vos M. C., Van Leeuwen W., Van Belkum A., Verbrugh H. A., et al. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 5(12): p751-62.

Winn W., Allen S., Janda W., Konemman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Ed Lippincott Williams and Wilkins. p 645-662

Wojtyczka R. D., Dziejic A., Idzik D., Kępa M., Kubina R., Kabala-Dzik A., Smoleń-Dzirbax J., Stojko J., Sajewicz M., Wąsik T. J. (2013). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Molecules*.18: p 9623-9640.

Z

Zouagui S., Bekkhoucha S.N., Amhis W., Abi-Ayad R., Boubekri I., Benmehdi I., Lazizi A., Louail A.A. (2015). Situation des *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) dans l'ouest algérien. 8ème journée Nationale d'Hygiène Hospitalière et de lutte contre les infections associées aux soins. P 10.

Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont devenus une des premières causes d'infections nosocomiales et communautaires dans le monde entier.

Le principal objectif de cette thèse visait à évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis EEP vis à vis des bactéries multirésistantes (SARM). Pour ce faire, nous avons sélectionné des souches SARM isolées cliniquement puis étudié leur profil de résistance à différentes familles d'antibiotiques. La détection de la résistance à la méticilline a été complétée par recherche du gène *mecA* par PCR. La synergie entre l'EEP et de 12 antibiotiques antistaphylococciques a également été étudié.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a permis de détecter **34** souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline **SARM** soit (21,11 %) provenant de différents prélèvements : pus, hémocultures, urines, prélèvements vaginaux et matériels (cathéters).

L'analyse du profil de résistance des SARM aux antibiotiques confirme le caractère multirésistant de ces bactéries aux différentes familles d'antibiotiques : aminosides, macrolides et fluoroquinolones.

L'analyse des extraits d'ADN de 24 souches SARM par amplification a révélé la présence du gène *mecA* chez 21 souches indiquant que ce gène est responsable de la méticillino résistance chez ces souches.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la propolis a montré que EEP présentait une bonne activité antibactérienne vis à vis toutes les souches étudiées SASM et SARM. Les valeurs moyennes des CMI et CMB contre les souches de SASM étaient successivement de $0,55 \pm 0,45$ mg / ml et de $5,5 \pm 4,5$ mg / ml. Dans le cas des souches de SARM, la CMI et la CMB étaient les suivantes: $0,67 \pm 0,41$ mg / ml et $6,72 \pm 4,16$ mg / ml.

L'ajout de l'EEP à une concentration égale à 0,25 mg/ mL dans le milieu a augmenté la sensibilité des souches de SARM à tous les antibiotiques. Cette analyse a révélé une synergie entre EEP et tous les antibiotiques testés. En revanche aucun cas d'antagonisme entre l'EEP et tous les antibiotiques testés n'a été enregistré. La synergie rapportée ici est pertinente et la propolis peut constituer une alternative pour le traitement de ces pathogènes.

Mots clés : Résistance aux antibiotiques, SARM, *mecA*, EEP, synergie antibiotique propolis.

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has come to be one of the primary causes of nosocomial and community infections worldwide.

The main objective of this thesis was to evaluate the antibacterial activity of propolis ethanol extract EEP with respect to multidrug-resistant bacteria (MRSA). In order to achieve so, clinically isolated MRSA strains had been selected and then studied their resistance profile to different antibiotics families. Methicillin resistance detection has been completed by looking for *mecA* gene via PCR. The synergy among EEP and 12 anti-staphylococcal antibiotics has also been studied.

Antibiotic sensibility study allowed us to detect 34 strains of *S. aureus* resistant to methicillin MRSA (21.11%) from diverse samples: pus, blood cultures, urine, vaginal samples and equipment (catheters).

The resistance profile analysis of antibiotic MRSA approved the multi-resistant nature of these bacteria to different antibiotics families: aminoglycosides, macrolides and fluoroquinolones.

DNA extracts Analysis of 24 MRSA strains by amplification indicated the presence of the *mecA* gene in 21 strains, showing that this gene was responsible for methicillin resistance in these strains.

Antibacterial activity assessment of propolis revealed that EEP exhibited worthy antibacterial activity with respect to all MSSA and MRSA strains. The average MIC and CMB values against the MSSA strains were respectively 0.55 ± 0.45 mg / ml and 5.5 ± 4.5 mg / ml. In the case of MRSA strains, the MIC and CMB were correspondingly: 0.67 ± 0.41 mg / ml and 6.72 ± 4.16 mg / ml.

The addition of EEP at a concentration of 0.25 mg / mL in the medium improved the MRSA strains sensibility to all antibiotics. This analysis showed a synergy between EPP and all tested antibiotics. On the other hand, no case of antagonism between PEF and tested antibiotics was recorded. This reported synergy was relevant, and propolis can be an alternative for these pathogens treatment.

Key words: Antibiotic resistance, MRSA, *mecA*, EEP, antibiotic-propolis synergy.

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has come to be one of the primary causes of nosocomial and community infections worldwide. The main objective of this thesis was to evaluate the antibacterial activity of propolis ethanol extract EEP with respect to multidrug-resistant bacteria (MRSA). In order to achieve so, clinically isolated MRSA strains had been selected and then studied their resistance profile to different antibiotics families. Methicillin resistance detection has been completed by looking for *mecA* gene via PCR. The synergy among EEP and 12 anti-staphylococcal antibiotics has also been studied.

Antibiotic sensibility study allowed us to detect 34 strains of *S. aureus* resistant to methicillin MRSA (21.11%) from diverse samples: pus, blood cultures, urine, vaginal samples and equipment (catheters).

The resistance profile analysis of antibiotic MRSA approved the multi-resistant nature of these bacteria to different antibiotics families: aminoglycosides, macrolides and fluoroquinolones.

DNA extracts Analysis of 24 MRSA strains by amplification indicated the presence of the *mecA* gene in 21 strains, showing that this gene was responsible for methicillin resistance in these strains.

Antibacterial activity assessment of propolis revealed that EEP exhibited worthy antibacterial activity with respect to all MSSA and MRSA strains. The average MIC and CMB values against the MSSA strains were respectively 0.55 ± 0.45 mg/ml and 5.5 ± 4.5 mg/ml. In the case of MRSA strains, the MIC and CMB were correspondingly: 0.67 ± 0.41 mg/ml and 6.72 ± 4.16 mg/ml.

The addition of EEP at a concentration of 0.25 mg/ml in the medium improved the MRSA strains sensibility to all antibiotics. This analysis showed a synergy between EPP and all tested antibiotics. On the other hand, no case of antagonism between PEF and tested antibiotics was recorded. This reported synergy was relevant, and propolis can be an alternative for these pathogens treatment.

Key words: Antibiotic resistance, MRSA, *mecA*, EEP, antibiotic-propolis synergy.

اصبحت المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (SARM) واحدة من الأسباب الرئيسية للإصابات البكتيرية بالمستشفيات و خارجها في جميع أنحاء العالم. الهدف الرئيسي من هذه الرسالة هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلص الإيثانولي للعكبر **EE P** ضد البكتيريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (SARM).

للقيام بذلك قمنا باختيار سلالات **SARM** المعزولة سريريًا ، ثم دراسة مظهر مقاومتها لعائلات مختلفة من المضادات الحيوية. استكمل الكشف عن مقاومة الميثيسيلين من خلال البحث عن جين *mecA* بواسطة **PCR**. كما تمت دراسة التأثير التآزري بين المستخلص الإيثانولي للعكبر **EEP** و 12 مضاد حيوي.

سمح لنا التحليل الشامل للحساسية للمضادات الحيوية باكتشاف 34 سلالة من المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين **SARM** اي ما يعادل % 21.11 و المعزولة من عينات مختلفة: القيح ، ثقافات الدم ، البول العينات المهبلية والمعدات. أكد التحليل الشامل للحساسية للمضادات الحيوية لبكتيريا **SARM** انها متعددة المقاومة لعائلات مختلفة من المضادات الحيوية: الأمينوغليكوزيدات ، الماكروليدات والفلوروكينولونات.

اثبت وجود جين *mecA* لدى 21 سلالة من بين 24 سلالة **SARM** مما يشير إلى أن هذا الجين هو المسؤول عن مقاومة الميثيسيلين عند هذه السلالات.

دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص الإيثانولي للعكبر **EEP** اثبت أن هذا الأخير له نشاط مضاد جيد ضد جميع سلالات البكتيريا الحساسة للميثيسيلين **SASM** والمقاومة للميثيسيلين **SARM**. وكانت معدل قيم **CMI** و **CMB** لسلالات بكتيريا **SASM** 0.55 ± 0.45 ملغ / مل و 4.5 ± 5.5 ملغ / مل على التوالي . اما في حالة سلالات **SARM** ، كان معدل قيم **CMI** 0.67 ± 0.41 ملغ / مل و **CMB** 4.16 ± 6.72 ملغ / مل .

إضافة المستخلص الإيثانولي للعكبر بتركيز (0.25 ملغ/مل) في الوسط ادى إلى زيادة حساسية سلالات **SARM** لجميع المضادات الحيوية المدروسة. وكشف هذا التحليل عن وجود تأثير تآزري بين **EPP** وجميع المضادات الحيوية التي تم اختبارها. من ناحية أخرى ، لم تسجل أي حالة تضاد بين **PEF** وجميع المضادات الحيوية المدروسة.

التأثير التآزري للمستخلص الإيثانولي للعكبر المسجل يمكن أن يجعله مناسباً للاستعمال مع المضادات الحيوية لزيادة حساسيتها .

الكلمات الرئيسية: مقاومة المضادات الحيوية ، **SARM** ، *mecA* ، **EEP** ، التأثير التآزري للمضادات الحيوية.

Annexe N°1


CE 0722
REF _____ / ____ / ____ / ____



Origine _____
Origen _____

1			2			4			1			2			4			1			2			4			1			2			4			1			2			4																				
0			GLU			FRU			MNE			MAL			LAC			TRE			MAN			XLT			MEL			NIT			PAL			VP			RAF			XYL			SAC			MDG			NAG			ADH			URE			LSTR		

Autres tests _____
Ident. _____

Figure N° 24 : Fiche de lecture API STAPH.



Figure N° 25 : Mise en évidence des caractères biochimique par API STAPH.

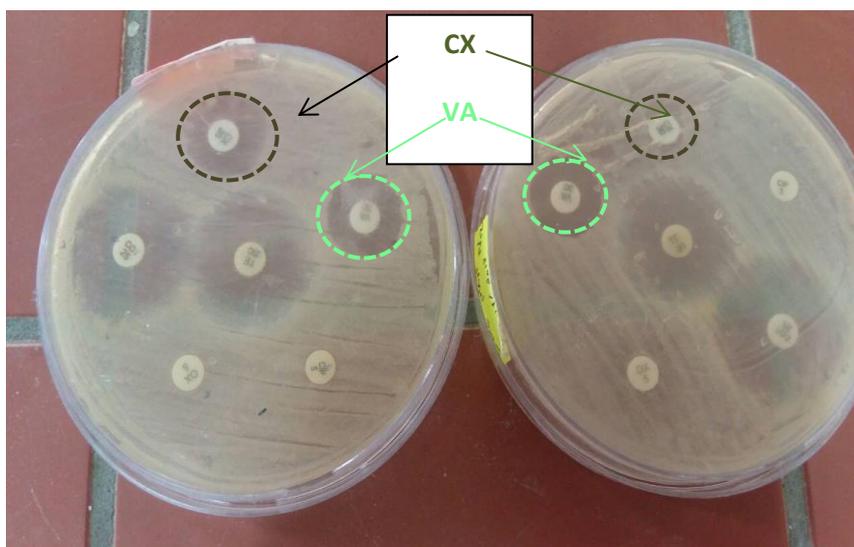
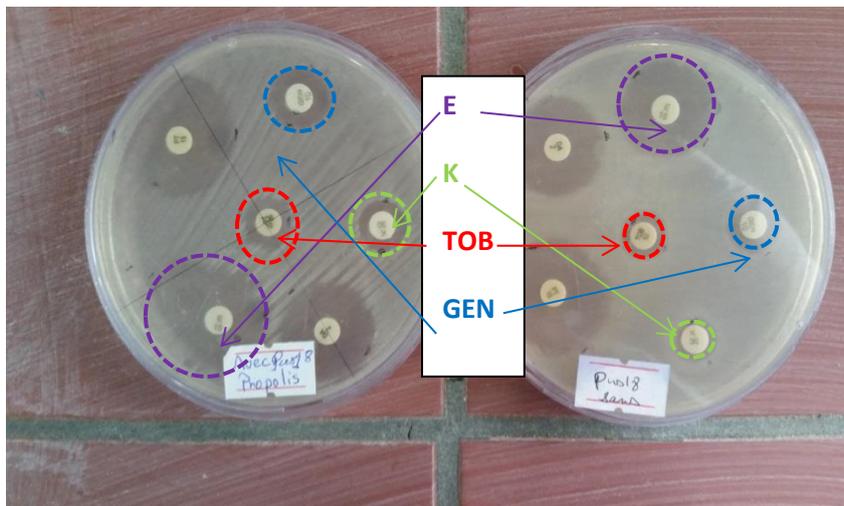
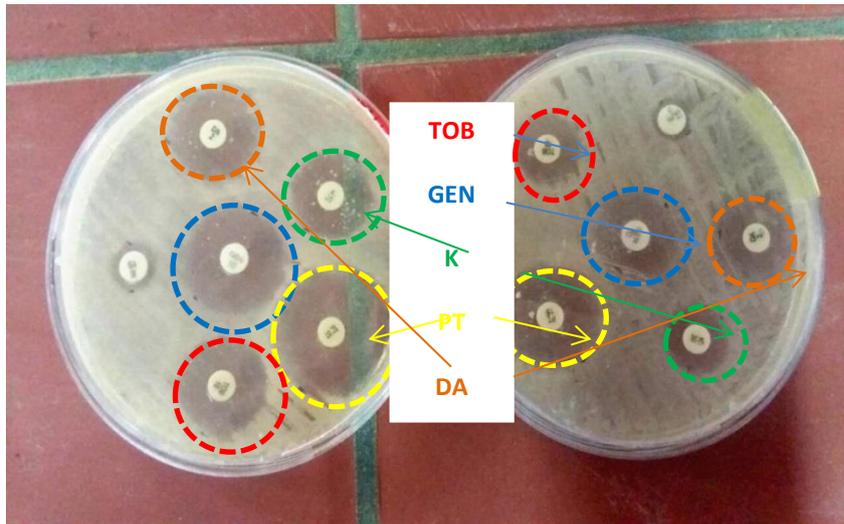
Annexe N° 2

Tableau N° 11: Antibiotiques testés pour *S. aureus* et leurs valeurs critiques
selon CA-SFM 2017

Les Antibiotiques	Abréviation	Charge des disques	Diamètres critiques en mm		Concentrations critiques CMI en µg/ml	
			Résistantes R <	Sensibles S ≥	Résistantes R >	Sensibles S ≤
β-lactamines: Pénicilline G	P	10µg	26	26	0,12	0,12
Oxacilline	OX	5µg	20	20	2	2
Céfoxitine	Cx /FOX	30µg	25	27	8	4
Céftaroline	CN	5µg	19	21	1	1
Aminosides Gentamicine	GEN	10µg	18	18	1	1
Kanamycine	K	30µg	18	18	8	8
Tobramycine	TOB	10µg	18	18	1	1
Macrolides Erythromycine	E	15µg	18	21	1	2
Lincosamides Clindamycine	CM/CD	2µg	19	22	0,25	0,5
Streptogramines Quinupristine+Dalf omycine	QDF	15µg	18	21	1	2
Pristinamycine	PR/PT	15µg	19	22	1	2

Fluoroquinolones Ciprofloxacin	CIP	5µg	21	21	1	1
Norfloxacin	NOR	10µg	/	17	/	/
Levofloxacin	LVX	5µg	22	22	1	1
Glycopéptides Vancomycine	VA	30µg	/	/	2	2
Teicoplanine	TEC	30µg	/	/	2	2
Tétracyclines Tétracycline	TE	30µg	19	22	1	1
Cotrimoxazole Trimethoprim+Sul famides	SXT	1,25+2 3,75	14	17	2	4
Oxazolidinones Linézolide	LIN	10µg	21	21	4	4
Lipopéptides Daptomycine	DA		/	/	1	1
Autres Fosfomycine	FOS	200µg	23	23	32	32
Rifampicine	RIF	5µg	23	26	0,06	0,2
Acide fusidique	FA	10µg	24	24	1	1

Annexe N° 3



Photographie N°16 : Effet synergique de la propolis et antibiotiques

Annexe N° 4**Diamètre des zones d'inhibition (synergie antibiotique propolis)**

* Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associées $p < 0.05$.

1. β -lactamines

OX=11,222±6,59

OX+EEP=12,8889± 6,8477 P* = 0,042

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre OX et OX_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,042	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de significatio ,05.

FOX=12,111±3,2238

FOX+EEP=15,444± 6,680 P* = 0,027

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre FOX et FOX_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,027	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de significatio ,05.

2. Aminosides

Gen =16,556+-3,053

Gen +EEP =17,8889 +-3,6953 P* = 0,014

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between Gen and Gen_EEP equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,014	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

TOB=14 ± 7,657

TOB+EEP=17,55± 7,581 P* = 0,011

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre TOB et TOB_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,011	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de signification ,05.

K=12 ,11±4,522

K+EEP=14± 5,156 P* = 0,017

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre K et K_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,017	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de signification 05.

3.Macrolides

CD=13 ± 8,216

CD+EEP=14,444±8,59 P* = 0,109

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre DA et DA_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,109	Retenir l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de signification ,05.

$E=13,22 \pm 7,032$

$E+EEP=15,55 \pm 8,438$ $P^* = 0,027$

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre E et E_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,027	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de signification 05.

$PR=19,66 \pm 7,055$

$PR+EEP=21,88 \pm 7,652$ $P^* = 0,039$

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre PR et PR_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,039	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de signification ,05.

4.Glycopéptides

$VA=17,777 \pm 0,747$

$VA+EEP=18,6667 \pm 1,385$ $P^* = 0,039$

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre VA et VA_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,039	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de significatio
,05.

5. Fluoroquinolones

CIP=16,222±7,967

CIP+EEP=18,7778± 7,865 P* = 0,011

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre Cip et Cip_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,011	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de significatio
,05.

6. Tétracyclines

Te=17,777±5,486

Te+EEP=20± 5,569 P* = 0,011

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre Te et Te_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,011	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de significatio
,05.

7.Cotrimoxazole

SXT=20±9,175

SXT+EEP=22,33± 8,080 P* = 0,016

Récapitulatif du test d'hypothèse

	Hypothèse nulle	Test	Sig.	Décision
1	La médiane des différences entre SXT et SXT_EEP est égale à 0.	Test de rang signé de Wilcoxon à échantillons associés	,016	Rejeter l'hypothèse nulle.

Les significations asymptotiques sont affichées. Le niveau de significatio ,05.

Annexe N° 5**1. Composition chimique du tampon TBE (10X)**

Tris	10,78 g	
Acide borique	5,5 g	pH= 8
EDTA	0,74 g	
Qsp H ₂ O	100 ml	

Ajuster le pH avec HCl

2. Composition chimique du tampon de charge : bleu de bromophénol (6X) pour gel d'agarose

Bleu de bromophénol (0,025% m/v)	25mg
Glycerol 3%	3,3ml
H ₂ O	6,7 ml

Agiter jusqu'à complète dissolution, stocker à 4 °C

3 .Préparation de l'étalon de turbidité Mc Farland 0,5% (0,5 /ml)

BaCl₂ à 0,048 mol/l (1,175% p/v BaCl₂·2H₂O) 0,5ml

H₂SO₄ à 0,18 mol/l (0,36 N) de H₂SO₄ (1% v/v) 99,5 ml

1 .Ajouter 0,5 ml de la solution **BaCl₂** 0,048 mol/l à 99,5 ml d'une solution 0,18 mol/l de **H₂SO₄** (1% v/v) et agiter vigoureusement.

2. Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et des cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13.

3. Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.

4. Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

5. Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un Vortex.

6. .Renouveler l'étalon ou vérifier son absorbance après 6 mois de conservation.

Annexe N° 6



Figure N° 26: étapes du lavage des mains.