

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



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



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

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

MEMOIRE

Présenté par

BEKHCHI Chaimaa

SELADJI Samia

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Option : Microbiologie Fondamentale

Thème

**Activité antibactérienne et anti biofilms d'huile essentielle
contre *Staphylococcus aureus* souche associés à des infections
hospitalières**

Soutenu le 04 /07 /2021, devant le jury composé de :

Promoteur
Présidente
Examinatrice

HASSAINE Hafida
BELLIFA Samia
MKEDDER Ilham

Professeur
Maître de conférences B
Maître de conférences B

Université Tlemcen
Université Tlemcen
Université Tlemcen

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Avant toute chose, nos remerciements vont à Dieu le tout puissant qui nous a éclairé les chemins du savoir et nous a maintenu en santé pour mener à bien cette année d'étude.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Madame **Hassaine Hafida** Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel et consciencieux, pour sa patience, sa rigueur scientifique, ses multiples conseils, et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Vous êtes un exemple à suivre.

Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par :

Madame **Bellifa Samia** pour l'honneur qu'elle nous fait a présidé le jury de ce mémoire, merci pour votre aide précieuse, la confiance qu'elle nous a accordée, sa gentillesse et sa bienveillance.

Veillez trouver ici nos sincères remerciements

Madame **Mkadder Ilham** c'est un grand plaisir pour nous de vous avoir accepté d'examiner ce modeste travail, merci pour votre présence et vos encouragements.

Qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs de l'université d'Abou Bekr Belkaid- Tlemcen pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nous témoignons notre reconnaissance envers tous nos enseignants qui nous ont guidé jusque-là, c'est en une grosse partie grâce à eux que nous sommes arrivée à ce jour, nous vous remercions du plus profond de nos cœurs.

Dédicace

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail. Je tiens c'est avec immense plaisir que je dédie à:

A l'être la plus chère a ma vie ma mère

Quoi que je fasse ou que je die, je ne saurai point te remercie comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés à toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

Ton amour et ta gentillesse ont conquis nos cœurs, tu es mon modèle à suivre

A mon très cher père

*Qui a semé en moi le respect et l'amour de la science
Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité
Tu es le meilleur Papa qui a toujours fait de ton mieux avec nous.*

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation. Vous êtes les plus chers à mon cœur

A ma grand-mère la plus belle et la plus douce Habiba

Ceci est à profonde gratitude pour votre éternel amour. Que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

Que Dieu le tout puissant la protège et lui donne une longue et joyeuse vie.

A mes sœurs adorées Merieme, Kḥadidja et Amina et a mon beau-frère Mohammed

Un signe d'amour et de reconnaissance pour ses soutiens morale, leurs conseils précieux tout au long de mes études et les sacrifices dont vous avez fait preuve à mon égard.

Que Dieu les protège et leurs offres la chance, la réussite et le bonheur.

A ma nièce Rayhene et mon neveu Rassim

Lorsque vous êtes entrés dans nos vies, vous avez rendus tout lumineux et beau. Vous avez rempli mon cœur d'un immense amour et d'une joie que je ne peux pas comprendre,

Je vous aime mes amours

Un neveu ou une nièce sont les plus beaux cadeaux que puissent vous faire votre frère et votre sœur.

A tous mes amies Ilhem, Amel, Nafissa, Rachida, Zineb, Merci à tous pour vos encouragements et votre soutien

Son oublier ma binôme Samia, pour son soutien moral, sa sympathie, sa compréhension tout au long de ce projet dont laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec elle.

Nous avons formé une belle équipe SYMO. Je te souhaite plein d'autres réussites et beaucoup de bonheur

« En vérité, le chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout. » Albert Camus

Chaimaa

Dédicace

Avec l'aide d'Allah le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience
J'ai pu accomplir cet humble travail que je dédie à :

A mon cher papa, Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta disponibilité, tes sacrifices illimités, ton soutien moral et financier ne m'ont pas manqué durant ces longues années d'étude. Tout ça est grâce à toi et à tout ce que tu as déployé pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère maman, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence je te remercie pour ton soutien permanent, ta compréhension, tes sacrifices tes prières et pour toute la confiance que tu m'as accordé afin de me motiver dans mes études et me voir satisfaite et heureuse. Je n'aurai jamais réussi sans toi.

Sources de mes joies, secrets de ma force, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Je vous aime.

A mes sœurs et mon frère, qui n'ont omis aucun refus à me porter aide et assistance. Je vous remercie pour tout votre appui et votre encouragement ce travail n'aurait pas pu être sans votre aide, en témoignage de mon affection fraternelle merci d'être toujours là pour moi.

Sans oublier mes nièces et mon neveu **Sonia, Ines & Racim**, les prunelles de mes yeux et ma source de bonheur, ils ont toujours sur me distraire et me redonne le sourire dans mes pires journées. Je vous aime plus que tout.

Mes beaux-frères aussi : **Mahfoud, Moustafa & Farid** des personnes qui me sont chers à mon cœur, j'ai de la chance de vous avoir.

A mon binôme : qui a partagé les efforts et s'est investi autant que moi pour donner le meilleur de nous-même, je tiens surtout à la remercier pour sa patience, sa compréhension et sa tolérance lors de nos moments de fatigues, ton soutien moral m'a été d'une grande importance, je suis fière de nous et de tout ce qu'on a accompli cela n'a pas été facile mais on est arrivée. Merci **Chaymo** je te souhaite beaucoup de succès.

Une pensée particulière, et un remerciement spécial à mes copines : **Amel, Ilham, Yasmine et Samia**, qui m'ont toujours aidé sans jamais se plaindre.

Finalement, j'adresse mes chaleureux remerciements à tout les membres de ma famille, mes amies, et à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Samia

Table des matières

Introduction	10
Partie I. Synthèse bibliographique.....	3
Chapitre I: Place du <i>Staphylococcus aureus</i> dans les infections associées aux soins	3
1. Les infections associées aux soins définition	3
1.1. Gravité des infections associées aux soins	3
1.2. Germes impliqués.....	4
2. Les infections associées aux soins à <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline	4
3. Généralité sur <i>Staphylococcus aureus</i>	5
3.1. Taxonomie.....	5
3.2. Description	6
3.3. Caractères morphologiques	7
3.4. Caractères Biochimiques.....	7
3.5. Caractères Physiologiques.....	7
4. Pouvoir Pathogène.....	7
4.1. Biofilm.....	8
4.1.1. L'adhérence réversible	9
4.1.2. L'adhérence irréversible.....	9
4.1.3. Le développement précoce du biofilm	10
4.1.4. La maturation du biofilm.....	10
4.1.5. Le détachement de bactéries.....	10
4.2. Quorum Sensing.....	10
5. Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques	11
5.1. La résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à la méticilline	12
5.2. La Résistance des biofilms aux antibiotiques.....	12
Chapitre II: Alternative dans le traitement des infections à <i>Staphylococcus</i> multirésistants : Les Huiles essentielles	13
1. La Composition chimique	13
2. L'activité biologique des huiles essentielles	14
3. Les plantes d'études	14
3.1. <i>Thymus sp</i> (زعتر)	14
3.2. <i>Laurus nobilis</i> (رند).....	15
3.3. <i>Tetraclinis articulata</i> (عرعار)	16
3.4. <i>Eucalyptus globulus</i> (كاليبتوس).....	17

Partie II. Matériel et Méthodes	19
1. Prélèvement et origine des souches	19
1.1. Prélèvement et origine des souches de staphylocoques.....	19
1.2. Souches de références	20
2. L'isolement et purification	20
3. Identification	20
3.1. Coloration de Gram	20
3.2. Production de catalase	20
3.3. Oxydase.....	20
3.4. Test de Coagulase.....	21
3.5. Galerie API 20 STAPH (BioMérieux®)	21
3.6. Identification par VITEK 2 :	21
4. Etude de sensibilité aux antibiotiques	22
5. Détection du Biofilm	23
5.1. Etude de la formation du biofilm par la méthode <i>in vitro</i> de coloration au cristal violet sur microplaques	23
5.2. Méthode du rouge Congo agar (RCA) :	24
5.3. Méthode en tube	25
6. Les huiles essentielles utilisées	26
6.1. Origine et prélèvements des plantes	26
6.2. Extractions des huiles essentielles.....	27
7. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles étudiées	28
7.1. Méthode de diffusion en disque sur plaque d'agar « Aromatogramme »	28
7.2. Méthode de diffusion en puits	29
7.3. Evaluation des Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles utilisées.....	29
8. Evaluation de l'activité antibiofilm	30
8.1. Inhibition du biofilm	30
8.2. Eradication du biofilm.....	31

Partie III. Résultats et Discussion	32
1. Résultats des prélèvements des souches staphylococciques.....	32
2. Résultats d'identification des souches.....	32
2.1. Aspect des colonies sur milieu Chapman	33
2.2. Les résultats des examens microscopiques réalisés après coloration de Gram	33
2.3. Résultat d'identification par galerie Api 20 Staph	34
3. Résultats d'antibiorésistance des souches	35
4. Capacité de la formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> isolé.....	36
4.1. Evaluation de la formation du biofilm par la méthode de TCP.....	36
4.2. Evaluation de la formation du biofilm par la méthode RCA.....	37
4.3. Evaluation de la formation du Biofilm par la méthode en tube TM.....	38
5. L'Activité antibactérienne des huiles essentielles sur des souches planctonique.....	39
6. L'Activité antibiofilm des huiles essentielles.....	45
7. L'Activité d'éradication du biofilm des huiles essentielles	48
Conclusion.....	50
Références.....	50
Annexes.....	57

Liste des abréviations

IAS	Infection associée aux soins
HE	Huile essentielle
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMIB	Concentration minimale inhibitrice biofilm
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SCCmec	Staphylococcal cassette chromosome mec
GC	Guanine, cytosine
PAI	Peptide auto inducteur
OMS	Organisation mondiale de la santé
QS	Quorum sensing
AFNOR	Association française de normalisation
QSI	Quorum sensing inhibition
ATCC	L'American Type Culture Collection
PBS	Buffered saline Phosphate
BHI	Bouillon cœur-cervelle
MHA	Mueller Hinton Agar
TSB	Bouillon Trypticase soja
RCA	Rouge Congo agar
CV	Cristal violet
TM	Méthode en Tube
TCP	Tissue Culture Plate
PEN	Pénicilline
AMP	Ampicilline
VAN	Vancomycine
CEF	Cefuroxime
CLOX	Cloxacilline
CEP	Céphalothin
MET	Méthicilline
NOV	Novobiocine

Liste des figures

Figure 1 :	Observation au microscope électronique de <i>S. aureus</i>	6
Figure 2 :	Les étapes de la formation de biofilm.....	9
Figure 3 :	Facteurs de virulence chez <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Figure 4 :	Photographie des feuilles de <i>Tymus sp.</i>	15
Figure 5 :	Photographie des feuilles de <i>Laurus nobilis.</i>	16
Figure 6 :	Photographie des feuilles avec des cônes de <i>Tetraclinis articulata</i>	17
Figure 7 :	Photographie des feuilles d' <i>Eucalyptus globulus</i>	17
Figure 8 :	Photo montrant une plaque API Staph.....	21
Figure 9 :	VITEK 2. (1) Automate utilisé (2) Poste relié au VITEK 2 (Eddayab, 2012), (3) une carte du système Vitek.....	22
Figure 10:	Les étapes de formation de biofilm par la microplaque 96 puits.....	24
Figure 11:	Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu RC (Rouge Congo).....	25
Figure 12:	Evaluation de la production du biofilm par la méthode TM.....	26
Figure 13:	Montage de type Clevenger modifié pour l'hydrodistillation des HEs.....	28
Figure 14:	Répartition des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> retenus dans les cinq articles	32
Figure 15:	Aspect de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman.....	33
Figure 16:	Aspect de <i>Staphylococcus aureus</i> suite à une coloration de Gram.....	34
Figure 17:	Résultats de l'identification par Galerie API 20 Staph	34
Figure 18:	Etat de résistance de la souche de <i>S. aureus</i> N° 7 selon la méthode de diffusion vis-à-vis les cinq antibiotiques.	36
Figure 19:	Résultat de la production du biofilm par la méthode TCP.....	36
Figure 20:	Résultat sur aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu RC (Rouge Congo)	38
Figure 21:	Détection visuelle des souches de <i>S. aureus</i> pour leur capacité de formation de biofilm dans des tubes en polystyrène.....	38
Figure 22:	Détermination de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>Tetraclinis articulata</i> par l'application de la méthode de diffusion sur disques.....	40
Figure 23:	Histogramme représentatif des zones d'inhibitions de chaque huile essentielle	43
Figure 24:	Nombre des isolats de <i>Staphylococcus aureus</i> retenus pour l'activité antibiofilm dans les cinq articles	45
Figure 25:	Inhibition de la formation de biofilms chez <i>S. aureus</i> par <i>Thymus vulgaris</i> sur des disques de cathéter en 48h sous microscope optique	46
Figure 26:	Visualisation microscopique de l'effet de l'huile essentielle d' <i>E. globulus</i> des souches à biofilm positif de <i>S. aureus</i> cultivés sur des lames de verre.....	48

Liste des tableaux

Tableau 1 :	La classification de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Tableau 2 :	Origine et prélèvements cités dans les cinq articles	19
Tableau 3 :	Les résultats du nombre de souches formant un biofilm pour les trois techniques dans les quatre articles étudiés.....	39
Tableau 4 :	Les différentes valeurs de la CMI, CMB et pourcentages d'inhibitions des isolats planctoniques par les HE étudiées	44
Tableau 5 :	Les résultats de la CMIB des HE utilisées dans les cinq articles vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	47
Tableau 6 :	Les résultats d'éradication du biofilm obtenus par les HE dans trois articles.....	49

Introduction

Introduction

Au cours du siècle dernier, de nombreux agents antimicrobiens ont été utilisés pour traiter les infections bactériennes, mais au cours de ce siècle, le taux de découverte de nouveaux antibiotiques a considérablement diminué (**Liu et al., 2008**). En outre, l'utilisation à long terme d'antibiotiques bactéricides et bactériostatique a généré des *Staphylococcus aureus* multirésistants [(**Levy et Marshall, 2004**) ; (**Cegelski et al., 2008**)].

Le *Staphylococcus aureus*, est un important pathogène chez l'homme, qui provoque des infections graves. Cette bactérie est connue comme étant l'un des agents les plus résistants aux antibiotiques classiques. Elle cause également de nombreux problèmes dans les hôpitaux et société (**Panahi et al., 2011**).

Actuellement, l'un des défis mondiaux les plus importants dans le secteur de la santé est l'émergence croissante de bactéries résistantes aux antibiotiques, qui est principalement due à l'utilisation abusive des antibiotiques, notamment dans les régions en développement (**Alharbi et al., 2016**).

La résistance microbienne aux antibiotiques, en particulier parmi les souches de staphylocoques, constitue une menace majeure pour la santé publique. Depuis que la résistance de certaines souches de *Staphylococcus* à plusieurs antibiotiques comme la méthicilline est apparue à la fin des années 1970, de nombreuses stratégies pour contrôler la résistance aux antibiotiques ont été proposées (**Preuss et al., 2005**).

La propagation et l'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antimicrobiens sont des préoccupations majeures dans le traitement des maladies infectieuses, ce qui conduit à la nécessité de trouver de nouveaux agents antibactériens et modificateurs de résistance (**Mouwakeh et al., 2019**).

Les plantes sont considérées comme sources riches avec des propriétés antimicrobiennes très souvent utilisées dans le traitement des maladies infectieuses (**Panahi et al., 2011**). Pendant des milliers d'année les plantes ont été pour l'homme la principale source de remède contre les diverses maladies qu'ils ont affligé tout au long de son histoire à différence des médicaments classique, les plantes agissent en douceur et donnent rarement des effets secondaires. Par conséquent, l'intérêt, pour les produits naturels, connaît depuis quelque année une grande importance. Il se manifeste par une demande croissante de produits naturels bioactifs, dénués de tout effet nocif, par souci de protéger l'environnement (**Touhami, 2017**).

Introduction

Par conséquent, la découverte de nouveaux et efficaces agents antimicrobiens dérivés de nouvelles ressources pour ces bactéries résistantes est d'une importance primordiale (**Panahi et al., 2011**).

De ce fait, notre contribution s'est orientée vers cinq articles ou différentes plantes et huiles essentielles ont été utilisées à la quête de nouveaux agents antimicrobiens vis-à-vis des souches de staphylocoques multirésistantes d'origine hospitalière et de pouvoir comparer et identifier la plante présentant une meilleure activité antimicrobienne et antibiofilm.

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Place du *Staphylococcus aureus* dans les infections associées aux soins

1. Les infections associées aux soins définition

Une infection est dite associée aux soins (IAS) si elle survient au cours ou au décours d'une prise en charge d'un patient, et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de sa prise en charge. Lorsque l'état infectieux au début de la prise en charge n'est pas connu précisément, un délai d'au moins 48 heures ou supérieur à la période d'incubation est couramment accepté pour définir une infection associée aux soins. Dans le cas des infections du site opératoire, on considère comme associées aux soins celles survenant dans les 30 jours suivant l'intervention ou s'il y a mise en place d'un implant, d'une prothèse ou d'un matériel prothétique dans l'année qui suit l'intervention (**Ctinils, 2007**).

Les facteurs contribuant à la survenue d'infections associées aux soins sont très nombreux et inter-reliés les uns aux autres. Ils peuvent être regroupés en trois grandes rubriques : les facteurs liés aux malades, les expositions aux risques infectieux liées aux actes diagnostiques et thérapeutiques et les insuffisances dans l'organisation des soins (**Vincent-Boulétreau, 2004**).

La présence de certaines caractéristiques chez les malades augmente leur risque d'acquérir une infection associée aux soins. On peut citer les pathologies chroniques (diabète, immunodépression), un état nutritionnel perturbé (dénutrition, obésité), l'âge (avant un an et après 65 ans) en plus la nature et la qualité des soins influent sur le risque d'acquérir une infection associée aux soins. On peut évoquer les interventions chirurgicales, les actes et les dispositifs invasifs (endoscopie, dialyse, sondage, intubation/ventilation, drainage, perfusion, alimentation parentérale, ponctions, ...), les traitements diminuant la résistance à l'infection (corticothérapie prolongée, radiothérapie, chimiothérapie). Par ailleurs, chaque insuffisance dans l'organisation des soins s'accompagne de portes d'entrée potentielles qui sont autant d'occasions mises à profit par les germes. Cinq types d'erreurs peuvent être particulièrement lourds de conséquences : hygiène des mains défectueuse, stérilisation inefficace, désinfection insuffisante, asepsie insuffisante, antibiothérapie mal conduite (**Vincent-Boulétreau, 2004**).

1.1. Gravité des infections associées aux soins

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la mortalité imputable aux IAS. Aux USA, les IAS sont responsables de 80.000 morts par an, faisant d'elles l'une des dix premières causes de décès (**Astagneau et Brucker, 1999**).

A partir des données de surveillance Nord-Américaines (NNISS), la mortalité par infection associée aux soins dans les hôpitaux de plus de 500 lits est estimée à 3,3% des malades qui en sont atteints, la proportion des décès directement attribuables aux IAS était de 0,5% (NSIH, 1995).

En France, on estime que sur les 600.000 à 1100.000 malades qui vont contracter une infection associée aux soins chaque année, environ 10.000 à 20.000 vont mourir avec une infection associée aux soins qui sera directement ou indirectement la cause du décès soit un airbus qui s'écraserait chaque semaine !) (Mallarat et al., 1996).

En Algérie, rares sont les études qui se sont intéressées à la mortalité associée aux IAS. Une seule étude menée au CHU de Tlemcen rapporte un taux de prévalence de patients infectés de 16,85% (Hassaine, 2008).

1.2. Germes impliqués

Les microorganismes responsables d'infections associées aux soins appartiennent à la flore hospitalière qui est celle des malades, des soignants et de l'environnement hospitalier. Les bactéries sont responsables d'environ 70% de ces infections ; les espèces les plus souvent en cause, sont par ordre décroissant de fréquence :

- *Escherichia coli*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- Staphylocoques coagulase négative.
- Entérobactéries du genre *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*.

La fréquence de ces différentes bactéries est variable d'un hôpital à un autre et d'un service à un autre, en fonction de l'écologie bactérienne locale (Chakroun, 2009).

2. Les infections associées aux soins à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

Les infections causées par le SARM sont considérées comme une menace majeure pour la santé publique dans plusieurs pays et elle reste la principale cause des infections nosocomiales et communautaires, Cette bactérie est responsable de nombreuses infections liées à une morbidité et une mortalité remarquable, comme les bactériémies, les pneumonies, les infections de la peau, des tissus mous, du site chirurgical et des voies urinaires. Le nombre d'infections à SARM, qui sont plus fréquemment associées à la mortalité que les autres infections bactériennes ont augmenté ces dernières

années, soit un taux 20-40% de mortalité à 30 jours malgré un traitement approprié (**Ben Abdallah et al., 2020**).

Un développement évolutif récent, depuis le milieu des années 1990, il y a eu une explosion du nombre d'infection à SARM signalées dans les populations générales, Cette augmentation a été associée à la reconnaissance de nouvelles souches, qui ont été appelées MRSA (mécicillin-résistant *S.aureus*) (**Kong et al., 2016**).

3. Généralité sur *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus fut découvert dans les années 1870 lors de l'étude microscopique d'échantillons de pus. Ces bactéries de forme sphérique furent initialement nommées « micrococci », du grec kokkos pour grain. En 1880, Alexander Ogston, chirurgien écossais disciple de Lister, fut le premier à identifier formellement les micrococci comme la cause des abcès suppurés. La poursuite de ses travaux aboutit, en 1882, à la description des staphylocoques (du grec « staphyle » pour grappe de raisin), par opposition aux streptocoques (coques en chaîne) précédemment décrits par Billroth en 1874. En 1884, Anton J. Rosenbach, chirurgien allemand, isola deux souches différentes de staphylocoques qu'il baptisa en fonction de la couleur des colonies obtenues : *S. aureus* (dorées) et *S. albus* (blanches) (**Accarias, 2014**).

3.1. Taxonomie

Selon la 9^{ème} édition de la référence de la Taxonomie du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, l'espèce *Staphylococcus aureus* est classée parmi les Bactéries à Gram positive pauvre en GC est comprise entre 30 et 39% dans le domaine bacteria (**Touaitia, 2016**) (**Tableau 1**).

Tableau 1: La classification de *Staphylococcus aureus* (Prescott, 2010)

Classification	Nom
Règne	Bacteria
Classe	Bacilli
Famille	Staphylococcaceae
Division	Firmicutes
Ordre	Bacillales
Genre	<i>Staphylococcus</i>

3.2. Description

Staphylococcus aureus est une espèce ubiquitaire du genre *Staphylococcus* est plus communément appelée staphylocoque doré ; du grec Staphylo, grappe de raisin, apparait en amas à l'examen microscopique), et « *aureus* » doré vient de la coloration particulière des colonies qui sont dorées lorsqu'elles croissent sur milieu solide [(Howard et Kloos, 1987) ;(Zimmermann-Meisse, 2016)] (Figure1).



Figure 1: Observation au microscope électronique de *S. aureus* (X5000000)
(Zimmermann-Meisse, 2016).

3.3. Caractères morphologiques

Les staphylocoques se présentent sous forme de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chainettes de trois à cinq éléments positivement colorés au Gram (violet), mesurant de 0,5 à 1,5 μ de diamètre [(Fasquelle, 1974), (Couture, 1990)].

Le staphylocoque doré est asporulé, immobile et ne possédant pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'un pseudo capsule (Le Minor et Veron, 1990).

3.4. Caractères Biochimiques

Staphylococcus aureus a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Ces bactéries possèdent une activité catalase, coagulas, phosphatase, ainsi que des nucléases thermostables mais pas d'oxydase. Elles sont hémolytiques, ont la capacité de liquéfier la gélatine et de fermenter de nombreux sucres comme le glucose, le saccharose, le lactose et le mannitol. Le diagnostic permettant de distinguer *S. aureus* des autres espèces est basé sur des tests réalisés sur colonies tels que l'identification du facteur agglomérant, de la coagulase, des hémolysines et de la désoxyribonucléase thermostable ou thermo nucléase (Accarias, 2014).

3.5. Caractères Physiologiques

S. aureus peut croître facilement sur les milieux usuels (Gélose nutritive, bouillon nutritif...), se cultive également sur gélose au sang et le milieu sélectif Chapman. C'est une bactérie mésophile (37 °C de croissance optimale), neutrophile (pH 7 optimal) et halophile (tolérant vis-à-vis de hautes concentrations en sel, par exemple en bouillon hypersalé à 7% de NaCl et certaines souches peuvent croître jusqu'à une concentration de 20% de Na Cl). Elle est aussi relativement résistante aux inhibiteurs bactériens comme le cristal violet et le tellurite de potassium (Touaitia, 2016). Certaines espèces du genre *Staphylococcus* sont capables de vivre dans des environnements hostiles (Pellerin et al., 2010).

4. Pouvoir Pathogène

Le pouvoir pathogène désigne l'ensemble des particularités d'un microorganisme permettant sa colonisation, sa multiplication et sa provocation d'une maladie dans un organisme Hôte. La bactérie *S. aureus* est solidement armée pour effacer un certain nombre de défenses que son hôte pourrait lui opposer (anticorps, phagocytose ou cytotoxicité), ces parades se distribuent en plusieurs groupes de

toxines. La pathogénicité de *S. aureus* est surtout reliée à l'expression de facteurs de virulence. En plus de facteurs structuraux, il a en effet la capacité de sécréter, après invasion, des toxines, des enzymes ou encore des facteurs d'adhésion (Rebiahi, 2012) (Figure 2).

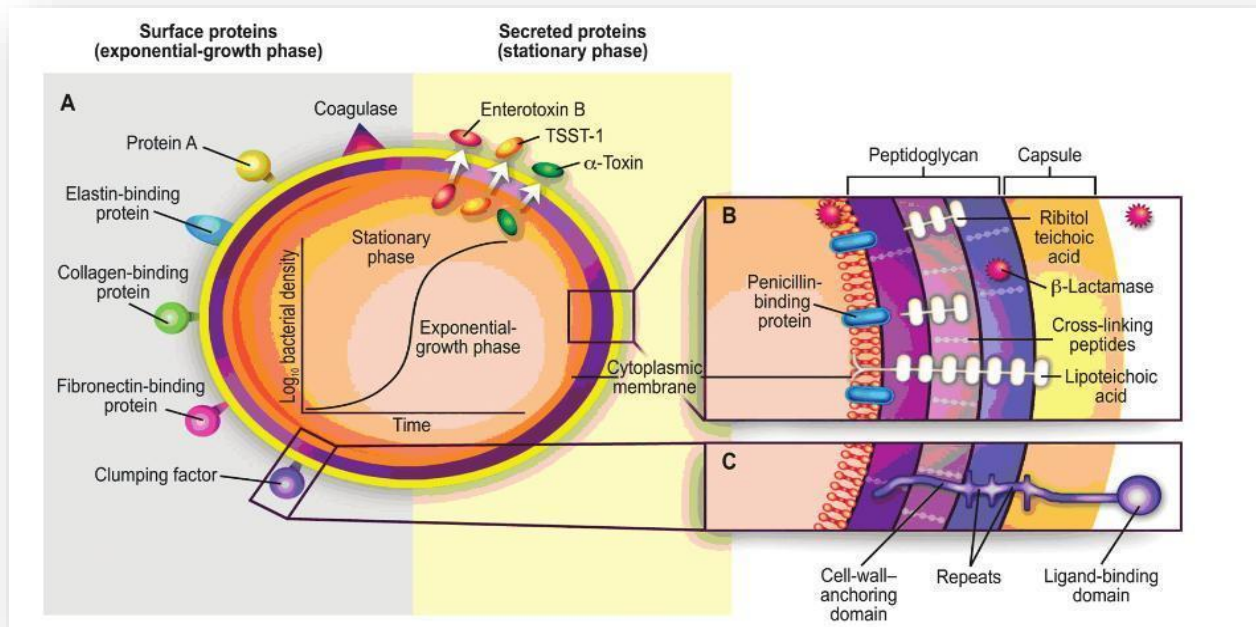


Figure 2: Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* (Al alam, 2008).

4.1. Biofilm

Nous définirons comme une association dense (Communautés microbiennes) structurée de cellules enrobées dans une matrice extracellulaire hydratée. Cette dernière est majoritairement constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et d'ions divalents. A l'échelle micrométrique, la distribution des composants de la matrice extracellulaire et des cellules du biofilm est hétérogène qui adhèrent à des surfaces biotiques ou abiotiques attachés de manière irréversible à une surface (Yong et al., 2019).

La formation d'un biofilm représente un changement radical de mode de vie des microorganismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile. Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement, ils peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques (Chibi, 2015).

On distingue généralement cinq étapes de formation de biofilm (**Figure 3**) :

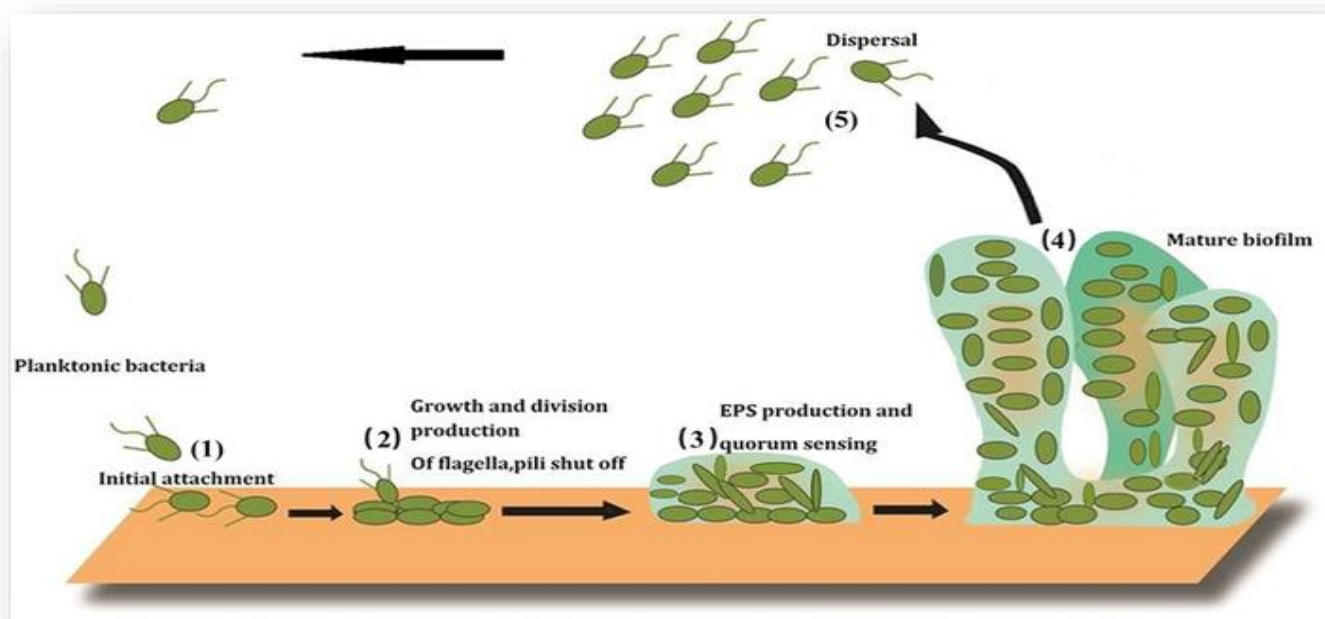


Figure 3 : Les étapes de la formation de biofilm (Sadekuzzaman et al., 2015).

4.1.1. L'adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide (**Høiby et al., 2011**) par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique de fluide.

L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (**Beloin et al., 2008**).

4.1.2. L'adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries (**Høiby, 2011**) et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (**Beloin et al., 2008**).

4.1.3. Le développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique (Jacolosen et al., 2008).

4.1.4. La maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (Folkesson et al. , 2008), permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (Tenke et al.,2006). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (Jacolosen et al., 2008).

4.1.5. Le détachement de bactéries

Pour que la densité bactérienne sur une surface peut atteindre 10^7 Un biofilm est approximativement constitué de 85% de matrice extracellulaire et de 15% de microorganismes (Bahlau et Gilmore, 2008).La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97%) et incluse également des polymères d'exopolysaccharides, de protéines, des phospholipides, des nutriments et des métabolites. Cette matrice à un rôle protecteur et un rôle structurel (Beloin et al., 2008).

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une révolution du profil d'expression de leurs gènes. Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé quorum sensing (Behlau et Gilmore, 2008).

4.2. Quorum Sensing

C'est un mécanisme de régulation des gènes à deux composés, basé sur la densité cellulaire et l'environnement extracellulaire. En résumé, il s'agit d'un système de communication entre les bactéries. Son principe repose sur la sécrétion d'un peptide auto-inducteur (PAI) dans le milieu externe qui, en s'accumulant pour atteindre une concentration seuil, ce qui va permettre l'expression de certains gènes de manière simultanée chez toute la population de bactéries (Zimmermann-Meisse, 2016).

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm. Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm et il peut réprimer ou stimuler

l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (**Irie et Parsek, 2008**).

Le biofilm est considéré comme un enjeu primordial de par sa structure organisée construite par presque toutes les bactéries qui est composée d'acides nucléiques, de lipides, de protéines et de polysaccharides. Dans le biofilm, le SARM, comme d'autres bactéries, devient plus persistant dans l'organisme hôte, ce qui constitue un problème médical important (**Ben Abdallah et al., 2020**).

Staphylococcus aureus occupe une place privilégiée. Son pouvoir pathogène, son caractère ubiquiste et l'absence d'exigences nutritionnelles font de cette bactérie un exemple d'adaptation et de dissémination surtout lors des ruptures de la barrière cutanée, ou l'immaturation du système immunitaire (**Accarias, 2014**).

5. Résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques

Au cours du siècle dernier, de nombreux agents antimicrobiens ont été utilisés pour traiter les infections bactériennes, mais au cours de ce siècle, le rythme de découverte de nouveaux antibiotiques a considérablement diminué (**Lee et al., 2014**).

L'augmentation des bactéries résistantes aux antibiotiques est un danger pour la population mondiale avec la récurrence des maladies infectieuses (**Jafri et al., 2014**). Et complique le traitement des infections par antibiotiques (**Achmit et al., 2021**).

L'OMS définit une souche résistante aux antibiotiques comme « une souche qui supporte une concentration d'antibiotiques notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce » (**Robert, 2013**).

Les premiers phénomènes de résistance sont apparus deux ans après l'introduction de l'utilisation médicale de la pénicilline. Il existe trois grands types de résistance bactérienne que sont :

La production de B-lactamases constitue un des mécanismes de résistances des bactéries contre les antibiotiques, l'altération des PLP qui conduit à leur non-reconnaissance par l'antibiotique et à la survie de la bactérie, et la perméabilité de la membrane (**Rice, 2016**).

A l'échelle microbiologique, l'émergence de la résistance repose sur la modification du génome de la bactérie. Si certaines bactéries sont naturellement résistantes à certains antibiotiques, elles peuvent également acquérir de la résistance aux antibiotiques par divers mécanismes, on parle alors de résistance acquise (**Couderc, 2015**).

5.1. La résistance de *Staphylococcus aureus* à la méticilline

En 1959, la méticilline a été découverte, c'est une bêtalactamine mais dont le noyau est résistant à l'action des pénicillinases. Peu après l'introduction de ce nouvel antibiotique ont apparu des souches de *S. aureus* résistants à la méticilline (Méticilline-résistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) (Touaitia, 2016).

Une souche dite « résistante a la méticilline » lorsqu'elle présente une résistance aux pénicillines du groupe M, et par extension tous les B-lactames, elle se définit par une concentration minimale inhibitrice CMI>2 mg /l pour l'oxacilline, la pénicilline M de référence, la résistance de *Staphylococcus aureus* a la méticilline (SARM) est l'un des pathogènes les plus fréquemment responsable d'infection associées aux soins en particulier en dermatologie (Peacock et Patreson, 2015).

5.2. La Résistance des biofilms aux antibiotiques

La notion de « résistance » des biofilms aux antibiotiques mérite d'être clarifiée. En effet, une souche bactérienne est définie comme étant résistante si sa croissance n'est pas inhibée à une concentration critique (CMI) d'antibiotique généralement observée pour la majorité des souches de l'espèce considérée (Oubekka, 2012).

Les cellules d'un biofilm sont quant à elles décrites comme résistantes par comparaison avec leurs homologues planctoniques. Les bactéries sous forme sessiles sont plus résistantes à la réponse immune de l'hôte que leurs congénères planctoniques : l'efficacité de la phagocytose est donc diminuée en présence de biofilms. De plus, les bactéries associées aux biofilms sont 10 à 1000 fois plus résistantes à l'action des agents antimicrobiens que celles sous forme planctonique (Allison et al., 2000). Cette résistance multifactorielle accrue, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.) qui modifient les propriétés physiologiques des microorganismes (Roux et Ghigo, 2006).

Ainsi, les propriétés pharmacodynamiques des agents antimicrobiens sont altérées en présence de biofilms, ils sont donc peu efficaces ce qui rend l'infection difficile à traiter (Utili, 2007).

La tolérance des biofilms aux antibiotiques pourrait également être expliquée par la notion de cellules persistantes qui sont des sous-populations très minoritaires de bactéries hyper-résistantes ayant survécu à l'action d'un antibiotique [(Keren et al., 2004) ; (Lewis, 2008) ; (Singh et al., 2009)].

Il est nécessaire de développer un nouveau mode d'action ou une nouvelle stratégie pour combattre les infections associées au biofilm causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques (Jafri et al., 2014).

Chapitre II: Alternative dans le traitement des infections à *Staphylococcus* multirésistants : Les Huiles essentielles

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16^{ième} siècle par le médecin Suisse Parascelsus Von HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel **(Burt, 2004)**.

Les huiles sont connues depuis des millénaires pour leur action bénéfique sur l'homme. Quatre mille ans avant J.C, les égyptiens utilisaient déjà les huiles comme parfum dans les momifications des corps. Il faudra attendre le XVI^{ième} siècle pour voir apparaître la généralisation de la production et de l'utilisation des huiles essentielles, grâce aux travaux sur les huiles essentielles de romarin, de bois de genièvre, de lavande **(Chouitah, 2012)**.

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne (01-2008 : 2098) : une huile essentielle (HE) est un produit odorant, généralement de composition complexe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante et au fait qu'elles soient inflammables. **(Hessas et Simoud, 2018)**.

Selon AFNOR NF T 75-006 (février 1998) : huile essentielle : « Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition [par exemple, redistillation, aération, ...] **(Lakhdar, 2015)**.

1. La Composition chimique

Les huiles essentielles sont des ensembles de composés aromatiques volatiles, ils sont donc un mélange complexe et variable de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpènes volatils et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. On retrouve plus d'un millier de composants chimiques dans les huiles essentielles.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG-SM) a révélé des variations entre les huiles en termes de nombre de composants en plus de leurs pourcentages **(Ben Abdallah et al., 2020)**.

2. L'activité biologique des huiles essentielles

L'activité biologique et antimicrobienne des HE peut varier, en fonction des variations de la composition chimique. Les HE reconnues par leurs propriétés thérapeutiques, sont utilisées du fait de leurs propriétés bactéricides, virucides, fongicides, antiparasitaires, insecticides, cosmétiques, agricoles, alimentaires et médicinales, en particulier dans les industries pharmaceutiques, sanitaires (**Bakkali et al., 2008**).

Elles sont utilisées pour combattre une variété d'infections pendant des centaines d'années comme médicament naturel. Il a été démontré que les HE possèdent plusieurs activités antimicrobiennes importantes telles que des activités antibactériennes, antivirales, antifongiques et antiparasitaires en plus de leurs propriétés antioxydantes, antiseptiques, insecticides et antiadhésives (**Ben Abdallah et al., 2020**).

Certaines HE inhibent l'adhésion des cellules bactériennes aux surfaces vivantes ou non vivantes au stade initial de la formation du biofilm, tandis que d'autres ont une activité d'inhibition du quorum (QSI) (**Sharifi et al., 2018**).

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (**Maruyama et al., 2005**). Elles se sont révélées être de puissantes activités antibactériennes et anti biofilms contre les isolats de SARM et pourraient être une bonne alternative pour la substitution d'antibiotiques (**Ben Abdallah et al., 2020**).

3. Les plantes d'études

Au delà de ces cinq articles, le choix des différentes plantes a été pour : *Thymus sp*, *Laurus nobilis*, *Tetraclinis articulata* et *Eucalyptus globulus*.

3.1. *Thymus sp* (زعتر)

Sont des sous arbrisseaux ligneux, pouvant atteindre 40cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncé, et qui sont recouvertes de poils tecteurs et sécréteurs (appelés trichomes) (**Figure 4**). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes (**Hessas et Simoud, 2018**).

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des lamiaceae, il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord-ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye) (**Hessas et Simoud, 2018**).

Le thym est utilisé sous forme de bains aromatiques ainsi qu'en traitement complémentaire en cas d'infections aiguës ou chroniques des voies respiratoires ou de prurit lié à une dermatose, pour traiter les douleurs rhumatismales et les névralgies (Hessas et simoud, 2018).



Figure 2: Photographie des fleurs de *Thymus sp* (Abdelli, 2017).

3.2. *Laurus nobilis* (رند)

Le laurier (*Laurus nobilis*) est un arbre à feuilles persistantes (**Figure 5**) pouvant atteindre 20m de hauteur, originaire de la région méditerranéenne. Il est le seul représentant européen de la famille des Lauraceae (Careda et al., 2002).

C'est une plante aromatique avec des propriétés médicinales pertinentes en raison de sa richesse en composantes chimiques importantes et ses effets thérapeutiques potentiels. *Laurus nobilis* est une plante indigène du sud de la méditerranée, que l'on trouve dans les régions à climat chaud et à forte pluviométrie (Merghni et al, 2016).

Les feuilles de *L. nobilis* sont traditionnellement utilisées pour traiter les symptômes des problèmes gastro-intestinaux et plus récemment, comme composant de parfum dans l'industrie cosmétique et alimentaire (Merghni et al, 2016).



Figure 3: Photographie des feuilles de *Laurus nobilis* (Bendjersi, 2017).

3.3. *Tetraclinis articulata* (عرعار)

Tetraclinis articulata également appelée thuya est un genre d'arbre conifère à feuilles persistantes (**Figure 6**) de la famille des Cupressaceae, indigène au nord-ouest de l'Afrique, au Maroc, en Algérie et Tunisie (**Chikhoune, 2013**).

T. articulata sont utilisées en médecine populaire pour leurs multiples propriétés thérapeutiques, principalement contre les infections respiratoires et intestinales, les fièvres infantiles, les douleurs d'estomac, l'hypertension et le diabète (**Zahir, 2020**).

T. articulata ayant un large spectre de propriétés biologiques telles que des activités antibactériennes, antifongiques, insecticides, cytotoxiques, anti-inflammatoires et antioxydantes, *T. articulata* en tant que antibactériens et antibiofilms contre le *Staphylococcus aureus* résistant aux médicaments et formant un biofilm, isolés à partir de cathéters infectés (**Achmit et al., 2021**).



Figure 4: Photographie des feuilles avec des cônes de *Tetraclinis articulata* (Kouider et al., 2017).

3.4. *Eucalyptus globulus* (كاليبتوس)

Le genre *Eucalyptus* est endémique en Australie et en Tasmanie. Il est cultivé de nos jours dans quelques régions subtropicales d'Afrique (**Figure 7**), d'Asie (Chine, Inde, Indonésie) et d'Amérique du Sud ainsi qu'en Europe méridionale et aux États-Unis. L'espèce *Eucalyptus globulus* appartenant à la famille des Myrtacées). De la région d'El Kala, elle est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde (**Bouras, 2018**).

Grâce à son principe-actif qui est le 1.8 cinéole, l'HE d'Eucalyptus possède des vertus considérables, elle est très recherchée pour son action antiseptique et cicatrisante. Elle agit comme un antibiotique naturel pour soigner certaines maladies respiratoires comme la grippe, la toux, la sinusite, la bronchite et la rhino-pharyngite tandis qu'en dermatologie, elle sert pour traiter l'acné, entre autres. Son action est particulièrement remarquable au niveau du poumon par sécrétion d'un mucus antiseptique. Pour ceux qui ont des problèmes de fièvre persistante. En outre, de nombreuses maladies gastro-intestinales peuvent également être soulagées par l'huile essentielle d'Eucalyptus grâce à ses propriétés anti-infectieuses, antibactériennes et anticancéreux aussi (**Bouras, 2018**).



Figure 7: Photographie des feuilles d'*Eucalyptus globulus* (Ghellai, 2016).

Matériel et Méthodes

Suite aux situations difficiles de cette année 2021 et de la pandémie du **Covid-19**, notre sujet de master et objectif d'origine restent irréalisables, en raison de la fermeture des laboratoires de recherche. En conséquence, nous avons orienté notre travail sur la réalisation d'une synthèse des cinq articles portant sur notre thème de départ à savoir l'effet de certaines huiles essentielles sur l'inhibition du biofilm des souches de *Staphylococcus aureus* résistant, toutes d'origine hospitalière.

1. Prélèvement et origine des souches

1.1. Prélèvement et origine des souches de staphylocoques

Dans les cinq articles consultés, les différents prélèvements étaient effectués au niveau du milieu hospitalier, provenant de patients présentant différentes infections (**Tableau 2**).

Tableau 2: Origine et prélèvements cités dans les cinq articles.

Lieu de prélèvement	Site du prélèvement	Sources
Hôpital public – Casablanca Maroc	Cathéters	(Achmit et al., 2021)
Hôpital King Abdulaziz - Arabie Saoudite.	Site opératoire Sang Nasal Brulures	(Ben Abdallah et al., 2020)
Hôpital universitaire de Monastir – Tunisie. (Laboratoire de microbiologie).	Echantillons de pus Hémocultures Cultures diverses.	(Merghni et al., 2018)
Hôpital Monastir –Tunisie (Service de chirurgie bucco-dentaire).	Infections Staphylococcique de la cavité buccale.	(Merghni et al, 2016)
JN Medical College, AMU, Aligarh- Inde.	Prélèvements divers.	(Jafri et al., 2014)

Tous les prélèvements ont étéensemencés sur un milieu de Chapman sélectionnant les staphylocoques grâce à la présence du mannitol et d'une concentration élevée en NaCl inhibant la plupart des autres bactéries.

1.2. Souches de références

Parallèlement une collection de souches de références a aussi fait preuve d'appuis pour une crédibilité des expériences effectuées lors de ces études. Les différentes souches de références de *Staphylococcus aureus* utilisées dans ces articles sont :

- ATCC 25923 (Achmit et al., 2021)
- ATCC 25922 (Ben Abdallah et al., 2020)
- ATCC 6538 [(Merghni et al., 2018) ; (Merghni et al., 2016)]

2. L'isolement et purification

L'isolement a été réalisé par repiquage successif sur bouillon nutritif et sur le milieu Chapman, incubés 18 à 24 h à 37°C. *Staphylococcus aureus* donne des colonies jaunes crémeuses bombées de 1 à 2 µm de diamètre dégradant le mannitol en acide lactique sur Chapman.

3. Identification

Les colonies de petite taille, punctiformes, de couleur jaunâtre et fermentant le mannitol ont été soumises à un examen microscopique pour mettre en évidence la forme des cellules, le mode de groupement et le type de Gram. Ensuite, les souches ont été identifiées sur la base des tests phénotypiques suivants :

3.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est effectuée à partir de colonies cultivées sur milieu de Chapman, pour confirmer le mode de regroupement en diplocoques et en grappes de raisin.

3.2. Production de catalase

La catalase est une enzyme contenant du Fer, qui catalyse la décomposition de peroxyde d'oxygène (H₂O₂) en H₂O. Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques.

3.3. Oxydase

Les cytochromes sont des protéines intervenant dans les mécanismes d'oxydoréduction. Les cytochromes de type 'c' sont détectés par le test de l'oxydase. L'absence de l'oxydase chez le genre *Staphylococcus* permet de le différencier des genres *Kocuria*, *Micrococcus*, *Macrococcus* et *Arthrobacter* [(Kloos et Schleifer, 1986) ; (Brun et Bes, 2000)].

3.4. Test de Coagulase

La coagulase est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte. La thrombine ainsi activée transforme le fibrinogène en fibrine. C'est la base du test de la coagulase (**Brun et al., 2003**). La mise en évidence de cette enzyme coagulase et d'un pigment jaune est un des critères d'identification de *Staphylococcus aureus*.

3.5. Galerie API 20 STAPH (BioMérieux®)

Cette galerie repose sur le même principe que les techniques biochimiques conventionnelles d'identification des bactéries. Elle se présente sous forme de 20 micro tubes prêts à l'emploi (**Figure 8**), contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques. Les substrats reconstitués suivant les recommandations du fabricant, sont examinés après incubation à 37°C pendant 24 h ,les réactions produites sont révélées par des virages colorés spontanés ou par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide de la matrice d'identification des staphylocoques en utilisant le tableur Excel.



Figure 8: Photo montrant une plaque API Staph.

3.6. Identification par VITEK 2 :

Dans l'article de **Ben Abdallah et al. (2020)** le VITEK 2 est un automate de microbiologie qui permet d'obtenir, rapidement, des résultats d'identification bactérienne et d'antibiogramme avec une expertise du phénotype. L'étape d'identification nécessite l'utilisation des cartes réactives. Celles-ci permettent de mesurer diverses activités métaboliques comme l'acidification, l'alcalinisation, l'hydrolyse enzymatique (**Eddayab, 2012**) (**Figure 9**).

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

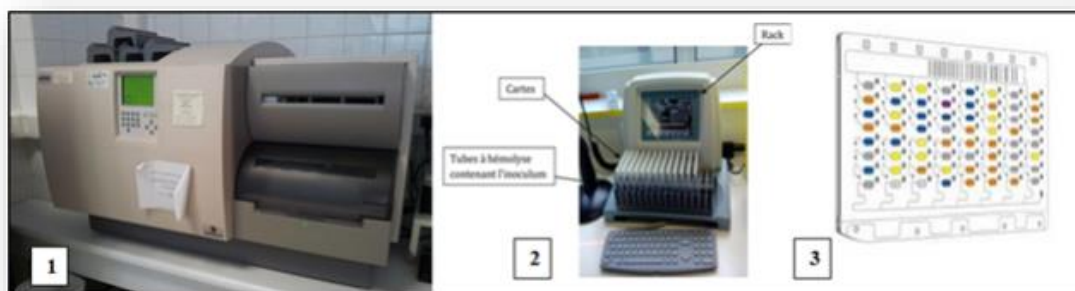


Figure 9: VITEK 2. (1) Automate utilisé (2) Poste relié au VITEK 2 (Eddayab, 2012), (3) une carte du système Vitek (Matuszewski, 2009).

L'identification de *Staphylococcus aureus* a été faite selon les étapes suivantes :

Les échantillons ont été isolés et purifiés sur gélose Chapman pendant 18 à 24 h à 37°C avant d'être soumis à l'analyse par le VITEK 2.

Pour cela la suspension bactérienne étudiée devait être ajustée à un standard McFarland de 0,5 ($\approx 10^8$ UFC/ml) dans 2,5mL d'une solution de chlorure de sodium à 0,45%.

- La carte en GP (Gram Positif) a été placée sur la cassette conçue pour VITEK 2, placée dans l'instrument, automatiquement remplie dans une chambre à vide, scellée, incubée à 35,5°C.
- La mesure colorimétrique a été faite automatiquement en utilisant une nouvelle tête de lecture optique toutes les 15min pour une période d'incubation maximale de 8h.
- Les données ont été analysées à l'aide de la base de données VITEK 2 version 4.01, qui permet l'identification de l'organisme en mode cinétique après 3h d'incubation.

4. Etude de sensibilité aux antibiotiques

L'étude de sensibilité aux antibiotiques pour *S. aureus* dans les trois articles de **Jafri et al. (2014)**, **Merghni et al. (2018)** et **Achmit et al. en 2021** a été réalisée par une technique standard qui est le test de diffusion sur disque, seul l'article **Ben Abdallah et al., (2020)** ou la recherche de la résistance aux antibiotiques a été faite par le système Vitek 2 (bioMérieux, Durham, North CA, USA).

Les géloses Mueller-Hinton ont étéensemencées, à l'aide d'un écouvillon, à partir d'une culture bactérienne jeune (18 à 24h) à 0.5 Mac Farland ($\approx 10^8$ UFC/ml) diluée au 1/100. Les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'un distributeur automatique. Les

boites ont été ensuite incubées pendant 18 à 24 h à 37°C. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques ont été mesurés afin d'interpréter les bactéries en 3 catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante (Ayad, 2017).

5. Détection du Biofilm

Il existe trois techniques pour étudier la capacité des souches isolées à former un biofilm :

- ❖ La méthode du cristal violet
- ❖ La méthode du rouge Congo
- ❖ La méthode en tubes

Dans les cinq articles étudiés au moins une de ces trois méthodes a été réalisée.

5.1. Etude de la formation du biofilm par la méthode *in vitro* de coloration au cristal violet sur microplaques

La méthode de cristal violet permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm par l'utilisation d'une microplaque de 96 puits suivant ce protocole (Figure 10):

Les suspensions bactériennes des souches à 10 μ L testées ont été ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre dans le milieu de croissance puis déposées dans les puits d'une microplaque à 96 puits, à l'exception des deux puits (témoin). La plaque était incubée à 37°C pendant 24h sans agitation. Après incubation, fixer par l'éthanol à 95 % pendant 45 secondes après les puits ont été lavés 3 fois par l'eau distillée stérile ou solution saline PBS afin d'éliminer les bactéries non fixées.

Le biofilm formé a été ensuite coloré avec du 100 μ L cristal violet et quantifié à l'aide de Spectrophotomètre après une solubilisation. La lecture des résultats était faite selon la mesure de la DO.

Les souches ont été classées comme suit :

$DO \leq DO_t$ (Témoin) : non formatrice du biofilm,

$DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$: Modérée

$DO_t \times 4 \leq DO$: Fortement formatrice du biofilm (Christensen et al., 1985).

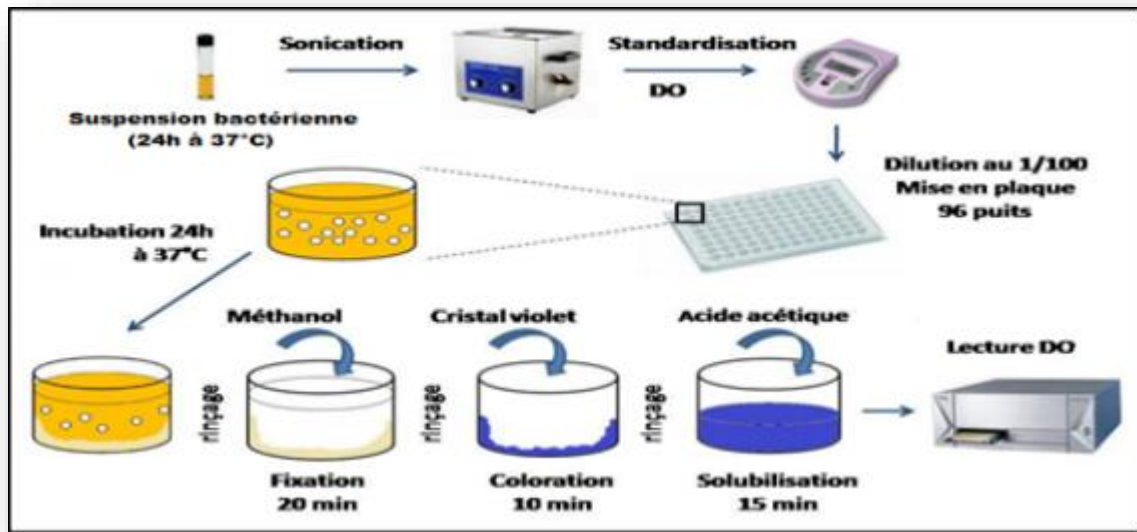


Figure 10: Les étapes de formation de biofilm par la microplaque 96 puits.

5.2. Méthode du rouge Congo agar (RCA) :

La capacité à former du biofilm chez les souches étudiées, a été caractérisée par une méthode souvent employée afin de mettre en évidence d'éventuelle production de slime par les staphylocoques et celles qui n'en produisent pas, en se basant sur la comparaison de la couleur de leurs colonies. Elle se base sur le caractère phénotypique des souches ensemencées sur milieu rouge Congo (**Freeman et al., 1989**).

Les souches testées ont été ensemencées par stries en surface du milieu rouge Congo coulé en boîtes de Pétri. Les boîtes ont été alors incubées en aérobiose pendant 24 à 48 heures à 37°C et ensuite pendant une nuit à température ambiante [(**Ziebuhr et al., 1997**) ; (**Diamond-Hernández et al., 2010**)].

Les colonies des souches non productrices de slime étaient de couleur rose, tandis que celles productrices de slime sont de couleur grise légèrement noire à noire foncée (**Figure 11**) [(**Arciola et al., 2006**) ; (**Liberto et al., 2009**)].



Figure 11: Aspect du biofilm sur un milieu de RC (Rouge Congo) (Belifa, 2014)

5.3. Méthode en tube

La capacité à former un biofilm dans des conditions statiques a été faite dans des tubes en polystyrène décrite par **Christensen et al., (1982)**.

La technique a été réalisée à partir d'une boîte de culture 18-24 heures, ou une colonie était ensemencée dans 10mL de BHI supplémenté de 2% de saccharose puis incubée à 37°C pendant 24 h. Les tubes ont été lavés avec du PBS (pH=7,3) puis séchés. Chaque tube a été ensuite coloré par le cristal violet (0,1%) pendant 15 minutes. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée (**Mathur et al., 2006**).

La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et le fond du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm. La formation du biofilm est notée comme de pour négatif (-) absent, (+) pour modérée et (+++) pour fort (**Figure 12**).

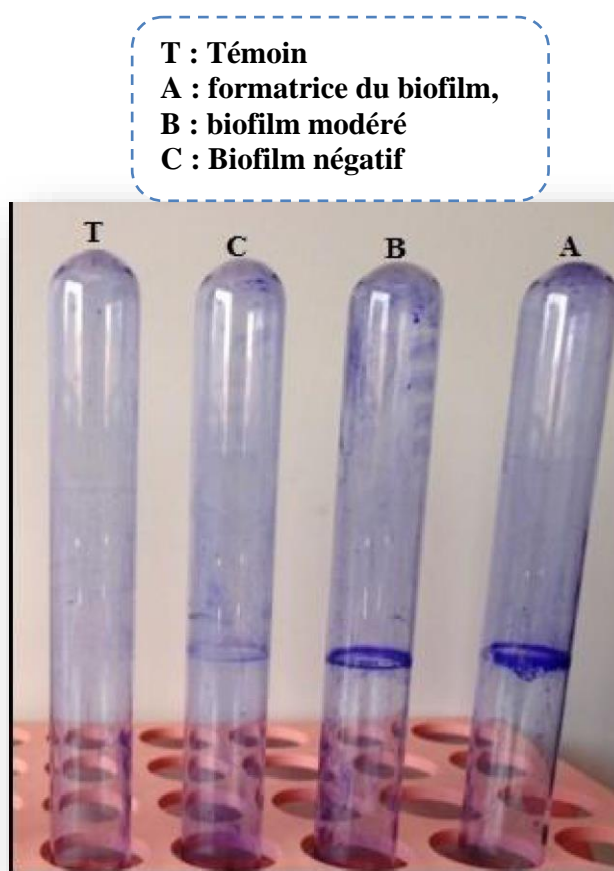


Figure 12: Evaluation de la production du biofilm par la méthode TM (Belifa, 2014).

6. Les huiles essentielles utilisées

6.1. Origine et prélèvements des plantes

Différentes plantes ont été utilisées dans ces articles et toutes de diverses origines.

Merghni *et al.*, En 2016 a travaillé sur le laurier « *Laurus nobilis* » récolte à Gafsa dans le sud-ouest de la Tunisie, et à Sousse dans le centre-est du pays.

- Achmit *et al.*, 2021 ont travaillé avec un sous-produit qui est la sciure de ronce de racine de « *Tetraclinis articulata* » collecté auprès d'artisans spécialisés dans la transformation du bois de thuya à Essaouira (sud-ouest du Maroc).
- Ben Abdallah *et al.*, (2020) ont travaillé sur trois plantes *Rosmarinus officinalis*, *Thymus zygis* et *Origanum majorana*.
- Merghni *et al.* (2018) ont travaillé sur *Eucalyptus globulus*.
- Jafri *et al.*, (2014) ont travaillé sur *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citractus*, *Cymbopogon martini* et *Syzygium aromaticum*.

6.2. Extractions des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles est certainement une phrase délicate car, elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborées par le végétal tel que Les huiles essentielles.

Dans les deux articles de **Merghni et al., (2016)** et **Achmit et al., (2021)** les huiles essentielles ont été extraites par la méthode d'hydrodistillation.

À l'aide d'un montage de type Clevenger (**Figure 13**), selon la technique recommandée par la pharmacopée européenne (**European–Pharmacopoeia, 2005**). 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'HE. L'huile est recueillie dans une burette graduée ou le volume est lu directement. L'extraction est généralement effectuée pendant trois jusqu'à cinq heures sur des plantes aromatiques (**Benbelaid, 2015**).

- Dans l'article **Achmit et al., (2021)** environ 100g de la sciure de ronce de racine de *T. articulata* a été utiliser pour obtenir une huile essentielle de couleur jaune clair et d'odeur aromatique avec un rendement, exprimé en pourcentage du poids sec de 1,66%, elle a ensuite été séchée avec du sulfate de sodium anhydre et stockée dans des flacons sombres scellés conservés à 4 °C jusqu'à son utilisation.
- Dans l'article **Merghni et al., (2016)** 100 g des feuilles de *L. nobilis* séchées à l'air libre et à l'ombre pendant plusieurs jours qui sont ensuite grossièrement broyées et mélangées à 600 mL d'eau distillée.
- Dans les études de articles **Ben Abdallah et al., (2020)** ; **Merghni et al., (2018)** ; et **Jafri et al., (2014)** les huiles essentielles ont été commercialisée.



Figure 13 : Montage de type Clevenger pour l'hydrodistillation des HEs.

7. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles étudiées

Dans les cinq articles étudiés deux techniques ont été employées pour déterminer l'activité antibactérienne, quatre d'entre eux ont utilisé la méthode de diffusion sur disque d'agar [(Merghni et *al.*, 2016) ; (Merghni et *al.*, 2018) ; (Ben Abdallah et *al.*, 2020) ; (Achmit et *al.*, 2021)]. Seul Jafri et *al.* (2014) ont utilisés la méthode de diffusion en puits.

7.1. Méthode de diffusion en disque sur plaque d'agar « Aromatogramme »

La méthode de diffusion sur disque de gélose déjà été décrite précédemment pour la résistance aux antibiotiques mais cette fois ci a été utilisée pour étudier la sensibilité de *S. aureus* aux huiles essentielles, suivant les étapes suivantes :

La technique consiste à utiliser des disques de papier filtres stériles imprégnés par 10 μ L d'huiles essentielles puis ont été déposés sur des boîtes de gélose Mueller-Hinton Agar (MHA) ensemencées préalablement à l'aide d'un écouvillon stérile avec une suspension bactérienne de 10^8 CFU/mL (0,5 Mcfarland). Après leurs dépôts, les disques imprégnés sont laissés pendant un temps à température ambiante pour permettre la diffusion des huiles essentielles et ont ensuite été incubées pendant 24 heures à 37 °C. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones claires autour des disques appelées zones d'inhibition, l'activité

antibactérienne a été évaluée en mesurant le diamètre de ces zones d'inhibition de la croissance. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicate [(Conner et Beuchat, 1984) ; (Merghni et al., 2016) ; (Merghni et al., 2018) ; (Ben Abdallah et al., 2020) ; (Achmit et al., 2021)].

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée selon la fourchette proposée par Ponce et al., (2003) comme suit :

$6 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 8 \text{ mm}$: non sensible

$9 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 14 \text{ mm}$: sensible

$15 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 19 \text{ mm}$: très sensible

$\emptyset \geq 20 \text{ mm}$: extrêmement sensible.

7.2. Méthode de diffusion en puits

L'activité antimicrobienne des huiles utilisée dans l'étude de Jafri et al., (2014) a été déterminée par la méthode de diffusion par puits d'agar.

Cent microlitres (100 μL) de l'inoculum standardisé (0,5 Mac-Farland) de chaque bactérie ont été étalés à l'aide d'un écouvillon stérile sur une boîte d'agar Muller-Hinton stérile afin d'obtenir une croissance confluyente.

Une fois la surface des boîtesensemencées séchées, des puits de 6 mm de diamètre ont été perforés dans les géloses à l'aide du bout de pipettes pasteur stériles.

7.3. Evaluation des Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles utilisées

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CMB) a été déterminée dans les cinq articles par la méthode de microdilution en bouillon sur microplaques de polystyrène à 96 puits pour mesurer l'effet des huiles essentielles sur la croissance des cellules planctoniques.

Dans chaque puits des plaques à 96 puits étaient placés 10 μL d'une suspension bactérienne (5×10^6 CFU/mL) à une densité de 0,5 turbidité standard McFarland de la souche à tester dans le milieu de LB. Une aliquote des solutions mères de chaque HE à 100 μL a été ajoutée dans le premier puits. Ensuite, des dilutions au 1/2 en série ont été transférées dans le puits consécutif. Le puits de contrôle négatif contient du bouillon nutritif sans HE et d'inoculum bactérien. Et les plaques ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h [(Merghni et al., 2016) ; (Ben Abdallah et al., 2020) ; (Achmit et al., 2021)].

Les valeurs de la concentration minimale bactéricide (CMB) dans les deux articles (**Merghni et al., 2018**) ; (**Ben Abdallah et al., 2020**) ont été déterminées à partir des puits clairs du test des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

10µL dans l'article **Merghni et al., (2018)** et 20µL dans l'article **Ben Abdallah et al., (2020)** ont été placés sur une gélose Mueller-Hinton agar (MHA). Après 24h d'incubation à 37°C, le nombre d'organismes survivants a été déterminé en UFC/mL. Les valeurs CMB ont été définies comme la concentration la plus faible de l'échantillon qui a entraîné une destruction $\geq 99,9\%$ de l'inoculum initial.

8. Evaluation de l'activité antibiofilm

8.1. Inhibition du biofilm

Les effets des huiles essentielles ont été déterminés sur la forme sessile des souches de *S. aureus* hautement adhérents. Les concentrations minimales inhibitrices du biofilm (CMIB) ont été déterminées par la technique de cristal violet (décrite précédemment).

100 µL de suspensions bactériennes (10^8 UFC/mL cultivées dans du TSB supplémenté avec un 1 à 2 % de glucose ont été distribués dans les plaques de microtitration à 96 puits contenant de 100µL huiles essentielles. Après incubation des microplaques pendant 24 h à 37 °C, chaque puits a été lavé trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate du PBS stérile (pH 7,4), séchée et coloré par l'ajout de 100 à 200 µL colorant cristal violet (CV). Par la suite, Le cristal violet a été enlevé et la plaque a été lavée avec de l'eau. Les biofilms colorés ont été mis en suspension dans 200 µL d'éthanol à 95 % pendant 1 h et l'expérience a été réalisée en triple. La densité optique (DO) a été mesurée à une longueur d'onde à l'aide d'un lecteur de microplaques pour déterminer la CMIB [(**Jafri et al., 2014**) ; (**Merghni et al., 2016**) ; (**Merghni et al., 2018**) ; (**Ben Abdallah et al., 2020**) ; (**Achmit et al., 2021**)].

Le pourcentage d'inhibition du biofilm a été déterminé par les formules suivantes :

- (**Ben Abdallah et al., 2020**): % Inhibition = $100 - (OD_{570} \text{ échantillon} / (OD_{570} \text{ contrôle}) \times 100$.
- (**Achmit et al., 2021**): %Inhibition = $[(\text{moyen } OD_{630} \text{ contrôle} - \text{moyen } OD_{630} \text{ échantillon}) / \text{moyen } OD_{630} \text{ contrôle}] \times 100$.
- [(**Merghni et al., 2016**) ; (**Merghni et al., 2018**)]: % Inhibition = $[(\text{contrôle de la croissance DO} - \text{échantillon de DO}) / \text{contrôle de croissance de la DO}] \times 100$.
- (**Jafri et al., 2014**): % Inhibition = $(\text{moyenne } DO_{405} \text{ du puits traité} / \text{moyenne } DO_{405} \text{ du puits témoin non traité}) \times 100$.

8.2. Eradication du biofilm

Dans les trois articles **Merghni et al., (2016)** ; **Merghni et al., (2018)** ; et **Ben Abdallah et al., (2020)** l'éradication du biofilm a été évalué par la technique suivante :

Les biofilms ont été formes comme décrit précédemment, ceux n'ayant subi aucun traitement ont été utilisés comme témoins. Expérimentalement, les microplaques ont été incubées pendant 24 h à 37 ° C pour permettre la fixation et la croissance du biofilm. Après 24h d'incubation, le biofilm adhérent a été rincé deux fois avec du PBS éliminant ainsi les cellules non adhérentes, Ensuite, 200 µL de TSB (2% de glucose) avec des concentrations finales des HE équivalentes et supérieurs à la CMI ont été ajoutés, et les plaques ont été incubées pendant 24 h. L'expérience a été réalisée en triple.

Le % d'éradication du biofilm a été calculé comme décrit précédemment.

Résultats et Discussion

1. Résultats des prélèvements des souches staphylococciques

Toutes les souches isolées de *S. aureus* dans les cinq articles concernés, sont d'origines hospitalières et de sites différents.

Les isolats cliniques de SARM dans l'article de **Ben Abdallah et al., (2020)** ont été collectés au King Abdulaziz Specialist Hospital, Taif, Arabie Saoudite. **Merghni et al., (2018)** ont travaillé sur des souches de *Staphylococcus aureus* du laboratoire de microbiologie du CHU de Monastir (Tunisie), alors que dans leurs article de **2016**, les souches de *S. aureus* ont été isolées de la cavité buccale de patients tunisiens. Quant à **Jafri et al., (2014)** et **Achmit et al., (2021)** leurs souches de *S. aureus* ont été prélevées soit des cathéters infectés ou de divers prélèvements hospitaliers (**Figure 14**).

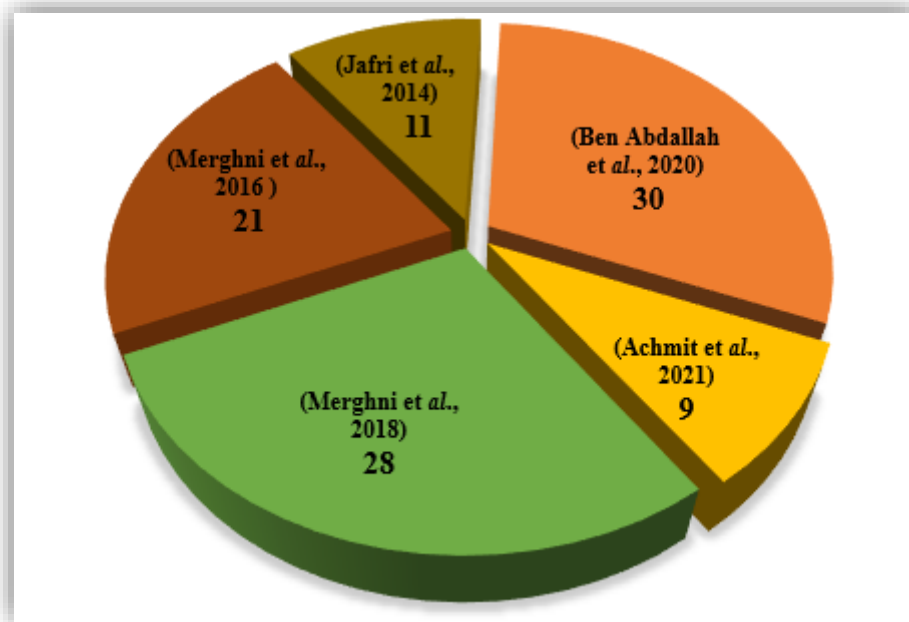


Figure 14: Répartition des isolats de *Staphylococcus aureus* retenus dans les cinq articles étudiés.

2. Résultats d'identification des souches

Suite aux différents tests réalisés dans le but d'identification de la souche mise en évidence dans nos cinq articles, tous ce sont avéré être des *S.aureus*, par la présence d'une culture sur milieu de Chapman qui a permis d'orienter l'identification vers le genre *Staphylococcus*.

2.1. Aspect des colonies sur milieu Chapman

Généralement *Staphylococcus aureus* développe des colonies de petites tailles apparaissent souvent pigmentées, sur le milieu de Chapman et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, sinon les colonies sont de couleur blanche, elles sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm diamètre (**Figure 15**) (**Boukhalifa, 2017**).



Figure 15: Aspect de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman.

2.2. Les résultats des examens microscopiques réalisés après coloration de Gram

La coloration de gram a confirmé que les souches de *S. aureus* présentent une couleur violette typique des bactéries Gram positives, elles se présentent sous forme de Cocci souvent sphériques, en grappe de raisin (**Figure 16**). La présence d'une coagulase positive confirme d'identification de *Staphylococcus aureus*.

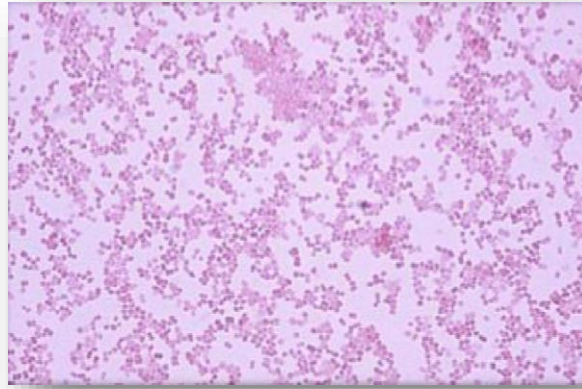


Figure 16: Aspect de *Staphylococcus aureus* par une coloration de Gram.

2.3. Résultat d'identification par galerie Api 20 Staph

Pour ce qui est de la galerie Api 20 Staph, la lecture des résultats se fait à l'aide d'un catalogue qui est une base de données, renfermant toutes les souches. La lecture de ces réactions (positives ou négatives) se base en fonction des variations des couleurs (**Figure 17**) à partir des testes biochimique (**Annexe 1**). L'association de ces caractéristiques réunies permet de connaître le genre et l'espèce bactérienne de l'isolat.

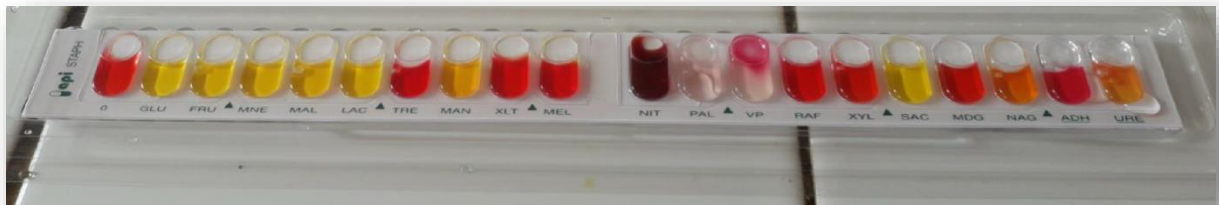


Figure 17: Résultats de l'identification par Galerie API 20 Staph.

3. Résultats d'antibiorésistance des souches

Ben Abdallah et al., (2020) et **Merghni et al., (2018)** ont travaillé sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline.

Après identification, **Jafri et al., (2014)** ont réalisé un antibiogramme sur onze souches de *S. aureus*, vis-à-vis de huit antibiotiques à savoir la pénicilline (**PEN**), Ampicilline (**AMP**), Cefuroxime (**CEF**), Cloxacilline (**CLOX**), Céphalothin (**CEP**), Méthicilline (**MET**), Novobiocine (**NOV**) et la vancomycine (**VAN**).

Suite à cet antibiogramme une recherche de la concentration minimale inhibitrice (**CMI**) et la concentration bactéricide minimale (**CMB**) vis-à-vis de l'**AMP**, de la **CEF** et de la **VAN** était réalisée afin de confirmer l'état de multirésistances des souches.

Les souches sont considérées comme résistantes si la valeur de **CMI** $\geq 64 \mu\text{g/mL}$, **1** et **4** $\mu\text{g/mL}$ pour la **VAN**, l'**AMP** et la **CEF** respectivement.

Les résultats trouvés des **CMI** et **CMB** sont cités comme suit:

Antibiotique	CMI $\mu\text{g/mL}$	CMB $\mu\text{g/mL}$
VAN, AMP	64 - 1024	128 – 2048
CEF	256 -1024	512 – 2048

Ces résultats confirment la résistance de toutes les souches à la Cefuroxime et à la Vancomycine.

Achmit et al., (2021) ont isolait 9 souches de *S.aureus* d'origine hospitalière dont une (*S.aureus* N 7) a présenté une multirésistance aux cinq antibiotiques testés (**Figure 18**).

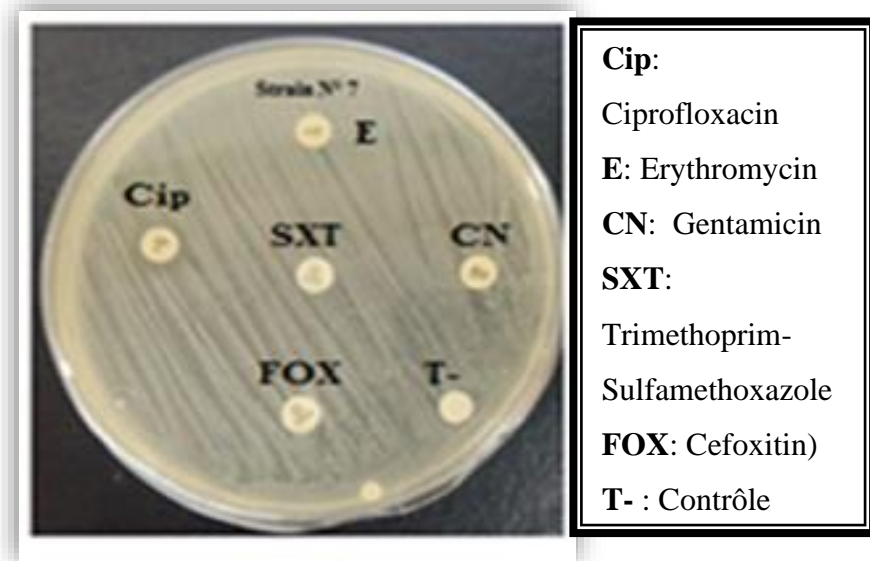


Figure 18 : Etat de résistance de la souche de *S. aureus* N° 7 selon la méthode de diffusion vis-à-vis les cinq antibiotiques (Achmit et al., 2021).

4. Capacité de la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* isolé

4.1. Evaluation de la formation du biofilm par la méthode de TCP

Il a été démontré que la méthode TCP détecte mieux les bactéries productrices de biofilm par rapport à d'autres méthodes. C'est une technique qui est pratique et économique pour l'identification des facteurs et des conditions de cultures optimales pour la formation du biofilm (Figure 19).

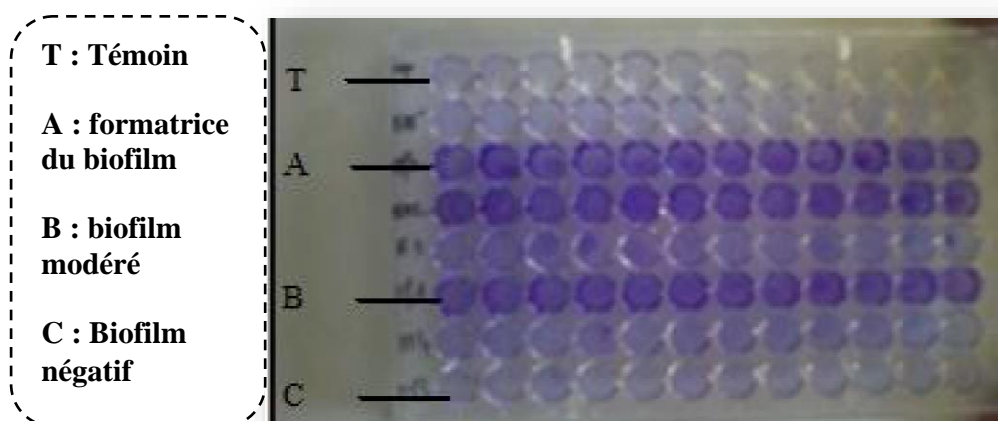


Figure 19 : Résultat de la production du biofilm par la méthode TCP.

Les souches de SARM dans l'article de **Ben Abdallah et al., (2020)** ont été testées pour leurs potentialités à former un biofilm sur une surface de polystyrène et ont indiqué que 96,66% des isolats étaient capables de former un biofilm, leur répartition étaient comme suit :

Formation du biofilm	Bactéries Hautement positifs	Bactéries Faiblement positifs
Pourcentage	40%	56,66%
DO ₅₇₀	1,175 - 3,635	0,113 - 0,87

Quant à l'article de **Merghni et al., (2018)** le résultat du test de coloration au cristal violet a montré que quatre souches (4/28) de *S. aureus* étaient hautement positives pour le biofilm (**DO570 ≥ 1**). Alors que 24 étaient moyennement formatrice de biofilm (**0,1 ≤ DO570 < 1**). Même **Jafri et al., (2014)** ont utilisé la même technique, dans laquelle les souches étaient divisées en trois catégories :

Formation du biofilm	Forte	Modéré	Faible
OD ₆₂₀	0,1 < OD ₆₂₀ ≤ 0,4	0,4 < DO ₆₂₀ ≤ 0,8	OD ₆₂₀ > 0,892
Nombre de souche (n)	n=4	n=5	n=1

4.2. Evaluation de la formation du biofilm par la méthode RCA

Dans l'article de **Merghini et al., (2016)** parmi les 21 isolats de *S. aureus*, 19 souches étaient productrices de biofilm, le même auteur en (2018), sur 28 isolats testés seule 19 souches de *S. aureus* présentaient un phénotype positif et variable soit (67,8 %) par la méthode de RCA. Selon les auteurs, la classification des staphylocoques ensemencés sur milieu rouge Congo est rendue possible, en comparant la couleur des colonies, une couleur rose indique l'absence de biofilm et une couleur noire avec une consistance sèche indique la présence de biofilm; tandis qu'une couleur rose avec un noircissement au centre de la colonie correspond aux souches faiblement productrices de biofilm alors que les colonies d'une couleur noire et lisses indiquent que les souches sont intermédiairement productrices de biofilm [(**Freeman et al., 1989**) ; (**Mathur et al., 2006**)] (**Figure 20**).

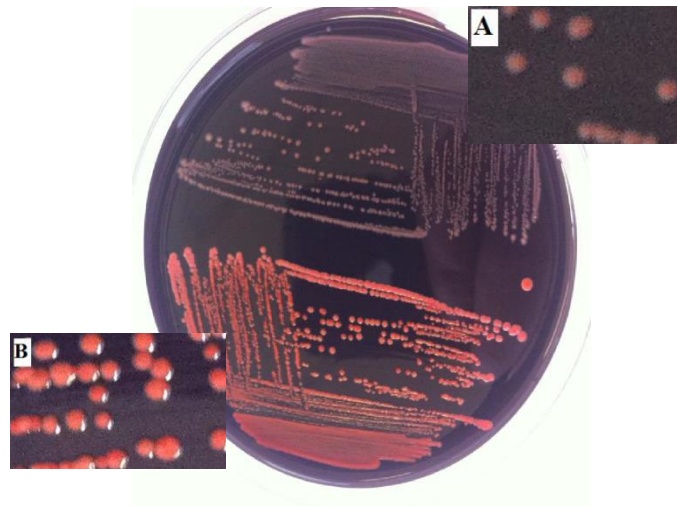


Figure 20: Résultat sur aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu RC (Rouge Congo)

4.3. Evaluation de la formation du Biofilm par la méthode en tube TM

L'évaluation qualitative du potentiel de la formation du biofilm sur tube de verre dans l'article **Merghini et al., (2018)** a montré que 50 % des souches de *S. aureus* étaient fortement adhérentes, 42,9 % étaient modérément adhérentes, et seulement deux souches étaient faiblement adhérentes. De mêmes 10 souches sur 11 ont formé un biofilm modéré à fort dans l'étude de **Jafri et al., (2014)** par la même technique.

La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube (**Belifa, 2014**) (**Figure 21**).

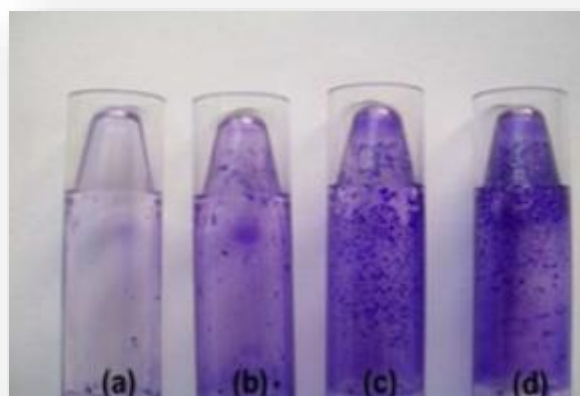


Figure 21: Détection visuelle des souches de *S. aureus* pour leur capacité de formation de biofilm dans des tubes en polystyrène (Jafri et al., 2014).

(a) - ; (b) + ; (c) ++ ; (d) +++

Les résultats de la formation du biofilm des quatre articles ont été résumés dans le tableau suivant (**Tableau 3**).

Tableau 3: Les résultats du nombre de souches formant du biofilm pour les trois techniques dans les quatre articles étudiés (Personnelle).

	TCP			RC			TM		
	Forte	Modéré	Faible	Forte	Modéré	Faible	Forte	Modéré	Faible
(Ben Abdallah et al., 2020)	12	18	/						
(Merghni et al., 2018)	5	24	/	6	23	/	15	12	2
(Jafri et al., 2014)	3	3	2				4	5	1
Total	20	45	2	6	23	/	19	17	3

5. L'Activité antibactérienne des huiles essentielles sur des souches planctonique

L'activité antibactérienne de l'huile de *Tymus sp* vis-à-vis des souches de *S. aureus* a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque, dans l'article **Ben Abdallah et al., (2020)**

Et **Jafri et al., en (2014)**, l'huile de *Tymus sp* a montré une forte activité inhibitrice sur des souches de *S. aureus*.

L'HE de *Tymus sp* dans l'article **Ben Abdallah et al., (2020)** et **Jafri et al., (2014)** est apparue comme l'HE avec une plus grande activité antibactérienne, ou les souches de *S. aureus* étaient très sensibles.

Achmit et al., (2021), en utilisant l'HE de *Tetraclinis articulata* montra que celle-ci avait une forte activité vis-à-vis toutes les souches de *S. aureus* isolées (**Figure 22**).

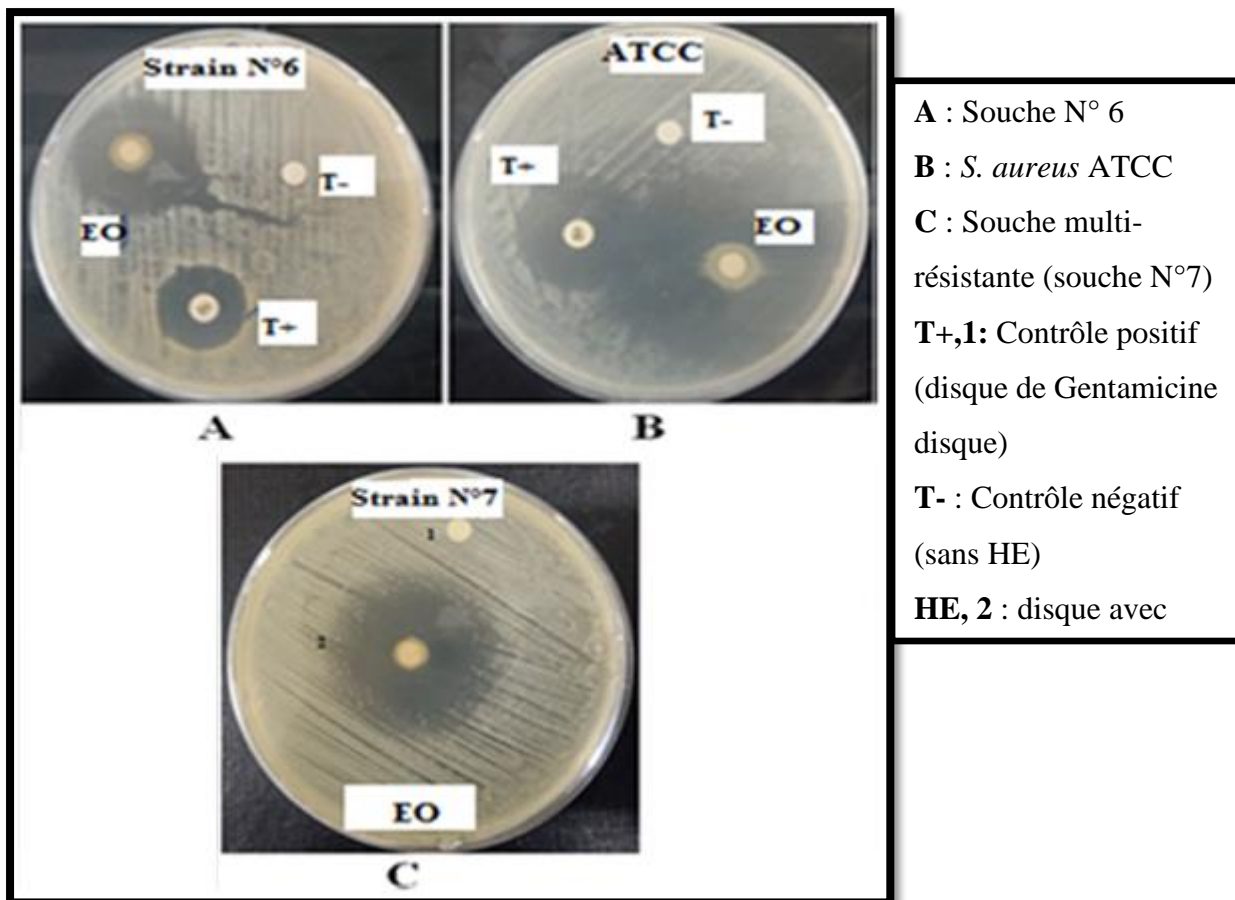


Figure 22 : Détermination de l'activité antibactérienne de l'HE de *Tetraclinis articulata* par l'application de la méthode de diffusion des disques

La détermination des CMI des huiles de *Tetraclinis articulata* par le test de microdilution a montré que toutes les souches de *S. aureus*, y compris la souche numéro 7 (souche multirésistante), étaient extrêmement sensibles.

Dans son étude l'HE de *Tetraclinis articulata* peut être classée comme agent bactéricide contre tous les isolats cliniques testés de *S. aureus* à des concentrations sublétales.

Ces résultats concordent avec ceux de **Zaika et al., (1988)**, ou ils démontrent clairement que l'HE de la sciure du bois de loupe de *Thuya* avait un effet antibactérien puissant sur des souches cliniques résistantes à des antibiotiques avec plus d'efficacité sur *S. aureus* que sur *E. coli*.

Djouahri et al., (2014) ont rapporté que les huiles essentielles obtenues à partir de l'hydrodistillation de *T. articulata* présentaient une activité antibactérienne élevée contre *S. aureus*. De même **Akabli et al., (2016)** annoncent que 5 uL de l'HE du bois de loupe de

Thuya avait un effet bactéricide puissant sur une souche clinique *d'E. coli* et seulement bactériostatique sur une souche clinique de *S. aureus*.

En 2004 **Satrani et al.**, trouvaient que l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*, extraite du bois et testée contre des bactéries a montré une grande activité antibactérienne. De plus il précise que HE extraite de ses feuilles a montré une forte activité inhibitrice contre quatre microorganismes, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus* et celle extraite des rameaux a révélé son effet inhibiteur uniquement sur *S.aureus* et *Micrococcus luteus* (**Bourkhiss et al., 2007**).

Il est important de noter que les valeurs de CMI trouvées par **Achmit et al.**, en (2021) étaient très faibles par rapport à celles trouvées par **ABI-Ayad et al.**, (2011) dans son étude, car celui-ci a travaillé sur des HE extraite des feuilles de *T. articulata* d'Algérie contre des souches de référence de *S. aureus* **ABI-Ayad et al.**, (2011) contrairement à **Achmit et al.**, (2021) qui lui a utilisé l'HE de bois de ronce de racine de thuya.

De même **El Moussaouiti et al.**, (2010) rapportent dans leurs travaux que l'HE extraite de la sciure de bois de ronce de *T. articulata*, avait une activité antibactérienne très importante sur *Enteroccus faecalis*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*.

Habituellement les bactéries Gram – comme *E. coli*, Klebsielles sont connues pour leurs résistances que les bactéries Gram + comme *S. aureus* à l'effet inhibiteur des HE et ce grâce à la structure particulière de leur membrane externe, mais à travers ces différentes contributions, l'HE de *Tetraclinis articulata* peut avoir un rôle prometteur en tant qu'agents antibactériens.

Merghini et al., (2016) quant à lui, a étudié l'activité antistaphylococciques de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*, il démontra son puissant effet antibactérien contre 21 souches de *Staphylococcus aureus* testées.

Da Silveira et al., (2014) démontrèrent que les bactéries a Gram négatif telles *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont insensibles à l'HE du *Laurus nobilis* car leur mécanisme de résistance se manifeste au niveau de la structure de leur enveloppe bactérienne . Par ailleurs cette HE a une activité très marquée sur la bactérie Gram positif : *Staphylococcus aureus*.

En 2018, ce même auteur a étudié l'effet d'une autre huile essentielle de *Eucalyptus globulus* sur des souches de *S. aureus* d'origine buccale, où il montra une forte activité antibactérienne contre toutes les souches testées.

Déjà les travaux de **Cimanga et al.**, (2002) et de **Takarda et al.**, (2002) avaient rapporté que cette HE avait une bonne activité antimicrobienne. Contrairement à **Van Vuuren et al.**, en

(2007) qui ont montré que le constituant majeur de l'HE d'*E. globulus*, avait un faible effet sur *S. aureus* avec des CMI de 8 mg/mL, alors que **Ait-Ouazzou et al., (2011)** ont mis en évidence une bonne activité bactériostatique et bactéricide d'*Eucalyptus globulus* contre sept bactéries pathogènes et d'altération dont *S. aureus*.

Néanmoins et contrairement à toutes ces études, **Prabuseenivasan et al., (2006)**, ont constaté que l'huile essentielle d'Eucalyptus n'a inhibé aucune des bactérie Gram négatives et Gram positives.

Les huiles essentielles de la feuille d'*E. globulus* ont montré des degrés variables d'activité antibactérienne contre deux isolats cliniques à savoir des bactéries Gram positives *S. aureus* et Gram négatives *E.coli* (**Bachir et al., 2012**).

En dehors de l'activité antibactérienne et antistaphylococcique de thymus **Jafri et al., (2014)** ont étudié l'effet de quatre autres huiles essentielles des plantes de *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martini* et *Syzygium aromaticum*.

L'huile essentielle de *S. aromaticum* a donné une bonne activité antimicrobienne contre la plupart des souches *Staphylococcus aureus* testées, contrairement aux huiles essentielles de *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus* et *Cymbopogon martini*.

Effectivement **Innsan et al., (2011)** l'avait déjà confirmé ou l'huile essentielle extraite de *Cymbopogon nardus* semblait avoir peu d'impact sur *S. aureus* par rapport à *E. coli*.

Plusieurs études telles **Aureli et al., (1992)** et **Matan et al., (2006)** ont montré que les huiles de girofle (*Syzygium*) avaient de forts effets inhibiteurs et constants contre divers agents pathogènes.

Dans l'étude **Prabuseenivasan et al., (2006)** les huiles de girofle, de citron ont présenté un effet inhibiteur significatif. En général, *Bacillus subtilis* était la plus sensible. D'autre part, *Klebsiella pneumoniae* a montré un faible degré de sensibilité.

Ben Abdallah et al., (2020) a essayé de comparer activité antibactériennes de deux autres huiles à savoir l'huile essentielle de *Origanum majorana* et *Rosmarinus officinalis* qui ont montré également une forte action inhibitrice des isolats du *Staphylococcus aureus* et de SARM. L'HE d'*O. majorana* semblait plus inhibitrice que *R. officinalis*.

Suite à la synthèse des cinq articles, nous résumons (**Figure 23**) l'effet de toutes les huiles essentielles étudiées en fonction de leurs zones d'inhibition, où nous constatons que HE d'*Eucalyptus globulus* présente la meilleure zone, suivit des HE de *Tétracelinis articulata*, du thymus, du romarin, de l'origan et des autres.

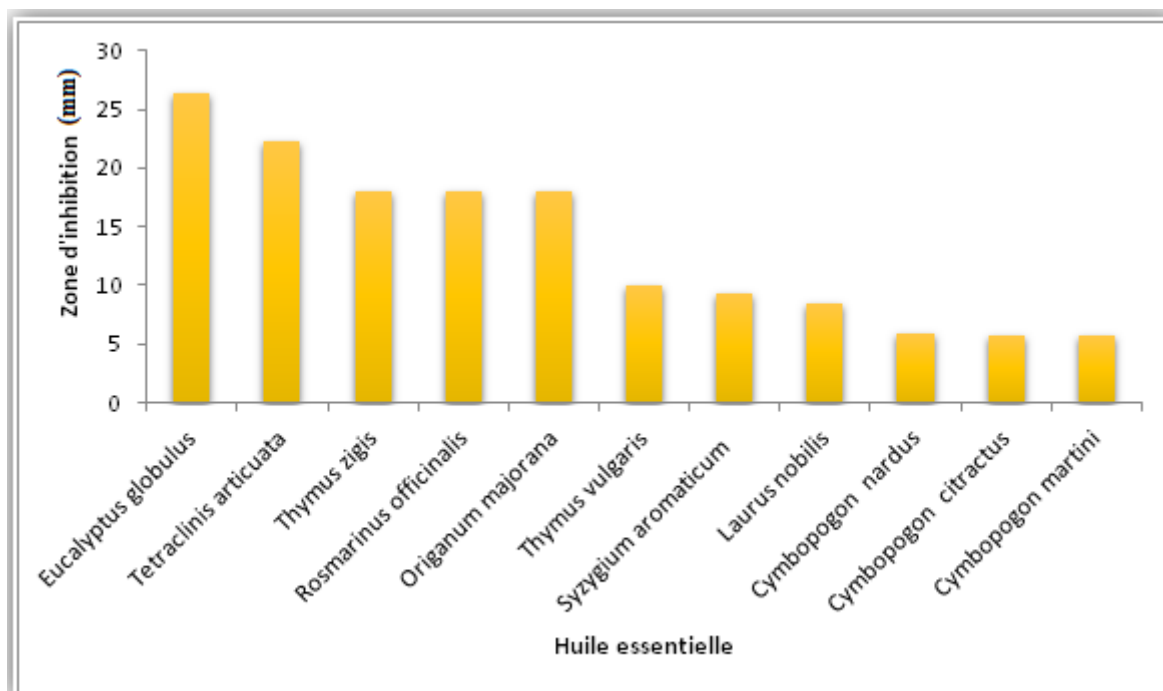


Figure 23: Histogramme représentatif des zones d'inhibitions de chaque huile essentielle.

Le **Tableau 4** qui résume les valeurs de CMI et CMB des huiles étudiées confirme les résultats précédents où l'HE d'*Eucalyptus globulus* présente le meilleur effet antibactérien sur des souches de *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI et CMB comprises ente 0,048-25 et 0,097- ≤50 respectivement, suivit de l'HE de *Tetraclinis articulata*.

Tableau 4: Les différentes valeurs de la CMI, CMB et les pourcentages d'inhibitions des isolats planctoniques par les HE étudiées

	Huile essentielle	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	% d'inhibitions des isolats planctonique
Achmit et al., 2021	<i>Tetraclinis articulata</i>	0,19 – 48	0,19 – 48	
Ben Abdallah et al., 2020	<i>Thymus zygis</i>	0,39 - 0,78	3,125	80
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,78 - 1,56	12,5	46,66
	<i>Origanum majorana</i>	0,78 - 1,56	3,125 - 12,5	53,33
Merghni et al., 2018	<i>Eucalyptus globulus</i>	0,048 – 25	0.097- <50	99
Merghni et al., 2016	<i>Laurus nobilis</i>	3.91- 31,25	31.25 - 125	
(Jafri et al., 2014)	<i>Tymus vulgaris</i>	0,1578 - 0,6312		
	<i>Cymbopogon nardus</i>	0,3156 – 1,2624		
	<i>Cymbopogon citractus</i>	0,6312		
	<i>Cymbopogon martini</i>			
	<i>Syzygium aromaticum</i>	0,6312 - 1,2624		

6. L'Activité antibiofilm des huiles essentielles

L'activité antibiofilm des huiles essentielles était également recherchée vis-à-vis des isolats sessiles de *Staphylococcus aureus* des différentes études (Figure 24).

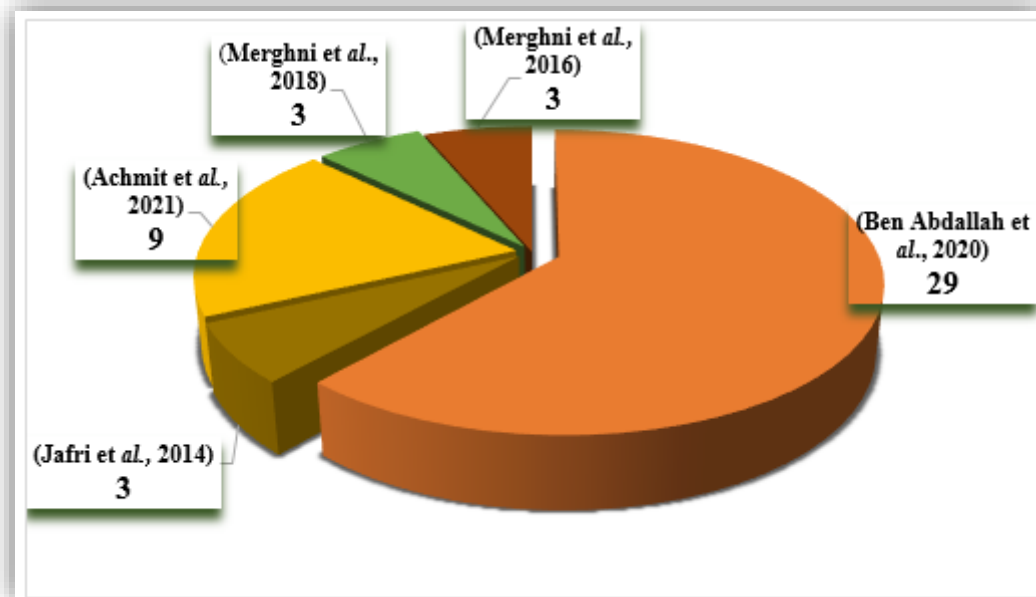


Figure 24: Nombre des isolats de *Staphylococcus aureus* retenus pour l'activité antibiofilm dans les cinq articles.

Dans l'article **Ben Abdallah et al., (2020)**, les activités inhibitrices du biofilm par les HE de *O. majorana*, *T. zygis* et *R. officinalis* ont été étudié vis-à-vis de 29 isolats de SARM toutes bonnes ou faiblement formatrices de biofilm en plus d'une souche de référence.

L'HE d'*O. majorana* a montré une activité antibiofilm de 26 isolats en plus de la souche de référence. L'HE de *R. officinalis*, avait un effet antibiofilm sur 23 des isolats alors que l'activité antibiofilm de *T. zygis* a été observée chez seulement sur 18 des 29 isolats.

Ces résultats corroborent avec les données récentes de **Cordeiro et al., (2020)** montrant que *O. majorana*, *R. officinalis* et *T. zygis* avaient une forte activité antibiofilm contre *S. aureus*.

Les résultats de **Jafri et al., (2014)** ont montré que les huiles de *Cymbopogon citratus* et de *Thymus vulgaris* ont présenté un schéma similaire d'inhibition du biofilm contre les souches de *S. aureus* étudiées (**JSA-02**, **JSA-06** et **JSA10** citées dans l'article). L'inhibition de la formation du biofilm par l'huile de thym chez la souche **JSA10** a été observée au microscope optique (Figure 25).

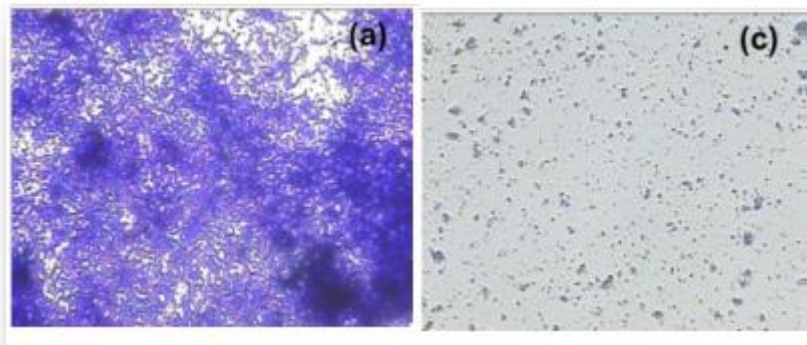


Figure 25: Inhibition de la formation de biofilms chez *S. aureus* par *Thymus vulgaris* sur des disques de cathéter en 48 h sous microscope optique (40 X). (a) : Contrôle non traité ; (c) : 10 mg/mL huile de thym
Jafri et al., (2014)

La **Figure 25 (a)** a montré que le biofilm non traité contrôlé après 48 heures présente un réseau dense de cellules avec des polymères extracellulaires. En présence l'huile de thym a permis de réduire efficacement le nombre de microcolonies et de cellules dispersées, ce qui indique que la formation du biofilm a été inhibée à différents niveaux **Figure 25 (c)**.

L'activité antibiofilm des huiles essentielles a pour but de déterminer l'effet des huiles de *L. nobilis* et de *E. globulus* ont exercé un effet anti-attachement et d'inhibiteur sur la capacité d'adhésion des 3 souches sélectionnées dans les études de **Merghini et al., (2016)** et en **(2018)** respectivement.

Dans l'étude d'**Achmit et al., en (2021)** l'huile essentielle *Tetraclinis articulata* a eu un très fort effet inhibiteur sur la formation du biofilm de toutes les souches. Les pourcentages d'inhibition de la formation du biofilm ont été observées avec des concentrations sublétales De CMI/2 et CMI/4. Une tendance similaire a été observée par plusieurs auteurs tels **Thati et al., (2011)** ; **Chusri et al., (2012)** et **Lee et al., en (2013)**.

Tous ces différents résultats ont été résumés dans le tableau suivant (**Tableau 5**) :

Tableau 5: Les résultats de la CMIB des HE utilisées dans les cinq articles vis-à-vis des souches étudiées.

	Huile essentielle	CMIB (mg/mL)	% d'inhibitions des isolats planctonique
Achmit et al., 2021	<i>Tetraclinis articulata</i>		85
Ben Abdallah et al., 2020	<i>Thymus zygis</i>	0,1578	11,67 à 91,48%
	<i>Rosmarinus officinalis</i>		10,20 - 95,65
	<i>Origanum majorana</i>		10,29 - 95,91
Merghni et al., 2018	<i>Eucalyptus globulus</i>	0,003 - 0,095	80
Merghni et al., 2016	<i>Laurus nobilis</i>	0.24 - 1.95	> 70
(Jafri et al., 2014)	<i>Tymus vulgaris</i>	0.6312- 1,2624	88,7 – 61,8
	<i>Cymbopogon nardus</i>	1,2624 – 2,5248	
	<i>Cymbopogon citractus</i>	0.6312- 1,2624	
	<i>Cymbopogon martini</i>		
	<i>Syzygium aromaticum</i>	1,2624 – 2,5248	

7. L'Activité d'éradication du biofilm des huiles essentielles

Les HE d'*O. majorana*, *T. zygis* et *R. officinalis* dans l'article **Ben Abdallah et al., (2020)** ont montré des activités d'éradication sur 41,37 % des isolats (12 souches) de SARM, indépendamment du spécimen, y compris la souche de référence.

Dans une autre étude **Ceylan et al., (2014)** ont montré que l'huile de *Rosmarinus officinalis* a réduit la quantité du biofilm de *S. aureus* à 60,76%.

Sur la base des catégories du biofilm et sous l'effet de *O. majorana*, cinq isolats (17,24%) sont passés de très positifs à faiblement positifs. De plus, une souche de faible positif et une souche hautement positive sont devenues négatives pour le biofilm.

Pour *T. zygis*, seuls deux isolats sont passés de très positifs et de faible positifs à des biofilms négatifs après le traitement, tandis que *R. officinalis* a provoqué des modifications sur trois isolats. Parmi eux, un faiblement positif a été changé en biofilm négatif, et deux très positifs sont devenus faiblement positifs. Le pourcentage d'éradication le plus élevé a été enregistré par *O. majorana*.

Dans l'étude de **Merghini et al., (2016)** l'huile essentielle de *L. nobilis* a montré divers effets sur le développement de biofilms préformés, le même auteur en **(2018)** a traité des souches sélectionnées de *S. aureus* par d'huile essentielle sous conditions de 2× CMI et 4×CMI.

Les témoins négatifs étaient présentés par des lames non traitées. Les résultats ont été corroborés par l'évaluation microscopique du biofilm de *S.aureus* sur lame (**Figure 26**).

Les concentrations de 4×CMI étaient éradicatrices.

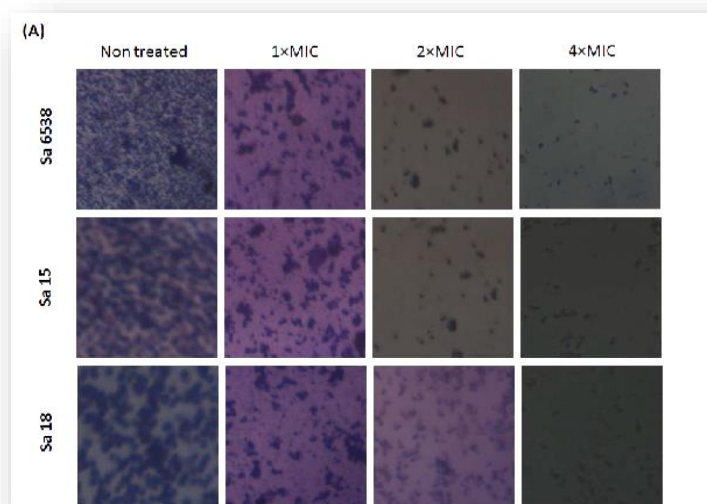


Figure 26: Visualisation microscopique de l'effet de l'huile essentielle d'*E. globulus* des souches positives de biofilm de *S. aureus* cultivés sur des lames de verre

Les résultats de l'activité d'éradication des biofilms par les différentes HE dans trois articles **Merghni et al., (2016)**, **Merghni et al., (2018)** et **Ben Abdallah et al., (2020)** sont présentés dans le suivant (**Tableau 6**).

Tableau 6: Les résultats d'éradication du biofilms obtenus par les HE dans trois articles.

	Huile essentielle	% d'éradications du biofilm
Ben Abdallah et al., 2020 12 souches	<i>Tymus zygis</i>	12,65 - 94,39
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	13,45 - 92,69
	<i>Origanum majorana</i>	18,31 - 98,01
Merghni et al., 2018 3 souches	<i>Eucalyptus globulus</i>	2,05 - 89,15
Merghni et al., 2016 3 souches	<i>Laurus nobilis</i>	1,93 - 45,6

Dans une autre étude l'huile d'eucalyptus avait une bonne capacité à éliminer le biofilm (**Hendry et al., 2009**). De même que l'extraction d'alginate des feuilles de *Laurus nobilis* avait une activité visuellement appréciable contre le biofilm, avec une capacité d'éradication d'environ 78% **Chmit et al., en (2014)**.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet antibactérien et antibiofilm de quelques huiles essentielles sur des souches du *Staphylococcus aureus* à travers une synthèse faite sur cinq articles traités.

Suite à cette analyse et aux résultats obtenus par les différents auteurs nous concluons que les 11 HE des plantes médicinales choisies étaient très efficaces sur l'activité biologique de *Staphylococcus aureus* à des degrés différents. Toutefois, l'huile essentielle qui a été la plus efficace est celle d'*Eucalyptus globulus* avec un pourcentage d'efficacité de 99% et 80% sur la croissance planctonique et sessile de *Staphylococcus aureus* respectivement, grâce à son composant majeur qui est le 1,8-Cinéole.

S'ajoute à cela une autre plante qui a brillé par son efficacité remarquable sur l'éradication du biofilm du Staphylocoque c'est *Origanum majorana* avec un pourcentage de 98%.

A travers cette recherche nous avons remarqué que les HE agissent bien sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram négatif, celles-ci paraissent moins sensibles à cause de la structure de leur paroi cellulaire représentant ainsi une barrière capable de diminuer la perméabilité des composés hydrophobes [(Burt, 2004) ; (Calsamiglia et al., 2007)].

En guise de perspective et malgré les limites de cette année à cause du Covid et quelque que soit la voie suivie pour les prochaines études, il serait souhaitable de tester des extraits de plantes algériennes souvent utilisées par la population afin de comparer leurs efficacités vis à vis de bactéries hospitalières et multirésistantes.

Références bibliographiques

Abdelli, W (2017). Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis).

Accarias, S (2014). Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

Achmit, M., Aoussar, N., Mellouki, F., Mhand, RA, Ibáñez, MD, Blázquez, MA, ... & Rhallabi, N (2021). Activité in vitro antibactérienne et inhibitrice du biofilm de l'huile essentielle de sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (vahl) contre les isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* associés aux cathéters. *Recherches actuelles en biotechnologie*, 3, 1-5.

Ait-Ouazzou A, Lorán S, Bakkali M, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, Pagán R, Conchello P (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J Sci Food Agric*. 91 (14):2643-51.

Akbli, M., Rhallabi, N., Mhand, R. A., Akssira, M., & Mellouki, F (2016). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de *Tetraclinis articulata* (Vahl) master du Maroc sur des souches d'origine clinique [Antibacterial activity of the essential oil of sawdust of root burl wood of *Tetraclinis articulata* (VAHL) master of Morocco against clinical strains]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 16(2), 314.

Al alam D (2008). Impacte de l'interaction entre les cellules épithéliales bronchiques et *Staphylococcus aureus* sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Thèse de doctorat. *Université de REIMS Champagne Ardenne UFR de Pharmacie*. 185P.

Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Alzaharni, K. E., Mothana, R. A., Alsaid, M. S., Alhoshan, M., ... & Alobaidi, A. S (2017). Effects of Piper cubeba L. essential oil on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: an AFM and TEM study. *Journal of Molecular Recognition*, 30(1), e2564.

Allison DG, McBain AJ, Gilbert P (2000). Biofilms: problems of control. In: Community Structure and Co-operation in Biofilms (Eds. Allison, D, Gilbert, P, Lappin-Scott, HM and Wilson, M), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 309–327

Aricola C.R., Commpaoccia D., Baldassari L., Donati M.E., Gamberini S., Montanaro L (2005). Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections Comparisons of a PCR method that recognize the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *Journal of Biomedical Research*. 76 (2): 425-430.

Astagneau, P., Rioux, C., Golliot, F., & Brücker, G (2001). Morbidité et mortalité associées aux infections du site opératoire : résultats de la surveillance INCISO 1997-1999. *Journal of Hospital Infection*, 48 (4), 267-274.

Aureli P, Costantini A, Zolea S (1992). Antibacterial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*, 55: 344-348.

Ayad A (2016). Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'Ouest algérien. Th. doct : Microbiologie : Faculté des sciences de la

nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers : Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

Ayad, F.Z., ABI-Ayad, M., Lazzouni, H.A., Rebiahi, S.A., Bessiere, J.M (2011). Antibacterial activity of essential oil extracted from leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Algeria flora. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 1, 1–6.

Bachir, R. G., & Benali, M (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(9), 739-742.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., et Idaomar, M (2008). Effets biologiques des huiles essentielles - un examen. *Toxicologie alimentaire et chimique*, 46 (2), 446-475.

Behlou, I. & Gilmore, M. S (2008). Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* 126, 1572-1581.

Bellifa, S (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen).

Beloin, C., Roux, A. & Svanborg, C (2005). *Escherichia coli*, biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 249-289.

Ben Abdallah, F., Lagha, R., & Gaber, A (2020). Propriétés d'inhibition et d'éradication du biofilm des huiles essentielles de plantes médicinales contre les isolats de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline Clinical. *Produits pharmaceutiques*, 13 (11), 369.

Benbelaid F, Khadir A, Abdoune MA, Bendahou M, Muselli A, Costa J (2014). Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4(6): 463–472.

Bendjersi, F. Z (2017). Etude de la composition chimique des extraits de *Laurus nobilis* L (Doctoral dissertation, Faculté de Chimie).

Boukhelifa, N., Perrin, ME, Huron, S., & Eagan, J (2017). Comment les travailleurs des données font face à l'incertitude : une étude de caractérisation des tâches. *Dans Actes de la conférence CHI 2017 sur les facteurs humains dans les systèmes informatiques* (pp. 3645-3656).

Bouras, M., Asehounne, K., & Roquilly, A (2018). Contribution des réponses des cellules dendritiques à l'immunosuppression induite par le sepsis et à la susceptibilité à la pneumonie secondaire. *Frontières en immunologie*, 9 , 2590.

Bourkhiss, B., Ouhssine, M., Hnach, M., Bourkhiss, M., Satrani, B., & Farah, A (2007). Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bull Soc Pharm Bordeaux*, 146, 75-84.

Brun Y and Bes M (2000). *Staphylococcus*. In Précis de bactériologie clinique, Eds Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C., ESKA. pp.783-830.

Brun Y, Bes M, Vandenesch F (2003). Actualités permanentes en bactériologie clinique. 55p.

Burt, S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94 (3), 223-253.

- Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., & Soro, C (2002).** Extraction du dioxyde de carbone supercritique et caractérisation de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (6), 1492-1496.
- Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ (2008).** The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol* 6:17–27.
- Chakroun M (2009).** Infections associées aux soins : Aspects cliniques. In Hygiène hospitalière et lutte contre les infections associées aux soins. *Les risques infectieux en milieu de soins. 2* : 27-36.
- Chibi, A (2015).** Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen (Doctoral dissertation).
- Chikhoun, A., Hazzit, M., Kerbouche, L., Baaliouamer, A., & Aissat, K (2013).** Tetraclinis articulata (Vahl) Masters essential oils: Chemical composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research*, 25(4), 300-307.
- Chouitah, O (2012).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H (1982).** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infectiology and Immunology*. 37: 318-326.
- Cimanga KK, Kambu , Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ (2002).** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol*. 79: 213-20.
- Conner, D.,Beuchat, L. R (1984).** Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of food science*, 49(2), 429-434.
- Cordeiro, L.; Figueiredo, P.; Souza, H.; Sousa, A.; Andrade-Júnior, F.; Medeiros, D.; Nóbrega, J.; Silva, D.;Martins, E.; Barbosa-Filho, J (2020).** et al. Terpinen-4-ol as an Antibacterial and Antibiofilm Agent against *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4531
- Couderc, C (2015).** Impact des antibiotiques sur l'histoire naturelle de la colonisation nasale par *Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Paris 6).
- Couture B (1990).** Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». *Vigot, Paris*. 15-32.
- Da Silveira, S. M., Luciano, F. B., Fronza, N., Cunha Jr, A., Scheuermann, G. N., & Vieira, C. R. W (2014).** Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 C. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 86-93.
- Diemond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leños-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Navales G (2010).** Production of icaADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infectious Diseases*. 10: 68.

- Djouahri, A., Saka, B., Boudarene, L., Benseradj, F., Aberrane, S., Aitmousa, S., Chelghoum, C., Lamari, L., Sabaou, N., Baaliouamer, A (2014).** In vitro synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential.
- Eddayab, Y (2012).** Détection des bactéries multirésistantes au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges (Doctoral dissertation, Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie).
- El Moussaouiti, M., Talbaoui, A., Gmouh, S., Aberchane, M., Benjouad, A., Bakri, Y., Kamdem, P (2010).** Chemical composition and bactericidal evaluation of essential oil of *Tetraclinis articulata* burl wood from Morocco. *J. Indian Acad. Wood Sci.* 7, 14–18.
- 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.
- Fasquelle R (1974).** Eléments de bactériologie médicale 9ème édition. Flammarion, Paris. 27-36.
- Folkesson, A., Haagenen, J. A. J., Zampaloni, C., Sternberg, C. and Molin, S (2008).** Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides, *Public Library of Science*, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989).** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42: 872-874.
- Funke, G., & Funke-Kissling, P (2005).** Performance of the new VITEK 2 GP card for identification of medically relevant gram-positive cocci in a routine clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 43(1), 84-88.
- Ghellai L (2016).** Étude de l'effet de trois huiles essentielles sur la formation de biofilm à *Staphylococcus aureus* responsable d'infections nosocomiales au C.H.U de Tlemcen (Doctoral dissertation).
- Hendry, JH, Simon, SL, Wojcik, A., Sohrabi, M., Burkart, W., Cardis, E., ... & Hayata, I (2009).** Exposition humaine à un rayonnement naturel élevé : que peut-elle nous apprendre sur les risques radiologiques, *Journal of Radiological Protection*, 29 (2A), A29.
- Hessas, T., & Simoud, S (2018).** Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus sp.*
- Højby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. and Bjarnsholt, T (2011).** The clinical impact of bacterial biofilms, *International Journal of Oral Sciences*, Vol. 3 No. 2, pp. 55-65
- Howard BJ and Kloos WE (1987).** Staphylococci. In: Howard BJ, Klass J II, Rubin SJ, Weissfeld AS, Tilton RC, eds. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. Mosby, Washington D.C. pp 231-244.
- Irie, Y., & Parsek, M. R (2008).** Quorum sensing and microbial biofilms. *Bacterial biofilms*, 67-84.
- J.H. Lee, J.H. Park, H.S. Cho, S.W. Joo, M.H. Cho, J (2013).** Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 29, 491-495.
- Jacobsen,S.M., Stickler,D.J.Mobley,M.L.& shitoliff,M.E (2008).**Complicated Catheterassociated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*.*Clin Microbiol Rev* 21,26-59.

- Jafri, H., Husain, F. M., & Ahmad, I (2014).** Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Ther Sci*, 1(1), 65-71.
- Kara terki, I (2014).** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen (Doctoral dissertation).
- Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K (2004).** Persisten cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett*. 230: 13-18.
- Kloos WE and Schleifer KH (1986).** Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Williams & Wilkins. pp.1013-1035.
- Kong, EF, Johnson, JK et Jabra-Rizk, MA (2016).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline associé à la communauté : un ennemi parmi nous. *Pathogènes PLoS* , 12 (10), e1005837.
- Kouider, H. A. D. J. A. D. J., & Assia, L. B (2017).** Synthèse bibliographique sur le thuya de berbérie [*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.]. *Geo-Eco-Trop*, 41(1), 13-27.
- Lakhdar, L (2015).** Évaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans*: étude in vitro (Doctoral dissertation).
- Le Minor, L., & Veron, M (1990).** Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*» J. Fleurette, 2, 773-794.
- Lee, K., Lee, JH, Kim, SI, Cho, MH et Lee, J (2014).** Activités anti-biofilm, anti-hémolyse et anti-virulence du poivre noir, du cananga, des huiles de myrrhe et du nérolidol contre *Staphylococcus aureus*. *Microbiologie appliquée et biotechnologie*, 98 (22), 9447-9457.
- Levy SB, Marshall B (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122–S129.
- Liberto MC, Matera G, Quirino A, Lamberti AG, Capicotto R, Puccio R, Barreca GS, Focà E, Cascio A, Foca F (2009).** Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques. *MicrobiologicalResearch*. 164 : 522-528.
- Liu CI, Liu GY, Song Y, Yin F, Hensler ME, Jeng WY, Nizet V, Wang AH, Oldfield E (2008).** A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* 319 :1391–1394.
- M.F. Innsan, M.H. Shahril, M.S. Samihah, O.S. Asma, S.M. Radzi, A.K.B. Jalil, M.N. Hanina (2011).** Pharmacodynamic properties of essential oils from *Cymbopogon* species. *Afr. J. Pharma. Pharmacol.*, 5(24), 2676-2679.
- Maruyama, K., Kawahara, N., Shin, M., Tago, M., Kishimoto, J., Kurita, H., ... & Kirino, T (2005).** Le risque hémorragique après radiochirurgie des malformations artérioveineuses cérébrales. *New England Journal of Medicine* , 352 (2), 146-153.
- Matan N, Rimkeeree H, Mawson AJ, Chompreeda P, Haruthaithanasan V, Parker M (2006).** Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int J Food Microbiol*.107: 180-185. 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.007.

- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* .24 (1):25-9.
- Matuszewski, M., Krolkowski, W., & Kivshar, YS (2009).** Interactions et transformations des solitons dans les milieux colloïdaux. *Examen physique A* , 79 (2), 023814.
- Merghni, A., Marzouki, H., Hentati, H., Aouni, M., & Mastouri, M (2016).** Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Current Research in Translational Medicine*, 64(1), 29-34.
- Microbiologie, E (2016).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline: Emergence et mécanismes de résistance (Doctoral dissertation, Université de Tebessa).
- Ministère de la santé, de la jeunesse et des sports. Comité technique des infections nosocomiales des infections liées aux soins (CTINILS) (2007).** Définition des infections associées aux soins, DGS/DHOS, CTINILS. Pages 11.
- Mouwakeh, A., Kincses, A., Nové, M., Mosolygó, T., Mohácsi Farkas, C., Kiskó, G., & Spengler, G (2019).** *Nigella sativa* essential oil and its bioactive compounds as resistance modifiers against *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*, 33(4), 1010-1018.
- Oubekka, S. D (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* : apport de la microscopie de fluorescence multimodale (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).
- Panahi, Y., Sattari, M., Babaie, A. P., Beiraghdar, F., & Ranjbar, R (2011).** The Essential Oils Activity of *Eucalyptus polycarpa*, *E. largiflorence*, *E. malliodora* and *E. camaldulensis* on *Staphylococcus aureus*. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(1), 43.
- Peacock, SJ et Paterson, GK (2015).** Mécanismes de résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus*. *Revue annuelle de biochimie*, 84.
- Pellerin JL, Gautier M, Le Loir Y (2010).** Identification de l'espèce au sein du genre. Monographies de Microbiologie. In Larpent JP, le Loir Y, Gautier M. *Staphylococcus aureus*. Editions Tec & Doc. Paris : Lavoisier, p. 1-20.
- Ponce, NM, Pujol, CA, Damonte, EB, Flores, ML, & Stortz, CA (2003).** Fucoïdanes de l'algue brune *Adenocystis utricularis* : méthodes d'extraction, activité antivirale et études structurales. *Recherche sur les glucides*, 338 (2), 153-165.
- Prescott L.M, Harley J.P, Klein D (2010).** Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université.
- Preuss, H. G., Echard, B., Dadgar, A., Talpur, N., Manohar, V., Enig, M., ... & Ingram, C (2005).** Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: in vitro and in vivo studies. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 15(4), 279-285.
- REBIAHI, S. A (2012).** Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibioresistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Doctoral dissertation).
- Rice, L. B (2016).** Antibiotic Resistance : Associations and Implications for Antibiotic Usage Strategies to Control Multiresistant Bacteria. *Antimicrobial Stewardship: Principles and Practice*, 80.

- Robert, D (2013).** *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive.
- Roux A and Ghigo JM (2006).** Les biofilms bactériens. Bull. Acad. Vét. France. 159(3):261-268.
- S. Chusri, K. Sompetch, S. Mukdee, S. Jansrisewangwong, T. Srichai, K. Maneenoon, S. Limsuwan, S.P. Voravuthikunchai (2012).** Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation by Traditional Thai Herbal Recipes Used for Wound Treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 159797.
- S. Prabuseenivasan, M. Jayakumar, S. Ignacimuthu (2006).** In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Comp. Alt. Med, 6, 39.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D (2015).** Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Compreminihensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491-509.
- Satrani, B., Farah, A., & Talbi, M (2004).** Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraite du bois de *Tetraclinis articulata* du Maroc. In *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique* (Vol. 97, No. 964, pp. 75-84).
- Sharifi, A., Mohammadzadeh, A., Zahraei Salehi, T., & Mahmoodi, P (2018).** Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of applied microbiology*, 124(2), 379-388.
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M (2009).** Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *Journal of medical microbiology*. 58: 1067-1073.
- Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T (2002).** A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 19 : 61-4. 10.1046/j.0902-0055.2003.00111. x.
- Tenke,P.Kovacs,B.,Jackel,M.& Nagy,E (2006).**The role of biofilm infection in urology.*World J Urol* 24,13-20.
- Touhami, A (2017).** Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. Université de Badji Mokhtar Annaba.
- Utili R, Durante-Mangoni E, Tripodi MF (2007).** Infection of intravascular prostheses: how to treat other than surgery. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 30 S : S42- S50.
- V. Thati, C.T. Hivannavar, S.M. Gaddad (2011).** Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad. *Indian. J.Med. Res*. 134, 704-708.
- Van Vuuren S and Viljoen A (2007).** Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr. J*. 22 : 540–544.
- Vincent-Boulétreau A (2004).** Infections nosocomiales : épidémiologie. In – Maîtrise des infections nosocomiales de A à Z ; Editions HEALTH&CO.

Yong, YY, Dykes, G., Lee, SM et Choo, WS (2019). Activité inhibitrice du biofilm des bétacyanines de la pitahaya rouge (*Hylocereus polyrhizus*) et de l'épinard rouge (*Amaranthus dubius*) contre les biofilms de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal de microbiologie appliquée*, 126 (1), 68-78.

Zahir, N., Sun, R., Gallahan, D., Gatenby, RA et Curtis, C (2020). Caractériser la dynamique écologique et évolutive du cancer. *Génétique de la nature*, 52 (8), 759-767.

Zaika LL (1988). Spices and herbs: their antibacterial activity and its determination. *J Food Saf.*, 23 : 97-118.

Ziebuhr W, Heilmann C, Götz F, Meyer P, Wilms K, Straube E, Hacker J (1997). Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun.* 65 : 890–896.

Zimmermann-Meisse, G (2016). Internalisation des leucotoxines de *S. aureus* dans les cellules cibles et conséquences cellulaires associées (Doctoral dissertation, Strasbourg).

Annexes

Annexe 1: Tests d'identification biochimique.

Test	Résultats	
	Positif	Négatif
Témoin	Rouge	-
GLU FRU MNE MAL	Rouge	Jaune
LAC		
XLT		
MEL		
Nit	NIT 1 + NIT 2 / 10 min	
	Incolore-rose pale	Rouge
Pal	ZYM A + ZYM B / 10 min	
	Incolore, beige-rosé, violet très pâle	Violet
VP	VP 1 + VP 2 / 10 min	
	Incolore-rose pâle	violet-rose
RAF	Rouge	Jaune
XYL		
SAC		
MDG		
NAG		
<u>ADH</u>	Jaune	Orange - rouge
<u>URE</u>	Jaune	Rouge – violet



Contents lists available at ScienceDirect

Current Research in Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/crbiot

In vitro antibacterial and biofilm inhibitory activity of the sawdust essential oil of *Tetraclinis articulata* (vahl) against catheter-associated *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Mohamed Achmit^{a,*}, Noura Aoussar^a, Fouad Mellouki^a, Rajaa Ait Mhand^a, María Dolores Ibáñez^b, María Amparo Blázquez^b, Mohamed Akssira^c, Khalid Zerouali^{d,e}, Naima Rhallabi^a

^a Research Unit of Microbiology and Bioactive Molecules, Laboratory of Virology, Microbiology, Quality, Biotechnology, Eco-toxicology and Biodiversity, Faculty of Sciences and Techniques, P.B. 146, Mohammedia, Hassan II University of Casablanca, Morocco

^b Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avenue Vicent Andres Estelles s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^c Laboratory of Physical Chemistry & Bioorganic Chemistry, URAC22, Faculty of Sciences and Techniques, P.B. 146, Mohammedia, Hassan II University of Casablanca, Morocco

^d Laboratory of Bacteriology, Virology and Hygiene, Ibn Rochd University Hospital, Casablanca, Morocco

^e Laboratory of Microbiology, Faculty of Medicine and Pharmacy, Hassan II University of Casablanca, Morocco



ARTICLE INFO

Keywords:
Staphylococcus aureus
Tetraclinis articulata
 Biofilm
 Essential oil
 Antibacterial activity
 Antibiofilm activity

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the chemical composition, antibacterial and antibiofilm activities of the essential oil of sawdust from root burl wood of *T. articulata*. Nine strains including 8 clinical isolates from catheters-related infections and one ATCC 25923 were tested. Twenty-seven different compounds were identified by GC-MS in the essential oil of *T. articulata* extracted by hydrodistillation. Carvacrol and cedrol were the principal compounds representing 34.37 ± 0.07 and 11.07 ± 0.09 respectively. The EO had a strong antibacterial activity against all strains including one Multidrug-Resistant (MDR) and two Methicillin-Resistant *S. aureus* strains. Inhibition Zone Diameter (IZD) values ranged from 25 to 44 mm and the MIC values, determined by microdilution method, ranged from 0.19 to 48 nL/mL. The EO had bactericidal effect and also exhibited at sub-lethal concentrations a very important inhibitory effect of biofilm formation of all strains.

1. Introduction

The catheter-related infections among hospitalized patients are frequently caused by staphylococci strains which play a crucial role in the persistence of chronic infections particularly those forming biofilm in host tissue and on medical implants (Prestinaci et al., 2015). Moreover, the increasing resistance of these bacteria to antibiotics makes treatment of infections with antibiotics more complicated. This alarming problem prompts constant searches for new and more effective therapeutic agents by screening various sources of molecules such as compounds of plant origin.

Tetraclinis articulata (Vahl) Masters (Cupressaceae), also called thuya, is native to northwestern Africa in the Atlas Mountains of Morocco, Tunisia and Algeria, with two small outlying populations in Malta, and near Cartagena in southeast Spain (Achak et al., 2009). In Morocco, *T. articulata* plays a very important socio-economic role

satisfying several needs of populations (wood products, sandarac gum, tannins and vegetal tar). Furthermore, different parts and preparations of *T. articulata* are used in popular medicine for their multiple therapeutic properties mainly against respiratory and intestinal infections, childhood fevers, stomach pain, hypertension and diabetes (Bourkhiss et al., 2007). On other hand, many works reported that *T. articulata* is a rich source of phytochemicals having a broad spectrum of biological properties such antibacterial, antifungal, insecticidal, cytotoxic, anti-inflammatory and antioxidant activities (Rached et al., 2018; Sadiki et al., 2017; Bourkhiss et al., 2016; Bourkhiss et al., 2010; El Moussaoui et al., 2010).

The objective of the present study was to determine for the first time the antibacterial and antibiofilm activities of the EO of sawdust from root burl wood of *T. articulata*, against clinical strains of *S. aureus* isolated from catheter-related infections from patients undergoing treatment at a public hospital in Casablanca (Morocco).

* Corresponding author.

E-mail address: achmitmohammed@gmail.com (M. Achmit).

<https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.12.001>

Received 30 September 2020; Revised 11 November 2020; Accepted 20 December 2020

Available online xxx


2590-2628/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V.

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



Article

Biofilm Inhibition and Eradication Properties of Medicinal Plant Essential Oils against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates

Fethi Ben Abdallah ^{1,2,*} , Rihab Lagha ^{1,2} and Ahmed Gaber ^{1,3}

¹ Department of Biology, College of Sciences, Taif University, P.O. Box 11099, Taif 21944, Saudi Arabia; rihab.k@tu.edu.sa (R.L.); a.gaber@tu.edu.sa (A.G.)

² Unité de Recherche, Virologie & Stratégies Antivirales, UR17ES30, Institut Supérieur de Biotechnologie, University of Monastir, Monastir 5000, Tunisia

³ Department of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza 12613, Egypt

* Correspondence: fetyben@tu.edu.sa

Received: 16 October 2020; Accepted: 4 November 2020; Published: 6 November 2020



Abstract: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is a major human pathogen that poses a high risk to patients due to the development of biofilm. Biofilms, are complex biological systems difficult to treat by conventional antibiotic therapy, which contributes to >80% of humans infections. In this report, we examined the antibacterial activity of *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis*, and *Thymus zygis* medicinal plant essential oils against MRSA clinical isolates using disc diffusion and MIC methods. Moreover, biofilm inhibition and eradication activities of oils were evaluated by crystal violet. Gas chromatography–mass spectrometry analysis revealed variations between oils in terms of component numbers in addition to their percentages. Antibacterial activity testing showed a strong effect of these oils against MRSA isolates, and *T. zygis* had the highest activity succeeded by *O. majorana* and *R. officinalis*. Investigated oils demonstrated high biofilm inhibition and eradication actions, with the percentage of inhibition ranging from 10.20 to 95.91%, and the percentage of eradication ranging from 12.65 to 98.01%. *O. majorana* oil had the highest biofilm inhibition and eradication activities. Accordingly, oils revealed powerful antibacterial and antibiofilm activities against MRSA isolates and could be a good alternative for antibiotics substitution.

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; essential oils; *Origanum majorana*; *Rosmarinus officinalis*; *Thymus zygis*; antibacterial; biofilm inhibition and eradication

1. Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is considered a principal human pathogen and the most common cause of nosocomial infections. MRSA causes several diseases ranging from skin and soft tissue infections to serious invasive infections such as pneumonia, bacteremia, endocarditis and osteomyelitis [1]. The number of MRSA infections, which are more frequently associated with mortality than other bacterial infections, has increased considerably over recent years. *S. aureus* carries 20–40% mortality at 30 days despite appropriate treatment [2].

MRSA poses a high risk to patients due to the development of biofilm [3]. Biofilm is considered as major virulence factor and is an organized structure built by almost all bacteria that is composed of nucleic acids, lipids, proteins, and polysaccharides [4]. Biofilms contribute to >80% of human infections and *S. aureus* is considered as the leading species in biofilm-associated infections [5]. In Biofilm, MRSA like other bacteria, become more persistent in the host organism, environment, and medical

Accepted Manuscript

Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains

Abderrahmen Merghni, Emira Noumi, Ons Hadded, Neyla Dridi, Harsh Panwar, Ozgur Ceylan, Maha Mastouri, Mejd Snoussi

PII: S0882-4010(18)30160-8

DOI: [10.1016/j.micpath.2018.03.006](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.006)

Reference: YMPAT 2822

To appear in: *Microbial Pathogenesis*

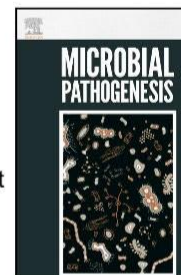
Received Date: 29 January 2018

Revised Date: 2 March 2018

Accepted Date: 5 March 2018

Please cite this article as: Merghni A, Noumi E, Hadded O, Dridi N, Panwar H, Ceylan O, Mastouri M, Snoussi M, Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Microbial Pathogenesis* (2018), doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.006.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and a legal disclaimers that apply to the journal pertain.





Available online at
ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com



Original article

Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections



Les activités antibactériennes et antibiofilm de Laurus nobilis L. huile essentielle contre Staphylococcus aureus tensions associées à infections orales

A. Merghni^{a,*}, H. Marzouki^a, H. Hentati^b, M. Aouni^a, M. Mastouri^{a,c}

^aLaboratory of infectious diseases and biological agents (LR99ES27), faculty of pharmacy, Monastir university, avenue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisia

^bBuccodental surgery department of Monastir dental clinic, laboratory of oral health and orofacial rehabilitation (LR12ES11), Monastir, Tunisia

^cLaboratory of microbiology, university hospital of Fattouma Bourguiba, Monastir, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 20 June 2015
 Accepted 30 October 2015
 Available online 4 December 2015

Keywords:
Laurus nobilis L.
 Essential oil
 GC–MS analysis
 Anti-staphylococcal activity
 Antibiofilm activity

Mots clés :
Laurus nobilis L.
 Huile essentielle
 CG–SM
 Activité anti-staphylococcique
 Activité antibiofilm

ABSTRACT

Background. – *Laurus nobilis* L. is an aromatic herb with relevant medicinal properties due to its important chemical composition and its potential therapeutic effects. In this study, we investigate the chemical composition, the antibacterial and the antibiofilms activities of Tunisian *L. nobilis* L. essential oils against clinical *Staphylococcus aureus* strains.

Methods. – The chemical composition of *L. nobilis* L. essential oils was analysed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS). The antibacterial activity of *L. nobilis* L. essential oils was evaluated in vitro against oral *S. aureus* ($n = 21$) strains using broth microdilution method. The antibiofilm activity was assessed via Crystal Violet staining and MTT assays.

Results. – Our results revealed that GC–MS assay exhibited 1,8-Cineole, methyl eugenol and α -terpinyl acetate as the major compounds in the essential oils. Moreover, the essential oil from Sousse exhibited the best bactericidal activity (MICs values ranged from 3.91 to 15.62 mg m⁻¹). Furthermore, this oil showed a strong biofilm inhibition effect above 70%, from a low sub-inhibitory concentration (1/16 \times MIC). MTT assay revealed that both essential oils displayed an excellent antibiofilm activity with eradication percentages ranging from 79.6 \pm 2.27 to 95.2 \pm 0.56.

Conclusion. – Our finding demonstrated that *L. nobilis* L. essential oils are able to inhibit oral *S. aureus* strains with important antibiofilm efficacy. It could have a promising role in the prevention of oral diseases.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

R É S U M É

Laurus nobilis L. est une plante aromatique avec des propriétés médicinales pertinentes en raison de sa richesse en composantes chimiques importantes et ses effets thérapeutiques potentiels. Dans cette étude, nous avons évalué la composition chimique, l'effet antibactérien et antibiofilm d'huiles essentielles tunisiennes *L. nobilis* L. contre des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de la cavité buccale.

Méthodes. – La composition chimique des huiles essentielles de *L. nobilis* L. a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectrométrie de masse (CG–SM). L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée in vitro contre les souches de *S. aureus* ($n = 21$) en utilisant la méthode de microdilution de bouillon (MH). L'activité antibiofilm a été évaluée par coloration au cristal violet et par réduction de MTT.

Résultats. – Les résultats d'analyse par CG–SM ont montré que les principaux composés des huiles essentielles de *L. nobilis* L. sont représentés par : 1,8-cinéole, l'eugénol de méthyle et l'acétate α -terpinyle.

* Corresponding author.

E-mail address: abderrahmen_merghni@yahoo.fr (A. Merghni).



Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*

Huma Jafri, Fohad Mabood Husain and Iqbal Ahmad

Department of Agricultural Microbiology, Aligarh Muslim University, Aligarh-202002

Received on: 04-Nov-2014

ABSTRACT

Increased emergence and spread of multidrug resistant bacteria including methicillin resistant *S. aureus*(MRSA) and their biofilms have created immense clinical problem in treatment of bacterial diseases. Biofilms are difficult to eradicate with standard antimicrobial treatments due to high antibiotic resistance level compared to free living cells. Biofilm formation by isolated *S. aureus* was first assayed by macro tube and microtitre plate assays. We demonstrate here that the selected essential oils and some of their compounds (eugenol, cinnamaldehyde, citral and geraniol) showed varying levels of antibacterial activity and sub-MICs of these agents effectively inhibit biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains. The order of antibacterial activity was found as *T. vulgaris*> *S. aromaticum*> eugenol> cinnamaldehyde> citral> *C. citratus*> *C. martini*> geraniol> *C. nardus*. The antibiofilm activity of tested oil (*Thymus vulgaris*) and compounds (eugenol) at 2xMIC values indicated their potential therapeutic application alone or in combination with antibiotics for treating biofilm associated clinical problems caused by *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Antibacterial, antibiofilm activity, biofilm, essential oils, *S.aureus*, MRSA

INTRODUCTION

An increase in antibiotic resistant bacteria is a major threat to world population with recurrence of infectious diseases. Among problematic multidrug resistant bacterial pathogens, *Staphylococcus aureus* has occupied prominent place. In the recent decades, an increase in the number of Staphylococcal infection has been observed both in hospital and community. *S. aureus* has caused 278,000 hospitalization and 19000 deaths annually in the United States alone.^{1,2} Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) has been recognized as a major nosocomial pathogens worldwide. MRSA pose a special problem due to its intrinsic resistant to β -lactam antibiotics, they have tendency to develop resistance to other unrelated antibiotics. Production of β -lactamases and *mecA* gene products are two widely known important resistance mechanisms to β -lactam drugs.³ Presently,

the only effective agents for treatment of MRSA infections are Vancomycin, daptomycin and linezolid.^{4,5} Therefore, there is greater need to develop new drugs with novel mode of action or new strategy for combating biofilm associated infections caused by drug resistant bacteria.

Biofilms are surface associated multicellular communities in which cell are held together by means of a self-produced extracellular matrix. *S. aureus* frequently forms biofilm in clinical setting most often catheters and other implanted devices but also in chronic wounds.^{6,7} Poor antimicrobial penetration, nutrient limitation, adaptive stress responses, phenotypic variability and persist cell formation all contribute towards making biofilm eradication difficult.^{6,8} Thus new anti-MRSA therapeutic strategies is needed to be developed.

Plant essential oils have been used for hundreds of years a natural medicine to combat a variety of bacterial infection and other ailments. Several essential oils have been documented for their antibacterial, antifungal, antimutagenic and anti-quorum sensing activities.⁹⁻¹⁴ However little efforts have been made to assess their antibiofilm activity and therapeutic potential against bacterial infection.^{8,9,12} Antimicrobial action of essential oils has been attributed due to the damage to cell wall and cell membrane leading to cell lysis leakage of cell contents and inhibition of proton motive force.¹⁵ Many essential oils have relatively low mammalian toxicity and degrade quickly making them safe and ecofriendly.

Prof. Iqbal Ahmad
Department of Agricultural Microbiology, Aligarh Muslim
University, Aligarh-202002-UP, INDIA.
Tel: +91 9412371170; Fax: +91 571 2703516
E-mail: ahmadiqbal8@yahoo.co.in

Cite as: *J. Biomed. Ther. Sci.*, 2014, 1(1), 65-71.

©IS Publications

ملخص

Staphylococcus aureus هو بكتريا متعايشة للإنسان التي تستوطن الجلد والأغشية المخاطية ولكن يمكن ان تصبح ممرضة وتسبب مجموعة من الإصابات وقد طور هذا نوع آليات المقاومة وجها لوجه المضادات الحيوية على وجه التحديد الميثيسيلين SARM هو الممرض المستشفوي مسؤول حصرا على زيادة معدلات الأمراض و الوفيات في المرافق الصحية في جميع أنحاء العالم .
هذا العمل هو توليف خمسة أعمال تتعلق بتقييم تأثير إحدى عشر زيوت أساسية على سلالات *S. aureus* مكتسبة من المستشفيات و مكون biofilm وقد تم تحديد السلالات المقومة للمضادات الحيوية عن طريق الإختبار antibiogramme في حين أن الإختبارات الزيوت الأساسية تمت بواسطة طريقة aromatoqramme و طريقة diffusion en puits. أظهرت النتائج أن الزيت الأساسي *Eucalyptus globulus* لديه نشاط مضاد للجراثيم و مضاد biofilm , قوي مقارنة مع الآخرين و مع ذلك *Origanum majorana* بارعة أيضا في القضاء على biofilm.

الكلمات المفتاحية : *S. aureus* , متعددة المقاومة, SARM, الزيوت الأساسية , biofilm , CMI, CMB, CMIB, نشاط مضاد الجراثيم , نشاط ضد biofilm.

Résumé

Staphylococcus aureus est une bactérie commensale de l'homme qui colonise la peau et les muqueuses, mais elle peut devenir pathogène et cause un large éventail d'infections. Cette espèce a développé des mécanismes de résistance vis-à-vis aux antibiotiques spécialement la méthicilline.

S. aureus résistant à la méthicilline est un agent pathogène exclusivement nosocomial, responsable de l'augmentation des taux de morbidité et de mortalité dans les établissements de santé partout dans le monde.

Le présent travail est une synthèse de cinq travaux portant sur évaluation de l'effet inhibiteur de onze huiles essentielles sur des souches de *S. aureus* résistantes d'origine hospitalières et formatrices de biofilm. La détermination de la résistance aux antibiotiques des souches a été faite par antibiogramme, tandis que les tests des huiles essentielles ont été faits par la méthode d'aromatoqramme et la méthode de diffusion en puits.

Les résultats montrent que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* possède une forte activité antibactérienne et antibiofilm en comparaison avec les autres, Toutefois, *Origanum majorana* à elle aussi brillé dans l'activité éradicatrice du biofilm.

Mots clés : *S. aureus*, multirésistance, SARM, huile essentielle, biofilm, CMI, CMB, CMIB, activité antibactérienne, activité antibiofilm.

Abstract

Staphylococcus aureus is a commensal human bacterium that colonizes the skin and mucous membranes. It colonizes the skin and mucous membranes, but it can become pathogenic and cause a wide range of infections. This species has developed resistance mechanisms to antibiotics, especially methicillin.

Methicillin-resistant *S. aureus* is an exclusively nosocomial pathogen, responsible for increasing morbidity and mortality rates in health care facilities worldwide.

The present work is a synthesis of five studies evaluating the inhibitory effect of eleven essential oils on resistant *S. aureus* strains of hospital origin and biofilm forming. The antibiotic resistance of the strains was determined by antibiogram, while the essential oils were tested by the aromatoqramme method and the well diffusion method.

The results show that the essential oil of *Eucalyptus globulus* has strong antibacterial and antibiofilm activity compared to the others, However, *Origanum majorana* also shone in the biofilm eradicating activity.

Key words: *S. aureus*, multidrug resistance, MRSA, essential oil, biofilm, MIC, BMC, BICM, antibacterial activity, antibiofilm activity.