

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



**UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE**

N° d'ordre : .....  
Série : .....

**THESE**

**En vue de l'obtention du diplôme de  
DOCTORAT EN SCIENCES  
Filières : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie**

**Thème**

*Effet de la propolis sur les bactéries résistantes aux  
antibiotiques par inhibition des pompes à efflux*

**Présentée par :**

**Sagia MOUSSAOUI**

**Soutenue le 02 Mai 2019**

**Devant le jury :**

<b>Pr. Laid DEHIMAT</b>	<b>U. frères Mentouri Constantine I</b>	<b>Président</b>
<b>Pr. Mesbah LAHOUEL</b>	<b>U. Mohammed Seddik Benyahia Jijel</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Nourreddine KACEM CHAOUCHE</b>	<b>U. frères Mentouri Constantine I</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Pr. Mohamed SIFOUR</b>	<b>U. Mohammed Seddik Benyahia Jijel</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Pr. Amar ZELLAGUI</b>	<b>U. Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi</b>	<b>Examinateur</b>

**Année Universitaire 2018/2019**

## *Remerciements*

*Je remercie Allah, le tout puissant qui ma donné la force et la volonté pour aller jusqu'au bout de ce modeste travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Mesbah LAHOUEL, Professeur à l'université de Jijel. Soyez assuré de m'a profonde gratitude. Sans vous je n'aurai pas eu le courage de soutenir cette thèse.*

*Je tiens à remercier avec gratitude Monsieur Laid DEHIMAT, Professeur à l'université de Constantine I, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury*

*J'adresse également mes plus vifs remerciements à Monsieur Nourreddine KACEM CHAOUCHE, Professeur à l'université de Constantine I, à Monsieur Mohamed SIFOUR, Professeur à l'université de Jijel et Monsieur Amar ZELLAGUI, Professeur à l'université d'Oum El Bouaghi d'avoir accepté de siéger dans ce jury de thèse.*

*Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes du laboratoire de microbiologie de l'université de Bordeaux pour leur disponibilité, pour m'avoir permis l'accès à la banque des souches du laboratoire et pour m'avoir acceptée aussi facilement dans leur équipe, et plus particulièrement Françoise pour ses petites attentions.*

*J'adresse ma plus profonde reconnaissance et tout mon amour à ma mère, source de tendresse, qui m'a soutenue et aidée par sa présence, ses prières et son appui moral. Tes prières et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études depuis mon enfance jusqu'à aujourd'hui. Je la remercie pour tous ses sacrifices qui m'ont permis d'en être là où j'en suis. Que dieu te garde et te bénisse.*

*Je tiens à remercier Leila, pour son soutien inconditionnel, ses encouragements et surtout son aide.*

*Je tiens également à remercier mon mari et mes enfants pour leurs encouragements et leur soutien.*

*Mes remerciements vont également à mes sœurs, mes belles sœurs et mes frères pour leurs encouragements, et leurs aides.*

*Sans oublier mon défunt père Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde!*

*Enfin, je tiens à faire mes excuses les plus sincères auprès de toutes les personnes qui ont travaillé de près ou de loin avec moi pour mon très fort penchant au retard, au « remettre à demain ce que j'aurai pu – et dû – faire le jour présent » et à mes indisponibilité pour finaliser ce travail mais aussi pour les oublis, les lacunes et les faiblesses que puisse contenir la présente étude.*

## Résumé

La résistance des bactéries aux différentes chimiothérapies anti-infectieuses pose un vrai problème de santé publique. Les bactéries échappent aux antibiotiques par le développement de pompes à efflux capables de rejeter activement les médicaments hors des cellules. L'efflux est un mécanisme de résistance très puissant utilisant des systèmes de pompes situés à la surface des membranes bactériennes. Pour cela, des bactéries génétiquement modifiées et porteuses de différents types de pompes à efflux ont été choisies comme modèle d'étude sur lesquels la propolis Algérienne a été testée.

Les tests *in vitro* réalisés sur différentes souches bactériennes ont montrés des résultats comparables à celles rapportés par la littérature et confirment que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'effet de la propolis que les bactéries Gram négatif. De plus l'efficacité de la propolis s'étend aussi sur des souches résistantes par les mécanismes de pompes d'efflux. Les résultats satisfaisants obtenus nous ont encouragés à réaliser des études *in vivo* sur des rats wistar.

Les effets sur un modèle d'infection provoquée chez les rats ont été étudiés et évalués par différents paramètres biologiques.

Le rétablissement des paramètres testés *in vivo* après traitement de l'infection avec la propolis, pourrait confirmer l'intérêt de l'utilisation de cette dernière comme agent naturel capables de contrer les effets du stress oxydatif lié aux infections telles que la septicémie. Comme peu d'informations sont disponibles sur l'efficacité clinique de la propolis algérienne, une nouvelle étape serait intéressante pour compléter la recherche et ainsi développer les investigations cliniques obtenues qui permettrait d'évaluer l'effet bénéfique de la propolis chez les malades.

Aussi les résultats obtenus dans ce modeste travail pourraient être exploités pour justifier la place que peut avoir la propolis algérienne dans la recherche des thérapeutiques alternatives.

**Mots clés :** Propolis, Bactéries, Pompes d'efflux, inhibition, CMI, Infection *in vivo*

# Abstract

The resistance of bacteria to various anti-infectious chemotherapies has become a real public health problem. Bacteria ovoid antibiotics through the development of antimicrobial resistance by draining drugs out the cells.

Drug efflux is a key mechanism of resistance mechanism using pump systems located on the surface of bacterial membranes. For this, genetically modified bacteria carrying different types of efflux pumps were chosen as the study model on which Algerian propolis was tested.

The tests *in vitro* performed on different bacterial strains have shown results comparable to those reported in the literature and confirm that Gram-positive bacteria are more sensitive to the effect of propolis than Gram-negative bacteria. In addition, the effectiveness of propolis also extends to resistant strains by efflux pump mechanisms

The satisfactory results obtained encouraged us to carry out *in vivo* studies on wistar rats.

The effects on a model of induced infection in rats were studied and evaluated by different laboratory parameters.

Restoring the parameters tested *in vivo* after treatment of the infection with propolis, could confirm the interest of using it as a natural agent capable of countering the effects of oxidative stress linked to infections such as sepsis.

As few information, on the clinical efficacy of Algerian propolis, is available, for this, a new step would be interesting to complete the research and thus develop the clinical investigations obtained which would make it possible to evaluate the beneficial effect of propolis in patients.

Also the results obtained in this modest work could be used to justify the place that Algerian propolis may have for alternative therapies in the search.

**Keywords :** Propolis, Bacteria, efflux pumps, inhibition, MICs, *in vivo* infection

## ملخص

تشكل مقاومة البكتيريا لمختلف أنواع العلاجات الكيميائية المضادة للعدوى مشكلة حقيقية في الصحة العامة. تتفادى البكتيريا فعل المضادات الحيوية من خلال تطوير مضخات التدفق القادرة على دفع الأدوية بشكل فعال خارج الخلايا.

التدفق هو آلية مقاومة قوية للغاية تستخدم أنظمة المضخات الموجودة على سطح الأغشية البكتيرية. لهذا الغرض، تم اختيار البكتيريا المعدلة وراثيا التي تحمل أنواعا مختلفة من مضخات التدفق كنموذج لدراسة مدى فعالية العكبر الجزائري عليها.

الاختبارات المخبرية التي أجريت على سلالات بكتيرية مختلفة، أظهرت نتائج مماثلة لتلك المذكورة في المراجع العلمية وتؤكد أن البكتيريا إيجابية الجرام أكثر حساسية لتأثير العكبر من البكتيريا سالبة الجرام. بالإضافة إلى ذلك، تمت فعالية العكبر أيضاً إلى سلالات مقاومة بفضل استعمال وسائل مضخات التدفق. شجعنا النتائج المرضية التي تم الحصول عليها على إجراء دراسات في الجسم الحي على فئران ويستار . تمت دراسة وتقييم التأثيرات على نموذج العدوى المستحدثة في الجرذان من خلال معايير عملية مختلفة.

استعادة المعايير المختبرة في الجسم الحي بعد علاج العدوى بالعكبر يمكن أن تؤكد قيمة استخدام هذا الأخير كعامل طبيعي قادر على مواجهة آثار الإجهاد التأكسدي المرتبط بالعدوى مثل تجرثم الدم. نظراً لقلّة المعلومات المتوفرة حول الفعالية السريرية للعكبر الجزائري، فإن الخطوة الجديدة ستكون مثيرة للاهتمام لإكمال البحث وبالتالي تطوير التحقيقات السريرية التي تم الحصول عليها والتي من شأنها أن تجعل من الممكن تقييم الأثر المفيد للعكبر على المرضى. كما يمكن استخدام النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل المتواضع لتبرير المكانة التي يمكن أن يحتلها العكبر الجزائري في البحث عن علاجات بديلة.

**الكلمات المفتاحية:** العكبر، بكتيريا، مضخات التدفق، تثبيط، التركيز الأدنى المثبط، عدوى بكتيرية.

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

## Partie I: Analyse bibliographique

### Chapitre I : La propolis

1. Histoire de la propolis.....	4
2. Définition et Etymologie.....	5
3. Origine de la propolis.....	5
3.1. Origine externe.....	5
3.2. Origine interne.....	5
4. Récolte de la propolis.....	5
4.1. Par les abeilles.....	5
4.2. Condition de récolte.....	6
4.2. Par l'homme.....	6
5. Utilisation de la propolis.....	7
5.1. Utilisation de la propolis par les abeilles.....	7
5.2. Utilisation par l'homme.....	7
6. Propriétés physico-chimiques.....	7
7. Conservation.....	8
8. Composition chimique de la propolis.....	8
9. Toxicité.....	9
10. Propriétés thérapeutiques.....	9

### Chapitre II : Résistance par efflux

1. Les pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques.....	10
2. Résistance des bactéries aux antibiotiques et efflux .....	11
2.1. Antibiotiques.....	11

2.2. Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	13
a) Mécanismes génétiques.....	13
b) Mécanismes biochimiques.....	13
2.3. Rôle de l'efflux dans la résistance des bactéries aux antibiotiques.....	15
2.3.1. <i>Pompes spécifiques</i> .....	15
2.3.2. <i>Pompes MDR</i> .....	16
3. Inhibiteurs des pompes d'efflux bactériennes.....	17
3.1. Modes d'action des EPIs.....	17
3.2. Méthodes d'évaluation des EPIs.....	18
3.3. Exemples d'inhibiteurs.....	18

## **Partie 2 : Etude expérimentale**

### **Chapitre I: Etude *in vitro***

#### **1. Matériel et Méthodes**

1.1. Matériel végétal.....	20
1.1.1. Récolte de la propolis.....	20
1.1.2. Préparation de l'extrait brut de la propolis.....	20
1.2. Inhibiteurs des pompes d'efflux.....	21
1.3. Produit chimique .....	21
1.4. Souches bactériennes et conditions de culture.....	21
1. 4.1. Souches bactériennes.....	21
1.4.2. Milieux de culture.....	22
1.5. Détermination des CMI <sub>s</sub> .....	22

#### **2. Résultats et discussion**

2.1. Valeurs des CMI <sub>s</sub> de l'extrait de propolis.....	24
2.2. CMI de la propolis A sur des souches présentant une hyperproduction de différents systèmes d'efflux.....	25



## Chapitre II : Etude *in vivo*

### 1. Matériel et méthodes

1.1. Etude bactériologique.....	31
1.1.1. La souche bactérienne.....	31
1.1.2. Repiquage de <i>S. aureus</i> .....	31
1.1.3. Identification de la souche <i>S. aureus</i> .....	32
1.1.4. L'antibiogramme.....	33

### 2. Etude *in vivo*

2.1. Entretien des animaux.....	33
2.2. Répartition et traitement des animaux.....	33
2.2.1. Induction de la pathologie expérimentale.....	34
2.2.2. Traitement par la propolis.....	35
2.2.3. Traitement par l'antibiotique.....	35
2.2.4. Traitement par l'association propolis- antibiotique.....	35
2.3. Prélèvement des échantillons et analyses.....	35
2.3.1. Prélèvement du sang.....	35
2.3.2. Test CRP (C Reactive Proteine).....	36
2.3.3. Exploration du profil immunitaire.....	36
2.3.2. Examen Cytobactériologique des urines (ECBU).....	36
2.4. Sacrifice des animaux et prélèvement d'organe.....	37
2.5. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	37
2.5.1. Dosage de MDA cytosolique tissulaire.....	37
2.5.2. Analyse histologique.....	38
2.6. Analyse statistique.....	39

### 3. Résultats et discussion

3.1. Etude bactériologique.....	40
3.2. Effets de l'infection et du traitement chez le rat .....	43
3.2.1. Variation du poids des rats.....	43
3.2.2. Variation de la température corporelle.....	44
3.2.3. Identification du germe à partir du sang et urine et comportement aux	

antibiotiques .....	45
3.2.4. Variation de la CRP.....	46
3.2.5. Variation du profil immunitaire.....	47
3.2.6. Variation cyto bactériologique des urines .....	48
3.2.7. Variation du MDA cytosolique .....	49
3.2.8. Examen macroscopique des organes.....	50
3.2.9. Analyse histologique .....	51
3.2.9.1 Effet du traitement sur l’histologie hépatique.....	51
3.2.9.2. Effet du traitement sur l’histologie rénale.....	52
3.2.9.3. Effet du traitement sur l’histologie du péritoine.....	53
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>55</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>58</b>

## *Liste des abréviations*

ABC : TP-Binding-Cassette

ATCC : American Type Culture Collection

BH : Brain Heart

BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Elargi

CCCP : Carbonyl cyanide mchlorophénylhydrazone

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EEP : Extrait Ethanolique de la Propolis

EPIs: Efflux Pump Inhibitors

FRO : Formes réactives de l'oxygène

MATE : Multidrug And Toxic Compound Extrusion

MDA : MalonylDiAldehyde

MDR : MultiDrug Resistance

MFS : Major Facilitator Superfamily

MH : Mueller-Hinton

MLS : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines

PAβN : Phénylalanine-Arginine-β-Naphtylamide

PLP : Proteines de Liaison des Pénicillines

RND : Resistance/Nodulation/cell Division

S, I, R : Sensible, Intermédiaire, Résistant

SMR : Small Multidrug Resistance

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloracétique

UFC : unité formant colonie

## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> : Butineuses récoltant et portant deux gouttelettes de propolis. ....	6
<b>Figure 2</b> : Propolis dans la ruche.....	8
<b>Figure 3</b> : Propolis brute.....	8
<b>Figure 4.</b> Les cinq familles de pompes d’efflux bactériennes.....	11
<b>Figure 5.</b> Mode d’action des antibiotiques.....	13
<b>Figure 6.</b> Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques.....	14
<b>Figure 7.</b> Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram positif, à Gram Négatif et des mycobactéries.....	15
<b>Figure 8.</b> Cibles potentielles dans le mécanisme d’efflux .....	17
<b>Figure 9.</b> Protocole d’extraction de l’extrait de Propolis.....	21
<b>Figure 10.</b> Aspect macroscopique des colonies de <i>S. aureus</i> cultivé sur milieu Chapman.....	40
<b>Figure 11.</b> <i>S. aureus</i> après coloration de Gram .....	41
<b>Figure 12.</b> Mise en évidence de la coagulase.....	41
<b>Figure 13.</b> Variation du poids corporel des rats avant et après l’infection.....	43
<b>Figure 14.</b> Variation du poids corporel des rats traités.....	44
<b>Figure 15</b> : Courbe thermique des rat témoins et infectés par <i>S. aureus</i> .....	44
<b>Figure 16.</b> Courbe thermique des rats traités par l’EEP, l’ATB, et par l’association EEP-ATB.....	45
<b>Figure 17.</b> Variation lymphocytes chez les différents groupes de rats .....	47
<b>Figure 18.</b> Variation des globules blancs chez les différents groupes de rats.....	47
<b>Figure 19.</b> Variation des concentrations du MDA chez les différents groupes de rats .....	50
<b>Figure 20.</b> Lésions observées après la dissection des rats.....	51
<b>Figure 21.</b> Coupes histologiques de foie des rats témoins infectés par <i>S. aureus</i> et traités par la l’extrait de propolis.....	52
<b>Figure 22.</b> Coupes histologiques du rein des rats témoins infectés par <i>S. aureus</i> et traités par l’extrait de propolis.....	53
<b>Figure 23.</b> Coupes histologiques du péritoine des rats témoins infectés par <i>S. aureus</i> et traités par la l’extrait de propolis.....	53

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1.</b> Classification et caractéristiques des systèmes d'efflux bactériens impliqués dans la résistance aux antibiotiques.....	10
<b>Tableau 2.</b> Classification des antibiotiques.....	12
<b>Tableau 3.</b> Caractéristiques des souches utilisées.....	21
<b>Tableau 4.</b> Détermination de la CMI de la propolis A sur un panel de souches bactériennes sensibles aux antibiotiques.....	24
<b>Tableau 5.</b> CMI de la propolis A sur un panel de bactéries présentant des mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	25
<b>Tableau 6.</b> CMI de la propolis vis-à-vis des souches hypermutatrices.....	27
<b>Tableau 7.</b> Résultats des valeurs CMI des inhibiteurs.....	28
<b>Tableau 8.</b> Résultats des valeurs des CMI EEP seul et en association avec EPIs (1/4 CMI).....	28
<b>Tableau 9.</b> Les différents antibiotiques testés avec leurs charges .....	33
<b>Tableau 10.</b> La répartition et traitement des animaux.....	34
<b>Tableau 11.</b> Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques testés.....	42
<b>Tableau 12.</b> Variation de la CRP chez les rats témoins et traités.....	46



# Introduction

---

Depuis l'aube des temps, l'homme a toujours été intrigué et intéressé par la nature qui l'entourait. En effet, le milieu naturel constitue aujourd'hui la source principale pour la recherche et l'exploitation des molécules biologiques actives, il livre en même temps aux scientifiques des modèles de structures nouvelles susceptibles de donner lieu à des applications dans différents domaines.

L'homme a su tirer parti des ressources naturelles pour s'adapter à son environnement lui permettant ainsi d'évoluer, associant la domestication et l'agriculture.

Parmi les espèces animales domestiquées, il en est une particulièrement exceptionnelle: l'abeille. Les vertus de ce petit insecte ont tout de suite séduit la curiosité humaine et depuis les temps les plus reculés, l'homme a su profiter des produits de la ruche. La première représentation iconographique de la relation homme-abeille date de plus de 9000 ans avant Jésus Christ. Une silhouette humaine est représentée, perchée devant une anfractuosité de rocher, récoltant les rayons d'une ruche (Bankova, 2005). Tous nous ont montré au fil des études et des observations qu'ils pouvaient contribuer au bien-être et à l'amélioration de la qualité de la vie de l'homme et de l'animal. C'est ainsi que l'abeille devint l'animal domestique, seul insecte avec le ver à soie *Bombyx moré* à être élevé pour subvenir aux besoins de l'homme. Depuis, au même titre que les vaches, l'abeille a été sélectionnée, des races ont vu le jour, se différenciant par leur potentiel à élaborer tel ou tel produit pour en maximiser le rendement.

Il existe plusieurs produits de la ruche qui sont utilisés par l'homme tel que le miel, la propolis, le pollen, la cire, gelée royale, venin et larves...

Récemment plusieurs chercheurs se sont intéressés à la propolis, car ce produit du moins très bénéfique pour l'abeille, suscite beaucoup d'intérêts pour l'homme qui l'utilisait au début, dans la médecine traditionnelle comme un antiseptique, antibiotique et anti-inflammatoire. Elle constitue un élément susceptible de fournir de nouveaux produits, qui pourraient avoir une protection pour la santé humaine et animale (Kocot et *al*, 2018) ; actuellement elle est employée dans des milliers de pharmacies du monde, des centres médicaux, des cliniques de médecine humaine ou vétérinaire et des laboratoires expérimentaux.

Ce produit de la ruche est très apprécié en raison de ses propriétés antioxydantes, antibactériennes, antivirales, antifongiques, anticancéreuses, et thérapeutiques liées à sa composition en polyphénols et flavonoïdes (Moreira et *al*, 2008 ; Monzote et *al*, 2012 ; Rufatto et *al*, 2017).

Son utilisation, sans avoir été permanente, s'est maintenue au fil des siècles et est à nouveau redécouverte de façon relativement récente par de nombreux chercheurs qui s'attachent et s'efforcent progressivement, depuis quelques années, d'expérimenter scientifiquement l'ensemble des données empiriques de ces produits par l'étude de leur composition et leur effet sur les microorganismes et les maladies qu'elles engendrent (Oryan et al, 2018).

La propolis méditerranéenne, de différentes régions, est un produit naturel précieux possédant le potentiel pour améliorer la santé humaine, et pour permettre son utilisation dans des domaines variés, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer sa chimie et son activité biologique (Popova et al, 2011).

Les échecs thérapeutiques dus aux résistances des bactéries aux antibiotiques constituent aujourd'hui un problème de santé publique majeur (Sylvie, 2009). Ce phénomène est observé malheureusement pour toutes les molécules dont nous disposons aujourd'hui. Parmi les mécanismes en cause, les systèmes d'efflux procaryotes, qui peuvent être à l'origine de ces résistances (Cattoir, 2004 ; Li et al, 2004 ; Pagès, 2002).

Les pompes d'efflux sont des transporteurs transmembranaires chargés de rejeter vers le milieu extracellulaire des substances variées, notamment des antibiotiques. La recherche de nouvelles molécules insensibles aux mécanismes de résistance est un processus long et aléatoire. Alternativement, l'association d'inhibiteurs de pompes d'efflux (EPIs pour Efflux Pump Inhibitors) à des antibiotiques déjà disponibles mais inactivés par ce mécanisme, permet de restaurer la sensibilité aux antibiotiques des souches résistantes par efflux (Kaatz, 2005 ; Wright, 2000). Malheureusement, la plupart des EPIs actuellement disponibles sont trop toxique pour présenter un intérêt thérapeutique.

C'est dans le cadre d'un retour vers la nature que s'effectue notre travail dans le quel nous avons :

- Présenté une synthèse bibliographique sur :
  - la propolis pour estimer le développement des activités de ce produit *in vitro* et *in vivo* et découvrir les nouvelles utilisations de la propolis dans les différents domaines.
  - les caractéristiques des pompes d'efflux impliquées dans la résistance des bactéries aux antibiotiques.
- évalué dans un premier temps l'activité antibactérienne *in vitro* de la propolis de la région de Jijel sur quelques de souches bactérienne à Gram positif et Gram négatif.



- testé par criblage, des souches d'origine clinique présentant un mécanisme de résistance aux antibiotiques par la méthodes bactériologique (antibiogrammes et CMI) permettant de détecter l'activité antibactérienne et évalué l'effet inhibiteur *in vitro* des associations propolis-EPIs afin d'établir une éventuelle restauration de la sensibilité.

Pour cela, une partie de ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Bactériologie de l'UMR CNRS 5234 (« Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité ») de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, où des souches isogéniques, ne différant que par l'expression ou l'hyper expression d'une pompe donnée, ont été sélectionné à partir de la banque de souches.

Par ailleurs,

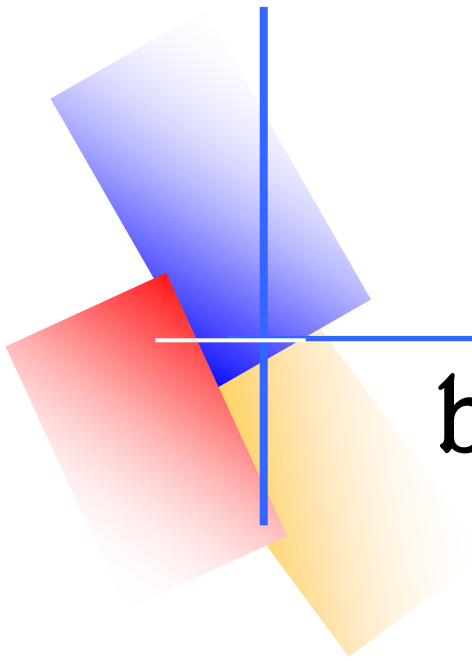
Du fait que de nombreux travaux sur la propolis ont été décrits dans la littérature mais beaucoup n'ont jamais dépassé le stade de l'étude *in vitro*

Du fait que la propolis possède une activité antibactérienne surtout sur les bactéries Gram positif (Antunes *et al*, 1996 ; Fernandes *et al*, 1995) qui a été confirmer dans notre étude,

Du fait aussi que les infections staphylococciques occupent en pathologie infectieuse une place importante par leur nombre et leur gravité et reste grevée d'une lourde mortalité malgré le traitement (Veyssier *et al*, 1971)

Nous avons élargie notre travail à l'étude de l'effet de l'extrait brut de la propolis sur une infection à *Staphylococcus aureus*.

Pour cela, une infection a été provoqué chez le rat *Wistar albinos*, par la suite un traitement par la propolis a été utilisé puis comparé avec celui à base d'antibiotique.



Analyse

bibliographique

# **Chapitre I : La propolis**

## 1. Histoire de la propolis

Les abeilles ont été en existence pendant >125 millions d'années (Bankova et *al*, 2005; Burdoch, 1998). Depuis la plus haute antiquité l'homme s'est intéressé aux abeilles et à ses produits comme le miel, la cire, le venin, la gelée royale et en fin la propolis.

La propolis est beaucoup moins anciennement connue que le miel. L'usage de la propolis remonte à plusieurs millénaires. Connue déjà des prêtres de l'Égypte antique pour embaumer les corps des défunts, la propolis fut très certainement utilisée par les Grecs puisque Aristote en parle dans son livre « Histoire des animaux » et la considère comme « remède aux infections de la peau, plaies et suppurations » (Bankova et *al*, 2000).

Au 2<sup>ème</sup> siècle, c'est au tour du médecin Galien d'en faire mention dans ses traités et d'en recommander l'usage.

Puis, beaucoup plus tard, au 11<sup>ème</sup> siècle, le philosophe et médecin Iranien Abu Ali Ibn Sina connu sous le nom d'Avicenne note à son propos « la propolis a la qualité de faire éliminer les pointes de flèches et les épines, nettoie facilement et amollit fortement ». Connues des Incas chez lesquels elle était utilisée dans le cadre des infections fébriles (Hegazi, 1997), elle est retrouvée également dans les livres de médecine de Géorgie à partir du 12<sup>ème</sup> siècle. En France, ce n'est qu'au début du 18<sup>ème</sup> siècle que le terme de propolis apparaît dans les écrits d'Amboise (chirurgien d'Henri II de François 1<sup>er</sup>, de Charles IX ainsi que d'Henri III).

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, on trouve quelques traces de son usage dans les traitements des plaies, mais c'est surtout à l'occasion de la guerre de Boers en Afrique du sud, dans les années 1900, qu'elle connaît son apogée d'utilisation grâce à ses propriétés désinfectantes et cicatrisantes (Hegazi et *al*, 2000).

A la fin du 21<sup>ème</sup> siècle, un important marché de la propolis existe en Russie et en Allemagne, c'était un remède populaire qui prétendait soigner tous les maux. On l'employait surtout en usage externe comme anti-infectieux, cicatrisant, adoucissant et anti-inflammatoire sous formes d'onguent d'emplâtre, de lotion et de fumigation. Lors de la dernière guerre mondiale, la propolis a été expérimentée dans des cliniques Soviétiques. Les applications de ce fameux produit sont très intéressantes dans la médecine vétérinaire empirique pour le traitement des hémorragies et des plaies de toute nature (Hegazi, 1997).

## 2. Définition et Etymologie

La propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies par les abeilles sur certaines parties des végétaux (essentiellement les bourgeons et les écorces de certains arbres), substances qu'elles rapportent à la ruche et qu'elles modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs propres sécrétions (cire et sécrétions salivaires principalement) (Marcucci et *al*, 2001).

Etymologiquement, « *pro* » (devant) et « *polis* » (cité) veut dire « devant la cité » ou « Protège la cité ». Son nom résume bien à lui seul les propriétés et les rôles de cette substance d'origine à la fois végétale et animale (Antonio et *al*, 2005; Ghisalberti, 1997). Bien que la composition soit relativement différente selon l'origine géobotanique, l'activité des diverses propolis reste commune (Velikova et *al*, 2000; D'Arcy, 2005).

## 3. Origine de la propolis

La propolis à deux origines :

### 3.1. Origine externe :

Les principales essences d'arbres, connues pour être productrices de propolis sont différents conifères : pin, sapin, épicéa, et plusieurs espèces de peupliers

### 3.2. Origine interne :

D'après les chercheurs allemands; la propolis serait résidu résineux, provenant de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe de l'abeille, situé entre le jabot et l'intestin moyen (Bankova et *al*, 2000).

Il faut toutefois noter que la propolis diffère, tant du point de vue qualitatif que quantitatif des résines végétales, dont elle est issue ; la matière résineuse brute est additionnée de cire, de sécrétions salivaires, de pollen et de divers impuretés, donnant naissance à une substance tout à fait originale.

## 4. La récolte de la propolis

### 4.1. Par les abeilles

On sait maintenant que la propolis est formée à partir des résines végétales sécrétées par les bourgeons et l'écorce de certains arbres. La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source qu'elle attaque avec ses mandibules. Elle

décolle les fragments de résine, les mélange avec ses mandibules et les incorpore à sa salive. Puis, 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. Enfin, elle entasse et loge les gouttelettes formées dans ses corbeilles et les rapporte à la ruche (Figure 1) (Bankova et *al*, 2002; Kartal et *al*, 2002 ; Sawaya et *al*, 2002).



**Figure 1** : Butineuses récoltant et portant deux gouttelettes de propolis.

#### 4.2. Condition de récolte

Cette récolte ne répond pas à des règles bien définies et constantes elle dépend de nombreux facteurs (saisonniers, géographiques, climatiques).

#### 4.3. Par l'homme

L'homme récolte la propolis par plusieurs méthodes :

- **Par grattage** : cette méthode consiste à gratter la propolis qui se dispose sur les parois internes de la ruche.
- **Par les grilles** : c'est une méthode très efficace qui donne une très bonne qualité de propolis; elle consiste à mettre des grilles ou des toiles à l'entrée de la ruche, l'abeille bouche par de la propolis les interstices des grilles ou toiles, l'apiculteur change toutefois ces toiles ou grilles, il les met dans un congélateur pendant quelques heures, la propolis par la suite, se décolle facilement des grilles.

## 5. Utilisation de la propolis

### 5.1. Utilisation de la propolis par les abeilles

La propolis est utilisée à de nombreuses fins à l'intérieur de la ruche :

- Pour construire éventuellement de véritables barrières de défense
- Pour rendre la ruche parfaitement hermétique, permettant une bonne isolation thermique
- Pour vernisser l'ensemble des surfaces intérieures, afin d'en supprimer les aspérités
- Pour recouvrir d'une fine pellicule les nouveaux rayons, ainsi que l'intérieur de la totalité des cellules avant que la reine ne vienne y pondre (sorte de stérilisation)
- Pour enduire en combinaison avec de la cire, les petits animaux ou insectes, qui ne peuvent être évacués, sorte d'embaumement s'opposant ainsi à toute décomposition putride
- Enfin, pour consolider les cadres (Yves, 1981).

### 5.2. Utilisation par l'homme

La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tels que :

- le cosmétique où elle fait partie de la formule de toutes sortes de crèmes, lotions, shampoings.
- la médecine (Kouidhi et *al*, 2010)
- et en technologie agroalimentaire (Tosi et *al*, 2007)

## 6. Propriétés physico-chimiques :

### 6.1. Aspect

La propolis se présente sous l'aspect d'une substance de consistance variable en fonction de la température, dure et friable à 15° C, elle devient molle et malléable aux alentours de 30° C, puis collante ou gluante au-dessus, jusqu'à fondre en moyenne vers 60-70°C, parfois 100° C et au-delà (Alexandre, 1999).

### 6.2. Couleur

Très variable selon sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noir.

### 6.3. Saveur :

Souvent âcre et parfois amère.

#### 6.4. 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.

#### 6.5. Solubilité

La propolis est insoluble dans l'eau froide, mais elle l'est partiellement par certains procédés (ébullition à reflux par exemple) ; elle est partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, et seul un mélange adéquat de différents solvants permettent de dissoudre la quasi-totalité de ses composants.

#### 7. Conservation

La propolis (Figures 2 et 3) doit être conservée à l'abri de la lumière, de l'humidité, de la chaleur et doit être utilisée aussi fraîche que possible. On peut la conserver sous forme lyophilisée, ce qui lui permet de garder toutes ses propriétés sur une très longue durée.



**Figure 2:** Propolis dans la ruche



**Figure 3:** Propolis brute

#### 8. Composition chimique de la propolis

La composition de la propolis est variable selon l'origine géographique et l'écologie de l'abeille, ainsi que des arbres se trouvant dans son écosystème. Il existe des différences significatives de composition entre les propolis, selon le lieu géographique de la ruche, les végétaux employés, les espèces d'abeilles et la disponibilité des végétaux nécessaires à l'élaboration de la propolis (Koru *et al*, 2007).

A ce jour plus de 300 substances ont été identifiées dans la propolis mais les principaux sont de la classe des flavonoïdes (Kartal *et al*, 2002), substances qui jouent un rôle considérable en thérapeutique (Su-Hsiang *et al*, 2004 ; Rufatto *et al*, 2017). On trouve également des acides gras et des acides phénoliques et ses esters, terpènes, aldéhydes aromatiques et alcool (Kartal *et al*, 2002).



Les abeilles modifient la composition de la propolis à travers l'action de  $\beta$ -glycosidase, cette enzyme hydrolyse l'hétéroglycosides des flavonoïdes en aglycones (Park et *al*, 1997; Marcucci et *al*, 2001).

L'étude de Boutabet et *al*, en 2011 sur la propolis algérienne a permis de mettre en évidence 5 flavonoïdes. Parmi ces flavonoïdes, on trouve, un chalcone (pinostrobin), deux flavones (la chrysin et la tectochrysin) et deux flavanones (la pinocembrin et la naringénin).

## 9. Toxicité

Il a été démontré que la propolis n'est pas toxique pour l'homme et les animaux si elle est consommée en quantité raisonnable (Ghisalberti, 1997), et elle ne présente aucune interaction avec d'autres substances thérapeutiques (Burdock, 1998).

## 10. Propriétés thérapeutiques

La propolis est considérée l'un des plus anciens remèdes de l'humanité, en raison de ses propriétés thérapeutiques dues à la présence essentiellement de flavonoïdes (Park et *al*, 1997 ; Sera-Bonvehi et *al*, 1994):

effet antibactérien (Kujumgier et *al*, 1999 ; Velikova et *al*, 2000), effet antifongique (Murad et *al*, 2002 ; Oliveira, 2006) ; effet antiviral (Huleihel et *al*, 2002; Schnitzler et *al*, 2010), effet antiparasitaire (Gressler et *al*, 2012 ; Otoguro et *al*, 2011 ; Hegazi et *al*, 2007 ; Duran et *al*, 2011), effet immunitaire (Nakamura et *al*, 2010 ; Cheung et *al*, 2011), effet anticancéreux (Carvallho et *al*, 2011 ; Wu et *al*., 2011 ; Vatansever et *al*, 2010; Popolo et *al*, 2009 ; Sulaiman et *al*, 2012), effet antioxydant (Attia et *al*, 2012 ; Ramadan et *al*, 2012 ; Gülçin et *al*, 2010), effet hépatoprotecteur (Benskota et *al*, 2001), effet proapoptotique (Bankova, 2005).

## **Chapitre II : Résistance par efflux**

## 1. Les pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par exportation active grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou au contraire responsables de MDR (*multidrug resistance*). Ils sont impliqués dans l'incorporation des ions et nutriments essentiels, l'excrétion des métabolites et des substances toxiques, et la communication entre les cellules et l'environnement. Ces systèmes sont répandus aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes (comme les bactéries) (Van Bambeke et *al*, 2000 ; Li et *al*, 2004).

Certaines pompes d'efflux sont capables d'exporter des antibiotiques et peuvent être impliquées dans la résistance aux anti-infectieux.

Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par hydrolyse d'ATP (famille ABC), pour cela ils sont classés en cinq familles (Tableau 1, Figure 4).

**Tableau 1.** Classification et caractéristiques des systèmes d'efflux bactériens impliqués dans la résistance aux antibiotiques (Lomovskaya et *al*, 2001<sup>a</sup>)

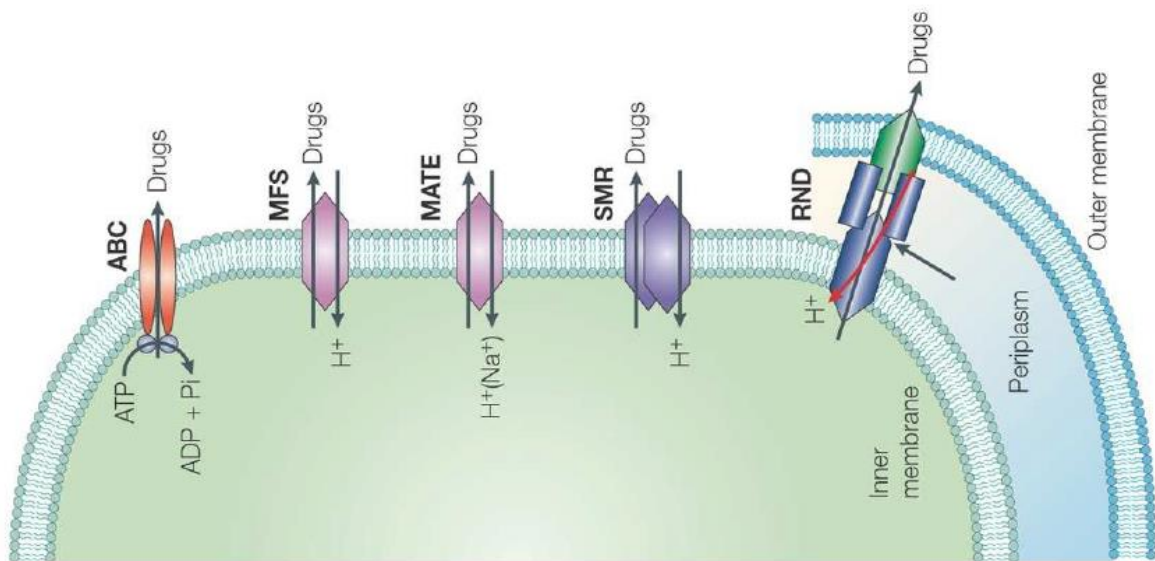
Familles	Source d'énergie	Spécificité de substrat	Bactéries	Nombre de TMS
<b>ABC</b>	<b>Hydrolyse de l'ATP</b>	<b>Spécifique, MDR</b>	<b>Gram+, Gram-</b>	<b>6 ou 12</b>
<b>SMR</b>	<b>FPM</b>	<b>MDR</b>	<b>Gram+, Gram-</b>	<b>4</b>
<b>MFS</b>	<b>FPM</b>	<b>Spécifique, MDR</b>	<b>Gram+, Gram-</b>	<b>12 ou 14</b>
<b>MATE</b>	<b>FPM</b>	<b>MDR</b>	<b>Gram-</b>	<b>1</b>
<b>RND</b>	<b>FPM</b>	<b>MDR</b>	<b>Gram-</b>	<b>12</b>

FPM : Force Proton Motrice

RND : Résistance-Nodulation-Division, ABC : **ATP-binding cassette**,

MFS : *Major facilitator superfamily*, SMR : *Small multidrug resistance*

MATE : *Multidrug and toxic compound extrusion*, MDR : multidrug resistance



**Figure 4.** Les cinq familles de pompes d'efflux bactériennes (Cattoir, 2004)

**MFS** ou *major facilitator superfamily* (ex. NorA chez *Staphylococcus aureus*) ; **SMR** ou *small multidrug resistance* (ex. EmrE chez *Escherichia coli*) ; **MATE** ou *multidrug and toxic compound extrusion* (ex. NorM chez *Vibrio parahaemolyticus*) ; **RND** ou *resistancenodulation cell division* (ex. MexB chez *Pseudomonas aeruginosa*) avec MexA (*membrane fusion protein*) et OprM (*outer membrane factor*) ; **ABC** ou *ATP-binding cassette* (ex. LmrA chez *Lactococcus lactis*). ATB : antibiotique substrat.

ABC transporteurs et systèmes MFS existent aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes, alors que les familles SMR, RND et MATE n'ont été trouvées que chez les bactéries (Li, et al, 2004 ; Van Bambeke et al, 2000 ; Van Bambeke et al, 2003 ; Putman et al, 2000).

## 2. Résistance des bactéries aux antibiotiques et efflux

### 2.1. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des agents strictement antibactériens, dont l'activité est liée au mode d'action spécifique. Ils sont classés sur la base de leur structure chimique en douze familles et quatre antibiotiques isolés (Tableau 2).

Tableau 2. Classification des antibiotiques

Familles	<ul style="list-style-type: none"> <li>β-lactamines</li> <li>Aminosides</li> <li>Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS)</li> <li>Quinolones</li> <li>Tétracyclines</li> <li>Phénicolés</li> <li>Sulfamides ± triméthoprim</li> <li>Glycopeptides</li> <li>Rifamycines</li> <li>Polypeptides</li> <li>Nitro-imidazoles</li> <li>Nitrofuranes</li> </ul>
Antibiotiques isolés	<ul style="list-style-type: none"> <li>Acide fusidique</li> <li>Fosfomycine</li> <li>Linézolide</li> <li>Mupirocine</li> </ul>

La cellule bactérienne offre aux antibiotiques un nombre limité de cibles:

(i) ils peuvent bloquer la synthèse du peptidoglycane (un composant essentiel de la paroi bactérienne), (ii) inhiber la synthèse protéique ou le métabolisme des acides nucléiques, (iii) désorganiser les membranes, ou (iv) jouer le rôle d'antimétabolites (Figure 5).

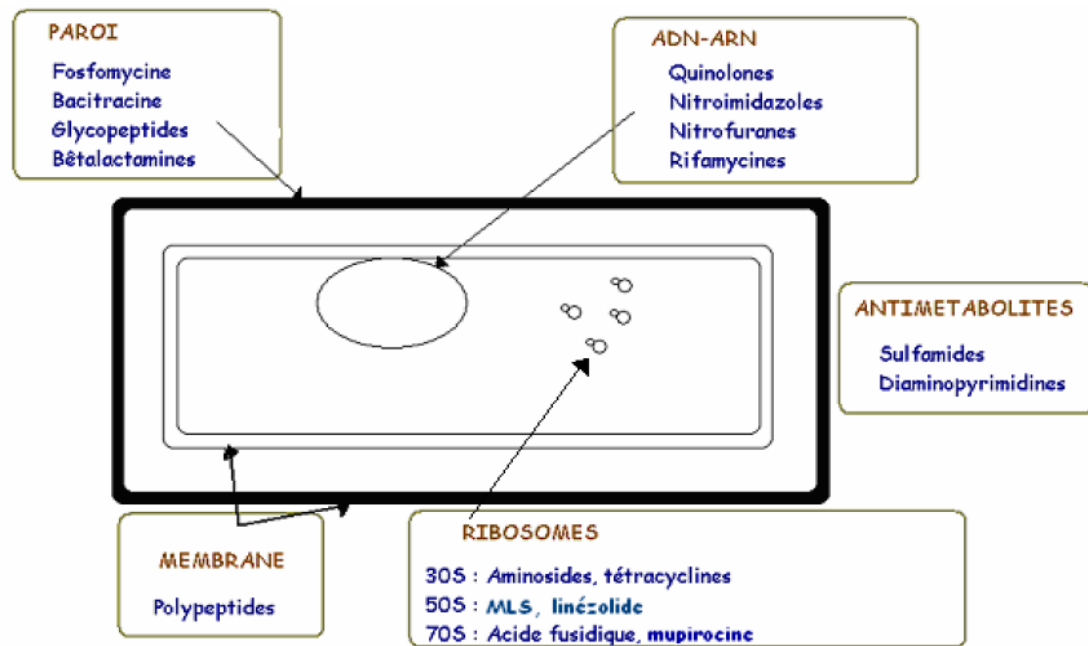


Figure 5. Mode d'action des antibiotiques

## 2.2. Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

### a- Mécanismes génétiques

Il faut distinguer les résistances naturelles et les résistances acquises (Bouyahya et *al*, 2017).

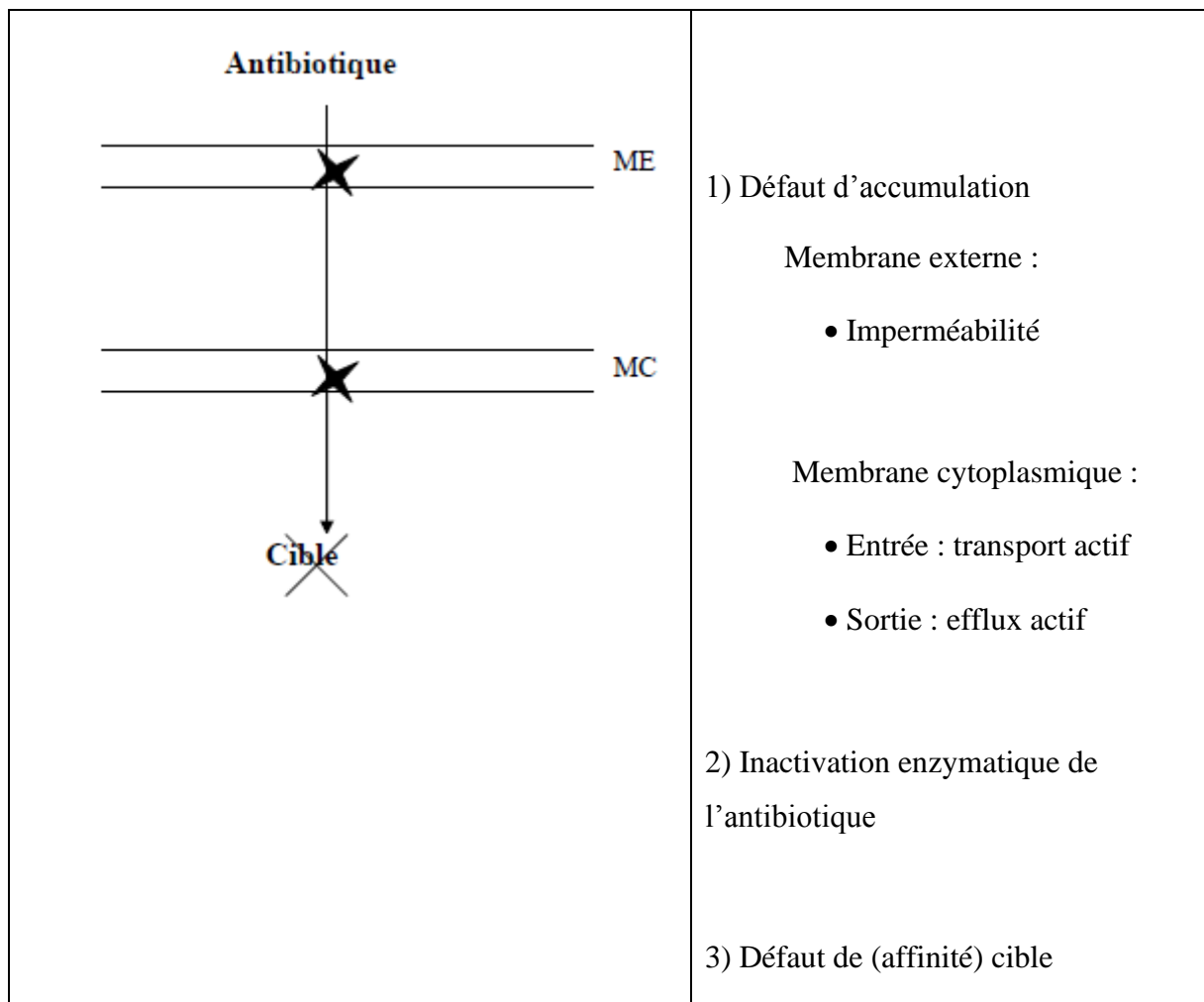
- Les résistances naturelles affectent d'emblée toutes les souches d'une même espèce. Les gènes en cause font partie du patrimoine génétique de l'espèce. Ces résistances sont constantes pour une espèce bactérienne donnée. Cependant, leur niveau d'expression peut être modulé par des systèmes de régulation.

- Les résistances acquises affectent une fraction des souches d'espèces naturellement sensibles, à la suite d'évènements génétiques variés : mutations chromosomiques ou acquisition de gènes. Les gènes acquis sont habituellement véhiculés par des éléments mobiles tels que les plasmides et/ou les transposons. Contrairement aux résistances naturelles, les résistances acquises sont éminemment variables et évolutives.

### b- Mécanismes biochimiques

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par trois mécanismes biochimiques : (i) accumulation insuffisante de l'antibiotique au contact de sa cible ; (ii) inactivation de

l'antibiotique par des enzymes bactériennes ; (iii) absence de cible ou d'affinité de(s) cible(s) (Figure 6).

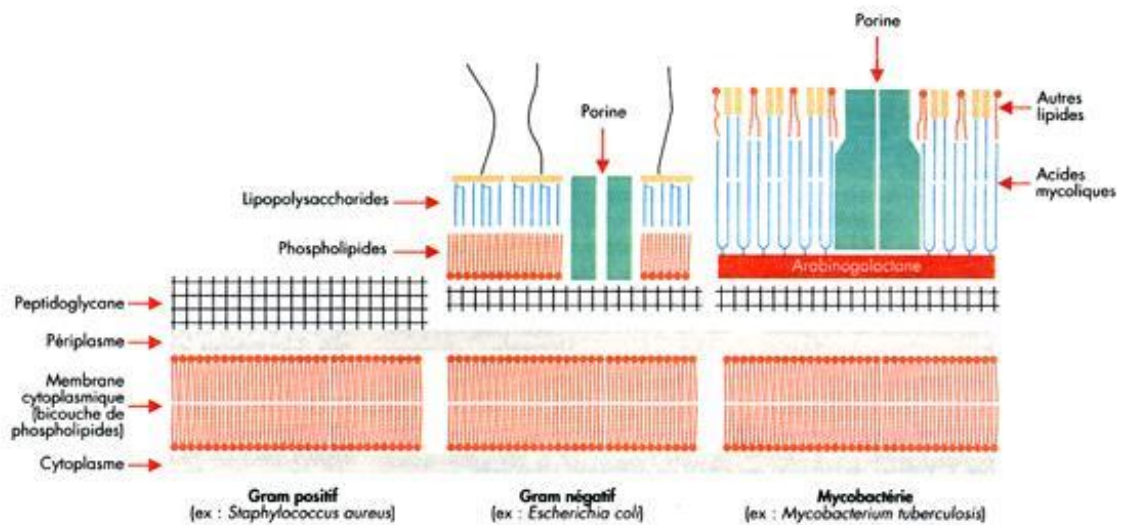


**Figure 6.** Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques.

Le défaut d'accumulation peut être dû à une imperméabilité ou à un efflux actif.

L'imperméabilité peut être liée à l'existence d'une membrane externe chez les Gram négatif et les Mycobactéries (Figure 7) ou à un défaut de transport actif au travers de la membrane cytoplasmique, pour les antibiotiques qui ont une cible intra-cytoplasmique. Des systèmes d'efflux actif, protéines intrinsèques de la membrane cytoplasmique, peuvent refouler les antibiotiques vers le milieu extérieur.

Les résistances naturelles et acquises peuvent avoir pour effecteurs l'un ou l'autre de ces trois mécanismes biochimiques.



**Figure 7.** Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des mycobactéries.

Ces trois types de bactéries possèdent, comme toute cellule, une membrane cytoplasmique. Cette membrane est recouverte d'un réseau tridimensionnel constitué de peptidoglycane, macromolécule formée de la répétition d'un motif disaccharide-pentapeptide.

### 2.3. Rôle de l'efflux dans la résistance des bactéries aux antibiotiques

Il existe deux types de pompes d'efflux capables d'entraîner la résistance aux antibiotiques (Marquez, 2005) :

- (i) les systèmes spécifiques, qui exportent un seul antibiotique ou une seule famille d'antibiotiques
- (ii) les systèmes à large spectre de substrats appelés MDR.

#### 2.3.1. Pompes spécifiques

Les pompes spécifiques sont généralement codées par des gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que plasmides et/ou transposons (Lomovskaya *et al*, 2001<sup>b</sup>). Elles sont donc responsables de résistances acquises, habituellement à haut niveau.

La résistance acquise par efflux spécifique concerne principalement trois familles d'antibiotiques : les Tétracyclines, les Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS) et les Phénicolés.



### 2.3.2. Pompes MDR

#### \* Résistances naturelles

Les pompes MDR sont généralement codées par des gènes chromosomiques qui font partie du patrimoine génétique de l'espèce (Lomovskaya et *al*, 1999). Toutes les bactéries produisent plusieurs pompes MDR, de même classe et de classes différentes.

Les pompes MDR participent à la résistance naturelle des espèces (Li et *al*, 2004). Ainsi l'inactivation génétique de NorA, AcrAB ou MexAB-OprM augmente la sensibilité de *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, respectivement, à une série d'antibiotiques montrant que ces transporteurs MDR sont exprimés chez les souches sauvages (Lomovskaya et *al*, 2001). L'inactivation génétique de la pompe majeure rend les Gram négatif aussi sensibles que les Gram positif à la plupart des antibiotiques.

De plus, la résistance naturelle par efflux MDR potentialise d'autres mécanismes de résistance. Chez les Gram négatif, l'effet des pompes d'efflux MDR se combine à l'imperméabilité membranaire pour entraîner une résistance naturelle particulièrement efficace, puisque les substrats efflués sont difficilement ré-accumulés.

Par ailleurs, l'expression de plusieurs pompes MDR est inductible par les antibiotiques qu'elles effluent, augmentant transitoirement en leur présence. Leur expression est aussi souvent modulée par des conditions environnementales, qui peuvent être rencontrées au cours des infections (ex : superoxydes et sels biliaires chez *E. coli*).

#### \* Résistances acquises

La résistance acquise par efflux MDR peut résulter de :

- Mutations : il s'agit le plus souvent de mutations dans le promoteur (ex : NorA de *S. aureus*) ou dans les gènes régulateurs (ex : MexAB-OprM de *P. aeruginosa*), entraînant une hyperproduction de la pompe (altérations quantitatives).
- Acquisition de gènes véhiculés par des plasmides/transposons (ex : *qacA* chez *S. aureus*) (Li et *al*, 2004).

La fréquence de la résistance par efflux est sûrement sous-estimée car plus difficile à détecter en routine et souvent associée à d'autres mécanismes de résistance (Van Bambeke, 2000).

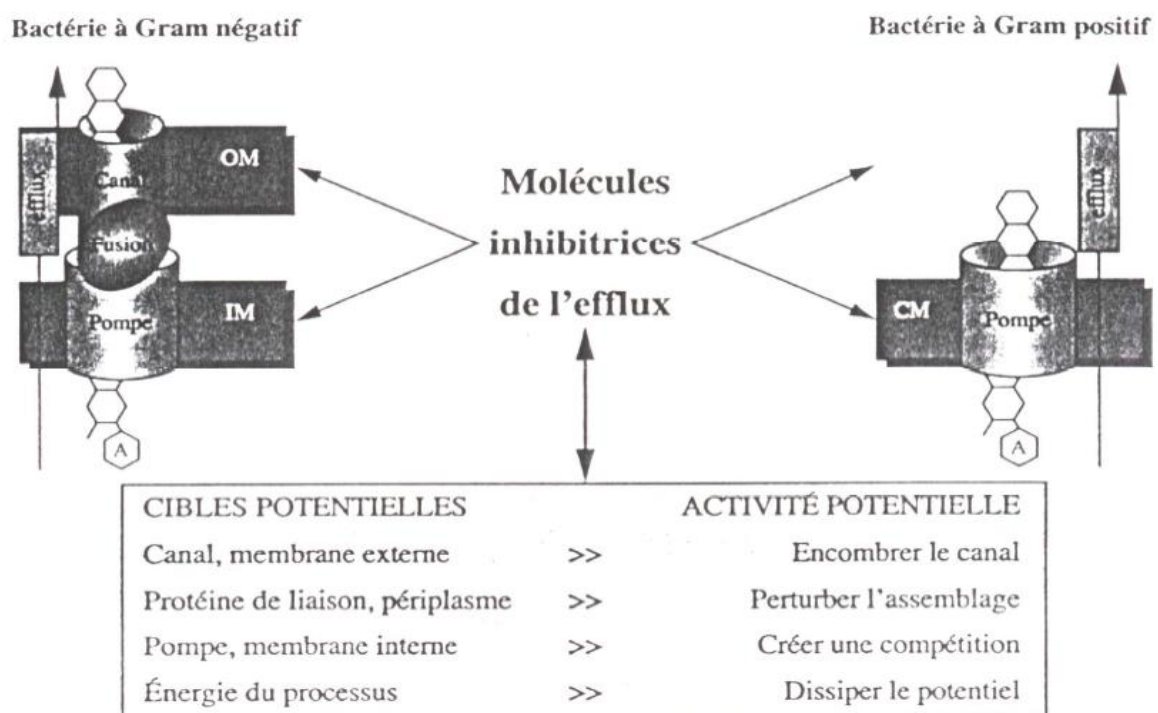
### 3. Inhibiteurs des pompes d'efflux bactériennes

Des inhibiteurs des pompes d'efflux (EPIs pour Efflux Pumps Inhibitors) administrables à l'homme permettraient de restaurer la sensibilité aux antibiotiques de souches résistantes par efflux (Kaatz, 2005). Malheureusement, la plupart des EPIs actuellement disponibles sont trop toxiques pour présenter un intérêt thérapeutique.

#### 3.1. Modes d'action des EPIs

En fonction de la physiologie des systèmes d'efflux, les EPIs peuvent avoir plusieurs cibles :

(i) la composante énergétique qui assure le transport ; (ii) la pompe elle même ; (iii) les caractéristiques fonctionnelles du canal ; (iv) l'assemblage du système, notamment des complexes tripartites retrouvés chez les Gram négatif (Borges-Walmsley *et al*, 2003 ; Masaoka *et al*, 2000 ; Pagès *et al*, 2005) (Figure 8).



**Figure 8.** Cibles potentielles dans le mécanisme d'efflux (Pagès, 2002).

Les « poisons d'énergie » qui agissent soit en inhibant la liaison de l'ATP, soit en perturbant le gradient de protons, sont toxiques pour l'homme.

L'inhibition de l'efflux potentiellement efficace en thérapeutique implique généralement un blocage du fonctionnement de la pompe: les inhibiteurs se lient directement à la pompe et la bloquent (Pagès, 2002). Récemment, il a été démontré que certains inhibiteurs de pompes MDR bactériennes agissaient en formant un complexe avec l'antibiotique, l'efflux de ce dernier étant gêné par la taille du complexe (Marquez, 2005).

### 3.2. Méthodes d'évaluation des EPIs

L'activité des EPIs potentiels peut être évaluée par des méthodes utilisant des bactéries, des cellules ou des membranes reconstituées.

Méthodes utilisant des bactéries.

Un germe test est mis en présence d'un substrat de la pompe, de l'EPI potentiel et de leur association, et l'effet EPI est apprécié par des techniques variées.

- Ce germe-test peut être : (i) un mutant spontané d'une souche sauvage, hyperproducteur de la pompe d'intérêt (ex : *S. aureus* hyperproducteur de NorA) (Kaatz et al, 1995).

- L'effet EPI peut être apprécié par :

(i) La croissance bactérienne en présence d'un antibiotique substrat :

- Réduction de la CMI de l'antibiotique en présence de l'EPI.

### 3.3. Exemples d'inhibiteurs

- ✓ Phénylalanine-arginine  $\beta$  naphthylamide (PA $\beta$ N) : inhibiteur des transporteurs MDR de la classe RND (Lomovskaya et al, 2001<sup>C</sup>).
- ✓ La Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) est l'un des premiers inhibiteurs efficaces sur les systèmes d'efflux bactériens décrits. En perturbant le gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique, le CCCP détruit l'une des composantes énergétiques de la pompe et bloque l'expulsion des antibiotiques. Le CCCP possède une excellente activité sur plusieurs pompes, de Gram positif et de Gram négatif, restaurant ainsi la concentration intracellulaire des antibiotiques expulsés (Bolhuis et al, 1997 ; Putman et al, 2000).
- ✓ La réserpine est un alcaloïde naturel des plantes, extrait de *Rauwolfia serpentina*. Elle a un effet inhibiteur sur les transporteurs des Gram positif (Marquez, 2005 ; Neyfakh, 1992). Il a été démontré chez des *S. aureus* hyperproducteurs de NorA, que la réserpine

diminue aussi le risque d'émergence de mutants résistants (Markham, 1999 ; Marquez, 2005).

- ✓ Le vérapamil inhibe un grand nombre de transporteurs MFS, incluant NorA de *S. aureus* (Markham, 1999).



# Etude Expérimentale

# **Chapitre I : Etude *in vitro***

L'étude expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire de recherche de Bactériologie de l'UMR CNRS 5234 (« Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité ») de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2 et au laboratoire de microbiologie de la faculté SNV, de l'université de Jijel. Elle est consacrée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique (EEP) de la propolis sur des souches isogéniques, ne différant que par l'expression ou l'hyper expression d'une pompe donnée, sélectionnée à partir de la banque de souches.

## **1. Matériel et méthodes**

### **1.1. Matériel**

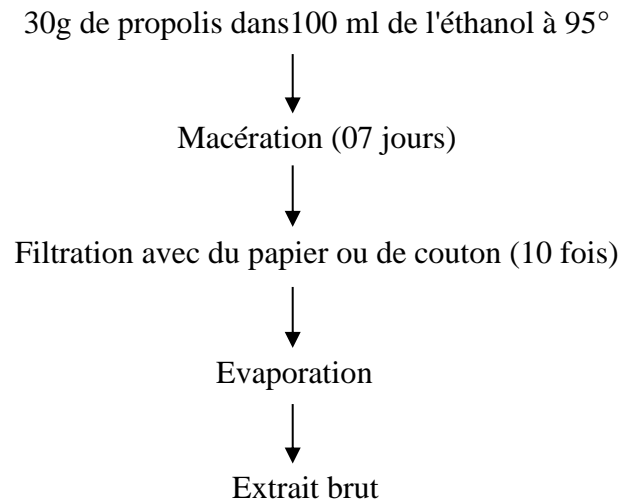
#### **1.1.1. Récolte de la propolis**

La propolis est récoltée au mois d'Avril 2005, elle est fournie par la coopérative apicole de la région de Kaous (Jijel). La récolte est effectuée par raclage et grattage de l'entrée des ruches. La propolis est stockée à l'abri de la lumière et de la chaleur dans des récipients bien fermés avant son utilisation pour garder ses principes actifs intacts.

#### **1.1.2. Préparation de l'extrait brut de la propolis**

L'extraction des substances bioactives contenues dans la propolis est réalisée selon le protocole décrit par Bruneton (1999).

L'échantillon de la propolis est découpé en petits morceaux puis lavé dans l'éthanol pendant deux heures pour éliminer les impuretés. Ensuite, 1g de la propolis est plongé dans 10 ml d'éthanol 95%. La macération est réalisée à l'abri de la lumière et à la température ambiante pendant 15 jours avec agitation de temps en temps. Le macérat est filtré sur papier filtre et par la suite le filtrat est évaporé au rotavapeur (Evaporator E100 Heidolph) à 79%. Le résidu est repris dans 10 ml de méthanol 70% et laissé à macération pendant une nuit. Après évaporation, l'extrait obtenu est appelé extrait brut de la propolis (Figure 9).



**Figure 9** : Protocole d'extraction de l'extrait de Propolis

## 1.2. Inhibiteurs des pompes d'efflux

Résérpine (Res), oméprazole (Omeprazole), Phénylalanine Arginine  $\beta$ -Naphthylamide (PA $\beta$ N), Carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP), vérapamil (vérapamil) ont été achetés à la firme Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Ces inhibiteurs ont été préparés extemporanément dans le solvant adéquat Diméthylsulfoxyde à 10% (DMSO), eau distillée stérile

## 1.3. Produit chimique :

Le DMSO a été utilisé pour réaliser les dilutions de l'extrait de propolis.

Un test d'innocuité du DMSO sur les souches bactériennes a été réalisé par la méthode de CMI de l'extrait de propolis. Puis des dilutions au 1/100 ont été réalisées dans l'eau distillée.

## 1.4. Souches bactériennes et conditions de culture

### 1.4.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées pour déterminer la CMI de l'EEP sont présentés dans le tableau 3.



Tableau 3 : Caractéristiques des souches utilisées

Bactéries	Numéro de la souche	Caractéristique de la souche
<b>Gram positif</b>		
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	Sensible aux antibiotiques
	SA 1 (mutant de la souche ATCC 25923)	Hyperproduisant le système NorA
	MRSA (Methicillino résistante <i>S. aureus</i> )	Acquisition d'une PLP2A, (gène <i>mecA</i> )
	RN4220	Sensible aux antibiotiques
	mutS2	Souche RN4220 <i>mutS</i> , hypermutatrice
<b>Gram négatif</b>		
<i>E. coli</i>	Ec2163	Productrice de CTX-M-15 <sup>(a)</sup>
	TG1	Souche sauvage
	TG1 $\Delta$ AcrAB	Souche avec son système AcrAB inactivé (hypersensible)
	TG1 $\Delta$ AcrAB + pUAcrAB	Hyperproductrice du système d'efflux AcrABToIC
<i>K. pneumoniae</i>	Kp2078	Kp2078, non- hypermutatrice
	Kp2079	Dérivée de la souche Kp2078, hypermutatrice
<i>P. aeruginosa</i>	Pa678	TEM-24(a)
<i>Shigella flexneri</i>	Sf588	OXA-1(b)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	Sensible aux antibiotiques
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966	$\Delta$ ahB+pEx19Gm $\Delta$ ahB+pEX-ABC

(a), CTXM-15 est une  $\beta$ -lactamase à large spectre (BLSE), (b), pénicillinase peu sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase

**Souches hypersensibles :** TG1 $\Delta$ acrAB pour *E. coli* dépourvue de son système d'efflux

**Souches résistantes:** SA-1 pour *S. aureus* aux antibiotiques utilisés en thérapies, TG1 $\Delta$ acrAB /pUAcrAB, pour *E. coli* souche résistante aux antibactériens.

#### 1.4.2. Milieux de culture

Les souches ont été cultivées à 37°C en aérobiose, sur milieu Mueller-Hinton (MH, BioRad, Marnes-la-Coquette, France ou AES), additionné d'antibiotique si nécessaire (ampicilline 100  $\mu$ g/mL, chloramphénicol 30  $\mu$ g/mL, tétracycline 15  $\mu$ g/mL). Elles ont été conservées par congélation à -80°C en bouillon Brain Heart (BH, BioRad, Marnes-la-Coquette, France), additionné de 10% de glycérol.

### 1.5. Détermination des CMI<sub>s</sub>

#### *Principe :*

Classiquement, la CMI est déterminée par dilution, en milieu solide ou liquide. Dans les deux cas, une solution mère d'antibiotique ou de molécule à évaluer est diluée de  $\frac{1}{2}$  en  $\frac{1}{2}$ , et chaque dilution est mise en contact avec la (les) souche(s) à tester. Après incubation, la CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique laissant au plus 3 colonies.

La détermination de la CMI en gélose permet de tester simultanément plusieurs souches, et de vérifier l'absence de contamination. L'inoculum standard est d'environ  $10^4$  UFC.

#### *Protocole réalisé :*

Dans ce travail, les CMI<sub>s</sub> de l'extrait éthanolique de propolis et EPI ont été déterminées par les techniques de dilution en gélose. Des solutions mères ont été préparées extemporanément dans les solvants adéquats (eau distillée, DMSO). A partir de ces solutions mères, des gammes de concentrations décroissantes de raison 2 ont été réalisées à 100 fois la concentration finale.

Chaque dilution a ensuite été incorporée au 1/100 dans de la gélose MH en surfusion coulée en boîtes de Pétri. Les gammes finales s'étendaient de 1024 et 0,007  $\mu\text{g/mL}$  selon le cas. Le milieu utilisé était la gélose MH sans additif. Pour chaque souche, une suspension de densité 0,5 Mc Farland, mesurée au densitomètre (BioMérieux) a été préparée à partir d'une culture bactérienne de 18 heures sur 1/10 dans de l'eau distillée. Ces suspensions ont été placées à raison de 200  $\mu\text{L}$  dans les puits d'une microplaque stérile. L'ensemencement a été effectué à l'aide d'un appareil de Steers.

L'inoculum final représentait environ  $10^4$  UFC par spot. Un témoin de croissance a été ensemencé au début et à la fin de l'expérience pour vérifier l'ensemencement. La CMI a été lue après une nuit d'incubation à 37°C en aérobiose. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois essais indépendants.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Valeurs des CMI de l'extrait de propolis:

Les CMI réalisées pour les souches sensibles sont représentés dans le tableau 4.

**Tableau 4** : Détermination de la CMI de la propolis A sur un panel de souches bactériennes sensibles aux antibiotiques

Bactérie		Code de la souche	Caractéristique de bactérie	CMI propolis (mg/ml)
Gram (+)	<i>S. aureus</i>	ATTC25923	Sensible aux antibiotiques	0.04
	<i>S. epidermidis</i>	CIP81.55 <sup>T</sup>	«	0.06
	<i>Enterococcus faecalis</i>	JH2-2	«	0.06
Gram (-)	<i>E. coli</i>	ATCC25922	«	8
	<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC25853	«	4
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC7966	«	0.12

ATCC : Ameican Type Culture Collection ; CIP : Collection Pasteur Istitute

Ces résultats confirment les résultats de la littérature, en effet notre extrait de propolis est actif sur la plupart des bactéries utilisées. Nous notons que les Gram (+) sont plus sensibles à la propolis avec des CMI allant de 0,04 à 0.06 mg/ml. Celles des Gram (-) avec des valeurs de 4 et 8 mg/ml sauf pour la souche *Aeromonas hydrophila* qui montre une CMI de 0.12 mg/ml.

La majorité des études montrent que la propolis possède une activité antibactérienne plus importante pour les Gram positif que les bactéries Gram négatif, ceci est expliqué par la différence au niveau de la structure bactérienne ; la membrane externe des bactéries Gram négatif composée essentiellement de phospholipides et lipopolysaccharides la rend imperméable à la plupart des molécules (Silici et al, 2005 ; Chen et al, 2018).

La propriété antimicrobienne de la propolis a été largement étudié et plusieurs auteurs ont démontré son action antibactérienne (Ghisalberti, 1979; Toth et al, 1987 ; Kujumgiev et al, 1993; Sforcin et al, 2000; Orsi et al, 2005; Scazzocchio et al, 2006).

La Galagine et l'acide caféique de la propolis sont des agents d'inhibition enzymatiques chez les bactéries (Havsteen, 1983; Koo et al, 2002). L'inhibition de l'ARN polymérase par des composés de propolis a été vérifiée (Takaisi et al, 1994) et peut expliquer partiellement la

synergie des EEP avec des médicaments qui agissent en inhibant la synthèse protéique (Fernandes Jr. et *al*, 2005).

Concernant *Aeromonas hydrophila*, une étude d'Abd-El-Rahman en 2009, rapporte dans son étude que la propolis diminue la mortalité des poissons du Nil infecté par cette souche en activant leur système immunitaire.

## 2.2. CMI de la propolis A sur des souches présentant une hyperproduction de différents systèmes d'efflux.

Les valeurs des CMI sont représentées dans le tableau 5.

**Tableau 5.** CMI de la propolis A sur un panel de bactéries présentant des mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Bactérie	Numéro de la souche	Caractéristique de la souche	CMI de la propolis A en mg/ml
<b>Gram positif</b>			
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	Sensible aux antibiotiques	0.06
	SA 1 (mutant de la souche ATCC 25923)	Hyperproduisant le système NorA	0.06
	MRSA (Methicillino résistante <i>S. aureus</i> )	Acquisition d'une PLP2A, (gène <i>mecA</i> )	0.06
	RN4220	Sensible aux antibiotiques	0.5
	mutS2	Souche RN4220 <i>mutS</i> , hypermutatrice	0.5
<b>Gram négatif</b>			
<i>E. coli</i>	Ec2163	Productrice de CTX-M-15 <sup>(a)</sup>	8
	TG1	Souche sauvage	8
	TG1 $\Delta$ AcrAB	Souche avec son système AcrAB inactivé (hypersensible)	0.25
	TG1 $\Delta$ AcrAB + pUAcrAB	Hyperproductrice du système d'efflux AcrAB/TolC	8
<i>K. pneumoniae</i>	Kp2078	Kp2078, non- hypermutatrice	4
	Kp2079	Dérivée de la souche Kp2078, hypermutatrice	2
<i>P. aeruginosa</i>	Pa678	TEM-24 <sup>(a)</sup>	4
<i>Shigella flexneri</i>	Sf588	OXA-1 <sup>(b)</sup>	2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	Sensible aux antibiotiques	0.12
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966	$\Delta$ ahB+pEx19Gm	0.12
		$\Delta$ ahB+pEX-ABC	0.25

(a), CTXM-15 est une  $\beta$ -lactamase à large spectre (BLSE), (b), pénicillinase peu sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase.

Les résultats n'ont montré aucune influence lorsque d'autres mécanismes de résistance aux antibiotiques (production de  $\beta$ -lactamase, modification des PLP) sont associés (Tableau 5) avec des valeurs variant entre 0.12 et 8 mg/ml. La CMI de 8 mg/ml est surtout observé pour la souche productrice d'une  $\beta$ -lactamase (*E.coli* Ec2163).

La souche *K. pneumoniae* hypermutatrice montre une CMI de 2 mg/ml, alors que sa la même souche mais non hypermutatrice montre une CMI de 4mg/ml.

Les souches isogéniques d'*E. coli* TG1 sauvage et celle dont le système d'efflux AcrAB est inactivé, la CMI diminue de 8mg/ml à 2 mg/ml. Lorsque la souche hypersensible est complémentée avec un plasmide apportant les gènes AcrAB, la CMI de la propolis augmente. Ces résultats suggèrent que le système AcrAB efflue la propolis.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux bétalactamines par production d'une  $\beta$ -lactamase montre une valeur de 4mg/ml et la souche *Shigella flexneri* productrice d'une pénicillinase résistante aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase une CMI de la propolis de 2 mg/ml.

L'efficacité de la propolis sur la souche *Aeromonas hydrophilanus* semble intéressante, où les valeurs des CMI sont de 0.12 et 0.25mg/ml. Cette d'une souche possédant le gène *aheB* cloné dans le vecteur pEX19Gm, générant un plasmide recombinant, lui conférant ainsi une résistance à de nombreux antibiotiques, celle contenant le pEX-ABC est hypermutatrice.

La présence de cette souche dans l'environnement augmente significativement les mois les plus chauds de l'année avec comme conséquence une présence accrue dans les aliments tels que les produits frais, les crèmes et les viandes (Janda et al, 1998). De plus cette souche peut survivre pendant de longues périodes dans les eaux potables, favorisant ainsi leur transmission à l'homme (Kuhn et al, 1997 ; Messi et al, 2002 ; Rahman et al, 2007) provoquant ainsi des gastroentérites (Abbott, 2003 ; Janda et al, 1998). La souche ATTCC7966 est l'une des plus pathogènes chez l'homme (Janda et al, 1991).

En parallèle, nous avons également testé quelques souches dites «hypermutatrices" (Tableau 6)

**Tableau 6.** CMI de la propolis vis-à-vis des souches hypermutatrices

Espèces		Caractéristiques	CMI propolis mg/ml
Gram (+)	<i>S. aureus</i>	ATCC 25923, sauvage, sensible aux antibiotiques	0.06
	<i>S.aureus</i>	Souche clinique	0.12
	<i>S.aureus</i>	Mutant Sa 1199 NorA	0.25
Gram (-)	<i>E. coli</i>	Souche sauvage	8
	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i> TG1 $\Delta$ acrAB	0.25
	<i>E.coli</i>	Souche KAM3 + plasmide (AMP-R) avec système AcrAB	8
	<i>E.coli</i>	Souche AG 100 $\Delta$ acrAB	0.25

L'efficacité de la propolis est observée pour la majorité des souches qui présentaient des résistances à de nombreux antibiotiques avec des valeurs allant de 0.06 mg/ml à 0.25 mg/ml. Notre propolis est très efficace sur les souches de Staphylocoques y compris la souche surexprimant son système d'efflux NorA avec une CMI de 0.25mg/ml.

La sensibilité est amoindrie pour les deux souches d'*E.coli*, souche sauvage et la souche possédant le plasmide de résistance vis-à-vis de l'ampicilline et possédant la pompe d'efflux AcrAB avec une CMI de 8 mg/ml.

Ce qui attire notre attention est que la propolis montre toujours des CMI supérieures à celles obtenus avec les Gram positif. Ces derniers mêmes quand elle possède des systèmes d'efflux comme pour *S.aureus* mutante hyperproduisant son système NorA de résistance ont des CMI de 0.25 mg/ml. Ceci comme l'a rapporté la littérature est due à la différence de structure entre Gram positif et Gram négatif.

Puisque la propolis s'est montré efficace sur les souches Gram positif, nous avons élargie l'étude de son effet sur les souches à Gram négatif en l'associant avec des inhibiteurs de pompes d'efflux.

Nous avons déterminé la CMI de la propolis et des inhibiteurs, utilisés dans le domaine médical, vis-à-vis de certaines souches sélectionnées pour leur résistance vis-à-vis des antibiotiques utilisés en thérapeutiques (Tableau 7).

Tableau 7 : Résultats des valeurs CMI des inhibiteurs

Souches		CMI (mg/ml) EEP	CMI EPIs				
			PaβN	Res	Ver	Omep	CCP
<i>E. coli</i>	ATCC	≥8	128	512	512	8	8
	TG1	8	512	512	512	8	8
	TG1ΔacrAB	0.25	64	512	512	8	8
	AcrAB + pUacrAB	8	512	512	512	32	8
<i>Salmonella</i>	456	≥8	256	512	512	32	32
<i>Klebsielle pneumoniae</i>	593	8	≥512	512	512	8	8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3186	≥8	≥512	512	512	32	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2778	4	≥512	256	128	32	32

Les CMI des inhibiteurs montrent des valeurs variant entre 8 et  $\geq 512$  mg/ml; Alors que celles de la propolis entre 0.25 et  $\geq 8$ mg/ml.

La souche *E.coli* TG1 est une souche sauvage résistante à tous les antibiotiques et montre une CMI supérieure à 8mg/ml, par contre la souce AcrAB + pUacrAB montre une CMI de 0.25mg/ml.

Pour évaluer l'effet de la propolis sur ces mêmes souches nous avons associé cette dernière avec les inhibiteurs d'efflux. La concentration des ces derniers est utilisé au 1/4 de leur CMI représentés dans le tableau 4, dans le but d'éliminer l'effet des EPIs sur l'activité bactérienne et les résultats obtenus sont représenté dans le Tableau 8.

Table 8. Résultats des valeurs des CMI EEP seul et en association avec EPIs (1/4 CMI)

Souches		CMI (mg/ml) EEP	CMI EPIs				
			PaβN	Res	Ver	Omep	CCP
<i>E. coli</i>	ATCC	≥8	0.12	8	8	2	0.06
	TG1	8	0.06	≥8	≥8	≥8	1
	TG1ΔacrAB	0.25	0.12	1	1	1	0.5
	AcrAB+pUacrAB	8	≤0.06	≥8	≥8	≥8	0.12
<i>Salmonella</i>	456	≥8	>8	≥8	≥8	≥8	0.25
<i>Klebsielle pneumoniae</i>	593	8	≤0.06	2	4	4	≤0.06
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3186	≥8	0.25	8	8	≥8	≥8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2778	4	>8	8	≥8	≥8	1

Nous constatons que les valeurs des inhibiteurs en association avec la propolis ont diminué et varient d'une CMI inférieure ou égale à 0.06mg/ml à 8 mg/ml pour l'association

propolis-Pa $\beta$ N, de 1 à supérieure ou égale à 8 mg/ml pour l'association propolis-réserpine, propolis-vérapamil, et propolis-Oméprazole mais elle est inférieure ou égale à 0.06mg/ml à supérieure ou égale à 8mg/ml.

Les valeurs des CMI de la propolis seul se rapprochent de celle des inhibiteurs qui étaient plus efficace sur les souches, il s'agit des deux inhibiteurs Pa $\beta$ N et CCCP.

La souche d'*E.coli* TG1 cliniquement résistantes à plusieurs antibiotiques a une CMI de la propolis de 8 mg/ml, sa souche isogénique TG1 $\Delta$ acrAB sensible, avec une CMI de 0.25mg/ml par contre celle de TG1 $\Delta$ acrAB+pUacrAB est de 8mg/ml. Cependant, nous remarquons que la propolis en présence de Pa $\beta$ N et CCP restaure de la pompe d'efflux de cette même souche Ceci est probablement dû à l'effet des deux inhibiteurs qui restaure l'efficacité de la propolis et qui est révélé par la diminution de sa CMI à 0.006mg/ml avec Pa $\beta$ N et à 0.12mg/ml avec le CCP.

Ceci suppose que la propolis peut être partiellement effluer par les pompes d'efflux des bactéries Gram négatif et pourrait probablement expliqué que la propolis est moins efficace sur les bactéries Gram négatif que sur es Gram positif rapporté par la littérature.

Le puacrAB est un plasmide qui confère l'augmentation de la résistance aux médicaments (Nishino et *al*, 2001). Ce plasmide joue un rôle important dans le phénotype de résistance aux antibiotiques chez *E. coli*.

La superexpression des pompes d'efflux est fréquemment observée chez les bactéries responsables d'infections et elle est la cause de l'augmentation des valeurs des CMI des antibiotiques utilisés en thérapeutique. Pour cela les chercheurs suggèrent que les transporteurs membranaires sont devenus un facteur déterminant, à prendre en considération, de l'efficacité des anciens et des nouveaux antibiotiques (Lomovskaya et *al*, 2006). Par conséquent, la découverte et le développement d'agents antibactériens au cours de ces dernières années, prend en considération ce phénomène aussi bien chez les bactéries Gram positif que chez les Gram négatif.

L'inhibition des pompes à efflux est une voie très prometteuse soutenue par plusieurs chercheurs (Lomovskaya et *al*, 2001<sup>a</sup> ; Li, 2004 ; Lomovskaya, 2000<sup>b</sup> ; Marquez, 2005), pour lutter contre les infections causées par des agents pathogènes résistants grâce à la surexpression



génétiques des pompes d'efflux. Cependant, pour faciliter leurs applications cliniques dans le futur, beaucoup d'efforts doivent être réalisés pour réduire leur cytotoxicité (Sun et al, 2014).

Ce fait nous a encouragés à utiliser la propolis, produit naturel sans risque de toxicité chez l'homme, comme alternative pour traiter les infections d'origine bactérienne.

Pour cela nous allons évaluer dans la deuxième partie de cette étude expérimentale l'effet de la propolis utilisée comme traitement d'une infection provoquée *in vivo* chez le rat wistar.

## **Chapitre II : Etude *in vivo***

## 1. Matériel et méthodes

Le but de cette deuxième partie de thèse est la mise au point d'un modèle d'une infection bactérienne *in vivo* (pyélonéphrite rétrograde) pour cela trois étapes ont été réalisées :

- le suivi d'une infection septicémique provoqué par *Staphylococcus aureus* chez des rats *Wistar albinos*,
- confirmer l'état infectieux par des tests bactériologiques et hématologiques,
- et évaluer l'efficacité du traitement à base d'extrait éthanolique de la propolis (EEP) par rapport à un traitement à base d'antibiotique.

### 1.1. Etude bactériologique

#### 1.1.1. La souche bactérienne

La souche utilisée dans notre travail est *Staphylococcus aureus* sélectionnée à partir de la banque de souches du laboratoire de Bactériologie de l'UMR CNRS 5234 (« Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité ») de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2.

Il s'agit d'une souche isogénique *Staphylococcus aureus* SA1, souche mutante de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC25923 hyperproduisant le système de pompe NorA. L'analyse de ce mutant avait conduit à l'identification de NorA (Neyfakh et al, 1993). Ce système d'efflux présente en plus un intérêt clinique, puisqu'il est impliqué dans la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques couramment utilisés dans le traitement des infections staphylococciques.

#### 1.1.2. Repiquage de *S. aureus*

Cette technique est utilisée pour revivifier les cellules bactériennes après la période de conservation (Delarras, 2008).

La réalisation du repiquage se fait en ensemençant en stries le contenu d'une anse de platine, sur le milieu Chapman afin d'obtenir des colonies bien isolées, après incubation à 37°C pendant 18 heures.

Les tests suivants sont réalisés pour tous les étapes de ce travail expérimental : confirmation de la souche avant l'infection et après son isolement lors de l'infection chez le rat *Wistar* à partir du sang, des urines et des fragments péritonéaux.

### 1.1.3. Purification de la souche *Staphylococcus aureus*

L'identification de *S. aureus* a été faite selon la méthode conventionnelle décrite par Larpent et al (1992) en effectuant la coloration de Gram, la recherche de la catalase, et la mise en évidence de la coagulase.

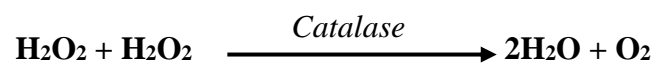
#### 1.1.3.1. Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle basée sur la perméabilité de la paroi bactérienne. Elle est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose Chapman présentant l'aspect caractéristique du Staphylocoque, pour confirmer la présence des cocci en grappes de raisin (Joffin et Leyral, 2006).

#### 1.1.3.2. Test catalase

- **Principe**

Le test de la catalase est un examen important pour identifier les microorganismes, en particulier les bactéries à Gram positif. Cette enzyme empêche la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dont l'accumulation pourrait être létale pour la bactérie. Cette enzyme peut convertir le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon l'équation suivante:



- **Test**

Des colonies bactériennes sont mises en contact avec une goutte de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Une réaction positive est confirmée par la présence de bulles qui se produisent en 10 secondes.

#### 1.1.3.3. Test coagulase

- **Principe**

*S. aureus* fabrique une exo-enzyme (coagulase libre) capable de coaguler en quelques heures le plasma humain ou celui du lapin citraté, hépariné, ou oxalaté (Azele, 1989).

- **Test**

Quelques colonies bactériennes prélevées soigneusement à partir d'une culture pure sont introduites dans un tube à hémolyse contenant 1ml de sérum citraté, après homogénéisation, le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant 1 à 2 heures, voir 24 heures. Le test est considéré comme positif lorsqu'un caillot moins compact apparaît.

#### 1.1.4. L'antibiogramme

L'antibiogramme de *S. aureus* a été réalisé par la technique de diffusion en milieu gélosé, Mueller Hinton (MH), recommandée par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (Soussy, 2007).

Une suspension équivalente au standard Mc Farland 0,5 ( $\sim 10^8$  UFC/ml) (NCCL, 1997) est diluée au 1/10 dans l'eau physiologique stérile. Le milieu Mueller-Hinton, estensemencé par la technique d'inondation. Huit disques d'antibiotiques (tableau 9) sont testés. Les boîtes sont, ensuite, incubées à 37°C pendant 18 heures.

La lecture est réalisée en mesurant le diamètre de chaque zone d'inhibition. Les résultats sont comparés aux diamètres critiques indiqués dans le tableau de lecture.

**Tableau 9.** Les différents antibiotiques testés avec leurs charges

Antibiotiques	Famille	Charge ( $\mu\text{g}$ )
Céfazoline	$\beta$ -lactamine	30
Doxycycline	Cycline	30
Lincomycine	Macrolide	15
Ampicilline	$\beta$ -lactamine	10
Pénicilline	$\beta$ -lactamine	6
Kanamycine	Aminoside	30

## 2. Etude *in vivo*

### 2.1. Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur dix rats *Wistar albinos* mâles, âgés de 7 semaines, pesant d'un poids moyen d'environ 212 g. Ils ont été fournis par l'institut Pasteur (Alger).

Les rats ont été gardés dans l'animalerie à température ambiante pour une période d'adaptation de deux semaines. Ils avaient libre accès à l'eau et à la nourriture.

### 2.2. Répartition et traitement des animaux

Le traitement et répartition des animaux sont montrés dans le tableau 10.

**Tableau 10.** La répartition et traitement des animaux

Répartition	Nombre de rats	Traitement
groupe 01	12	Témoin
groupe 02	12	Infecté par <i>S. aureus</i>
groupe 03	12	Infecté par <i>S. aureus</i> et traité par l'EEP
groupe 04	12	Infecté par <i>S. aureus</i> et traité par l'antibiotique
groupe 05	12	Infecté par <i>S. aureus</i> et traité par l'association de l'EEP et l'antibiotique

### 2.2.1. Induction de la pathologie expérimentale

#### ▪ Préparation de l'inoculum

Pour provoquer l'infection chez les rats, une suspension bactérienne en eau physiologique contenant  $10^8$  UFC/ml de *S. aureus* a été préparée. Pour cela, la concentration bactérienne de l'inoculum a été évaluée par la turbidité qui est ajustée à celle de l'étalon 0,5 Mc Farland sur un spectrophotomètre (shimadzu UV mini 1240) à une longueur d'onde de 625 nm, jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,08 à 0,1.

#### ▪ Inoculation

Une dose de 0.1 ml d'inoculum contenant  $10^8$  UFC/ml a été injectée par voie intrapéritonéale chez le 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> groupe. L'inoculation a été faite pendant 5 jours, une fois par jour et dans les mêmes conditions. L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures.

#### ▪ Suivi clinique

Le suivi clinique des rats a été effectué toute les quatre à six heures, de l'inoculation jusqu'à l'apparition des symptômes. Nous avons suivi:

- ✓ Les changements comportementaux
- ✓ L'appétit au lever
- ✓ Le réflexe de succion
- ✓ L'appétit
- ✓ Le poids corporel
- ✓ La mesure de la température rectale trois fois par jours (matin, midi et soir) avant, après l'inoculation par un thermomètre électronique et pendant toute la période du traitement.

### 2.2.2. Traitement par la propolis

Une dose de propolis de 100 mg/ kg a été ajustée en fonction de poids des rats (225,6 g).

Pour cela, les rats des groupes 03 sont traités par 0,2 ml de l'EEP administré par voie intra-péritonéale à la dose quotidienne de 100 mg/kg/jour pendant six jours (Kebsa et *al*, 2014).

### 2.2.3. Traitement par l'antibiotique

Pour instaurer le traitement à base d'antibiotique, Les rats du groupe 04 ont été traités par un antibiotique, la Céfazoline qui appartient à la famille des céphalosporines (Sandoz® 1g) et qui s'est révélé active vis-à-vis de notre souche de *Staphylococcus aureus* lors du test de l'antibiogramme. La posologie a été ajustée en fonction du poids des rats. 0,2 ml de l'antibiotique d'une concentration de 0.8 mg/ml a été administré deux fois par jour par voie intramusculaire à une dose quotidienne de 13 mg/kg pendant six jours.

### 2.2.4. Traitement par l'association propolis- antibiotique

Les animaux du 5<sup>ème</sup> groupe reçoivent par voie intramusculaire 0.2ml de l'antibiotique (13mg/kg/jours) avec 0.2ml de l'EEP (100mg/kg/jours) par voie intra-péritonéale pendant six jours.

## 2.3. Prélèvement des échantillons et analyses

### 2.3.1. Prélèvement du sang

Des prélèvements du sang ont été réalisés à tous les groupes de rats après l'inoculation, au cours et après le traitement sous une hotte microbiologique.

Le sang a été prélevé à partir du sinus rétro-orbitale de l'œil du rat à l'aide d'un tube capillaire lors d'un pic thermique pour les rats infectés. Les échantillons de sang prélevés ont été récupérés dans deux tubes :

- Tubes EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracycline) pour la réalisation du test FNS (Formule Numération Sanguine),
- Tubes secs pour la réalisation du test CRP (C Reactive Protein).

### Enrichissement sur BHIB

Trois gouttes de sang ont été inoculées dans des tubes contenant le BHIB dans le but d'enrichir la souche avant l'ensemencement sur milieu solide. Nous avons réalisé deux

prélèvements pour chaque rat à une heure d'intervalle pour augmenter la chance de cultiver le germe.

Après ensemencement les tubes de BHIB ont été immédiatement incubés à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. Dès qu'un trouble est apparu, témoignant d'une croissance visible, un repiquage était effectué sur gélose Chapman. Les boîtes étaient incubées 24 heures à 37°C.

Après l'incubation les tests d'identification suivants ont été effectués:

- ✓ Coloration de Gram.
- ✓ Test catalase.
- ✓ Test coagulase.
- ✓ Antibiogramme.

### **2.3. 2. Test CRP (C Reactive Proteine)**

#### **▪ Principe**

C'est un test rapide basé sur la méthode d'agglutination présentée par Singer et al (1956). Il est basé sur la réaction immunologique entre la CRP comme antigène et des anticorps spécifiques présents sur la surface des particules de latex.

#### **▪ Mode opératoire**

Après centrifugation des échantillons à (3000 rpm pendant 3 minutes), un volume de 50µl de sérum a été déposé sur la carte, ensuite, on a placé 50µl de latex anti-CRP à côté de dépôt. Les deux gouttes ont été mélangées et étalées, puis on a imprimé sur la carte un mouvement de rotation pendant 2 minutes. L'apparition éventuelle d'une agglutination révèle une réaction positive. Si la réaction est négative, le mélange reste homogène.

### **2.3. 3. Exploration du profil immunitaire**

Le profil immunitaire a été déterminé à l'aide d'un automate d'hématologie Biocode Hycel.

Les paramètres mesurés sont : les globules blancs et les lymphocytes.

### **2.3.4. Examen Cytobactériologique des urines (ECBU)**

Les rats présentant les signes de l'infection ont été mis dans des cages à métabolismes lors d'un pic thermique pendant une nuit, pour rechercher une éventuelle bactériurie.



Après la récupération des urines, la gélose Chapman a été ensemencé avec une goutte de chaque échantillon, les boîtes de Pétri ont été ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Pour évaluer la bactériurie, une dilution au 1/10 à 1/100000 des urines recueillir durant une nuit, ont été préparé puis le culot de centrifugation des deux dernières dilutions ont été ensemencé. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

Une éventuelle leucocyturie a été évalué par dénombrement des leucocytes sur la cellule de Malassez.

Le nombre des leucocytes est calculé avec la formule suivante:

$$N = (\bar{X} \cdot 100) / 1 \text{ mm}^3$$

N: nombre des leucocytes par mm<sup>3</sup>;

$\bar{X}$ : Nombre moyen des cellules leucocytaire;

1 mm<sup>3</sup>: volume total de la cellule de Malassez.

100: le nombre des quadrillages.

#### **2.4. Sacrifice des animaux et prélèvement d'organes**

Tous les groupes d'animaux ont été autopsiés, la paroi abdominale est ouverte, le foie, le rein et un fragment péritonéal sont prélevés, examinés macroscopiquement pour toute anomalie.

Une fois débarrassé de leurs tissus adipeux, ils sont plongés et lavés dans le NaCl (0,9%).

Un fragment péritonéal est plongé dans le milieu d'enrichissement BHIB et incubé immédiatement à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. L'identification du germe a été réalisée après le repiquage et un test d'antibiogramme a été effectué.

Des fragments de foies sont maintenus immédiatement à -20°C pour le dosage du MDA et des fragments de chaque organe sont conservés dans du formol 10% pour une étude histologique.

#### **2.5. Evaluation de la peroxydation lipidique**

##### **2.5.1. Dosage de MDA cytosolique tissulaire**

###### **▪ Principe**

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la dégradation des acides gras polyinsaturés médié par les radicaux libres. Son dosage du MDA repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100°C), entre une molécule de MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

- **Mode opératoire**

La quantité de MDA est évaluée selon la méthode de (Okawa *et al*, 1979). 1g de tissu est additionné à 3ml de la solution de chlorure de potassium (KCl) (1,15 M) puis broyé à l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 steered firm. New Jersey USA). A 0.5 ml de l'homogénat nous avons additionné 0.5ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation pendant 15 minutes à 3000 tours /minutes, la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm.

La concentration du MDA est déduite à partir d'une gamme étalon préparé dans les mêmes conditions en utilisant une solution de Tétraéthoxypropane (TEP).

### 2.5.2. Analyse histologique

La technique utilisée est celle décrite par Houlot (1984) qui consiste à faire couper les échantillons en petits pièces puis les fixés dans le formol 10 % pour que les composants des tissus soient préservés.

Un processus de déshydratation est réalisé, dont les organes sont mis dans des bains successivement plus concentré d'éthanol puis l'éthanol absolu, et puisque l'alcool n'est pas miscible avec la paraffine, les pièces du foie infiltrés sont baignés dans le xylène pour éliminer l'alcool, ensuite inclus dans des bains de paraffine et laissés se solidifier à froid. Cette méthode permet d'obtenir des coupes d'organes aussi minces que 5 µm.

Après la réalisation des blocs, des coupes de 5 µm d'épaisseur faites à l'aide du microtome.

Les coupes sont collées sur des lames et laissées à sécher pendant plusieurs heures à l'étuve à 37°C ; avant de faire la coloration, les coupes sont déparaffinées par le xylène puis réhydratées dans des bains d'éthanol successivement moins concentré, puis dans l'eau, ensuite colorées à l'hématoxyline-éosine pour mettre en évidence la topographie de la structure des tissus étudiés

### 2.6. Analyse statistique

Les normes européennes (AFNOR, 1995) utilisent le test  $t$  de student pour évaluer les différences entre le groupe témoin les autres groupes. Pour ce fait, ce test a été utilisé avec un seuil de signification supérieur à 95% ( $P < 0.05$ )

Les résultats sont exprimés en moyennes et écart-types. Les valeurs analysées ont été comparées grâce ce test. La valeur trouvée par le calcul du  $t$  peut affirmer que les populations diffèrent avec un risque d'erreur  $p$  tel que:

- $P > 0.05$ : la différence n'est pas significative<sup>NS</sup>
- $P < 0.05$  : la différence est significative\*
- $P < 0.01$ : la différence est très significative\*\*
- $P < 0.001$ : la différence est hautement significative\*\*\*

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Etude bactériologique

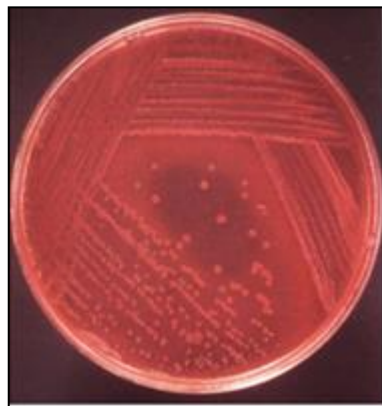
La souche *Staphylococcus aureus* SA1, souche mutante de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC25923 hyperexprimant son système d'efflux NorA, a été sélectionné pour réaliser la partie expérimentale *in vivo*. Le choix de cette souche est basé sur sa sensibilité vis-à-vis de l'extrait éthanolique de propolis avec une CMI de 0.06 mg/ml démontré dans la première partie de cette étude expérimentale.

##### 3.1.1. Résultats et purification de *S. aureus*

Cette étape a pour but d'obtenir une souche pure et jeune qui possède l'aspect macroscopique de *S. aureus* cultivée sur gélose Chapman.

###### 3.1.1.1. Aspect macroscopique

*S. aureus* est apparu sur le milieu de culture Chapman après 18 heures d'incubation à 37°C (Figure 10) sous forme de colonies jaune doré de 1 à 4 mm de diamètre, lisses, crémeuse, rondes et bombées.

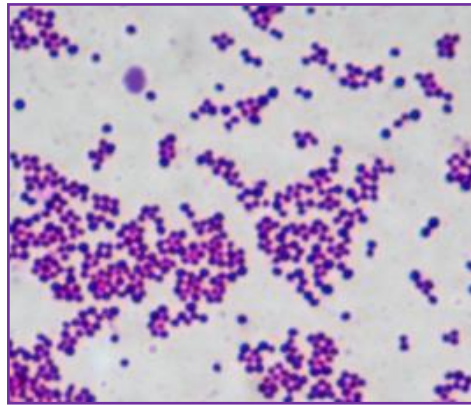


**Figure 10.** Aspect macroscopiques des colonies de *S. aureus*  
Cultivé sur le milieu Chapman

La gélose Chapman-Mannitol Salt Agar est un milieu sélectif pour l'isolement et le dénombrement des staphylocoques. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol (*S. aureus*) de celles qui ne le fermentent pas (*S. epidermidis*). Après culture, un virage au Jaune se traduit par une fermentation du mannitol par *S. aureus* en présence du rouge de phénol (indicateur de pH).

### 3.1.1.2. Aspect microscopique

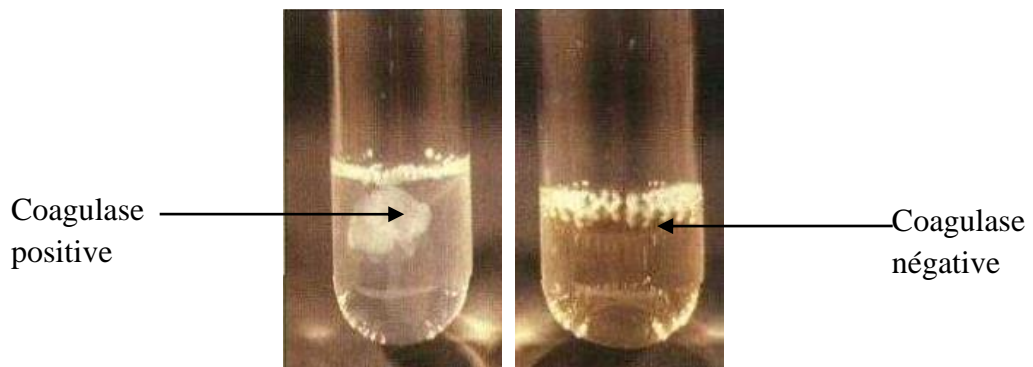
Les observations microscopiques après la coloration de Gram (Figure 11) ont montré des cocci en grappe de raisin, Gram positif (Schaechter et *al*, 1999).



**Figure 11.** *S. aureus* après une coloration de Gram sous microscope optique à l'objectif (x100)

### 3.1.1.3. Résultats des tests de la coagulase et la catalase

Après deux heures de l'incubation des tubes, on remarque l'apparition d'un culot (Figure 12) confirmant la présence d'une coagulase en faveur de *S. aureus*.



**Figure 12.** Mise en évidence de la coagulase libre de *S. aureus*

Après la réalisation du test catalase, on a observé une effervescence qui se traduit par un dégagement gazeux ce qui signifie que notre souche (*S. aureus*) est catalase positive. De plus, ce test permet de différencier les staphylocoques catalase positive, des autres cocci catalase négative.

### 3.1.1.4. Comportement vis-à-vis des antibiotiques

Afin de sélectionner l'antibiotique qui sera utilisé comme traitement de l'infection provoquée chez les rats Wistar, la connaissance et la surveillance du profil de sensibilité de la souche de *S. aureus* sont primordiales dans la prise en charge des infections générées par cette espèce bactérienne.

Le comportement de notre souche vis-à-vis des antibiotiques testés par la méthode de diffusion sur gélose MH est représenté dans le tableau 11.

**Tableau 11.** Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques testés

Antibiotique testé	Zone d'inhibition en mm	Catégorie (S, I, R)
Céfazoline	24	S
Doxycycline	18	S
Lincomycine	22	S
Ampicilline	16	I
Pénicilline	14	I
Kanamycine	13	R

D'après les résultats de l'antibiogramme, nous remarquons que notre souche est résistante aux Aminosides (Kanamycine) avec une zone d'inhibition de 13 mm.

Elle est très sensible au Céfazoline, avec une zone d'inhibition de 24mm, et sensible aux Cyclines (Doxycycline) et Macrolides (Lincomycine) avec des zones d'inhibition 18mm et 22 mm successivement. Cependant elle montre des zones d'inhibition intermédiaire vis-à-vis de l'ampicilline et pénicilline avec des diamètres de 16mm et 14mm successivement.

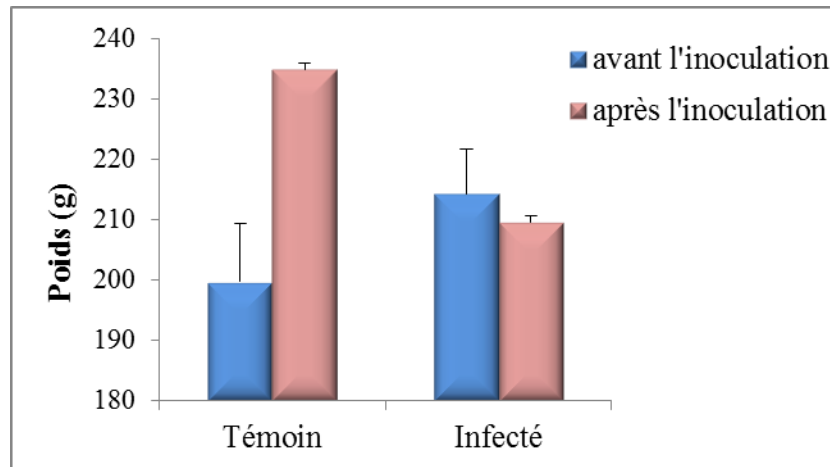
En vue de ces résultats, la Céfazoline a été utilisé comme traitement de l'infection expérimentale dans notre présent travail.

La Céfazoline exerce son action bactéricide par inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Fanny, 2008). Une étude récente a trouvé que la Céfazoline, une nouvelle céphalosporine est active *in vivo* et *in vitro* sur les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Jacqueline et *al*, 2012).

### 3.2. Effets de l'infection et du traitement chez le rat

#### 3.2.1. Variation du poids des rats

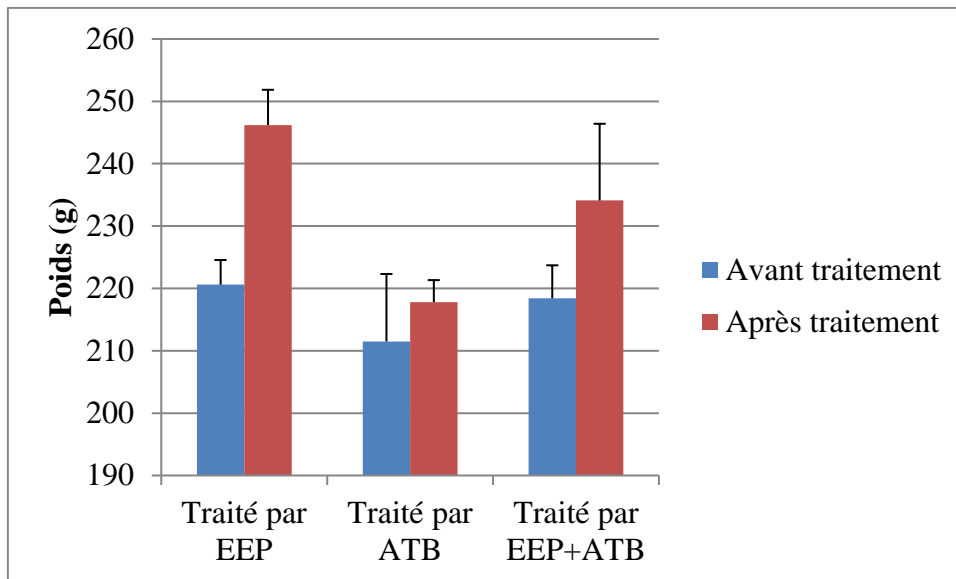
Après les cinq jours d'inoculation, nous remarquons une diminution du poids corporel des rats infectés par rapport aux rats témoins. La figure 13 représente les variations du poids corporel des rats avant et après l'inoculation.



**Figure 13.** Variation du poids corporel des rats avant et après l'infection.

La moyenne des poids des rats avant l'inoculation est 214,3 g. Cette valeur s'est diminuée après l'inoculation jusqu'à 209,6g. Cette décroissance est expliquée par une anorexie et une diarrhée (Fontaine, 1988). En microbiologie la diarrhée causée par *S. aureus* est dite : diarrhée toxigène. En effet *S. aureus* sécrète des toxines qui entraîne la destruction et l'irritation des cellules épithéliales intestinale aboutissant à des pertes aqueux et électrolytiques qui résulte de la déshydratation et enfin une perte de poids (Pilly, 1990).

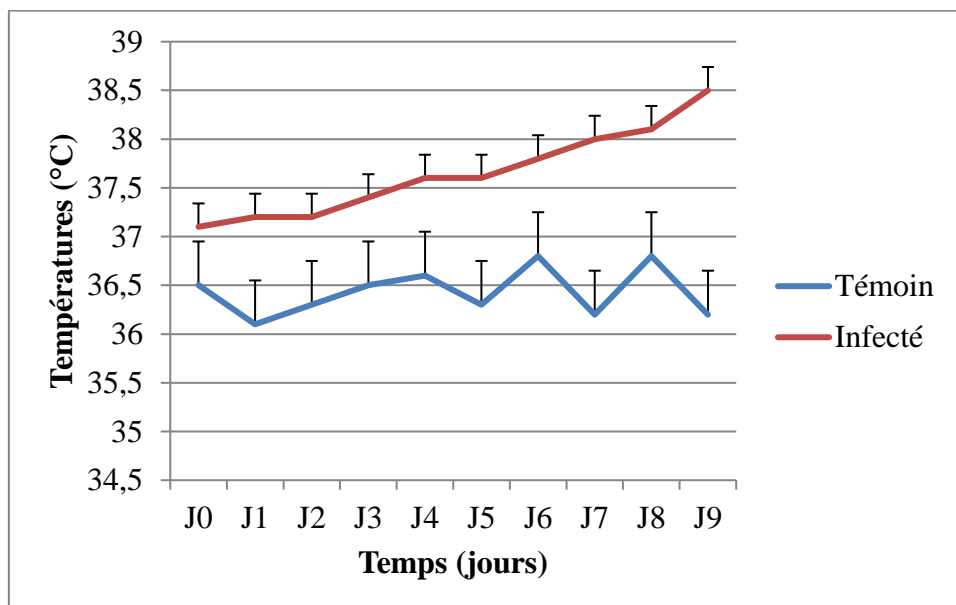
Le symptôme de diarrhée chez les rats infectés confirme l'infection et la présence de *S. aureus* dans les intestins après inoculation intra péritonéale. Après traitement des différents lots de rats nous observant une nette augmentation du poids corporel (Figure 14) en faveur de l'amélioration de l'état général des rats.



**Figure 14 :** Variation du poids corporel rats traités.

### 3.2.2. Variation de la température corporelle

Les résultats du suivi thermique des rats témoins, infectés et traités sont illustrés sur les figures 15 et 16.



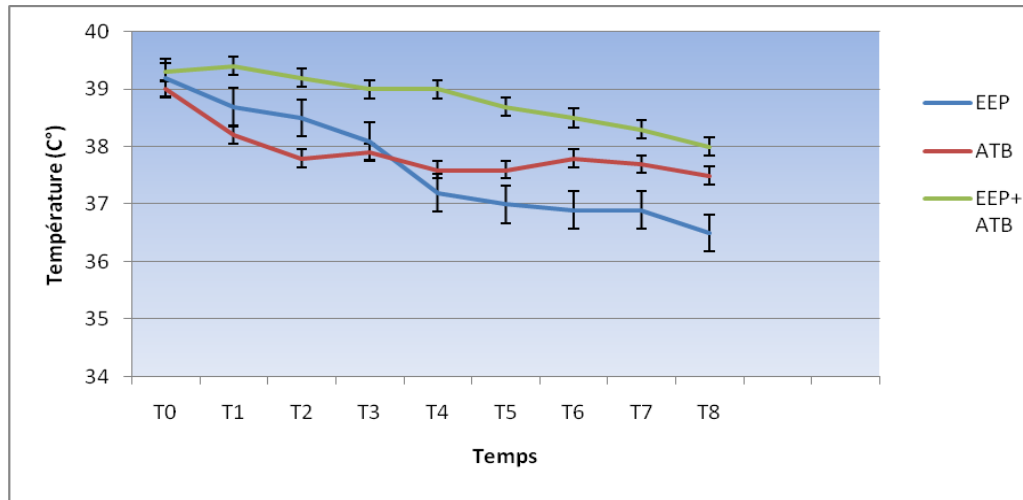
**Figure 15 :** Courbe thermique des rat témoins et infectés par *S. aureus*

J0 : avant l'inoculation

J1, J2, J3, J4, J5 : pendant l'inoculation

J6, J7, J8, J9 : après l'inoculation





**Figure 16.** Courbe thermique des rats traité par l'EEP, l'ATB et par l'association d'EEP et ATB

T0 : avant le traitement ; T1- T7 : pendant le traitement ; T8 : après sept jours du traitement

Avant le traitement ( $t_0$ ) la température de tous les rats été entre 39°C et 39.3°C. Chez les rats témoins les températures restent normales ( $36,4 \pm 0,24$  °C) signe de la bonne santé. Par contre les rats infectés et après quelques heures d'injection intra péritonéale de *S. aureus* on note une élévation de température de 37,1°C (J0) jusqu'à 38,5°C (J9) confirmant une multiplication bactériennes dans le sang.

En effet, la fièvre est un facteur d'alerte de la présence d'un corps étranger (bactéries, virus, parasite...etc) dans le sang (Fontaine,1988), de plus, la fièvre est causée par des entérotoxines staphylococciques et la toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1) qui sont des superantigènes pyrogène (PTSAGs) en provoquant une réaction anormale du système immunitaire par l'activation d'une quantité importante des lymphocytes produisant une quantité d'IL-2 anormalement élevé ce qui va amplifier l'inflammation (Saper et al, 1994). Après sept jours de traitement on remarque une diminution de la température chez les rats traités par l'EEP et ceux traités par l'antibiotique ( $37,66 \pm 0,96$ ,  $37,93 \pm 0,45$  respectivement).

### 3.2.3. Identification du germe à partir du sang et urine et comportement aux antibiotiques

Après l'incubation, les tubes d'enrichissement BHIB des rats infectés sont devenus troubles, témoignant d'une croissance bactérienne. Par contre nous n'observons aucun trouble pour les tubes des rats témoins. Après l'incubation, seules les boitesensemencées par le sang

et urine des rats infectés présentent une culture bactérienne dont les colonies présentent l'aspect macroscopique et microscopique de *S. aureus*.

La souche isolée à partir du sang et des urines présente le même comportement aux antibiotiques que celle de la souche utilisée pour provoquer l'infection.

Concernant les tubes des rats traités par l'antibiotique (Céfazoline), l'EEP et par l'association, nous notons aucun trouble.

En outre, les boîtes ensemencées par le *sang* des rats traités ne présentent aucune croissance bactérienne. Cela traduit l'effet bactéricide de l'EEP qu'on peut attribuer aux groupes de flavonoïdes contenues dans la propolis (Boutabet et al, 2011 ; Segueni et al, 2016) et en particulier la galangine qui semble avoir un effet anti-staphylococcique très important (Ghedira et al, 2009). Takasi et al, (1994) ont déclaré que la propolis empêche la croissance bactérienne en empêchant la division cellulaire. En outre, la propolis désorganise le cytoplasme, la membrane cytoplasmique (Marcucci, 1995 ; Cooc et al, 1996 ; Mirzoevia et al, 1997) et la paroi cellulaire, qui provoque une bactériolyse partielle et inhibe la synthèse des protéines.

### 3.2.4. Variation de la CRP

Les résultats du test CRP sont représentés dans le tableau 12.

**Tableau 12.** Variation de la CRP chez les rats témoins et traités

Groupe d'animaux	CRP qualitative	
	Avant traitement	Après traitement
<b>Témoin</b>	-	-
<b>Infecté</b>	+	+
<b>Traité par EEP</b>	+	-
<b>Traité par ATB</b>	+	-
<b>Traité par EEP+ ATB</b>	+	-

D'après les résultats du test CRP, nous observons que tous les groupes infectés montrent une réaction positive avant le traitement sauf chez le témoin. La concentration de CRP dans le sang de chaque rat est supérieure à 6mg/l (Singer, 1957). Cela est expliqué par la présence d'un foyer inflammatoire chez les rats infectés due à la virulence de *S. aureus* et pourrait aussi

expliquer les lésions observées au niveau du foie, du rein et du péritoine lors des observations microscopiques au niveau des coupes histologiques réalisées chez les rats infectés.

Mais après cinq jours du traitement, nous notons une réaction négative. Cette négativité est confirmée aussi par l'absence de culture des prélèvements après incubation. Ce qui nous permet de confirmer la disparition de l'infection et donc la guérison des rats.

### 3.2.5. Variation du profil immunitaire

Les valeurs des lymphocytes et des globules blancs obtenues grâce au test de FNS sont représentées dans les figures 17 et 18.

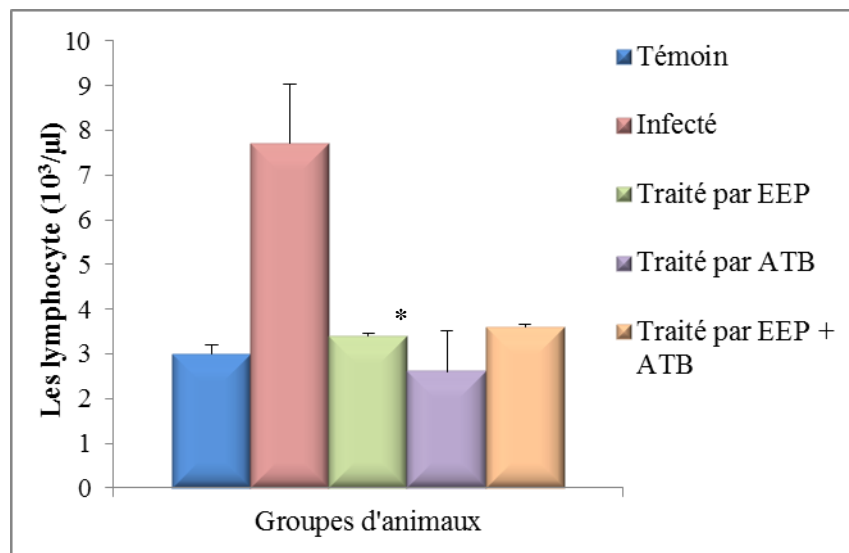


Figure 17. Variation des lymphocytes chez les différents groupes de rats

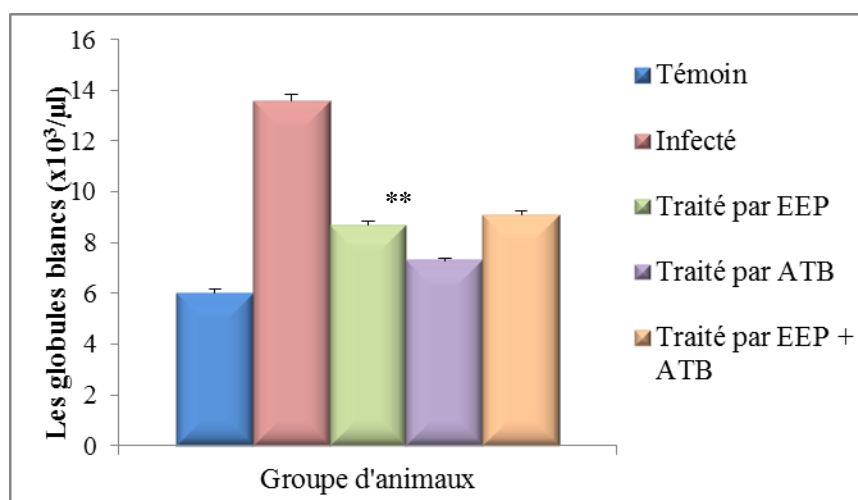


Figure 18. Variation des globules blancs chez les différents groupes de rats

Chez le groupe traité par l'EEP, nous avons constaté une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du nombre des lymphocytes ( $3,4 \pm 0,07 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) par rapport au groupe infecté avec une valeur de  $7,7 \pm 1,34 \times 10^3/\mu\text{l}$ , et une diminution hautement significative ( $p < 0,001$ ) du nombre des globules blancs ( $8,7 \pm 0,14 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). Cette diminution peut être expliquée par l'activité anti-inflammatoire de la propolis. En effet plusieurs chercheurs ont expliqués cette activité, en utilisant différents modèles expérimentaux (Khayyal et al, 1993 ; Miyataka et al, 1997 ; Hu et al, 2005 ; Paulino et al, 2006).

Orsatti et al, (2010) ont démontré que l'administration de la propolis (200 mg/kg pendant 3 jours) à des souris inhibe la production d'IFN- $\gamma$  dans les cultures de splénocytes. En outre, les souris traitées par la propolis verte du Brésil (200 mg / kg) pendant 14 jours ont montré une inhibition des IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2 et IL-10 par les cellules de la rate (Araujo et al, 2012)

Pour le groupe traité par Céfazoline, on a observé une diminution significative du nombre des lymphocytes ( $2,6 \pm 0,91 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) par rapport au groupe infecté ( $7,7 \pm 1,34 \times 10^3/\mu\text{l}$ ), et une diminution hautement significative de nombre des globules blancs ( $7,3 \pm 0,07 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). Confirmant l'activité antibactérienne de la Céfazoline.

Pour le groupe traité par l'association d'EEP et Céfazoline, on observe une diminution significative des lymphocytes ( $3,6 \pm 0,07 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) en comparaison avec le groupe infecté ( $7,7 \pm 1,34 \times 10^3/\mu\text{l}$ ), et une diminution hautement significative du nombre des globules blancs ( $9,1 \pm 0,14 \times 10^3/\mu\text{l}$ ).

Ce résultat peut être expliqué par un effet synergique entre l'EEP et la Céfazoline.

### 3.2.6. Variation cytobactériologique des urines

Pour le diagnostic d'infection urinaire, on retient les critères de Kass (1960) : leucocyturie supérieure à  $10^4/\text{ml}$  avec bactériurie supérieure à  $10^5$  UFC/ml.

Les résultats de la recherche d'une éventuelle bactériurie montrent après dénombrement la des colonies bactériennes sur les cultures des boîtesensemencés par les urines provenant des rats infectés une valeur de  $2.10^5$  UFC/ml ce qui confirme une bactériurie positive.

Le meilleur signe d'infection urinaire est la présence continue de bactéries dans les urines vésicales normalement stériles. Cependant, l'infection peut secondairement atteindre les

muqueuses de l'arbre urinaire et surtout le parenchyme rénal entraînant alors une pyélonéphrite (Berche et *al*, 1979).

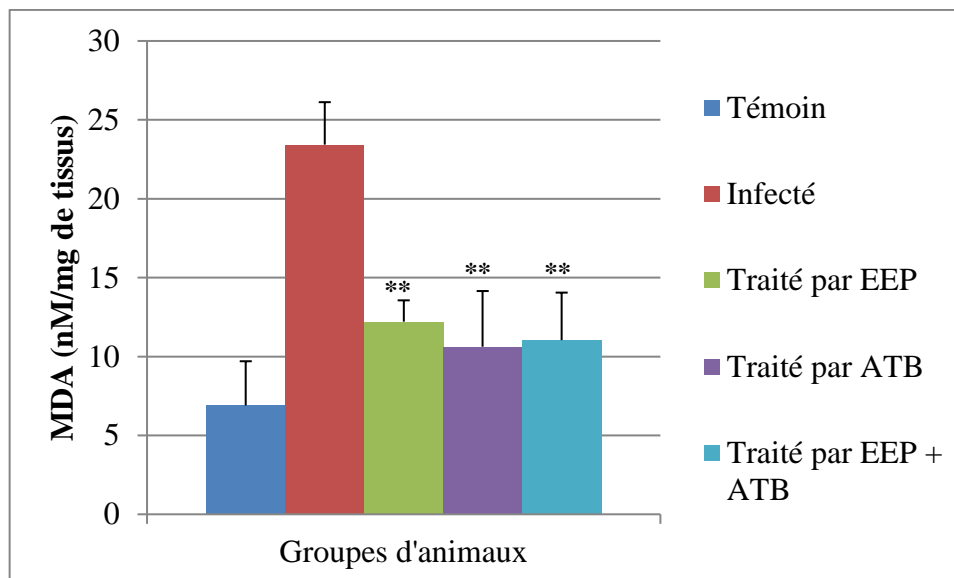
Le dénombrement des leucocytes est supérieur à  $10^4$ /ml ce qui permet de confirmer que la leucocyturie est positive témoignant d'une inflammation du tractus urinaire.

L'élimination rénale des bactéries et ces toxines présentes dans le milieu interne (sang) des rats infectés est un moyen de défense corporelle. D'après Wilson et Gaido (2004), la septicémie bactérienne est l'une des facteurs prédisposant à une infection urinaire. En effet, chez l'humain adulte, une corrélation entre la bactériémie et la bactériurie a été mise en évidence : 27% des sujets avec hémoculture positive pour *S. aureus* avaient, dans les 48 heures suivant l'examen sanguin, une bactériurie significative supérieur à  $10^5$  UFC/ml (Lee et *al*, 1998). Dans une autre étude sur 16 patients bactériémiques à *E. coli*, la bactériurie urinaire était positive dans 12 cas (Brauner et *al*, 1991).

### 3.2.7. Variation du MDA cytosolique

Le malondialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides et dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire, permet de montrer l'effet d'une pénétration d'un xénobiotique dans l'organisme. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif (Giguère et *al*, 2003).

D'après les résultats obtenus illustrés dans la figure 19, nous constatons une diminution hautement significative des concentrations en MDA ( $p < 0,001$ ) chez tous les groupes traités (par EEP, ATB et par l'association des deux) avec des valeurs de  $12,21 \pm 1,35$  nmol/mg,  $10,62 \pm 3,53$  nmol/mg,  $11,04 \pm 3,01$  nmol/mg de tissu, successivement.



**Figure 19.** Variation des concentrations du MDA chez les différents groupes.

Au cours d'une infection septicémique, les quantités produites des ROS par les polynucléaires neutrophiles (PNN) activés augmentent. Cela provoque des dommages tissulaires, et notamment au niveau des lipides (la peroxydation des acide gras insaturé de la membrane cellulaire) qui conduit à la formation de MDA (Di Virgilio, 2004 ; Alves-Filho et *al*, 2008 ; Bergamini et *al*, 2004).

Dans notre étude, nous avons obtenu une diminution du taux du MDA chez les rats traités par EEP. Cela démontre le rôle antioxydant et l'effet curatif de la propolis.

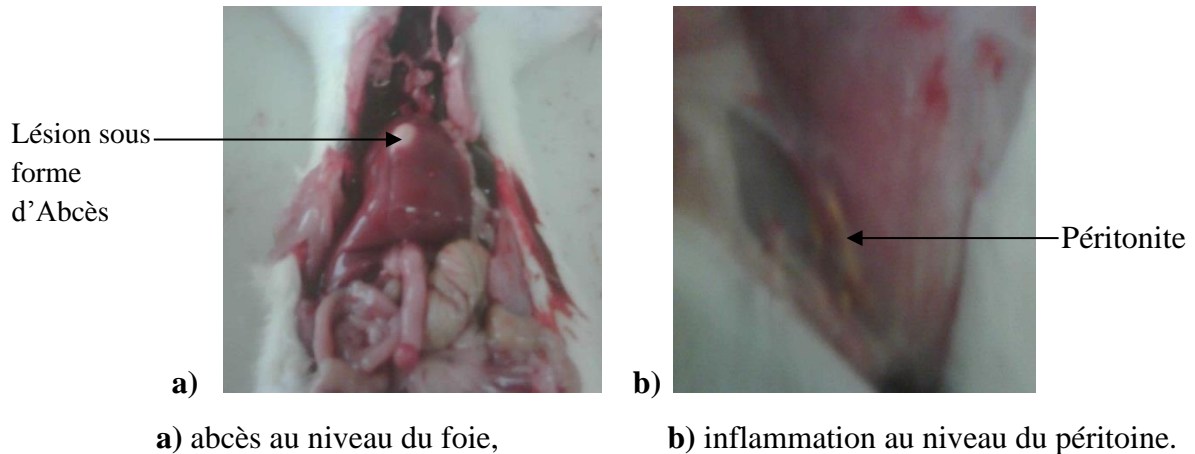
En effet, la propolis algérienne est douée d'un pouvoir antioxydant et joue un rôle écran contre l'action délétère des radicaux libres (Lahouel et *al*, 2004 ; Kumazawa et *al*, 2004 ; Kebsa et *al*, 2014). Son activité antioxydante est principalement attribuée à sa composition en flavonoïdes.

Il a été aussi démontré que la propolis induit également l'activation des enzymes antioxydants telles que le superoxide dismutase et la catalase (CAT) qui agissent contre radicaux libres (Jasprica et *al*, 2007).

### 3.2.8. Examen macroscopique des organes

Après le sacrifice des rats on remarque une inflammation au niveau du péritoine et un abcès au niveau du foie (figure 20) chez les groupes infectés, traités par EEP et traités par l'association propolis- antibiotique. Par contre, les rats du groupe témoin et traité par l'ATB ne

présentent aucune lésion. Les lésions, observées au niveau des organes des rats infectés, après la dissection sont représentées dans la figure 20 (a et b).



**Figure 20.** Lésions observées au niveau des organes des rats infectés

La présence d'un abcès au niveau du foie chez les rats infectés est probablement due à une inhibition des leucocytes par la leucocydine du *S. aureus* résultant de la formation du pus (Schaechter et al, 1999 ; Vincenot et al, 2008 ; Silverman et al, 2006). Ainsi que la présence d'un foyer inflammatoire péritonéale chez les rats infectés non traités.

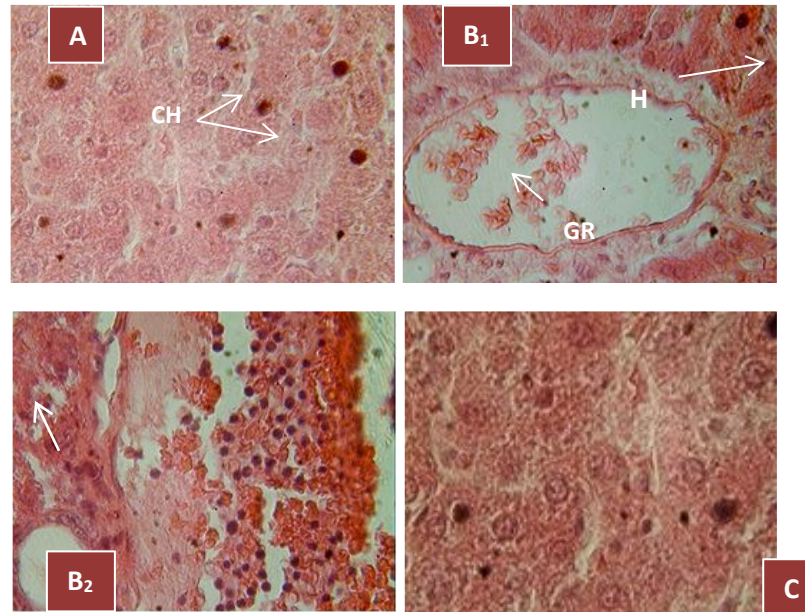
### 3.2.9. Analyse histologique

#### 3.2.9.1 Effet du traitement sur l'histologie hépatique

L'analyse histologique du tissu hépatique montre que chez les rats témoins (Figure 21 A), le foie est de structure normale, les hépatocytes forment des travées bien agencées, qui sont séparées par des sinusoides. Il n'y a pas de foyers inflammatoires.

Chez le groupe présentant une infection à *S. aureus*, l'analyse histologique de la partie lésée du foie (observée macroscopiquement) révèle une infiltration leucocytaire (Figure 21B<sub>1</sub>) témoignant une inflammation avec nécrose ainsi qu'une désorganisation architecturale du tissu hépatique avec l'apparition d'hémorragie (Figure 21B<sub>2</sub>).

Les dommages sévères du foie sont radicalement diminués chez les rats traités par l'extrait brut de la propolis, nous notons l'absence de nécrose et d'hémorragie (Figure 21C).



**Figure 21.** Coupes histologiques de foie des rats témoins (photos A), infectés par *S. aureus* (photos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) et traités par l'extrait de propolis (photo C) après coloration à l'hématoxyline-éosine (grossissement X 40). CH : cellules hépatocytes ; H: hémorragie; VS: vaisseau sanguin; GR: globules rouges; NH : nécrose hépatique.

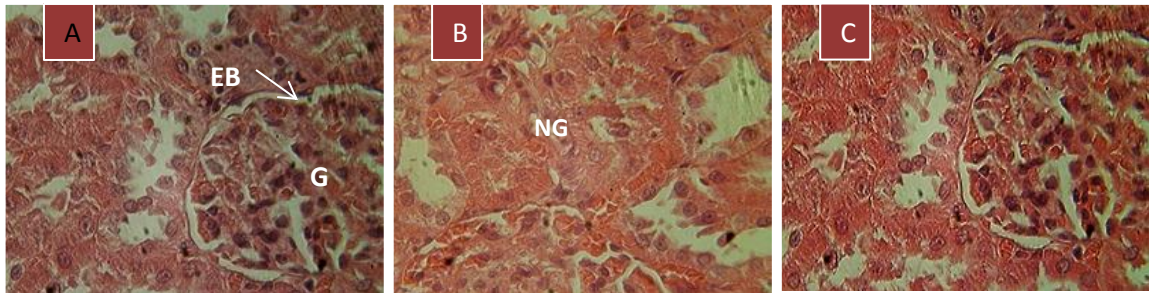
### 3.2.9.2. Effet du traitement sur l'histologie rénale

L'observation microscopique des coupes histologiques rénales des rats du groupe témoin a montré un parenchyme rénal normal avec des glomérules ou corpuscules rénaux disposés en rangées parallèles et des tubules rénaux bien définis (Figure 22A).

L'aspect histopathologique rénal des rats inoculés par *S. aureus* révèle des glomérules rétractés sur eux même et caractérisés par l'absence de l'espace de Bowman ainsi qu'une nécrose (Figure 22B).

Chez les rats traités par la propolis (Figure 22C), l'évaluation histologique montre l'absence de la nécrose glomérulaire.



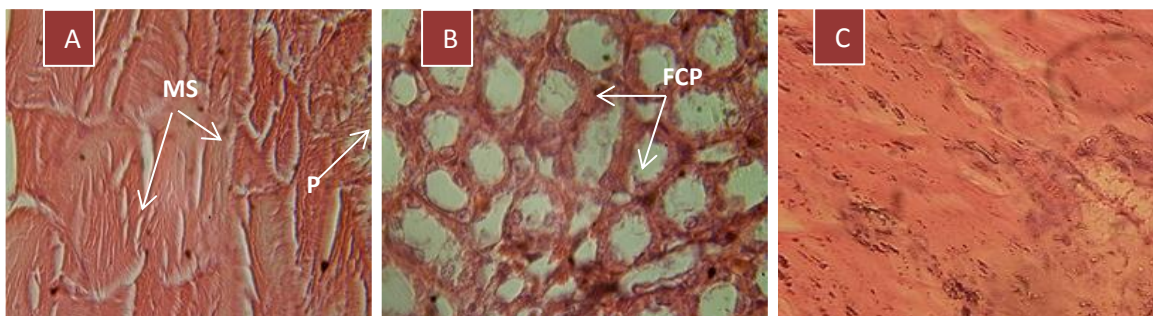


**Figure 22.** Coupes histologiques du rein des rats témoins (photos A), infectés par *S. aureus* (photos B) et traités par l'extrait de propolis (photo C) après coloration hématoxyline-éosine (grossissement X 40). *G* : glomérule ; *EB* : espace de Bowman ; *NG* : nécrose glomérulaire

### 3.2.9.3. Effet du traitement sur l'histologie du péritoine

L'analyse histologique montre un tissu péritoine musculaire strié normal chez le groupe de rats témoins (Figure 23A) ; alors que le péritoine chez les rats infectés par *S. aureus* est déformé sous forme d'une fragmentation cytoplasmique (Figure 23B).

Le traitement par l'extrait brut de la propolis a restauré la structure du péritoine (Figure 23C).



**Figure 23.** Coupes histologiques du péritoine des rats témoins (photos A), infectés par *S. aureus* (photos B) et traités par l'extrait de propolis (photo C) après coloration hématoxyline-éosine (grossissement X 40).

*MS* : muscle strié ; *P* : péritoine ; *FCP* : fragmentation cytoplasmique du péritoine

L'examen histologique est conçu dans le but de confirmer l'atteinte des organes au cours d'une infection septicémique et de compléter nos résultats précédents.

Eu fait l'apparition des foyers inflammatoires avec l'infiltration des leucocytes permettent d'affirmer avec certitude l'augmentation du CRP et des globules blancs.

Les lésions tissulaires observées sont dues aux FRO (Formes réactives de l'oxygène) et aux enzymes protéolytiques libérées par les polynucléaires neutrophiles infiltrés au site inflammatoire suite à une pénétration et une diffusion du germe.

En outre, les lésions tissulaires sont caractérisées par une réaction inflammatoire intense avec activation des macrophages, ces lésions évoluent rapidement vers la formation d'abcès comme le confirme l'étude de Schaechter en 1999.

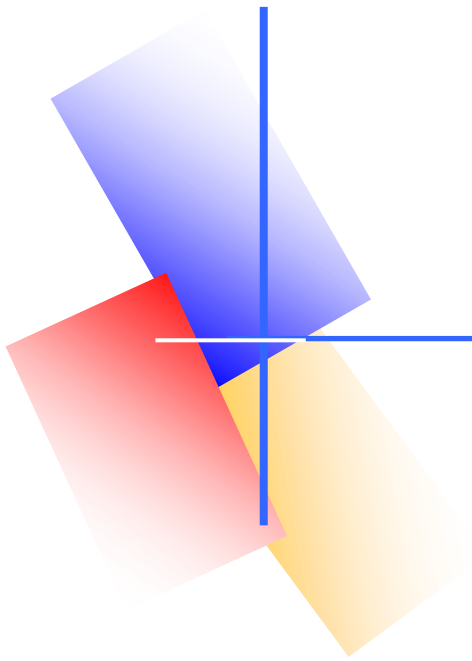
Nos résultats sont conformes à ceux de Coquin (1982) qui a montré que l'infection *S. aureus* évolue presque toujours vers une septicopyoémie avec de nombreuses localisations viscérales.

La restauration des tissus traités par l'extrait brut de la propolis peut être expliquée par la régulation du volume sanguin et la diminution de taux des leucocytes suite à une diminution du nombre de germe grâce à l'effet antibactérien et anti-inflammatoire de la propolis ; ces résultats confirment clairement la guérison des rats traités par la propolis par rapport au groupe infecté.

A la lumière de ce qu'on a obtenu comme résultats au cours de cette étude expérimentale réalisée sur un modèle vivant nous estimons que la propolis se révèle très efficace pour traiter une infection dû à un germe résistant aux antibiotiques par hyperexpression de leur pompes d'efflux.

En effet, et à ce jour, aucun inhibiteur de pompe d'efflux n'a été homologué pour le traitement des infections bactériennes en médecine humaine ou vétérinaire, et il est clair que cette lacune de notre arsenal antimicrobien doit stimuler la recherche menant au développement de nouvelles molécules du EPIs (Pagès et *al*, 2005 ; Lomovskaya et *al*, 2006)

Le développement d'inhibiteurs efficaces de la pompe d'efflux constituera le principal avantage de la possibilité de réutiliser divers antibiotiques affectés par les pompes d'efflux ainsi que du contrôle de l'émergence et de la dissémination des souches d'efflux MDR (Mahamoud et *al*, 2006).



Conclusion

et

Perspectives

L'émergence de souches résistantes aux antibiotiques grâce à des systèmes de pompes d'efflux est un risque très préoccupant. En effet les mécanismes d'efflux actifs jouent un rôle important dans la survie et la stabilité des souches dans l'environnement de l'homme et ce fait l'impact clinique est en relation avec le pouvoir pathogène des bactéries.

La résistance par efflux potentialise d'autres mécanismes de résistance. L'hyperproduction de ces systèmes d'efflux facilite l'émergence de mutants aux niveaux de plusieurs gènes favorisant ainsi la sélection de mutants par exposition à des concentrations extracellulaires insuffisantes d'antibiotiques.

Les stratégies envisageables pour résoudre ce problème consiste en la recherche de molécules inhibant les systèmes d'efflux en cause.

La découverte d'inhibiteurs de pompes d'efflux est intéressante, puisque l'association de ces EPIs à des antibiotiques déjà disponibles mais inactivés par efflux, permettrait de restaurer l'activité de ces derniers. La combinaison des EPIs et des antibiotiques est une stratégie prometteuse pour lutter contre les infections causées par des agents pathogènes résistants grâce à la surexpression des génétiques des pompes d'efflux.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques pour les systèmes de pompes bactériennes semble constituer une approche thérapeutique intéressante, cependant, la toxicité qu'elles peuvent engendrer sur l'homme restreint leur utilisation. Pour cela nous nous sommes intéressé dans ce travail à exploiter un produit de la ruche, la propolis, et suivre son effet sur un panel de souches bactériennes.

Les valeurs des CMI obtenues sont satisfaisantes montrant que la propolis agit sur la majorité des souches testées. Ces valeurs varient entre 0.04 et 0.06 mg/ml pour les Gram (+) et entre 4 et 8 mg/ml pour les Gram (-).

L'exploitation des résultats obtenus pour les souches isogéniques d'*E. coli* TG1 sauvage et de la même souche avec un système d'efflux AcrAB inactivé, montre que la CMI diminue de 8mg/ml à 0.25mg/ml.

L'efficacité de la propolis est aussi démontrée sur les souches présentant des résistances à certains antibiotiques avec des valeurs qui varient de 0.06 mg/ml à 0.25 mg/ml.

La CMI de notre propolis pour la souche *S. aureus* mutante hyperproduisant son système NorA de résistance est de 0.25 mg/ml.

Nous avons aussi démontré que l'association de la propolis avec Pa $\beta$ N et CCP restaure la pompe d'efflux de la souche d'*E. coli* TG1 $\Delta$ acrAB+pUacrAB avec une CMI de 0.006 mg/ml avec le Pa $\beta$ N et de 0.12 mg/ml avec le CCP.

Nous avons aussi essayé d'exploiter les résultats obtenus *in vitro* pour voir s'ils peuvent être exploités sur un modèle expérimental.

L'état d'infection provoqué chez les rats par inoculation de *Staphylococcus aureus* est révélé par une fièvre modérée, une augmentation des paramètres sanguins, une apparition des foyers septiques secondaires, et les résultats des examens anatomopathologiques.

Après traitement, l'EEP a montré que les rats infectés étaient en bonne voie de guérison confirmant le rétablissement des paramètres testés

L'activité antioxydante de l'extrait brut de la propolis est très considérable puisque une diminution du taux du MDA chez les rats traités par l'EEP, ce qui favoriserait son utilisation dans la médecine comme anti-inflammatoire et antioxydant naturel très fort sans aucun effet secondaire.

Ces résultats préliminaires montrent l'efficacité antibactérienne de l'extrait de propolis.

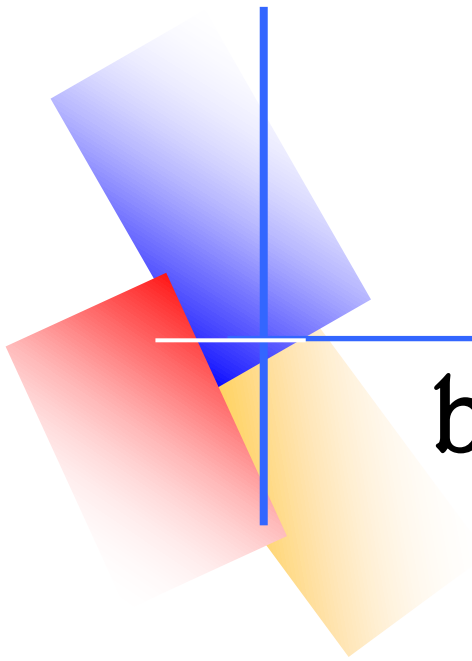
La propolis pourrait avoir une affinité importante pour les sites des pompes induisant ainsi un défaut de l'activité d'efflux constituant ainsi une application prometteuse afin de potentialiser la concentration des antibiotiques chez les pathogènes. Néanmoins son efficacité reste toujours modérée chez les Gram négatif. Mais son association avec les EPIs tel que le Pa $\beta$ N et CCCP diminue les valeurs des CMI, ceci est probablement dû au fait que la propolis est partiellement effluer au niveau membranaire.

Ce modeste travail apparait comme un outil préliminaire permettant d'orienter les cliniciens à profiter des bienfaits de la propolis afin d'éviter les effets secondaires des antibiotiques et des inhibiteurs chimiques.

La propolis, substance naturelle, a déjà montré des activités dans différents domaines thérapeutiques et pourrait constituer une substance intéressante pour de nouvelles utilisations en infectiologie.

A la lumière de nos résultats, nous pouvons envisager comme perspectives :

- ✓ Valider un modèle expérimental
- ✓ Déterminer le temps d'incubation de l'infection
- ✓ Evaluer et déterminer le temps de guérison.
- ✓ Evaluer l'activité de la propolis *in vivo* sur d'autres infections microbiennes
- ✓ Mesurer l'accumulation intracellulaire de la propolis chez les bactéries résistantes.



Références

---

bibliographiques

- Abbott, S. L.** (2003). *Aeromonas*. p701-705 In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8 ed, vol. 1. ASM Press, Washington,DC.
- Abd-El-Rahman, A.M.M.** (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*.27: 454-459.
- Aires, J. R., and H. Nikaido.** (2005). Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriol.* 187:1923-9.
- Alexandre F.** (1999). L'apiculture aujourd'hui. *Dargaud ed*, pp 121-125.
- Antonio, S., Erica W. T, N. Giuseppina, M. Dejour.** (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian propolis. *E CAM.* 2: 33-38.
- Antunes R., Catao R., Ceballos B.** (1996). Antimicrobial activity of propolis. *Rev Bras farm.*77: 8-15.
- Araujo, M.A.R, S.A. Libério, R.N.M. Guerra, M. N. S. Ribeiro, F. R. F. Nascimento.** (2012). Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Rev.Bras. Farmacogn. Braz.j.Pharmacogn.* 22 : 208-219.
- Attia, A.A., R.H. ElMazoudy, N.S. El-Shenawy.** (2012). Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 103: 87-93
- Azele F.** (1989). Bactériologie médicale Edition C et R. (13<sup>ème</sup>). PP: 32-45.
- Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini A G.** (2002). Chemical composition of European propolis: Expected and Unexpected Results. *N. Naturforsch.* 57c : 530-533.
- Bankova V, S, De Castro S. L, Marcucci M. C.** (2000). Propolis: recent advance in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 31: 3-15.
- Bankova, V.** Recent trends and important developments in propolis research.(2005). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2: 29-32.
- Banskota, A.H., Y. Tezuka, I.K. Adnyana, E. Ishii, K. Midorikawa, K. Matsushige.** (2001). Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine.* 8 : 16-23.
- Bergamini. C.M., S. Gambetti, A. Dondi , C. Cervellati.** (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage, *Curr. Pharm. Des.* 10: 1611–1626.
- Biedler, J. L. and H. Riehm.** (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30 : 1174-1184.



- Bolhuis, H., H. W. van Veen, B. Poolman, A. J. Driessen, and W. N. Konings.** (1997). Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev.* 21:55-84.
- Borges-Walmsley, M. I., K. S. McKeegan, and A. R. Walmsley.** (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J.* 376:313-38.
- Borrelli, F, P. Maffia, L. Pinto, et al.** (2002). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia.* 73 : S53–S63.
- Boutabet, K., W. Kebsa, M. Alyane, and Lahouel, M.** (2011). Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian J. Nephrology.* 21: 101-106.
- Bouyahya, A., Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, S. Charfi, J. Abrini, N. Dakka.** (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie.* 1-11.
- Breche P., J. Gaillard et M. Simonet.** (1988). Collection de la biologie à la clinique. Bactériologie: Bactéries des infections humaines. *Flammarion Médecine-Sciences. Paris.* PP: 26-270, 272: 274-276.
- Brunetton J.** (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3<sup>ème</sup> éd). Paris : édition Tec & Doc Lavoisier. p1120.
- Burdock G. A.** (1998). Review of the biological properties and toxicity of beehive propolis. *Food Chem Toxicol.* 36: 347-363.
- Carvalho, A.A. , D. Finger, C. S. Machado, et al.** (2011). *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food chemistry.* 126 : 1239-1245.
- Cattoir, V.** (2004). Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathologie Biologie.* 52: 607-616.
- Chen, Y., S. Ye, C. Ting, Y. Yu.** (2018). Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. *Journal of food and drug analysis.* 26: 761 e768.
- Chirumbolo, S.** (2012). Flavonoids in propolis acting on mast cell-mediated wound healing *Inflammopharmacology.* 20 :99-101.
- Choudhuri, S. and C.D. Klaassen.** (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. Journal. Toxicol.* 25 : 231-259.
- Cook, N.C., S. Samman.** (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr. Biochem.* 7 : 66–76.
- D'Arcy D.R.,** (2005). Antioxidants in Australian floral honeys: Identification of health-enhancing nutrient components. *ISSN 1440-6845.*

- Decastro, S. L., k.b. Higashi.** (1995). Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Erypaosolna cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*. 46: 55-8.
- Delaras, C.** (2008). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition: *Tec et Doc/EM inter*, Paris.
- DI Virgilio F.** (2004). New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets. *Curr Pharm Des*. 10: 1647-52.
- Eliopoulos, G., Moellering Jr., R.C.** (1996) Antimicrobial Combinations. In: Lorian, V., Ed., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, the Williams & Wilkins Co., Baltimore, 330-396.
- Fernandes, A. Jr., S. M. F., Fogo M.L., Funari S.R.C., Lopes C.A.M.** (1995). In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 1: 63-69.
- Fernandes Jr. A., E. C. Balestrin, J. E. C. Betoni, R. Orsi, M. R.da Cunha, A. C. Montelli.** (2005). *Propolis: Anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100 : 563-566.
- Fontaine, M.** (1988). Vade-Mecum du vétérinaire: Formulaire vétérinaire de Pharmacologie, de Thérapeutique et d'Hygiène. PP: 1035-1036.
- Gekker, G., S. H, M. Spivak, J.R. Lokensgard, P.K. Peterson.** (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4 (+) lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*; 102: 158-163.
- Ghedira. K., P. Goetez, R. Le Jeune.** (2009). Propolis. *Phytothérapie*. 7: 100-105.
- Ghisalberti, E.L.** (1997). Propolis: a review. *Bee World*. 60 :59-84.
- Graham JC, Galloway A.** (2001). ACP Best Practice No 167: the laboratory diagnosis of urinary tract infection. *Journal Clin Pathol*. 54 : 911-919.
- Gressler L.T., AS Da Silva, G Machado.** (2012). Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. *Research in veterinary science*. 93 : 11314-1317.
- Havsteen B.** (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*. 32:1141-1148.
- Hegazi, A. G.** (1997). Propolis an overview. *Internationall Symposium on-Apitherapy*. Cairo, Egypt.
- Hegazi, A. G.** (2000). Propolis. An overview. *Congreso International propoleos*. Argentina.
- Houlot, R.** (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *Ed. Maloine*. 19-21: 225-227.

- Hu F., H.R. Hepburn, Y. Li, M. Chen, S.E. Radloff, S. Daya.** (2005). Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 276-283.
- Huleihel, M., V. Isanu.** (2002). Antiherpes simplex virus effect of an aqueous extract of Propolis. *The Israel Medical Association Journal*. 4: 923-927.
- Jacqueline, C., P. Tattevin.** (2012). Ceftaroline, a cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Experimental and clinical data, therapeutic applications. *J. des Anti-infectieux*. 14: 3-10.
- Janda, J. M., and R. P. Kokka.** (1991). The pathogenicity of *Aeromonas* strains relative to genospecies and phenospecies identification. *FEMS Microbiol Lett* .69:29-33.
- Janda, J. M., and S. L. Abbott.** (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 27:332-44
- Jasprica, I., A. Mornar, Z. Debeljak, A. S. Bufalo, M. Medic-Saric, L. Mayer.** (2007). In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 110: 548-554.
- Joffin J.N., G. Leyral.** (2006). Microbiologie technique. Dictionnaires des techniques. Tome 01, 4<sup>ème</sup> édition, France. Pp: 239.
- Kaatz, G. W., and S.M. Seo.** (1995). Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 : 2650-2655.
- Kaatz, G. W.** (2005). Bacterial efflux pump inhibition. *Curr Opin Investig Drugs*. 6:191-8.
- Kartal, M, S. Kaya, and S. Kurucu.** (2002). CG-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z. Naturforsch.* 57c : 905-909.
- Kass, EH.** (1956). Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Physicians*. 69: 6-64 11.
- Kass, EH.** (1960). Bacteriuria and pyelonephritis of pregnancy. *Arch Intern Med*. 105: 194-8.
- Kebsa W., Rouibah H. and Lahouel M.** (2014). Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27 :1891-1897.
- Khayyal, M.T., M.A. El-Ghazaly M.A., El-Khatib A.S.** (1993). Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs under experimental and clinical research*. 19: 197-203.

- Kocot, J., M. Kielczykowska, D. Luchowska-Kocot, J. Kurzepa, I. Musik.** (2018). Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly : Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018 : 1-29.
- Koo, H., P. L. Rosalen, J.A. Cury, Y.K. Park, E.H. Bowen.** (2002). Effects of compounds found in propolis in *Streptococcus mutans* growth and glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1302-1309
- Koru, O., F. Toksoy, C.H. Acikel, Y.M. Tunca, M. Baysallar.** (2007). *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe.* 13: 140-145.
- Kuhn, I., M. J. Albert, M. Ansaruzzaman, N. A. Bhuiyan, S. A. Alabi, M. S. Islam, P. K. Neogi, G. Huys, P. Janssen, K. Kersters, and R. Mollby.** (1997). Characterization of *Aeromonas* spp. Isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *Journal Clin Microbiol.* 35:369-73.
- Kujumgiev, A., V. Bankova, A. Ignatova, S. Popov.** (1993). Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie.* 48: 785–786.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. and Popov, S.** (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal Ethnopharmacol.* 64: 235-240.
- Kumazawa, S., T. Hamasaka, T. Nakayama.** (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84:329-339.
- Lahouel, M, S. Boulkour, N. Segueni, J.P., Fillastre.** (2004). The flavonoids effect against vimblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathion concentration, *Heama.* 7: 59-67.
- Larpent, J.P., Boissonnet B., Boisonet G.** (1992). *Abrégé de bactériologie générale et appliqué.* Edition Marketin Ellipse.
- Lee, B. K., K. Grosslely.** (1998). The association between *Staphylococcus aureus* bacteremia and bacteriuri. *Am Journal med.* 6: 303-306.
- Li, X.Z., H. Nikaido.** (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 64: 159-204.
- Lomovskaya, O., A. Lee, K. Hoshino, H. Ishida, A. Mistry, M.S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland, and V.J. Lee.** (1999). Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 : 1340-1346.
- Lomovskaya, O., and W. Watkins.** (2001<sup>a</sup>). Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *Journal Mol. Microbiol Biotechnol.* 3 :225-236.
- Lomovskaya, O., and W.J. Watkins.** (2001<sup>b</sup>) Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Curr. Med. Chem.* 8 : 1699-1711.

- Lomovskaya, O., M. S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Leger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, and V. J. Lee.** (2001<sup>c</sup>). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:105-16.
- Lomovskaya, O., K.A. Bostian.** (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. *Biochem. Pharmacol.* 71 :910-918.
- Mahamoud, A., J. Chevalier, S. Alibert-Franco, W.V. Kern, and J.M. Pagès.** (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal Antimicrob. Chemother.* **59**, 1223-1229.
- Marcucci, M.** (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidology.* 26: 83-99.
- Marcucci, M.C, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova V.S, De Gastro S.L, Dantas A.P, Valent P.H.M. and Paulino N.** (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal Ethnopharmacol.* 74: 105-112.
- Markham, P. N.** (1999). Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:988-9.
- Marquez, B.** (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie.* 12: 137-147.
- Masaoka, Y., Y. Ueno, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** (2000). A twocomponent multidrug efflux pump, EbrAB, in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 182:2307-10.
- Messi, P., E. Guerrieri, and M. Bondi.** (2002). Survival of an *Aeromonas hydrophila* in an artificial mineral water microcosm. *Water Res.* 36: 3410-5.
- Mirzoeva, O.K., R.N. Grishanin, C. Calder.** (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 152: 239–246.
- Miyataka, H., M. Nishiki, H. Matsumoto, T. Fujimoto, M. Matsuka, T. Satoh.** (1997). Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physicochemical methods. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 20: 496-501.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** (1997). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa
- McKeegan, K. S., M.I. Borges-Walmsley, and A.R. Walmsley.** (2004). Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4 : 479-486.

- Monzote, L., O. Cuesta-Rubio, M. C. Fernandez, I M. Hernandez, J. Fraga1, K. Pérez, M. Kerstens, L. Maes, P. Cos.** (2012). In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107: 978-984
- Moreira L., L. G. Dias, J. A.Pereira, L. Estevinho.** (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology.* 46: 3482-3485.
- Murad J.M, S.A. Calvi S, A.M.V.C. Soares A.,V. Bankova, and J.M. Sforcin.** (2002). Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against paracoccidioides brasiliensis. *J. Ethnopharm.* 79: 331-334.
- Neyfakh, A. A.** (1992). The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 36:484-485.
- Neyfakh, A. A., C.M. Borsch, and G.W. Kaatz.** (1993). Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 128-129.
- Nishino. K., a. Yamaguchi.**( 2001). Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in Escherichia coli. *J.of Bacteriology.* 183 : 5803-5812.
- Okawa, H., N.Ohishhi, K. Yagi.** (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry.* 95: 351-358.
- Orsatti, C.L., F. Missima, A. C. Pagliarone, T. F. Bachiega, M. C. Búfalo, J. P. Araújo Jr.** (2010). Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research.* 24: 1141-1146.
- Orsi, R.O., J.M. Sforcin, S.R. Funari, and V. Bankova.** (2005). Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against Salmonella Typhimurium. *Int Immunopharmacol.* 5: 359–368.
- Oryan, A., E. Alemzadeh, A. Moshiri.** (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 98 : 469-483.
- Otoguro, K., M. Iwatsuki, A. Ishiyama, M. Namatame, A. Nishihara-Tsukashima, H. Kiyohara, T. HashimotoY. Asakawa, S. Ōmura, A. Yamada.** (2012). In vitro antitrypanosomal activity of some phenolic compounds from propolis and lactones from Fijian Kava (*Piper methysticum*). *Journal of Natural Medicines.* 66: 558-561.
- Pagès, J. M.** (2002). Les inhibiteurs de pompes d'efflux chez les bactéries. *In XXII° réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse.* 151-162.
- Pagès, J. M., M. Masi, and J. Barbe.** (2005). Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med.* 11:382-9.

- Park Y.K, M.H. Koo, M. Ikegaki & J.L. Contado.** (1997). Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Technol.* 40: 97-106.
- Patel, S.** (2016). Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. *Journal Dietary Supplements.* 13: 245-268.
- Popova, M., B. Trusheva, D. Antonova, S. Cutajar, D. Mifsud, C. Farrugia, I. Tsvetkova, H.Najdenski, V. Bankova.** (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry.* 126: 1431–1435
- Paulino, N., C. Teixeira, R. Martins , A. Scremin , V. M. Dirsch , A. M. Vollmar , S. R. L. Abreu , S. L. de Castro, M. C. Marcucci.** (2006). Evaluation of the Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of a Brazilian Green Propolis. *Planta Medica.*72: 899- 906.
- Pilly E.** (1990). Maladies infectieuses. 11<sup>ème</sup> édition. *la Medeleine C. et R.* PP: 420.
- Putman, M., H.W. van Veen and W.N. Konings.** (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 672-693.
- Rahman, M., G. Huys, M. Rahman, M. J. Albert, I. Kuhn, and R. Mollby.** (2007). Persistence, transmission, and virulence characteristics of *Aeromonas* strains in a duckweed aquaculture-based hospital sewage water recycling plant in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* 73:1444-51.
- Rsenthal C., R. Tamarin, S. Samish, D. Elad.** (1989). Demonstration on the inhibitory effect of propolis on microbial strains. *Proc XIXnXdl Int Congr Apiculture Rio Janeiro, Brazil, Apimondia.* 224.
- Rufatto, LC., D. Amilton dos Santos , F. Marinho, JA. Pegas Henriques, M. Roesch Ely, S. Moura.** (2017) Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,* 7 : 591- 598.
- Saier, M. H., Jr., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray, and H. Nikaido.** (1998). Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *Faseb Journal.* 12:265-74.
- Saper, C.B., C.D. Breder.** (1994). The neurologic basic of fever. *J.Med.* 330: 1880-1886.
- Sawaya, A. C.H.F., Palma M. A, Caetano F. M.,M. C. Marcucci, I.B. da Silva Cunha, C.E.P. Araujo, and M.T. Shimizu.** (2002). Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology.* 35, 203-207.
- Scazzocchio, F., F.D. D’Auria, D. Alessandrini, and F. Pantanella.** (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res.* 161: 327–333.
- Schaechter, M., G. Medoff, B. Eisenstein. B. I., J.-P. Flandrois** (1999). Microbiologie et pathologie infectieuse. 2<sup>ème</sup> édition, *DeBoeck.* pp 670.

- Schmitz, F. J., A.C. Fluit, S. Brisse, J. Verhoef, K. Kohrer, and D. Milatovic.** (1999). Molecular epidemiology of quinolone resistance and comparative in vitro activities of new quinolones against European *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26 : 281-287.
- Schnitzler. P., Neuner A., S. Nolkemper, C. Zundel, H. Nowack, K. H. Sensch, J.Reichling.** (2010). Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy research.* 1 : S20-28.
- Segueni N., Zellagui A., Moussaoui F., Lahouel M., Rhouati S.** (2016). Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry,* 9 : S425-S428.
- Sera-Bonvehi J, C.F. Ventura and J.R. Escola.** (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal Amer. Oil. Chem. Soc.* 71: 529-532.
- Sforcin, J.M., A. Jr. Fernandes, C.A. Lopes, V. Bankova, S.R. Funari.** (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 73: 243–249.
- Sforcin. J.M., A. Fernandes Jr, C. A. M. Lopes, S. R. C. Funari, V. Bankova.** (2001). Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Venom. Anim. Toxins.* 7: 139-144.
- Silverman, G. J., C.S. Goodyear.** (2006). Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. *Nature Reviews Immunology.* 6: 465–475.
- Silici, S., Singer, G.M., Plotz, C.M. Amer.** (1956) *J. Med.* 21: 888-895
- Su-Hsiang F, Y. Ming-Hua, W. Hwei-Mei and C. Jiing-Chuan.** (2004). Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis.* 13: 43-50.
- Sun, J., Z. Deng, A. Yan.** (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 453 : 254-267.
- Sylvie, C.** (2009). La résistance aux antibiotiques un enjeu de santé publique important)! *Pharmactuel.* 42: 6-21.
- Takasi, K., NB Kikuni, H Schilr.** (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of propolis. *Povenance planta Med.* 60: 222-227.
- Tóth, L., V. Papay.** (1987). Propolis and its medicinal properties. *Egész Munka* 34: 325-329.
- Van Bambeke, F., E. Balzi, and P.M. Tulkens.** (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60 : 457-470
- Van Bambeke, F., Y. Glupczynski, P. Plesiat, J.C. Pechere, and P.M. Tulkens.** (2003). Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal Antimicrob. Chemother.* 51: 1055-1065.



- Velikova, M., V. Bankova, K. Sorkun, S. Houcine, I. Tsvetkova & A. Kujungiev.** (2000). Propolis from the Mediterranean Region: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Z. Naturforsch.* 55c (9/10) : 790-793.
- Veyssier, P., & A. Domart.** (1971). [Aspects and current problems of staphylococca infections]. [Review]. *Presse Med.* 79 : 1975-1980.
- Veyssier, P., A.M., Liebbe.** (1998). Infections nosocomiales. 2<sup>ème</sup> édition. *Masson II, Paris.* PP140.
- Vincenot, F., M. Saleh, G. Prévost.** (2008). *Staphylococcus aureus* virulence factors. *Revue Francophone des Laboratoires.* 407: 61-69.
- Wilson, M., L. Gaido.** (2004). Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clinical Infectious Diseases.* 38: 1150-1160.
- Wright, G. D.** (2000). Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. *Chem. Biol.* 7, R127-R132.
- Yves, D.** (1981). Les produits de la ruche. 3<sup>ème</sup> Edition.