



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la
vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Khedidja ZINE

Le : mardi 9 juillet 2019

Effets inhibiteur de certains extraits des plantes aromatiques sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline SARM d'origine hospitalière

Jury :

M.	Mohamed TITAOUINE	M.C.A	Université de Biskra	Président
M.	Fathi BENBELAID	M.C.B	Université de Biskra	Rapporteur
Mm.	Soulef KRIKER	M.A.A	Université de Biskra	Examinatrice

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Je remercie avant tous, Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toutes les longues années d'études afin que je puisse arriver là.

Je remercie mon encadreur BENBELAID Fethi, j'ai profité de ses précieux conseils, son sens de la critique et son travail acharné.

Je remercie les membres distingués des jurys d'avoir lu et évalué mon mémoire. Ce qui augmente la valeur de mon travail

Mes sincères remerciements s'adressent à tous les professeurs depuis l'âge de 6 ans qui ont contribué à mon arrivée à ce jour et ont goûté au sens du succès

Je tiens tout particulièrement à remercier:

Tout le personnel du laboratoire de microbiologie du l'hôpital Hakim Saadane de Biskra, leur accueil et sympathie, ainsi que le personnel du laboratoire du département de SNV de l'université de Biskra pour leur gentillesse.



Dédicaces

Je dédie ce travail à mes très chers parents Nour El-ddine et Akila
À celui que je ne pourrais jamais remercier assez, mon père qui a semé en
moi le respect et l'amour de la science ;

Et ma mère, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et tous
Je leur exprime ma profonde gratitude pour leur soutien moral ainsi que
pour leurs encouragements durant tout mon parcours vers un avenir
meilleur.

Pour tout son affection, son soutien et sa compréhension ;
À mes frères : Akram, Adem Amine ; et surtout mon frère qui m'a laissé
avec la volonté d'aller au succès, Rachid, Malheureusement il est mort il y a
deux mois, m'a soutenu dans tout (que Dieu ait pitié de lui)

À mes soeurs : Sana, Ahlam, Soumia ;

À les enfants de ma soeur : El-hareth Abedarahmane, Zayed ;

À Ma profonde et sincère gratitude et reconnaissance s'adresse à Cher
Fahima Morsi l'étoile de ma vie c'était le lien du début
À mes meilleurs amies Haizia, Karima, Saliha, Farida, Amel, Khaoula, Souda,
Fatima, Salwq, Nessrine, Aïcha, Hanane et Hayatte notre amitié date de
longtemps depuis, jusqu'à ce jour on a tout partagé.

Qu'Allah maintienne si longtemps que possible ce lien

Ce travail est aussi le vôtre!

Et toutes mes amies sans exception ;

À Toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide

À tous, du fond de mon cœur je vous dédie ce travail.



Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Première partie: Bibliographique

Chapitre 1. *Staphylococcus aureus*

1.1. Généralité : <i>S. aureus</i>, un pathogène ancien	3
1.2. Facteurs de virulence	3
1.2.1. Les toxines	3
1.2.1.1. Les toxines formant des pores	3
1.2.1.2. Les toxines à activité protéolytique	4
1.2.2. Les superantigènes	4
1.2.3. Formation de biofilm	4
1.3. Résistance vis-à-vis les antibiotiques	4
1.3.1. Résistance naturelle	4
1.3.2. Résistance acquise	4

Chapitre 2. Infections liées aux soins causées par le SARM

2.1. Définition du SARM	5
2.2. Historique	5
2.3. Mécanismes de résistance envers la méticilline	5
2.4. Actualité sur le SARM et les méthodes de lutte	6

Chapitre 3. Huiles Essentielles

3.1. Généralités	7
-------------------------------	----------

3.2. Activité antimicrobienne	7
3.3. Mode d'action	8
3.4. Activité anti-biofilm	8

Deuxième partie: pratique

Chapitre 4. Matériels et Méthodes

4.1. Huiles essentielles	10
4.1.1. Source du matériel végétal	10
4.1.2. Obtention	10
4.1.3. Conservation	11
4.2. Souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
4.2.1. Origine	11
4.2.1.1. Souches de référence	11
4.2.1.2. Souches Cliniques	11
4.2.2. Prélèvements	11
4.2.3. Isolement	12
4.2.4. Identification	12
4.3. Antibiogramme	12
4.5. Activités antimicrobiennes des Huiles essentielles vis-à-vis les souches SARM/SASM .	13
4.5.1. Aromatogramme	13

Chapitre 5. Résultats et discussions

5.1. Rendements en huiles essentielles	15
5.2. Identification des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
5.2.1. Examen Macroscopique	16
5.2.2. Examen Microscopique	16
5.2.3. Identification biochimique	17
5.2.3.1. Test de catalase	17
5.2.3.2. Test de coagulase ou staphylocoagulase	17

5.3.2.3. Résultats de l'indentification par les plaques API	18
5.3. Les tests de sensibilité aux antibiotiques.....	19
5.4. Effets des huiles essentielles étudiées sur les souches SARM/SASM.....	21
5.4.1. Diamètres des zones d'inhibition	21
5.5. CMI de la croissance	23
5.6. Détermination de la CMI de la formation de biofilms CMIB.....	24
Bibliographie.....	27
Annexes	38
Résumés	43

Liste des tableaux

Tableau 1. Rendements en huiles essentielles.....	15
Tableau 2. Comparaison des rendements en huiles essentielles des plantes étudiées avec d'autres travaux.	15
Tableau 3. Résultats des antibiogrammes	19
Tableau 4. Diamètres d'inhibitions des huiles essentielles des trois plantes	21
Tableau 5. Concentration minimale inhibitrice CMI (%)	23
Tableau 6. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la formation de biofilms	24

Liste des figures

Figure 1. Site d'échantillonnage des plantes.....	10
Figure 2. L'appareil d'extraction des huiles essentielles par hydro distillation	11
Figure 3. Aspect des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman	16
Figure 4. Coloration de Gram de <i>S. aureus</i>	17
Figure 5. Observation de Test de catalase	17
Figure 6. Test de la coagulase en tube de <i>S. aureus</i>	18
Figure 7. La mise en évidence des caractères biochimiques par la galerie API Staph.....	19
Figure 8. Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Figure 9. Profil de résistance des souches SARM aux antibiotiques	21
Figure 10. Effet des huiles essentielles étudiées sur des souches SARM	23
Figure 11. Résultats de détermination de CMIB de l'huile essentielle de l' <i>O vulgare</i>	25

Liste des abréviations

AHA: *Artemisia herba alba*

ATCC: American Type Culture Collection

AV: *Ammoides pusilla*

BMR : Bactéries Multirésistances

BORSA : Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

CDC: *Center for Diseases Control and Prevention*

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CMIB: Concentration Minimale Inhibitrice du Biofilm

CMRSA : *Canadian methicillin resistant Staphylococcus aureus*

EPS: Extracellular polysaccharide substances

ET: Toxines exfoliatines

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HEs : Huiles essentielles

LukF-PV: Fast eluted Panton Valentine

LukS-P: Slow eluted Panton Valentine

MH: Muller Hinton

OG: *Origanum vulgare subsp. Glandulosum*

PAM : Plantes Aromatiques Médicinales

PH : point Hydrogène

PLP: Protéines de liaison aux pénicillines

PVL: Leucocidine de Panton-Valentine

***S. aureus* :** *Staphylococcus aureus*

SARM: *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

SARM-AC: *Staphylococcus aureus* résistant à la méricilline acquis en communauté

SARM-AH: *Staphylococcus aureus* résistant à la méricilline acquis en milieu hospitalier

SASM: *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méricilline

SCC *mec*: La cassette chromosomique staphylococcique *mec*

SSSS: *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*

TFP: Toxines formant des pores (En Anglais : PFTs pore-forming toxins)

TSST-1: Toxic shock syndrome toxin 1

Dénomination des gènes de *S. aureus* :

***agr*:** *accessory gene regulator*

ccr : gène des recombinaisons

gyrA : gène de la gyrase

mecA : gène de la résistance à la pénicilline

spa : gène de la protéine A

Dénomination des gènes de toxines staphylococciques :

egc: enterotoxin gene cluster

eta, etb, etd: exfoliatines A, B, D

hla: hémolysine alpha

hlb: hémolysine beta

hlg: hémolysine gamma

hlgv: hémolysine gamma variant

lukSPV-lukFPV: leucocidine de Pantone Valentine

lukE-lukD: leucocidine lukE-lukD

lukM: leucocidine M

sea-i, sep, ser, ses, set: entérotoxines A-I, P, R, S, et T

sej-o, se/q, se/u, se/u2, se/v : entérotoxines-like J-O, Q, U, U2, et V

tst: toxine du choc toxique staphylococcique

Introduction

Introduction

L'hôpital est le lieu dans lequel on reçoit les traitements mais c'est également un lieu où le risque d'infection est très important dont les germes deviennent de plus en plus résistants (Boyce *et al.*, 1997 ; Porwancher *et al.*, 1997). De ce fait, les infections contractées au niveau de l'hôpital sont reconnues comme un problème majeur de santé publique de par leur fréquence, leur coût et leur gravité qui touche aussi bien les patients et leurs entourages ainsi que l'ensemble des professionnels de santé (Méité *et al.*, 2010). Ces infections attrapées en milieu hospitalier sont connues par le terme infections nosocomiales ou bien les infections liées aux soins.

L'émergence de la multi résistance chez les bactéries limite le choix thérapeutique et entraîne une augmentation du taux de mortalité, de morbidité, une durée prolongée de séjour hospitalier et un coût élevé (Méité *et al.*, 2010; Ottmani *et al.*, 1994).

En Europe, l'incidence des infections nosocomiales représente 5,5 à 9,9 % des admissions à l'hôpital (Maugat *et al.*, 2003). Une enquête de prévalence réalisée en 1996 dans 830 hôpitaux français a donné un taux de 6,7 % (Golliot *et al.*, 1998). Au Maroc, une enquête de prévalence réalisée en 1994 a montré qu'aucun hôpital n'échappe à ce péril infectieux; ce taux atteint une moyenne de 10 % dans les hôpitaux régionaux (Ottmani *et al.*, 1994). Les infections liées aux soins dépendent de l'état du patient et sont favorisées par la technicité des actes et traitements (Berche *et al.*, 1988).

Peu d'études ont été consacrées à la survie des souches impliquées dans les infections nosocomiales (Neely *et al.*, 2000 ; Beard-Pegler *et al.*, 1998 ; Wilkoff *et al.*, 1969). Néanmoins, l'espèce multi résistante microbienne la plus fréquemment isolées au cours d'infections nosocomiales a été retenue, *Staphylococcus aureus*, ainsi largement étudiée pour ces résistances à des antibiotiques couramment utilisés en hôpital (Auajjar *et al.*, 2006).

Les bactéries sont dites multi résistantes aux antibiotiques (BMR) du fait de leur accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques (Résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques) (Astagneau *et al.*, 1999). Parmi les BMR qui font l'objet d'une surveillance très particulière est les Staphylocoques notamment l'espèce *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Site Web 1).

Les infections à *Staphylococcus aureus* sont responsables d'un taux de mortalité élevé entre 18 et 40 % selon les études et jusqu'à 60 % pour les septicémies. Globalement, le staphylocoque doré est le germe le plus souvent incriminé dans les infections nosocomiales (15,7 %) pouvant causer une grande variété d'infections allant de pourriture des tissus mous et

de la peau à l'intoxication alimentaire (Gordon et Lowy, 2008 ; Corne, 2004). Suite à l'introduction de la méthicilline (bêta-lactamine de la classe des pénicillines) en médecine humaine dans les années 60, des résistances envers cet antibiotique ont eu émergé chez certaines souches de *S. aureus* (Crombe *et al.*, 2013). Aujourd'hui appelé *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), elle cause environ 75 000 cas d'infections et près de 10 000 décès par année aux États-Unis (Weese et Duijkeren, 2010). Cependant, cette espèce est retrouvés un peu partout dans différentes communautés (Neeling *et al.*, 2007 ; Khanna *et al.*, 2008 ; Dressler *et al.*, 2012).

Face à ce problème majeur de santé publique, les chercheurs se sont penchés vers une voie alternative qui est la valorisation des substances d'origine végétale. En effet, le règne végétal et en particulier les plantes aromatiques et médicinales « PAM » ont été le seul moyen pour traiter les infections mêmes avant de découvrir les microbes. C'est vrai que la médecine traditionnelle est plus accessible pour les démunis, mais on assiste aujourd'hui à un retour même de la population occidentale vers cette médecine.

Dans le même axe de recherche et de valorisation des substances naturelles antimicrobiennes d'origines végétales, nous sommes proposé d'évaluer l'effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline SARM isolées du l'Hôpital Hakim Saadane de Biskra. Le but de ce travail est d'essayer de voir si les extraits des plantes aromatiques retenues en l'occurrence les huiles essentielles ont une bonne activité antimicrobienne sur les souches de SARM.

Pour cela le présent travail est divisé en trois parties :

- ❖ La première partie est une synthèse bibliographique sur les aspects cliniques, les mécanismes de résistances de *S. aureus* et sur l'importance des substances naturelles d'origine végétale pour la lutte contre le SARM.
- ❖ La deuxième partie est une présentation des différentes méthodes avec lesquels nous avons effectué l'identification, la caractérisation des souches SARM et l'évaluation de sensibilité des souches aux substances naturelles notamment les huiles essentielles.
- ❖ Et enfin dans la troisième partie nous avons présenté les résultats et les discussions.

Partie
Bibliographique

Chapitre 1

Staphylococcus Aureus

1.1. Généralité : *S. aureus*, un pathogène ancien

Connus depuis l'aube de la bactériologie, les staphylocoques ont été observés par Robert Koch (1878) puis reconnus par Louis Pasteur (1880) dans un pus (Spicer, 2003). En 1883 et après une coloration de Gram, les chercheurs ont remarqué que les cellules de cette espèce bactérienne sont regroupées en diplocoque ou en amas ayant la forme de grappe de raisin (Staphylos) (Dauwalder *et al.*, 2008). Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, catalase positive. Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des firmicutes, à la classe des bacilli et la famille des Staphylococcaceae. Par la production d'une coagulase, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) se distingue des autres staphylocoques dits alors à coagulase négative (de Bentzmann *et al.*, 2004 ; Kenneth *et al.*, 2004).

1.2. Facteurs de virulence (Annexe 1)

Plusieurs facteurs expliquent la fréquence et la gravité des infections à *S. aureus*, liés à la virulence de ces souches, principalement à des composés associés à la paroi et à des toxines protéiques (Sutra, 1998).

1.2.1. Les toxines

Les toxines produites par l'espèce *S. aureus* sont réparties en différentes classes selon leur structure et activité biologique (Parker, 2005).

1.2.1.1. Les toxines formant des pores (ou pore-forming toxins PFTs)

Ces toxines cytolytiques ont la capacité de détruire les cellules de défense de l'hôte en formant des pores au niveau des membranes cellulaires (Parker, 2005). Les PFTs sont souvent sécrétées sous forme de monomères (Lesieur *et al.*, 1997). En fonction des PFTs, des facteurs lipidiques ou protéiques interviennent ensuite pour permettre l'interaction de ces toxines avec les membranes de leurs cibles cellulaires (Vincenot *et al.*, 2008). Deux grands groupes de PFTs se sont distingués en fonction de leur structure tridimensionnelle à savoir les alpha-PFTs dont la structure secondaire est formée d'une simple hélice alpha hydrophobe (Wang *et al.*, 2007). Et les bêta-PFTs ou leucotoxines où le pore est constitué majoritairement de brins bêta s'assemblant en tonneaux bêta (Parker et Feil, 2005). Les leucocidines par opposition aux hémolysines ont pour cible les polynucléaires, les monocytes et les macrophages. Deux protéines sont importantes : LukE-LukD et la Leucocidine de Panton Valentine (LPV) composée de Luke S-PV et Luke F-PV dont le gène est codé par un phage (Wang *et al.*, 2007).

1.2.1.2. Les toxines à activité protéolytique

Les épidermolysines autrement dite les toxines exfoliatines « ET » font parties des protéases à sérine active, en Anglais « staphylococcal scalded skin syndrome » (SSSS). *S. aureus* sécrète la sérine protéase V8 qui clive spécifiquement la liaison peptidique des résidus aspartate et glutamate.

1.2.2. Les superantigènes

Les superantigènes sont des molécules présentant une liaison directe à grande affinité avec les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II des cellules présentant l'antigène, induisant ainsi l'activation polyclonale des lymphocytes T V β . *S. aureus* produit trois types de superantigènes : les entérotoxines (dont l'entérotoxine staphylococcique A), la toxine 1 du choc toxique (TSST-1) (Banks *et al.*, 2003), et les toxines exfoliatives. Les pathologies les mieux connues comme étant associées à ces molécules superantigéniques sont le choc toxique et les dermites exfoliatives (Merlet, 2010), mais aussi d'autres pathologies telles que la dermatite atopique, le syndrome de Kawazaki, une polypose nasale et certaines maladies auto-immunes (Schlievert et Case, 2007 ; Tervaert *et al.*, 1999).

1.2.3. Formation de biofilm

Les staphylocoques sont reconnus comme étant la principale cause des infections associées à la formation de biofilm. Le biofilm formé alors sur des surfaces garantit la protection de la bactérie contre le système immunitaire et les antibiotiques et offre à la bactérie la possibilité de se disséminer dans l'organisme. La biosynthèse du biofilm est définie par 3 étapes-clés : l'attachement primaire, la maturation et le détachement pour former de nouveaux foyers infectieux (O'Toole *et al.*, 2000).

1.3. Résistance vis-à-vis les antibiotiques

1.3.1. Résistance naturelle

Certaines espèces bactériennes sont dites naturellement résistantes à une famille d'antibiotique. D'un point de vue biologique cette résistance s'explique simplement par l'absence de la cible de l'antibiotique sur la bactérie. Cette résistance, est portée par le chromosome. Elle est donc transmise à sa descendance, elle se traduit habituellement par des CMI supérieures à la valeur critique basse de concentrations (c) de l'antibiotique concerné (Grohs, 2009).

1.3.2. Résistance acquise

Des résistances envers les antibiotiques s'apparaîtront soit par des mutations dans le génome bactérien ou par transfert horizontal des gènes de résistances (Normark et Normark, 2002).

Chapitre 2

Infections liées aux soins causées par le SARM

2.1. Définition du SARM

Une souche de *S. aureus* est résistante à la méthicilline si (CLSI M100-S26) :

La concentration minimale inhibitrice pour l'oxacilline est ≥ 4 mg/L OU;

La concentration minimale inhibitrice pour la céfoxitine est ≥ 8 mg/L OU;

Une zone d'inhibition de ≤ 21 mm est observée sur gélose Mueller-Hinton en présence d'un disque de céfoxitine de 30 μ g OU;

La souche possède le gène *mecA* ou le gène *mecC* OU;

La souche fabrique un produit du gène *mecA*, soit la protéine PBP2a ou PBP2'

Une souche de SARM a habituellement un profil moléculaire communautaire (SARM-AC) si:

Elle est caractérisée CMRSA-7, CMRSA-10, clone Européen ST-80, USA 700, USA 1000 ou USA1100; ET/OU

Elle possède le gène de la toxine de la leukocidine de Panton-Valentine; ET/OU

Elle possède la cassette chromosomique SCC-IV ou SCC-V. Une souche de SARM a habituellement un profil moléculaire hospitalier (SARM-AH) si :

Elle est caractérisée CMRSA-1, CMRSA-2, CMRSA-4 ou CMRSA-8; ET/OU

Elle ne possède pas le gène de la toxine de la leukocidine de Panton-Valentine; ET/OU

Elle possède la cassette chromosomique SCC-I ou SCC-II ou SCC-III (Isabelle, 2016).

2.2. Historique

Dès les années soixante, des résistances à la pénicilline sont observées chez *S. aureus*. La méthicilline, qui commença à être utilisée en médecine humaine durant cette période, permit de contourner cette problématique (Crombe *et al.*, 2013 ; Pletinckx *et al.*, 2011). Peu après son apparition, on rapporte rapidement des cas de résistance à la méthicilline chez *S. aureus* au Royaume-Uni (Crombe *et al.*, 2013 ; Prescott *et al.*, 2003 ; Weese et Duijkeren, 2010). Au cours des années 80, les SARM sont devenus endémiques dans pratiquement tous les hôpitaux américains (Deleo *et al.*, 2011). Selon un rapport du "Center for Diseases Control and Prevention" (CDC), 75 309 cas d'infection à SARM ont été répertoriés en 2012 et ont mené à 9 670 décès aux États-Unis (Weese et Duijkeren, 2010).

2.3. Mécanismes de résistance envers la méthicilline

Deux principaux mécanismes sont impliqués dans la résistance acquise de *S. aureus* aux betalactamines: la production de beta-lactamase et, la modification de la cible des antibiotiques (Nour *et al.*, 2004). La beta-lactamase est une enzyme inductible, elle hydrolyse la pénicilline G et ses analogues de structure (Katayama *et al.*, 2003).

La résistance à la méthicilline par modification de la cible, appelée aussi résistance intrinsèque, est due à la production de la PLP (PLP2a ou PLP2') présentant peu d'affinité

pour la méticilline et toutes les autres beta-lactamines. La PLP2a est codée par le gène *mecA* dont l'expression est régulée par : le système de gènes *mecI* et *mecR1* et le système *blaI* et *blaR1*. La protéine MecR1, produit du gène *mecR1*, agirait comme transducteur de signal : MecRI détecte la présence de b-lactamine grâce à son domaine extracellulaire. Une fois l'antibiotique lié, il y a activation du domaine intracellulaire.

Celui-ci subirait une activation par protéolyse limitée lui conférant une activité protéasique. Cette dernière conduit à la dégradation du MecI (répresseur de la transcription codé par *mecI*) qui est fixé au niveau de l'opérateur d'où libération de ce dernier et expression du *mecA* (Nour *et al.*, 2004).

2.4. Actualité sur le SARM et les méthodes de lutte

Pour le SARM, la colonisation précède généralement l'infection. De plus, la colonisation peut être de longue durée (mois, années). Le SARM se transmet généralement de personne à personne. L'apparition spontanée d'une résistance est très rare. La transmission de SARM à l'homme notamment à partir de l'environnement et des animaux. Les mesures de prévention doivent cibler 2 domaines : la transmission de personnes colonisées à des personnes non colonisées notamment en luttant contre la transmission manuportée de SARM (du personnel, des patients...) et le développement de l'infection chez les individus colonisés, notamment par les stratégies de décolonisation (GNPIN, 2018).

Les études cliniques et in vitro ont montré un pouvoir bactéricide antibactérien et antimycotique important des huiles essentielles sur les pathogènes nosocomiales (Warnke *et al.*, 2009), tels que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Inouye et Abe, 2007).

Chapitre 3

Huiles Essentielles

3.1. Généralités

De point de vue chimique, une huile essentielle est un mélange complexe de composés naturels de structures organiques variées, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales. Le terme "huile" vient de leur caractère hydrophobe et de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme "essentielle" fait référence à l'odeur dégagée par la plante productrice. Les huiles essentielles sont bio synthétisées comme métabolites secondaires par des plantes odorantes, dites aromatiques. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétrices des huiles essentielles dans presque tous les organes du végétal (fleurs, graines, racines, feuilles, fruits...). Il s'agit de structures histologiques sécrétrices spécialisées qui diffèrent selon l'organe végétal considéré et qui sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Ces structures sont également impliquées dans le stockage de ces huiles. Les huiles essentielles sont extraites des plantes aromatiques par différentes techniques. La distillation étant la méthode la plus utilisée pour la production commerciale de ces produits. Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée. Il s'agit des terpènes et de leurs dérivés oxygénés (alcools, aldéhydes, esters, éthers, cétones, phénols et oxydes) prépondérants dans la plupart des huiles essentielles, et des dérivés du phénylpropane retrouvés en tant que composés majoritaires dans les huiles de quelques espèces (Ciccarelli et Garbari, 2008), et à la dispersion des graines, un effet répulsif contre les herbivores (Isman, 2000), un effet allelopathique (De Feo *et al.*, 2002) et servent également de moyen de défense contre les organismes phytopathogènes.

3.2. Activité antimicrobienne

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (Cowan, 1999).

Les substances antimicrobiennes d'origine naturelles, est un inappropriée des antibiotiques pour traiter les infections microbiennes a entraîné la sélection de souches multi-résistantes (Cowan, 1999). La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004). Les plantes médicinales contenant des acides phénoliques se sont avérées efficaces contre les bactéries (Samy et Gopalakrishnakone, 2008). Les acides phénoliques (acide cinnamique, acide coumarique, acide caféique et férullique) ont montré une bonne activité contre les bactéries à Gram positif et seulement une faible activité contre les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) à

forte concentration (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007). Dans une étude menée par (Chanwitheesek *et al.*, 2007), l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique est attribuée à la présence d'une substance antimicrobienne active, l'acide gallique, qui a montré une activité contre *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI de 1,25 mg/ml. L'hydrophobicité partielle de l'acide gallique lui permet d'agir efficacement par déstabilisation de sa membrane externe. (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005). Il est démontré que la position et le nombre de groupements OH des acides phénoliques sont déterminants pour leur activité antimicrobienne et proportionnelle à leur toxicité (Kuete *et al.*, 2007). De plus, les phénols hautement oxydés, tels que les acides cinnamique et caféique, sont les plus toxiques (Cowan, 1999 ; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007)

3.3. Mode d'action

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Kalemba et Kunicka, 2003; Burt, 2004). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Annexe1). La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema *et al.*, 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Carson *et al.*, 2002 ; Ultee *et al.*, 2002). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relégués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire (Annexe 2).

3.4. Activité anti-biofilm

Il est connu que les biofilms microbiens sont difficiles à éradiquer par les agents antimicrobiens standards, tels que les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques (Kavanaugh et Ribbeck, 2012). Par contre, à travers des recherches effectuées récemment, les huiles essentielles sont avérées très efficaces vis-à-vis des biofilms microbiennes, où elles peuvent agir de plusieurs façons. D'après Niu et Gilbert (2004), les huiles essentielles à faible concentration inhibent la formation des biofilms bactériens par plusieurs mécanismes. Notamment, l'activation des gènes de réponse contre-stress qui à leur tour diminuent la production des polysaccharides extracellulaires (le constitue majoritaire de l'EPS). En plus, les huiles essentielles peuvent interagir avec les protéines des surfaces bactériennes ce qui inhibe leur fixation et du coup, la formation du biofilm. En outre, les huiles essentielles ont la particularité d'agir directement sur des biofilms déjà formés, contrairement à la majorité des

agents antimicrobiens. D'après Niu et Gilbert (2004), les huiles essentielles ont la possibilité d'éradiquer les biofilms microbiennes par solubilisation de leur matrice extracellulaire. D'autres auteurs indiquent que les huiles essentielles sont aptes de diffuser à travers la matrice polysaccharidique du biofilm et de la déstabiliser, en raison de leur forte propriété antimicrobienne intrinsèque (Ouhayoun, 2003).

Partie expérimentale

Chapitre 4

Matériel et Méthodes

4.1. Huiles essentielles

4.1.1. Source du matériel végétal

Trois plantes médicinales ont été sélectionnées pour cette étude, en fonction de leur utilisation traditionnelle dans les traitements des différentes pathologies infectieuses. Il s'agit de l'Armoise blanche, connue en Arabe par الشيح, son nom scientifique est *Artemisia herba-alba* Asso. Les deux autres plantes ont été remmenées de la région de Tlemcen, à savoir : L'Origan, en Arabe مردقوش, sous le nom scientifique *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietsw. *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. Connue sous le nom نونخة.

La récolte du matériel végétal a été effectuée comme suivant : *Ammoides pusilla* au mois de Juin 2018 à Tlemcen exactement à Attar. L'*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* au mois de Mars 2019 à Tlemcen exactement Attar. L'*Artemisa herba alba* au mois de Mai 2019 à Droe Biskra (Figure 1) (Annexe 3).



Figure 1. Site d'échantillonnage des plantes

Le matériel végétal est constitué de la partie supérieure de la plante (y compris feuilles, tiges, fleurs, grains). Les plantes collectées sont lavées puis laissées sécher pendant 10 jours dans un endroit sec, aéré, et en abri de la lumière solaire.

4.1.2. Obtention

La récupération des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation à l'aide d'un appareil de type « Clevenger ». Le procédé est basé sur la mise en contact direct du matériel végétal avec de l'eau dans un ballon placé au-dessus d'une source de chaleur. Le ballon est lié à une colonne qui communique avec un réfrigérant, permettant la condensation des vapeurs d'eau chargée de gouttelettes d'huiles essentielles. L'huile est recueillie dans une burette graduée ou le volume est lu directement. L'extraction a été effectuée pendant trois heures (European Pharmacopoeia, 2005) sur les parties aériennes des plantes aromatiques (Figure 2).

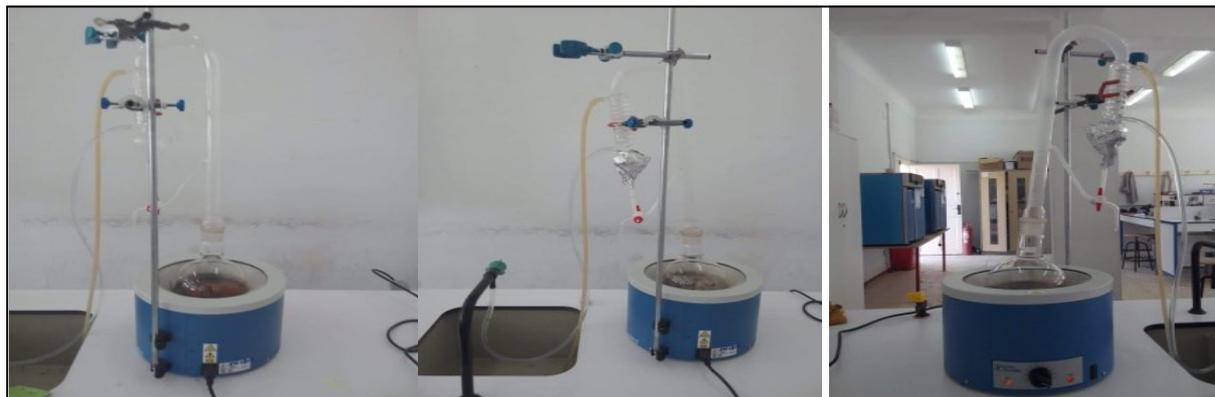


Figure 2. L'appareil d'extraction des huiles essentielles par hydro distillation « Clevenger ».

4.1.3. Conservation

La conservation des huiles essentielles est difficile, ceci est dû à l'instabilité de leurs molécules. De ce fait, les possibilités de dégradation sont nombreuses. Il est possible de limiter celles-ci en utilisant des flacons de faible volume en aluminium, en acier inoxydable ou en verre brun, entièrement remplis et fermés de façon étanche, stockés à basse température, ou conservés sous atmosphère d'azote (Goffard et Armand, 2000).

Les huiles obtenues ont été déshydratées sur le sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et conservées à 4 °C et à l'abri de la lumière.

4.2. Souches de *Staphylococcus aureus*

Les activités antimicrobienne et anti-biofilm des huiles essentielles étudiées ont été testés sur des souches cliniques SARM et de référence SASM.

4.2.1. Origine

4.2.1.1. Souches de référence

Deux souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) ont été utilisées dans cette étude à savoir : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, obtenues de la part de laboratoire LAMAABE, université de Tlemcen.

4.2.1.2. Souches Cliniques

Les souches cliniques utilisées (20) dans notre étude ont été obtenues auprès de laboratoire de l'hôpital Hakim Saadane Biskra à partir des patients hospitalisés ou externes dans plusieurs services à savoir les services de Pédiatrie, Néonatalogie, Pneumologie, Cardiologie, dermatologie et de Médecine interne.

4.2.2. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués par écouvillonnage sur les plaies postopératoires et dans les fosses nasales ou par incubations des cathéters veineux centraux.

4.2.3. Isolement

Les prélèvements collectés ont été incubés dans le bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) (Conda Pronadisa™, Espagne). Après incubation de 24h à 37°C, les souches de *S. aureus* ont été isolées sur gélose Chapman (Conda Pronadisa™, Espagne) puis incubées dans les mêmes conditions. Ensuite, les colonies ayant poussées en jaunes dorées ont été sélectionnées pour des tests d'identification initiaux tels que la coloration de Gram, le test du coagulase et le test de catalase. Au-delà, les souches ont été purifiées par repiquage successif sur gélose Chapman (Annexe 4).

4.2.4. Identification

L'identification des souches a été confirmée par les Galerie APIstaph bioMérieux. Cette technique repose sur l'utilisation d'une galerie biochimique qui comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. L'inoculum de la souche pure à identifier est préparé en mettant une colonie dans une ampoule de l'eau physiologique de 1 ml.

L'ensemencement s'effectue en inoculant les microtubes à l'aide d'une pipette de pasteur stérile. La lecture des plaques est basée sur les virages des indicateurs colorés et aussi en ajoutant les réactifs spécifiques tels que VP1 et VP2, nitrate1 et nitrate2 et ZYM A et ZYM B, cette révélation s'effectue en suivant le prospectus qui accompagne les plaques APIstaph.

4.3. Antibiogramme

L'antibiogramme est un test particulier en biologie clinique, car il constitue l'outil de mesure de la résistance bactérienne. Sa pratique et son interprétation font appel à de nombreuses connaissances cliniques, pharmaceutiques, bactériologiques, biochimiques et génétiques.

L'antibiogramme est un test de résistance, de prédiction, de croissance, totalement artificiel, complexe, à interprétation obligatoire, à impact variable et dont le résultat intéresse plusieurs destinataires (Marcel, 2005).

L'interprétation se fait aujourd'hui avec des systèmes experts qui suivent les recommandations de comités d'antibiogramme. Le choix des antibiotiques testés a beaucoup évolué en conséquence de ces connaissances. L'impact médical est de plusieurs ordres impact immédiat (traitement du malade concerné et alerte à la résistance), impact différé (Traitements empiriques), collectif (surveillance de la résistance), didactique (Marcel, 2005).

L'analyse moléculaire et l'interprétation thérapeutique de l'antibiogramme « lecture interprétative » se composent de trois étapes :

- a. Caractérisation du phénotype de résistance en testant une gamme judicieuse d'antibiotiques.
- b. Déduction du phénotype observé et du mécanisme biochimique de la résistance
- c. Analyse à partir du mécanisme déduit le phénotype prévu (Courvalin, 1996).

Les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations de l'EUCAST (EUCAST 2019). Des boîtes de pétrie préalablement remplies par la gélose Müller-Hinton (Conda Pronadisa™, Espagne) sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension bactérienne à 0.5 Mac Farland (équivalent d'une densité optique comprise entre 0.08-0.13 à 625 nm). Ensuite, des disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose à savoir : Chloromphénicol, Gentamicine, céfotaxime et Amoxiciline. Après incubation à 37°C pendant 24h, les zones d'inhibition sont mesurées en mm à l'aide d'un pied à coulisse. L'interprétation des résultats est réalisée selon l'EUCAST.

4.5. Activités antimicrobiennes des Huiles essentielles vis-à-vis les souches SARM/SASM

4.5.1. Aromatogramme

L'activité anti-SARM/SASM des huiles essentielles étudiées a été évaluée par la technique d'aromatogramme (Bauer *et al.*, 1966) appelé aussi technique de diffusion en gélose ou méthode de Vincent. Une culture de 18 à 24 h de la souche à tester sur bouillon Müller-Hinton a été préalablement préparée à une concentration $\approx 10^8$ UFC/ml en mesurant la DO à 625 nanomètre entre 0,08 et 0,13 (Larif *et al.*, 2013). Ensuite les souches sont ensemencées sur gélose Müller-Hinton par écouvillonnage selon les recommandations de CLSI (CLSI, 2011). Un disque de papier filtre stérile (Whatman No. 3) de 6 mm de diamètre imprégné de 2 μ l de l'huile a été déposé au centre de la boîte ensemencée. Nous avons testé 05 souches, dont 3 SARM cliniques et deux SASM de référence.

4.5.2. Détermination des CMI

Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées par la méthode de microplaque à 96 puits à fond rond (Wiegand *et al.*, 2008). L'huile essentielle a subi des dilutions successives au 1/2 dans le bouillon Müller-Hinton en ajoutant le Tween 80 pour une concentration de 1% dans le but d'avoir une miscibilité totale de l'huile dans le bouillon. Une deuxième solution dite blanche a été préparée avec le bouillon Müller-Hinton et le Tween 80 avec une même concentration de 1%. Cette solution a été utilisée pour compléter les dilutions successives de la première solution qui contiennent l'huile essentielle et afin que la concentration de Tween 80 reste la même à 1% dans les différentes concentrations préparées l'inoculum à 10^8 UFC/ml a été dilué au 1/1000 pour avoir une concentration $\approx 10^5$ UFC/ml.

Un volume de 180 µl de la suspension bactérienne à 10^5 UFC/ml a été déposé à l'intérieur des puits de la microplaque. Ensuite, 20 µl de la solution de l'huile essentielle a été ajouté. La concentration finale de Tween 80 est de 0,1 % dans chaque puits et les concentrations finales de l'huile essentielle sont de 4 % jusqu'à 0,0039 %.

4.5.3. Activité anti-Biofilm

Les CMI de la formation de biofilms ont été déterminées selon la méthode de Labrecque *et al.* (2006). Après incubation à 48 h et lecture des CMI de la croissance, les cellules microbiennes flottantes sont éliminées des puits par aspiration à l'aide d'une seringue. Les puits sont ensuite rincés trois fois à l'eau distillée pour éliminer les cellules faiblement adhérentes. Un volume de 100 µl de cristal violet à 0,4 % est ajouté et laissé pendant 15 min pour colorer les biofilms. Les puits sont ensuite rincés quatre fois à l'eau distillée pour éliminer le cristal violet non lié et séchés à 37 °C pendant 2 h. Après l'ajout d'un volume de 100 µl d'éthanol à 95 % (v/v) dans chaque puits, la plaque est agitée pendant 10 min afin de libérer la coloration à partir des biofilms. Les CMI de la formation de biofilms sont déterminées en tant que la plus faible concentration du produit à tester (l'huile essentielle ou le standard) pour laquelle la coloration n'est pas observée à l'œil nu (Beckloff *et al.*, 2007).

Chapitre 5

Résultats et discussions

5.1. Rendements en huiles essentielles

Les rendements en huiles essentielles en pourcentage (%) volume/poids (v/p) calculés par rapport au poids frais (classes par ordre décroissant) et la durée d'extraction faite pour chaque espèce végétale sont récapitulés dans le (Tableau 1).

Tableau 1. Rendements en huiles essentielles

Espèce	Rendement (% v/p)	Durée (h)
<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i>	2,2	3
<i>Artemisia herba-alba</i>	2,1	3
<i>Ammoides pusilla</i>	1,6	3

D'après le tableau ci-dessus on remarque que les rendements en huiles essentielles obtenus par hydro distillation sont variables. Les espèces *O. glandulosum*, et *Artemisia herba-alba* sont les plantes aromatiques qui présentent les rendements les plus importants.

Alors qu'*Ammoides pusilla*, ont donné des rendements moyens. La comparaison de nos rendements obtenus avec ceux de la littérature est du même ordre de grandeur pour certaines huiles mais différents pour d'autres huiles.

D'après la bibliographie, nous avons trouvé des études ayant rapporté les rendements en huiles essentielles des mêmes espèces étudiées (Tableau 2), selon lesquelles on constate une légère différence de ces variations de rendements en HE dépendent de nombreux facteurs tels que, l'espèce, l'âge de la plante, la partie de la plante traitée, l'état du matériel végétal avant utilisation, la période de récolte, l'origine géographique (effet du milieu), le mode d'extraction et la durée de distillation (Abdelmounaim, 2013).

Tableau 2 . Comparaison des rendements en huiles essentielles des plantes étudiées avec d'autres travaux.

Espèces	T1 (%)	T2 (%)	Références
<i>Origanum glandulosum</i>	2.2	2.52	(Bouhaddouda, 2016)
<i>Artemisia herba-alba</i>	2.1	2,46	(Abdoune, 2013)
<i>Ammoides pusilla</i>	1.6	1.43	(Abdoune, 2013)

T1 : Résultats de cette étude, T2 :% : Résultats d'autres auteurs.

5.2. Identification des souches de *Staphylococcus aureus* isolées du Hakim Saadane

Biskra

5.2.1. Examen Macroscopique

Après incubation des prélèvements sur le milieu Chapman, les colonies ayant poussé sont alors lisses, opaques, convexes et rondes (à bord net). Leur diamètre est compris entre 1 et 3 mm et elles sont pigmentées en jaune (Figure 3). Cette coloration a d'ailleurs donné le nom d' « *aureus* » à *S. aureus* car la pigmentation est souvent de couleur d'or (jaune à jaune orangée). Il faut préciser que le *S. aureus* peut également croître en milieu hostile c'est le cas de la gélose Chapman (milieu sélectif hypersalé) (Annexe 4), ce qui est un avantage pour isoler la souche *S. aureus*.

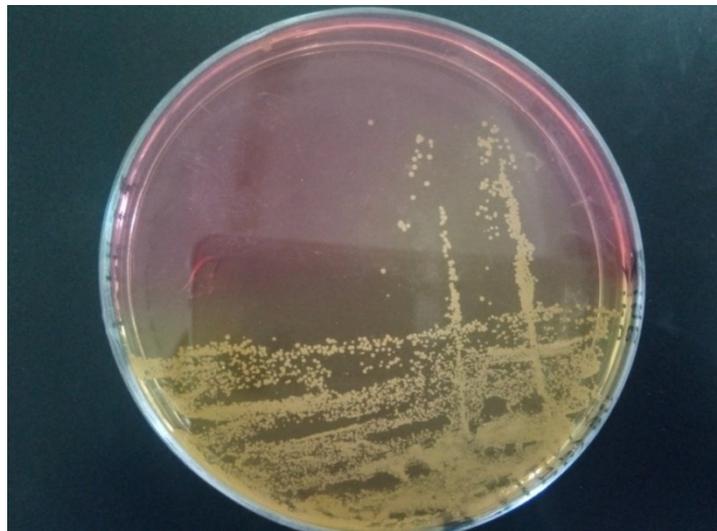


Figure 3. Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman

5.2.2. Examen Microscopique

Après la réalisation d'une observation au microscope optique (G x 1000), on a constaté que les cellules de staphylocoques sont regroupées en amas irréguliers forment souvent des grappes ou regroupés par deux (diplocoques) ou par quatre (tétraèdres). La coloration de Gram révèle que *S. aureus* sont des cocci à Gram positif (Annexe5), d'environ 0,5 à 1 μm de diamètre. Ils sont immobiles, non sporulés. La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture (Figure 4).

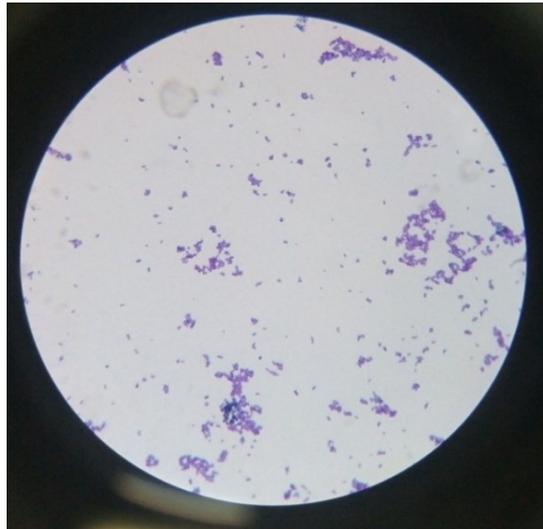


Figure 4. Coloration de Gram (G+) de *S. aureus*

5.2.3. Identification biochimique

5.2.3.1. Test de catalase

Le *S. aureus* possède une activité catalase positive comme tous les staphylocoques. Cette activité enzymatique permet la dégradation du peroxyde d'oxygène en eau et dioxygène. Pour réaliser ce test, il suffit de prélever quelques colonies de bactéries et de les mettre en présence de peroxyde d'oxygène (ou eau oxygénée). La présence de bulles de dioxygène confirme l'activité enzymatique de la bactérie (Figure 5) (Annexe 5). La catalase est très utile en pratique pour différencier les bactéries à Gram +.



Figure 5. Observation de Test de catalase (catalase +)

5.2.3.2. Test de coagulase ou staphylocoagulase

On utilise le test de la coagulase en tube comme marqueur de l'identification de *S. aureus* en routine dans les services de biologie. Ce test consiste à incuber à 37°C, un mélange de la souche à tester (0,5 ml) et du plasma de l'humain (0,5 ml) pendant 4h puis 24h. Si la

bactérie détient une coagulase, alors on voit apparaître un caillot en inclinant le tube. Le plasma de l'humain est resté pris en masse au fond du tube (Figure 6)

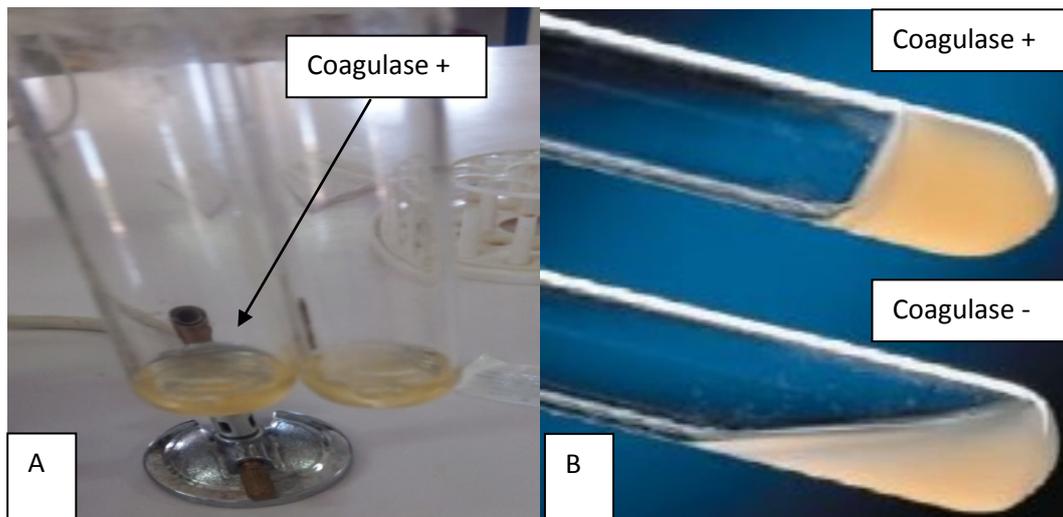


Figure 6. Test de la coagulase en tube «A : Photo originale ; B : (Isman, 2000) » de *S. aureus*

5.3.2.3. Résultats de l'indentification par les plaques API

L'identification des souches de *S. aureus* a été confirmée par la galerie API. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Ces systèmes utilisent des tests d'acidification ou d'assimilation des sucres (figure 7. A) et des tests enzymatiques (figure 7. B). Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

- Test VP : VP 1 et VP 2
- TEST NIT : NIT 1 NIT 2.
- Test PAL : ZYM A et ZYM B. (Annexe 6)

On confirme que Toutes les bactéries (20 souches) sont des SARM, grâce aux méthodes bactériologiques classiques : L'aspect des colonies, l'état frais, la coloration de Gram (Cocci gram positif), la recherche de catalase, le test de coagulation du plasma des patients pour la recherche de la staphylocoagulase libre, par les caractères biochimiques à l'aide des plaques API Staph.

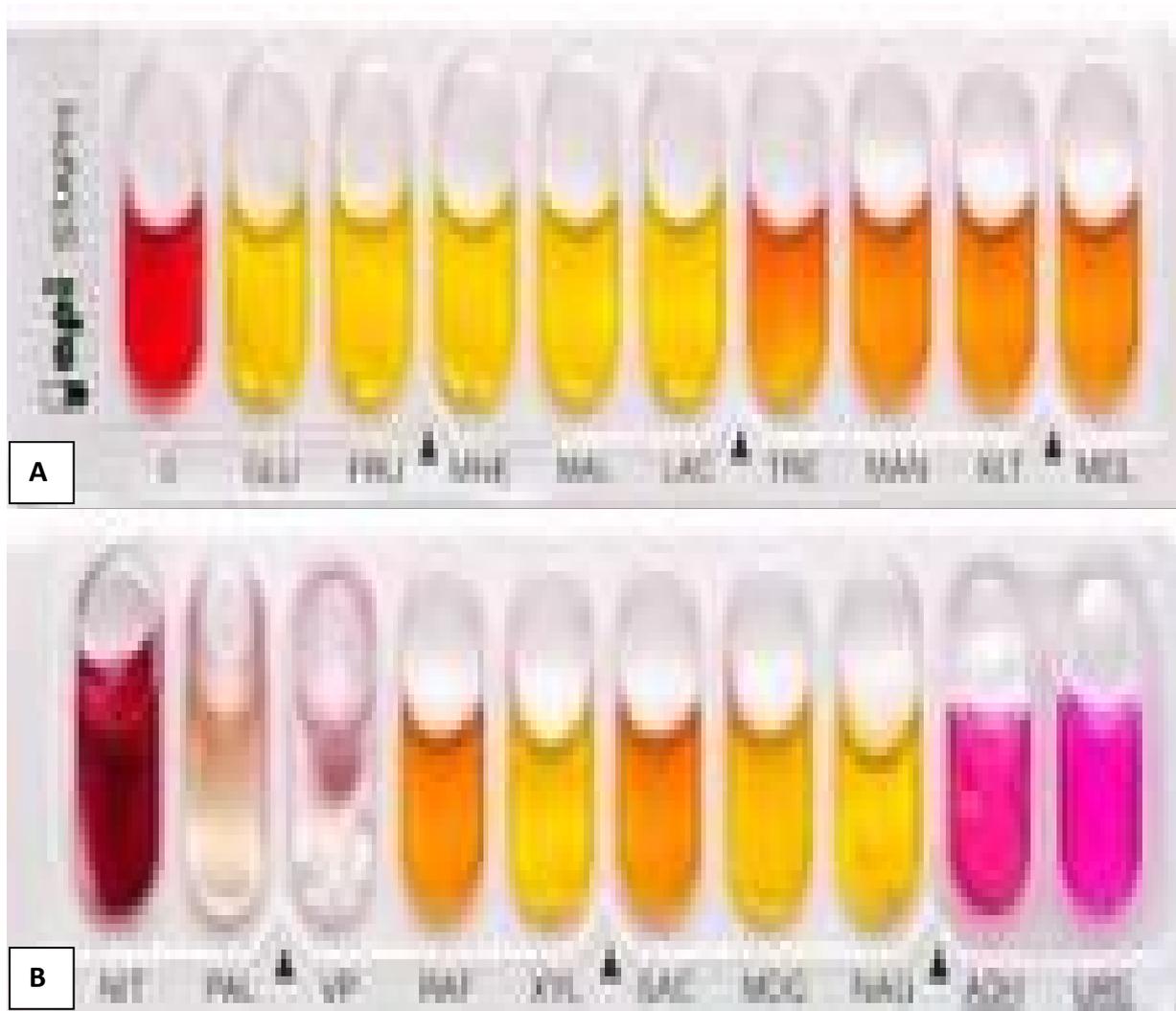


Figure 7. La mise en évidence des caractères biochimiques par la galerie API Staph.

A : Tests d'acidification ou d'assimilation des sucres sur galerie API Staph.

B : Tests enzymatiques sur galerie API Staph.

5.3. Les tests de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme des souches de *S. aureus* sont présentés dans le (Tableau 3).

Tableau 3. Résultats des antibiogrammes

Souches	Source	Echantillon pathologie	AMX	C	GEN	CTX
561	Pédiatrie	N	S	S	S	R
8548		N	S	S	S	R
11574		N	S	S	R	R
6763	Néonatalogie	N	S	S	R	R
1349		Vc	R	S	R	R

11234		VC	R	R	R	R
917	Pneumologie	Vc	S	S	R	R
8548		Vc	S	S	S	R
11237		Vc	R	S	R	R
10564	Externes	P	R	R	R	R
9809		P	R	S	R	R
6763	Cardiologie	P	R	S	R	R
20920		P	S	S	R	R
2999		P	R	R	R	R
12345	Dermatologie	P	R	R	S	R
5575		P	R	R	R	R
8846		P	R	R	R	R
7126	Médecine interne	P	R	S	R	R
2275		P	S	R	R	S
2991		P	R	R	S	R

P : plaïs, N : nasal, Vc : cathéter, AMX : amoxicilline, GEN : gentamicine, CTX: cefoxitime, C : chloramphenicol.

Il est à noter que nos résultats ont été difficiles à comparer à d'autres études à cause de disponibilité des antibiotiques mais aussi parce que les différentes études d'antibiorésistance s'intéressent à une seule espèce bactérienne, à un seul type d'infection ou ont été restreintes à certains services. *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) représente une préoccupation majeure dans de nombreux pays (Borg *et al*, 2006). Il est connu pour sa grande capacité d'adaptation, en particulier sa capacité à résister à de nombreux antibiotiques (Figure 8).

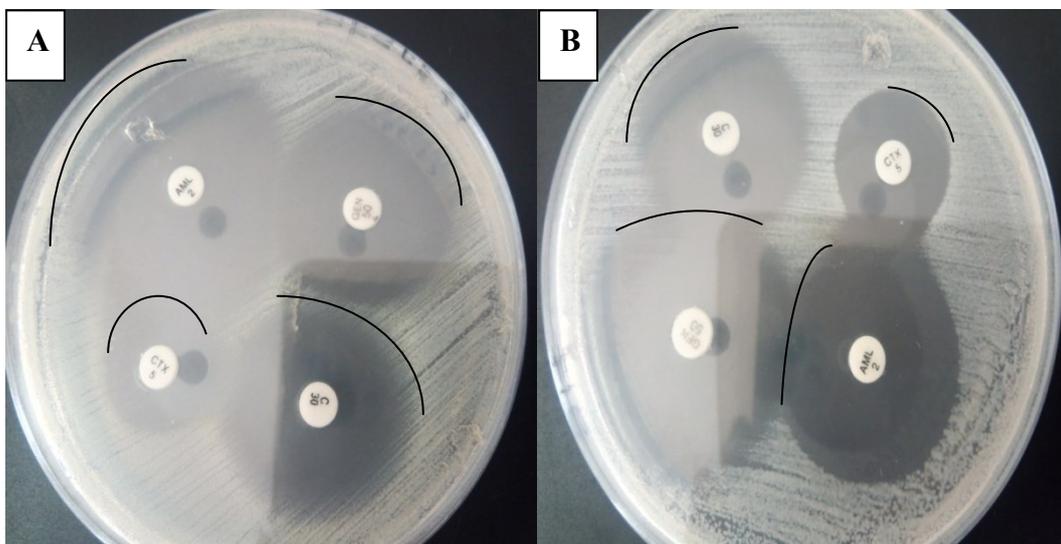


Figure 8. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* (A : Souche de référence ; B : Souche prélevées au Hakim Saadane de Biskra)

Le Taux de résistance du SARM d'AMX 85%, pour la C 60%, pour GEN de 50% et de 100% pour la CTX. Nos souches sont caractérisées par une forte résistance aux antibiotiques (Figure 9).

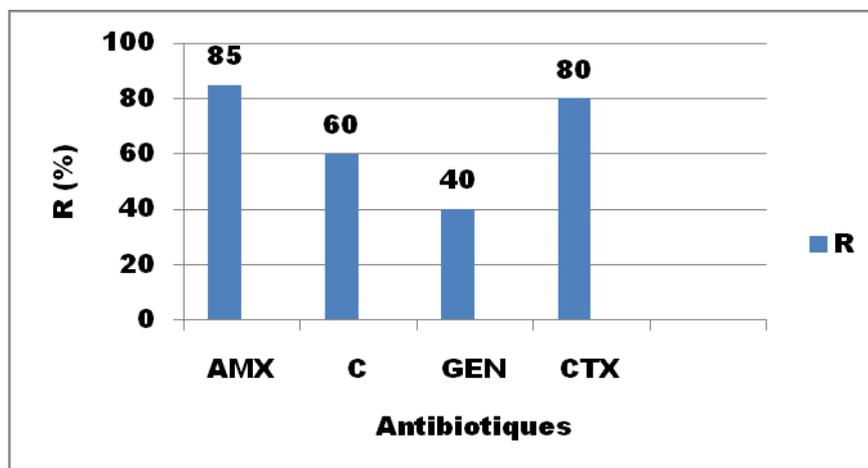


Figure 9. Profil de résistance des souches SARM aux antibiotiques

Dans nos travaux on trouve un large développement que les études précédentes dans la résistance des SARM envers le chloramphénicol et gentamicine, en 2004 (0.3/7)%, 2005 (1.3/7.3)%, 2006(1.3/6.1) %, 2007 (2.6/3.3) %, respectivement (Saïdani et al, 2006 ; Boucher et Corey, 2008).

5.4. Effets des huiles essentielles étudiées sur les souches SARM/SASM

5.4.1. Diamètres des zones d'inhibition

Nous avons sélectionné cinq souches de *S. aureus* (2 souches SASM de références et 3 souches SARM cliniques) pour les tests de sensibilité aux huiles essentielles. Les résultats d'inhibitions des huiles essentielles sont donnés dans le (Tableau 4).

Tableau 4. Diamètres d'inhibitions des huiles essentielles des trois plantes

Souche Code	Diamètre (mm)		
	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i>	<i>Artemisia herba-</i> <i>alba</i>	<i>Ammoides pusilla</i>
SARM 25	50	15	19
SARM 23	41	15	25
SARM 1	40	15	16
SARM 2	38	14	17
SARM 3	35	15	18

Moyen	40.8	14.8	19
--------------	------	------	----

SASM 25 : *S. aureus* ATCC 25923 ; SASM 33 : *S. aureus* ATCC 33862.

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'huile essentielle la plus active contre les souches de SARM est *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* avec formation des larges zones d'inhibition 35-50 mm. L'huile d'*Ammoides pusilla* a également montré une bonne activité antibactérienne traduite par des zones d'inhibitions plus au moins larges comprises entre 16-25 mm. Par contre, les zones d'inhibition formées par l'huile essentielle *Artemisia herba-alba* étaient réduites 14-15 mm signifiant une activité antimicrobienne modeste. Selon les moyennes des diamètres des zones d'inhibitions on peut classer les huiles essentielles par ordre décroissant comme suit : *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (40.8 mm), *Ammoides pusilla* (19 mm), *Artemisia herba-alba* (14.8 mm) (Figure 10).

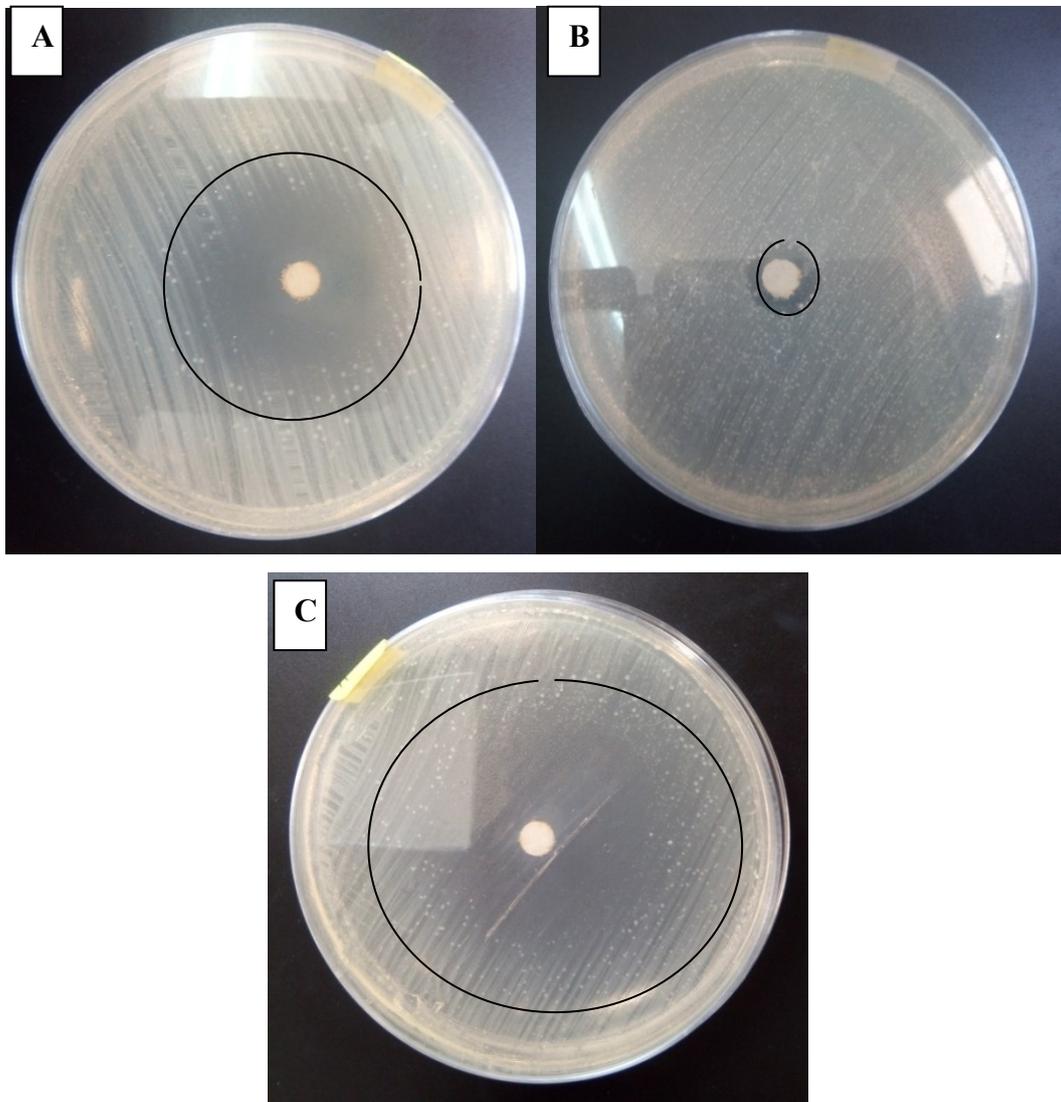


Figure 10. Effet des huiles essentielles étudiées sur des souches SARM<SARM11574 ; SARM11234 ; SARM8548> (A : *Ammoides pusilla* ; B : *Artemisia herba-alba* ; C : *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*).

Après comparaison de nos résultats obtenus avec ceux de la littérature, on constate que (Abdelmounaim, 2016) a trouvé que l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* était très efficace envers des souches SARM/SASM sachant que cette huile essentielle a montré les zones d'inhibitions les plus grandes (> 57 mm) pour certaines souches malgré le faible volume utilisé des huiles essentielles (2ul) par disque.

D'autre part, en comparant entre la sensibilité des souches de référence avec celle des souches cliniques vis-à-vis les huiles étudiées on remarque que les deux souches des références (ATCC33862 ; ATCC29213) sont plus sensibles par rapport aux souches cliniques, notamment envers l'huile d'*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*.

5.5. CMI de la croissance

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches SARM/SASM par les huiles essentielles sont présentés dans le (Tableau 6).

Tableau 5. Concentration minimale inhibitrice CMI (%)

Souche code	Concentration minimale inhibitrice CMI % (V/V)		
	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i>	<i>Artemisia herba-alba</i>	<i>Ammoides pusilla</i>
SARM 25	0.0625	0.5	0.125
SARM 23	0.0625	0.5	0.125
SARM 1	0.0625	0.5	0.125
SARM 2	0.0625	0.5	0.125
SARM 3	0.125	0.5	0.25

SASM 25 : *S. aureus* ATCC 25923 ; SASM 33 : *S. aureus* ATCC 33862.

D'après les résultats présentés ci-dessus, on remarque que les huiles essentielles les plus efficaces dans l'inhibition de la croissance des souches SARM/SASM étudiées sont celles de l'*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* et celle d'*Ammoides pusilla* avec des concentrations très faibles allant de 0.0625% à 0.1250%, respectivement. Tandis que l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* s'est avérée faible par rapport aux autres huiles étudiées avec une concentration plus au moins élevée de 0.5%, mais ça reste quand-même une activité antimicrobienne intéressante. D'après ces résultats passionnants, on déduit que les trois huiles essentielles étudiées présentent une activité anti-staphylococcique particulièrement

intéressante. Après une recherche bibliographique, nous avons constaté qu'il existe des études précédentes avec les mêmes résultats que ceux présentés ci-dessus tel que l'étude de (Abdelmounaim, 2016) à travers laquelle l'auteur a trouvé que l'huile essentielle d'*O.glandulosum* était la plus forte avec des CMI $\leq 0,06$ % envers certaines souches SARM.

5.6. Détermination de la CMI de la formation de biofilms CMIB

Les résultats obtenus pour les CMI de la formation de biofilms sont récapitulés dans le (Tableau 6).

Tableau 6. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la formation de biofilms

Souche code	CMI de l'inhibition des biofilms %		
	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>glandulosum</i>	<i>Artemisia herba-</i> <i>alba</i>	<i>Ammoides pusilla</i>
SARM 25	0.125	0.25	0.125
SARM 23	0.0625	0.25	0.0625
SARM 1	0.0312	0.5	0.0625
SARM 2	0.015	0.125	0.125
SARM 3	0.008	0.5	0.125

SASM 25 : *S. aureus* ATCC 25923 ; SASM 33 : *S. aureus* ATCC 33862.

D'après les résultats montrés ci-dessus on s'aperçoit en premier lieu que les concentrations d'inhibition des biofilms sont nettement inférieures à celles d'inhibition des cellules planctoniques, cela était remarqué pour toutes les souches et les huiles. L'huile essentielle la plus efficace dans l'inhibition de formation des biofilms est l'*Origanum vulgare subsp.glandulosum* avec de concentrations minimales inhibitrices très faibles allant de 0.008% à 0.015%. Par la suite, l'huile d'*Ammoides pusilla* a inhibé la formation des biofilms des souches SARM/SASM avec des concentrations faibles ainsi intéressantes de l'ordre 0.125 % jusqu'à 0.0625%. Alors que l'huile essentielle de l'*Artemisia herba-alba* était la plus faible parmi les huiles essentielles étudiées avec des concentrations d'inhibition des biofilms de 0.5% jusqu'à 0.125 %. Ces concentrations restent de toute façon très intéressantes. Alors que l'huile étudiée la plus active, celle d'Origan, était plus inhibitrice envers les biofilms des souches SASM que celles ayant présenté des résistances envers les antibiotiques, notamment contre la méthicilline beaucoup plus (Figure 11).

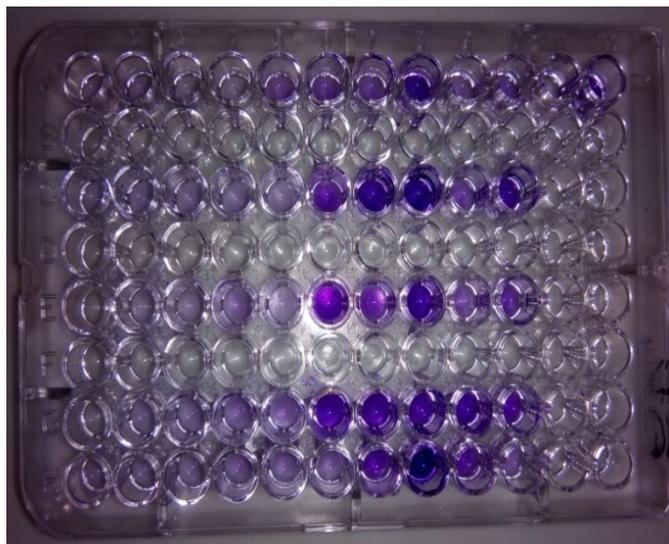


Figure 11. Résultats de détermination de CMIB de l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare subsp. glandulosum*.

Conclusion

Conclusion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles, obtenues de plantes aromatiques envers des souches multi-résistantes SARM isolées du l'hôpital Hakim Saadan de Biskra.

D'après les résultats obtenus, notre étude a révélé un grand potentiel antibactérien de nos plantes locales, ce qui peut contribuer à l'élargissement de l'effet des plantes douées de propriétés antibactériennes.

L'antibiogramme a montré qu'il y a augmentation dans la résistance aux antibiotiques d'une manière très élevée de 2004 à 2019 de SARM isolés des patients hospitalisés dans différents services du l'hôpital Hakim Saadan de Biskra (Le Taux de résistance du SARM d'AMX 85%, pour la C 60%, pour GEN de 50% et de 100% pour la CTX). Aussi, ces résultats ont montré qu'il y a une propagation de souches SARM productrices de β -lactamases.

Les huiles essentielles de trois espèces végétales (*Ammoides pusilla*, *Origanum glandulosum*, et *Artemisia herba-alba*) ont été testées sur cinq souches sélectionnées SARM/SASM (2 souches de références et 3 souches cliniques SARM) qui représentent un ensemble connus par leur pathogénicité.

La majorité des plantes étudiées sont riches en huiles essentielles et constituent une bonne source pour ces substances avec des rendements variant de 1.6 % à 2.2 % (v/p) ou *Origanum glandulosum* est la plante ayant le plus grand rendement. Les huiles essentielles, dans ce travail, montrent une activité antimicrobienne inhibitrice, sur la formation de biofilms. Les CMI de la croissance indiquent une activité antimicrobienne remarquable pour l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*. Cette huile essentielle était capable d'inhiber la formation des biofilms à des concentrations de 0.0625%.

Ces résultats rendent ces huiles essentielles une bonne source de molécules bioactives qui peuvent être utilisées pour garder l'hygiène ou pour la prévention des maladies nosocomiales ou pour leur éradication complète comme une perspective.

Références bibliographie

Bibliographie

Abdelmounaim K. 2013. Effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline SARM isolées du CHU de Tlemcen Thèse de doctorat d'état, Université d' Tlemcen, Algérie, p. 158

Astagneau P., Legrand P., Lucet J.C., et 1999. Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Paris : Ministère chargé de l'Emploi et de la Solidarité, p. 23

Auajjar N., Attarassi B., Elhaloui N. E., Badoc A.2006. Multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, p. *Fluorescens* et *staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers *145(1/4):61*

Baba Aïssa F. 1991. Les plantes médicinales en Algérie. Thèse de doctorat d'état, université de paris, France, p.290

Banks M. C., Kamel N. S., Zabriskie J.B., Larone D.H., Ursea D., Posnett D. N. 2003. *Staphylococcus aureus* Express Unique Superantigens Depending on the Tissue Source. *The Journal of Infectious Diseases* 187:77–86.

Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. 1966. Antibiotic susceptibility Testing by a standardized single disk method *The American Journal of Clinical Pathology* 45:493-496.

Beard-Pegler M. A., Stubbs E., Vickery A. M. 1998. Observations on the resistance to drying of staphylococcal strains. - *J. Med. Microbiol* 26(4) :251-255

Beckloff N., Laube D., Castro T., Furgang D., Park S., Perlin D., Clements D., Tang H., Scott R. W., Tew G. N., Diamond G. 2007. Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (11): 4125 - 4132.

Berche P., Gaillard J. L., Simonet M.1988. Bactériologie. Les bactéries des infections humaines. - *Ed. Flammarion*, « De la biologie à la clinique » p. 649

Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L H., Mingllou F., Kalloustian J.2010. Composition chimique de huile essentielle d'*Artemisia herba alba* provenant de la region de Biskra(Algérie), *Phytothérapie* 8 :277 - 281.

Borg MA, Scicluna E, de Kraker M, van de Sande-Bruinsma N, Tiemersma E, Gür D, Ben Redjeb S, Rasslan O, Elnassar Z, Benbachir M, Pieridou Bagatzouni D, Rahal K, Daoud Z, Grundmann H, Monen J. 2006. Antibiotic resistance in the southeastern Mediterranean--preliminary results from the ARMed project. *Euro Surveill* 11(7):164-7

Boucher HW, Corey GR.2008. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.*46 (1 5):S344-9.

Bouldjadj R. 2009. Étude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Artemisia herba alba* Asso chez des rats sains et des rats rendus diabétiques par streptozotocine. *Thèse de magister*. Université Mentouri Constantine, p. 300

Boyce J. M., Potter-Bynoe G., Chenevert C., King T. 1997. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect. Control Hosp. Epidemiol* 18(9) :622-627

Boyle W. 1955. Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfumer Essent. Oil Rev* 66: 25-28.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol* 94: 223-253.

Cabiac S. 2014. Traitements et conseils à l'officine des affections cutanées les plus couramment rencontrées. Thèse d'exercice, Université de Montpellier I. UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques, 1968, France, p. 320

Carson C. F., Hammer K. A., Riley TV.2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev* 19: 50-62.

Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag A., Kilburn J. D.,Rakariyatham N.2007. Antimicrobial gallic acide from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry* 100: 1044-1048.

Ciccarelli D., Garbari F., Pagni A M. 2008. The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae) : secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora* 203 : 85-93.

Corne P. 2004. *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation: étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Montpellier 1. Thèse de doctorat, Université de Montpellier I. Faculté de médecine, 190p.

- COUNCIL O. E. 2005. European Pharmacopoeia. *General Text*, p.5
- Courvalin P. 1996. Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). *Clinical Microbiology and Infection* 2:26 - 34.
- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12 (4) : 564-570.
- Crombe F., Phillips L., Monnet D. 2013. *Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Pigs*. *Frontiers in Microbiology* 4:57.
- Dauwalder O. G., Lina G., Durand M., Bes H., Meugnier V., Jarlier B., Coignard F., Vandenesch J., Laurent F. 2008. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 46:3454-3458.
- De Bentzmann S. A., Tristan J., Etienne N., Brousse F. 2004. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis* 190:1506-1515
- De Feo V., De Simone F., Senatore F., Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 61 : 573-8.
- Deleo F., Otto M. Un demi-siècle de SARM. *Rev franc des lab*. Fev 2011 429 :27.
- Dhur A., Galan P., Hercberg S. 2004. Relationship between selenium, immunity and resistance against infection. *Comp biochem phys*. Juin 2004 96.2:271-280.
- Dressler A. E. 2012. *Prevalence, antibiotic resistance and molecular characterisation of Staphylococcus aureus in pigs at agricultural fairs in the USA*. *Veterinary Record* 170(19): 495-78
- European Committee on Antimicrobiale Susceptibility Testing. 2018/2019. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended. Version 2.0. EUCAST 2019.
- Festy D. 2008. *Ma bible des huiles essentielles*. Thèse d'exercice, Université de Paris: Leduc.s ed, France, p. 267
- Fournier P., Boisvert C. 2010. *Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France*. Thèse d'exercice, Université de Paris, France, p. 296

Fridkin S. K., Steward C. D., Edwards J. R., Pryor E.R., McGowan J. E. Jr., Archibald L. K., Gaynes R. P., Tenover F.C. 1999. Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States hospitals: project ICARE phase 2. Project Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) hospitals. -*Clin. Infect. Dis* 29(2) :245-252

Ghrabi Z. S., R. L. 2008. *Artemisia herba alba* Asso. *A Guide to Medicinal Plants in North Africa*, pp. 49 – 49

Goffard M., Armand C. 2000. Huiles essentielles – Extraits naturels, Les activités de documentation de physique et chimie 24(2):211-215

Golliot F., Baffoy N., Astagneau P., Brucker G. 1996. Les infections nosocomiales chez les patients opérés. Résultats de l'enquête de prévalence dans l'inter-région Paris-Nord 29:125-126

Grohs P. 2009. Évolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques : la méticilline est-elle encore un marqueur de multirésistance *Pathologie Biologie* 57:1-8.

Groupe National de Guidance Luxembourg, le 15 juillet 2018 en matière de Prévention des Infections Nosocomiales (GNPIN). 2018. Recommandations Nationales pour la lutte contre le *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méticilline (Methicilline Resistant *Staphylococcus aureus*) dans les établissements hospitaliers, 15 juillet 2018, Luxembourg,

[Http://www.who.int/topics/emerging_diseases/en/](http://www.who.int/topics/emerging_diseases/en/)

Inouye S., Abe S. 2007. Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie* 5, pp. 2- 4

Isabelle T. 2016. Surveillance de laboratoire des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline isolés de pus superficiels et pus profonds de la peau et des tissus mous de patients provenant de la communauté : rapport 2015, Juin 2016

Isman M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management *Crop Prot* 19 : 603-8.

Katayama Y., Zhang H., Hong D., Chambers H. 2003. Jumping the barrier to β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* 185:5465-72.

Kavanaugh N.L., Ribbeck K. 2012. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* And *Staphylococcus aureus* biofilms." *Appl. Environ. Microbiol* 78(11): 4057 – 4061

- Kenneth J.R., Ray G. 2004. Sherris Medical Microbiology. An infection to Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus* 185(4):5465-54
- Khanna, T., Edmond M.B., Wenzel R.P. 2008. *Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers*. Veterinary Microbiology 128(3-4):298-303
- Kuete V., Tangmouo J.G., Penlap B.V., Ngounou, F.N.,Lontsi D.2006. Antimicrobiol activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. xxx, xxx-xxx (Article in press).
- Labrecque J., Bodet, C., Chandad F., Grenier D. 2006. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58 (2): 439-443.
- Lesieur C., Vecsey-Semjen B., Abrami L., Fivaz M., van der Goot F.G. 1997. Membrane insertion: the strategies of toxins. *Mol Membr Biol* 14:45-64.
- Lynda I et Soraya A. B. 2016. Etude de la résistance aux antibiotiques de souches de *Staphylococcus aureus* isolées de l'hôpital, Université A. MIRA, Bejaia, p.79
- Marcel J.P. 2005. L'antibiogramme et son impact médical. *Antibiotiques* 7:53-58.
- Maugat S., Carbonne A., Astagneau P.1996. 2001. Réduction significative des infections nosocomiales : analyse stratifiée des enquêtes de prévalence conduites en et dans l'inter-région Nord. -*Pathol. Biol* 51(8-9) :483-489
- Méité S., Boni-Cissé C., Monemo P., Mlan Tanoa Ap., Faye-Ketté H., Dosso H. 2010. Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire : exemple du chu de Yopougon, abidjan, cote d'ivoire. *J. sci. pharm. biol*. Vol 1. pp. 73-81.
- Merlet A. 2010. Implication de la leucocidine de Panton et Valentine dans les infections sévères à *Staphylococcus aureus* en Nouvelle-Calédonie thèse de doctorat, Université Bordeaux 2 des sciences médicales, Algérie, 117 p.
- Neeling A.J., Hollis R.J., Edmond M.B., Wenzel R.P. 2007. *High prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs*. Veterinary Microbiology 122(3-4):366-72
- Neely A. N., Maley M.P. 2000. Survival of *Enterococci* and *Staphylococci* on hospital fabrics and plastic. - *J. Clin. Microbiol* 38(2) :724-726

Niu C., Gilbert E. 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure." *Appl. Environ. Microbiol* 70(12): 6951–6956.

Normark B. H., Normark S .2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 252:91–106.

Nour M., Mastouri M., Ben Nejma M. 2004. Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et bases moléculaires de la résistance. *PATBIO* 53:334-340.

O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol* 54: 49-79.

Ottmani S., Amrani J.F.1994. Enquête de prévalence des infections nosocomiales au niveau de 24 hôpitaux du Maroc. *Direction des hôpitaux, Rabat, Maroc*, p.Lepellier D. Evolution de la résistance et des facteurs de risque d'infection antibiotiques 6:69-72.

Ouhayoun J.P. 2003. Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. *J. Clin. Periodontol* 5: 10–12.

Parker M. W., Feil S.C.2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88:91-142.

Pletinckx L.J., et al., 2011. *Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs*. *Infection, Genetics and Evolution* 11(8):2133-7

Porwancher R., Sheth A., Remphrey S., Taylor E., Hinkle C., Zervos M. 1997. Epidemiological study of hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Possible transmission by an electronic ear-probe thermometer. - *Infect. Control Hosp. Epidemiol* 18(11) :771-783

Proksch P. 2002. *Artemisia herba-alba*. In: Wright CW (ed.) *Artemisia, London & New York: Taylor & Francis*, pp. 81-86

Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Alakomi H.L., Oksman-Caldentey K.M. 2005. Bioactive berry compounds-novel tools against pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 8-18.

Recommandations en matière de prévention, maîtrise et prise en charge des patients porteurs de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (MDRO) dans les institutions de

soins. Conseil supérieur de la santé - Belgique (version validée par le Collège de mai 2017, version améliorée planifiée pour mai 2018)

Robert T. 2015. Huiles essentielles et antibiotiques: alternative et complémentarité. Thèse d'exercice, Université de Montpellier. UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques, France, p. 301

Rodriguez-Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca De., Nadra M.C. 2007. Antibacterial effect of phenolic compound from different wines. *Food Control* 18: 93-101.

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

Samy R.P., Krishnakone G. P. 2008. Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drugs discovery pp.1-12

Schlievert P. M., Case L. C.2007. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. *Methods Mol Biol* 391:113-26.

Sikkema J., de Bont J. A. M., Poolman B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem* 269: 8022-8028.

Soussy C. J. 2010. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM): Recommandations 2010. Paris: Société Française de Microbiologie. Retrieved June 10, 2010.

Spicer W. J. 2003. Pratique Clinique en bactériologie mycologie et parasitologie. Edition : Flammarion Médecine Science. Paris pp.28-29

Tervaert J. W., Popa E. R., Bos N.A., 1999. The role of superantigens in vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 11(1):24-33

Ultee A., Bennik M. H., Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol* 68: 1561-1568.

Vincenot F., Saleh M., Prévost G.2008. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires* 407:61-69.

Vokou D., Kokkini S., Bessiere J. M. 1993. Geographical variation of Greek Oregano (*O. vulgare ssp. hirtum*) essential oils. *Biochem. System. Ecol* 21: 287-295

Wang R., Braughton K. R., Kretschmer D., Bach T.H., Queck S.Y., Kennedy Li M., A.D., Dorward D. W., Klebanoff S. J., Peschel A., DeLeo F. R., Otto M. 2007. Identification of novel 90(9):2947-2951

Warnke P.H., Becker S.T., Podschun R., Sivananthan S., Springer I.N., Russo P.A., Wiltfang J., Fickenscher H., Sherry E. 2009. The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 37:392-397.

Wayne P. A. 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 31. (2011).

Weese J.S., Van Duijkeren E. 2010. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine*. *Veterinary Microbiology* 140(34):418-29

Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3:163-175.

Wilkoff L. J., Westbrook L., Dixon G.J. 1969. Factors affecting the persistence of *Staphylococcus aureus* on fabrics. - *Appl. Microbiol* 17(2):268-274

Zur Prävention von Evon K. 2014. Staphylococcus aureus Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsbl* 57(6):696-732.

Site Web :

1. http://www.who.int/topics/emerging_diseases/en/.

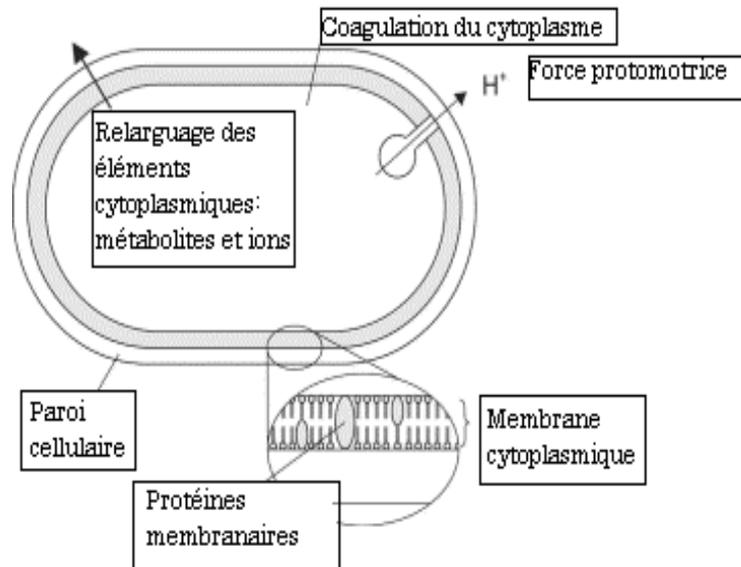
Annexe

Annexe 1. Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Schlievert, 2007)

Constituant de la paroi cellulaire	Clumping factor A	<i>clfA</i>	Adhésion au fibrinogène
	Clumping factor B	<i>clfB</i>	Adhésion au fibrinogène
	Coagulase	<i>coa</i>	Liaison au fibrinogène
	Protéine Fib A	<i>fibA</i>	Liaison au fibrinogène
	Fibronéctine liée à la protéine A	<i>fnbA</i>	Attachement à la fibronéctine
	Fibronéctine liée à la protéine B	<i>fnbB</i>	Attachement à la fibronéctine
	Collagène lié à la protéine	<i>cna</i>	Adhésion au collagène
	Elastine liée à la protéine	<i>ebps</i>	Liaison à l'élastine
	Protéine analogue MHC	<i>map ou eap</i>	Liaison à la protéine de la matrice extracellulaire (incluant fibronéctine, fibrinogène vitronectine, sialoprotéine osseuse et thrombospondine)
	Adhésine intracellulaire Polysaccharidique	<i>pia</i>	adhésion intracellulaire et formation de biofilm
	Protéine A	<i>spa</i>	invasion possible des défenses de l'hôte
	Polysaccharides capsulaires (types 1, 5 et 8)	<i>cap</i>	Molécule Anti-phagocytose
Entérotoxines A-E, H	<i>sea-e, h</i>	Invasion des défenses de l'hôte avec des superantigènes, responsables des diarrhées associées à	

			la nourriture
Constituant de la paroi cellulaire	Syndrome du choc Toxique toxine-1	<i>tst</i>	Invasion des défenses de l'hôte avec des superantigènes responsables de TSS
	Toxine exfoliative A, B	<i>eta, etb</i>	Invasion des défenses de l'hôte, agents responsables du syndrome de la peau ébouillantée
	Lipase	<i>geh</i>	Invasion des défenses de l'hôte
	Protease V8	<i>Sas P ou ssp</i>	Invasion des tissus et modification des protéines de surface
	Leucocidine de Panton-Valentin	<i>lukF, lukS</i>	Invasion des défenses de l'hôte, lyse des phagocytes de l'hôte
	Staphylokinase	<i>sak</i>	Invasion des défenses de l'hôte
	Hemolysine -a	<i>hla</i>	Invasion des Tissus, à partir des pores dans les membranes des cellules de l'hôte
Toxines et enzymes extracellulaires	β-hemolysine	<i>hlb</i>	Tissu invasion, sphingomyelinase
	δ-hemolysine	<i>hld</i>	Potentialisation de la β-hemolysine
	γ-hemolysine	<i>Hla A, B, C</i>	Potentialisation de la lyse des cellules de l'hôte
	Phospholipase C	<i>plc</i>	Lyse cellulaire
	Elastase	<i>sepA</i>	Invasion des tissus
	Hyaluronidase	<i>hysA</i>	Invasion des tissus

Annexes 2. Action des huiles essentielles et de leurs constituants (Burt, 2004).



Annexe 3. Différentes types de plantes et leur Descriptions botaniques

Nom de plante	Figure	Description botanique
<p>AHA: <i>Artemisa herba-alba</i> Asso. (chih)</p>		<p>Plante herbacée vivace caractérisée par une odeur de thymol, Tiges ligneuses, de 20 à 40 cm, rigides, ramifiées et très feuillées. Feuilles divisées en languettes fines, blanches et laineuses, Fleures groupées en grappes à capitules très petites et ovoïdes de 1,5 à 3mm de diamètre de couleur jaune à rougeâtre (Proksch, 2002 ; Gharabi <i>et al</i>, 2008 ; Bouldjadj, 2009 ; Bezza <i>et al</i>, 2010)</p>

AV: *Ammoides pusilla* (brot.)breistr.
(Nonkha)



A tige rougeâtre de 20 à 80 cm, couverte de poils mous. Ses feuilles odorantes sont vert foncé ovales et pointues au gout, roses ou blanches sont groupées en glomerules quadrangulaires. (Robert, 2015 ; Cabiac, 2010 ; Fournier et Boisvert 2010 ; Festy, 2008)

OG: *Origanum vulgare* (Desf.) letsw
subsp.glandulosum
Zateur Zaâter (Baba
Aïssa, 1991)



La famille des Lamiacées, une plante herbacée ou sous ligneuse à la base. En Algérie, Ce genre regroupe 3 espèces: *Origanum mai orana* (L.), *Origanum glandulosum* (Desf.) et *Origanum floribundum*. L'espèce *Origanum glandulosum* pousse spontanément au niveau des, à fleurs restants contigus après la floraison. La corolle a une lèvre inférieure plus longue que la lèvre supérieure (Vokou *et al.*, 1993).

Annexe 4. Milieux de culture

Gélose Chapman

Peptone.....	11,0 g
Extrait de viande.....	1,0g
Chlorure de sodium.....	75,0 g
Mannitol.....	10,0 g
Agar	15,0g
Rouge de phénol	
pH = 7,6	

Préparation : 111 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20 min.

Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de boeuf.....	300 ml
Peptone de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar.....	10,0 g
pH= 7,4	

Préparation : 37 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 116°C, 15 min.

Annexe 5. Coloration de Gram et Test de catalase

- **Coloration de Gram**

Réalisation d'un frottis bactérien sur une lame bien dégraissée ;

Fixation des bactéries par passage de la lame dans la flamme de bec Bunsen ;

La lame est recouverte par le premier colorant, violet de gentiane pendant 1 min ;

Traitée la lame par le lugol, qui fixe la premier colorant pendant 30 sec ;

Décoloration par l'alcool durant 30 sec ;

Rincée la lame rapidement par l'eau, est faire le deuxième colorant, la fuchsine pendant 1min ;

Séchée la lame a l'aire libre, puis observée aux microscopiques optiques à l'objectif × 100, avec l'huile à immersion.

- **Test de la catalase**

Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée ;

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter 2-3 colonies identiques ;

Observer immédiatement ;

L'apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase (+) ;

Pas de bulles : catalase (-).

Annexe 6. Tableau de lecture de la galerie Api Staph (Lynda et Soraya, 2016)

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif	Jaune	
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate		
MNE	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites		
			Incolore /rose	Rouge
PAL	β -naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYMA A+ZYMA B	
			10 min	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1+VP 2 10 min	
			Incolore /rose	Violet /rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Sacharose			

MIDG	α -méthyl-D-glucosamine			
NAG	N-acétyl-glycosamin			
ADH	Arginine	Argénine dihydrolase	Jaune	Orange rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge violet

الملخص

المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) هي أحد مسببات الأمراض في المستشفيات الكبرى ، فهي مسؤولة عن ارتفاع معدل الأمراض والوفيات الشديدة في جميع أنحاء العالم. تعرضت 20 سلالة من سلالة MRSA المعزولة من مستشفى حكيم سعدان في بسكرة إلى عمل مضادات الميكروبات لثلاث زيوت أساسية، تم الحصول عليها من النباتات الطبية المحلية (*Artemisia herba-alba*, *Origanum glandulosum*). قمنا بتحديد السلالات بواسطة المعرض الكلاسيكي APIstaph bioMérieux وكذلك عن طريق بعض التحليلات الكيميائية الحيوية. بينما تم تأكيد التمييز بين سلالات SARM وSASM من خلال اختبارات الحساسية المضادة للميكروبات المتوافقة مع EUCAST. وفقا لنتائجنا أظهرت سلالات SARM التي تمت دراستها، حساسية عالية تجاه زيت الأساسي *O. glandulosum* مع مناطق تثبيط واسعة جدا أكبر من 57mm و MICs (الحد الأدنى من تركيز المثبط) أقل من 0.0625. في حين أن الزيوت الأساسية الأخرى أثبتت أنها أقل فعالية.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية الذهبية ، المقاومة ، ميثيسيلين MRSA، الزيوت الأساسية ، النشاط.

Résumés

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) est un agent pathogène nosocomial majeur responsable d'un taux élevé de morbidité grave et de mortalité dans le monde. Vingt souches SARM, isolées de l'hôpital Hakim Saadane de Biskra, ont été soumises à l'action antimicrobienne de trois Huiles essentielles obtenus de plantes médicinales locales (*Origanum glandulosum*, *Artemisia herba-alba*, *Ammoides pusilla*). L'identification des souches a été effectuée par Galerie APIstaph bioMérieux ainsi que par certains analyse de caractères biochimiques. Tandis que la distinction des souches SARM de celles SASM a été confirmée par des antibiogrammes réalisés selon les recommandation de l'EUCAST. D'après nos résultats, les souches SARM étudiées ont montré une grande sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle d'*O. glandulosum* avec des zones d'inhibition très larges supérieure à 57mm et des CMI (concentration minimale inhibitrice) inférieures à 0.0625. Alors que les deux autres huile essentielles sont s'avérées moins efficaces.

Mots clés : *Staphylococcus aureus* ; SARM ; Huiles essentielles ; Aactivité antimicrobienne.

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major nosocomial pathogen responsible for a high rate of severe morbidity and mortality worldwide. Twenty MRSA strains, which isolated from Hakim Saadane Hospital in Biskra, were subjected to the antimicrobial action of three essential oils obtained from local medicinal plants (*Origanum glandulosum*, *Artemisia herba-alba*, *Ammoides pusilla*). The identification of the strains was carried out by Galerie APIstaph bioMérieux as well as by some analysis of biochemical characters. While the distinction between MRSA and MRSA strains has been confirmed by antimicrobial susceptibility tests depending on EUCAST recommendations. According to our results, the studied MRSA strains showed a high sensitivity towards the *O. glandulosum* essential oil with very wide inhibition zones greater than 57mm and MICs (minimal inhibitory concentration) less than 0.0625%. While the other two essential oils have proven less effective.

Key words: *Staphylococcus aureus*; MRSA; Essential oils; Antimicrobial activity.