



République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de Biologie

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement « LAMAABE ».

## Mémoire

*Présenté par :*

*Mlle : HAKIKI Manel*

*Mlle : HABI Samia*

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie**

**Option : Microbiologie Fondamentale**

## Thème

Contribution à l'élaboration d'un produit à usage cutané à base d'huiles essentielles pour lutter contre les souches *Staphylococcus aureus* multirésistantes

**Soutenu le 22/06/2023**

Devant le jury :

**Président :** M.S. BARKA

Professeur

U. de Tlemcen

**Examineur :** M. BENDAHOU

professeur

U. de Tlemcen

**Encadreur :** A. KHADIR

Maître de Conférences Classe « B »

U. d'Oran

**Année universitaire 2022/2023**

# Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes piliers de ma vie, mes guides et mes plus grands soutiens « **Mes parents** » Cette dédicace est une humble reconnaissance de tout ce que vous avez fait pour moi.

A mes sœurs **Rihem**, **Wisseem** et **Nihel** mes confidentes et mes complices, qui ont toujours été là pour moi, apportant de la joie et de l'amour à chaque instant.

A ma tante **Lamia** et son mari **Bentaleb** et mes cousins, merci pour votre générosité et soutien.

A mes grands-parents qui m'ont facilité la tâche avec leurs douâas.

À ma merveilleuse meilleure amie et binôme **Samia**, Complice infatigable de mes aventures, cinq merveilleuses années que nous avons partagé des rires et des larmes, Succès et défis, dans ce parcours extraordinaire. À notre amitié éternelle et à nos souvenirs infinis.

A tous ce que qui me portent de l'amour et que j'aime en retour.

**Manel**

**Je dédie ce travail à :**

A mes **chers parents**, qui m'ont soutenue tout au long de ce chemin. Grâce à leur confiance en moi j'ai trouvé la force à réaliser ce rêve.

A mes frères **Boubeker** et **Fethi**, mes guides, mes complices. Votre présence est une source de réconfort et de force.

A mes sœurs et à leurs époux, **Ilhem** et **Ghouti** ainsi que **Nassima** et **Djelloul**. Merci d'être à mes côtés.

A mes petits neveux et nièces, **Meriem**, **Hadjer**, **Younes**, **Khaled** et **Chakib**.

A mes amies **Rihem**, **Sihem** et **Dounia** qui ont été là à chaque étape de ma vie étudiante.

Et enfin, à ma meilleure amie et binôme **Manel**, celle qui a partagé avec moi les joies, les peines. Tu es bien plus qu'une amie, tu es ma partenaire de complicité. Notre amitié est un trésor que je chérirai éternellement

**Samia**

## Remerciements

Nous tenons à adresser notre sincère remerciement à notre directeur de thèse monsieur **KHADIR Abdel Mounaim** maître de conférences classe « A » à l'université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, pour avoir accepté de nous encadrer, nous sommes extrêmement reconnaissantes pour sa patience, sa disponibilité et ces judicieux conseils.

Nous exprimons notre profonde gratitude à tous les membres du jury qui ont eu la gentillesse d'examiner attentivement notre travail.

Monsieur **BARKA Mohammed Salih**, professeur au département de biologie, université d'Abou Bekr Belkaid Tlemcen. D'avoir accepté de présider ce jury.

Monsieur **BENDAHOU Mourad**, professeur au département de biologie, université d'Abou Bekr Belkaid Tlemcen. D'avoir accepté d'examiner ce travail.

Pour conclure, nous souhaitons exprimer notre gratitude à tous les enseignants qui ont contribué à notre parcours académique.

# Table des matières

<i>Introduction</i> .....	1
<b>Partie 01 : Synthèse bibliographique</b> .....	
<b>Chapitre 01 : Présentation de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	
<b>1 Généralités</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 Caractères morphologiques .....	4
1.1.2 Caractères culturels .....	4
1.1.3 Caractères biochimiques .....	5
1.2 Taxonomie et classification.....	6
1.3 Habitat.....	6
<b>2 Pouvoir pathogène</b> .....	<b>7</b>
2.1 Les infections.....	7
2.2 Les toxines .....	7
2.2.1 Les toxines formant des pores ou « pore-forming toxins » (PFT) .....	8
2.2.2 Les toxines exfoliatives (ET) .....	8
2.2.3 Les superantigènes .....	9
<b>3 Diversité génétique et transmission</b> .....	<b>9</b>
<b>4 Résistance aux biocides</b> .....	<b>10</b>
<b>5 Résistance aux antibiotiques</b> .....	<b>10</b>
5.1 La résistance naturelle .....	11
5.2 La résistance acquise.....	11
5.3 Mécanismes de résistance .....	12
<b>6 Les biofilms</b> .....	<b>13</b>
6.1 Formation des biofilms .....	13
6.2 Composition du biofilm.....	15
6.3 Le quorum sensing .....	15
6.4 Les biofilms et l'antibiorésistance.....	16
<b>Chapitre 02 : Les huiles essentielles</b>	
1.1 Généralités .....	17
1.2. Méthodes d'obtention des huiles essentielles .....	17
1.4. Activité antibactérienne .....	18
<b>2 Les plantes aromatiques</b> .....	<b>19</b>

<b>2.1 Utilisation des plantes médicinales comme source d'agents antimicrobiens</b>	<b>19</b>
2.1.1 <i>Daucus crinitus</i> .....	20
2.1.2 <i>Artemisia arborescens</i> .....	20
2.1.3 <i>Ruta chalepensis</i> .....	20
2.1.4 <i>Lavendula dentata</i> .....	21
2.1.5 <i>Thymus fontanesii</i> .....	21
<b>2.2 Combinaison des huiles essentielles lutte contre les <i>S. aureus</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3 Produit pharmaceutique à usage cutané</b> .....	<b>22</b>

## **Partie 02 : Matériels et méthodes**

<b>1 Matériel</b> .....	<b>24</b>
1.2 Matériel de laboratoire .....	24
1.3 Matériel biologique.....	25
1.4 Milieux de culture .....	25
1.4.1 Milieux de culture solide.....	25
1.4.2 Milieux de culture liquide.....	25
1.5 Produits chimiques et colorants .....	25
1.6 Matériel végétal.....	26
<b>2 Méthodes</b> .....	<b>27</b>
2.1 Repiquage des souches de <i>S. aureus</i> .....	27
2.2 Identification des souches isolées .....	27
2.2.1 identification macroscopique.....	27
2.2.2 Identification microscopique.....	27
2.2.3 Identification biochimique .....	27
2.4 Antibiogramme .....	28
2.5 Obtention de l'huile essentielle.....	29
2.6 Méthode d'aromatogramme.....	30
2.7 Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	31
2.7.1 Préparation des dilutions.....	31
2.7.2 Préparation de l'inoculum.....	31
2.8 Etude de la combinaison entre les huiles essentielles des plantes étudiées ..	31
2.9 Formulation du produit à usage cutané .....	32

## **Partie 03 : Résultats et discussions**

### ***1. Résultat de l'identification***

<b>2. Résultats du test d'antibiogramme .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Résultats d'aromatogramme.....</b>	<b>37</b>
<b>4. Résultats des CMI .....</b>	<b>38</b>
<b>5. Résultats des combinaisons des huiles essentielles.....</b>	<b>41</b>
<b>6. Formulation du produit à usage cutané.....</b>	<b>42</b>
<b><i>Conclusion</i> .....</b>	<b>44</b>
<b><i>Références bibliographiques</i>.....</b>	<b>46</b>
<b><i>Annexes</i> .....</b>	<b>53</b>

## Liste des abréviations

**SARM** : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline.

**MRSA** : Methicillin resistant staphylococcus aureus.

**MSSA** : Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus.

**SCT** : Syndrome de choc toxique.

**PFT** : Pore- forming toxins.

**ET** : Exfoliatives toxins.

**PSM** : Phenol-soluble modulín.

**ET A** : Exfoliatives toxins A.

**ET B** : Exfoliatives toxins B.

**ET D** : Exfoliatives toxins D.

**SSSS** : Staphylococcal scaled skin syndrome.

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité.

**TCR** : T cell receptor.

**TSST** : Toxic shock syndrome toxin.

**SAg** : Superantigène.

**MGE** : Mobile genetic element.

**QAC** : Quaternary ammonium compound.

**CA-SFM** : Comité d'antibiogramme- société française de la microbiologie.

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute.

**SCC mec** : Cassette chromosomique staphylococcique.

**MDR** : Multi Drug resistance.

**PIA** : Polysaccharide intercellular adhesin.

**AHL** : Acyl homoserine lactone.

**UFC** : Unité formant colonie.

**HE** : Huile essentielle.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**BN** : Bouillon nutritif.

**BHIB** : Brain heart infusion broth.

**Ox** : Oxacilline.

**Van** : Vancomycine.

**Ofx** : Ofloxacin.

**Tm** : Triméthoprime.

**Fox** : Céfoxitine.

**PBP2a** : Penicillin Binding protein 2a.

**ATCC** : American Type Collection Culture.

**RAM** : Resistance aux antimicrobiens.

**MSCRAMM** : microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules.

**FICI** : fraction inhibitory concentration index

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> Culture de <i>S. aureus</i> sur gélose Chapman .....	5
<b>Figure 02 :</b> Modèle de développement du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
<b>Figure 03 :</b> Mécanismes d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne ...	18
<b>Figure 04:</b> Appareil Clevenger d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation .....	29
<b>Figure 05:</b> Méthode d'aromatogramme illustre.....	30
<b>Figure 06:</b> Sensibilité des souches étudiées aux antibiotiques .....	36
<b>Figure 07:</b> Le produit final.....	42

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01 :</b> Classification et stations des plantes testées.....	26
<b>Tableau 02 :</b> Résultats de l'identification microscopique et biochimique.....	34
<b>Tableau 03:</b> Résultat du test de sensibilité des souches .....	35
<b>Tableau 04 :</b> Les diamètres des zones d'inhibition données par les huiles essentielles des cinq plantes (mm) .....	37
<b>Tableau 05 :</b> Les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles (%) ..	39
<b>Tableau 06 :</b> Résultats des combinaisons des HE représentés en FiCi .....	41

# ***Introduction***

### **Introduction**

Les bactéries ont un rôle essentiel dans de nombreux aspects de la vie sur Terre. Elles sont présentes dans différents environnements, tels que le sol, l'eau, l'air, ainsi que sur les organismes vivants, y compris les humains. Elles jouent plusieurs rôles tels que leur décomposition importante dans les écosystèmes et le recyclage des éléments nutritifs, le cycle des éléments (le carbone, l'azote, le soufre et le phosphore), établissement des relations symbiotiques bénéfiques avec d'autres organismes, production des vitamines essentielles. Bien que la plupart des bactéries soient inoffensives ou bénéfiques, certaines peuvent causer des maladies chez les humains, les animaux et les plantes. Les bactéries pathogènes peuvent développer des adaptations pour coloniser l'hôte, éviter le système immunitaire et produire des toxines nocives, leur étude est essentielle pour comprendre les mécanismes des maladies infectieuses et développer des stratégies de prévention et de traitement. Principalement la bactérie *Staphylococcus aureus* communément appelé staphylocoque doré, est une bactérie pathogène qui peut causer une variété d'infections, allant des infections mineures aux infections potentiellement mortelles, telles que les infections sanguines ou les pneumonies.

Malheureusement, de nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* sont devenues résistantes à de multiples antibiotiques couramment appelées SARM, La transmission du SARM se fait principalement par contact direct avec des personnes infectées ou par contact avec des surfaces contaminées par les bactéries.

Les facteurs de risque de l'infection à SARM comprennent des séjours prolongés à l'hôpital, des antécédents d'infections récurrentes, des blessures cutanées, des interventions chirurgicales, des traitements fréquents par antibiotiques et une faible immunité.

La diversité et la capacité d'adaptation de ces bactéries rend le traitement des infections à SARM de plus en plus complexe en raison de la résistance aux antibiotiques. Dans certains cas, des antibiotiques spécifiques tels que la vancomycine ou la daptomycine (**Heidary, Khosravi et al. 2018**) peuvent être utilisés, mais il est important de prendre en compte la sensibilité aux antibiotiques spécifique à chaque souche.

Face à cette problématique, la recherche se tourne vers des alternatives potentielles, et une approche intéressante dans l'utilisation des huiles essentielles. Les huiles essentielles sont des extraits naturels de plantes qui possèdent de nombreuses propriétés antibactériennes.

Plusieurs études scientifiques ont démontré l'effet inhibiteur des huiles essentielles contre les staphylocoques, y compris *Staphylococcus aureus* résistant aux antibiotiques. Ces huiles essentielles peuvent agir de différentes manières, en perturbant les membranes cellulaires des bactéries ou en inhibant leurs mécanismes de résistance. Pour cette raison, nous avons pensé à contribuer dans l'élaboration d'un produit à base d'huiles essentielles extraites des plantes provenant de l'Algérie, ces plantes sont *Docus crinitus*, *Artemisia arborescens*, *Ruta chalpensis*, *Lavendula dentata*, *Thymus fontanesii*.

Nous allons faire des tests en faisant des antibiogrammes, des aromagrammes, la détermination des concentrations minimales inhibitrices de ces huiles essentielles et la combinaison entre eux dans le but de savoir la capacité de ces huiles essentielles à inhiber ces bactéries résistantes à la méticilline afin de pouvoir réaliser ce produit à usage cutané qui va t'être formulé à la fin de ce travail en fonction des résultats obtenus.

# ***Synthèse bibliographique***

## **Partie I. Synthèse bibliographique**

### **Chapitre I : Présentation de l'espèce *Staphylococcus aureus***

La bactérie *Staphylococcus aureus*, également nommée staphylocoque doré en référence à la couleur or des colonies qu'elle forme, a été décrit pour la première fois en 1880 par **Louis Pasteur**.

#### **1 Généralités**

##### **1.1.1 Caractères morphologiques**

Ce sont des Cocci à Gram positif sphériques et immobiles de 0,8-1  $\mu\text{m}$ , elles peuvent être isolées en petits amas, en diplocoques, en chaînettes ou en grappes « grappe de raisin ». La plupart des *aureus* sont capsulées mais peuvent perdre leur capsule après culture (yves,2009).

##### **1.1.2 Caractères cultureux**

Les staphylocoques dorés possèdent une bonne croissance sur les milieux usuels à 37 °C en 18 à 24h (culture entre 10 et 45 °C). Les colonies ont été lisses, arrondies d'un diamètre de 1 à 3 mm, opaques, bombées parfois pigmenté d'un jaune-orange sur la gélose ordinaire. Sur la gélose profonde *S. aureus* pousse sur toute la hauteur du tube (caractère Aero-anaérobie facultatif), pour les isoler on utilise le milieu Chapman comme milieu sélectif.

En bouillon, la culture forme un trouble uniforme abondant, des fois un dépôt ou bien un voile en surface (Yves et Michel 2009).



**Figure 01** : Culture de *S. aureus* sur gélose Chapman (Sagar, 2022).

### 1.1.3 Caractères biochimiques

L'espèce *staphylococcus aureus* est aéro-anaérobie facultatif à catalase positif capable ainsi de produire l'acétoïne, l'ADH, l'hémolyse et la thermonucléase. En effet, elle métabolise plusieurs sucres tel que : l'amidon, glucose, fructose, galactose, ribose, lactose. Le test phosphatase alcaline est positif pour *S. aureus*. Elle a la capacité de réduire les nitrates en nitrites (Gautier, 2010).

*S. aureus* est caractérisée par la production d'une staphylocoagulase (fauchere et al, 2002) dont elle permet de distinguer les souches potentiellement pathogènes car elle joue un rôle majeur dans le pouvoir pathogène des staphylocoques en leur permettant d'agir contre les anticorps polonisants et la phagocytose par les leucocytes (yves,2009). Ainsi *S. aureus* peut produire d'autres nombreuses enzymes tels que les protéases, lipases, coagulases libres ou liées.

## 1.2 Taxonomie et classification

Selon l'ouvrage de la taxonomie bactérienne Bergey's Manuel of systematic bacteriology. L'espèce *S. aureus* est classée parmi les bactéries à coloration Gram positive pauvres en GC. (**Brenner et al , 2004**)

Phylum : Firmicutes.

Classe : Bacilli.

Ordre : Bacillales.

Famille : Staphylococcaceae.

Genre : Staphylococcus.

Espèce : *Staphylococcus aureus*.

## 1.3 Habitat

Il a été trouvé que la peau et les muqueuses de l'homme et les animaux à sang chaud sont l'habitat principal des staphylocoques. Ils peuvent être trouvés aussi dans la bouche, les voies respiratoires supérieures, les glandes mammaires ainsi que le tractus intestinal et urogénital (**Passerat et al, 2009**), (**Hadil, 2022**).

La porte d'entrée de cette espèce commensale est plus particulièrement cutanée (point de pénétration d'un cathéter, une plaie, excoriation) (**Etienne et Vandenesch 2003**).

Une étude prospective a été menée sur le portage nasal des *S. aureus* a démontré qu'il existe trois types de portages :

- **Porteur persistant** dont la charge bactérienne  $>10^3$  UFC.
- **Porteur intermittent** : charge bactérienne entre  $10^2$  et  $10^3$  UFC.
- **Non porteur** : négativité de la culture sur écouvillon nasal. (**ABID, Toumi et al, 2022**)

## **2 . Pouvoir pathogène**

### **2.1 . Les infections**

*S. aureus* est également responsable d'infections variées aussi bien en milieu communautaire qu'hospitalier. Le pouvoir pathogène de *S. aureus* est lié à l'expression de nombreux facteurs de virulence. On distingue schématiquement deux types de syndromes cliniques selon les symptômes qui sont liés à l'action directe de la bactérie ou à l'action de toxines à distance du site de l'infection :

#### **Les infections suppuratives et les infections toxiniques(Nhan, Gillet et al. 2012)**

En tant qu'agent pathogène sa compétence est attribué à son armement de facteurs de virulence qui sont les toxines secrétées, jouant un rôle important, capables d'endommager les membranes cellulaires de l'hôte en dégradant les connexions intercellulaires ou bien en modulant des réponses immunitaires.

Les staphylocoques sont liés à certaines maladies telles que le syndrome de choc toxique (SCT), syndrome de la peau échaudée, Parmi les infections il y a :

**Les infections suppuratives** ce sont des infections superficielles cutanéomuqueuses comme les folliculites, les furoncles, les impétigos, les sinusites et les otites qui sont les plus fréquentes. La complication de ces infections peut augmenter par une diffusion hématogène de la bactérie, ces septicémies sont à l'origine de localisation viscérales pleuropulmonaires pour l'abcès bulleux, ostéoarticulaires (les ostéomyélites), urinaires (phlémon per nephretique ou cardiaque (endocardites aiguës). (**Vincenot, Saleh et al, 2008**)

### **2.2. Les toxines**

Les principales toxines de *S. aureus* sont divisées en trois principaux groupes :

Les toxines porogènes (PFT).

Les toxines exfoliatives (ET).

Les superantigènes.(**Ahmad-Mansour, Loubet et al, 2021**)

### **2.1.1 Les toxines formant des pores ou « pore-forming toxins » (PFT)**

Forment des pores au niveau des membranes cellulaires, elles sont secrétées sous forme de protéines libres hydrosolubles qui est leur principale caractéristique.

En fonction des structures tridimensionnelles on distingue deux grands groupes de PFTs :

-les alpha-PFTs : formée d'une simple hélice alpha hydrophobe qui regroupe les **Delta-hémolysine** composé de 26 acides aminés, l'oligomérisation se réalise en octamères ou en trimères, 97% des staphylococcus aureus synthétise ces toxines.

**(Parker et Feil, 2005)**

Et les **PSM peptides ou phénol- soluble peptides** : composées de deux sous-groupes les peptides type 1 contiennent une vingtaine d'acides aminés et ceux de type 2 sont deux fois plus longs, chacun de ces peptides sont codés par des gènes spécifiques.

-**Les toxines à brins bêta (bêta-PFTs ou leucotoxines)** : leurs cibles cellulaires majeures sont les leucocytes (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages et lymphocytes) d'où on les a surnommés leucotomies pour les designers. Le pore est constitué des brins beta s'assemblant en tonneaux bêta.

Ils sont regroupés en **alpha-toxine ou alpha-hémolysine**, **Les leucotoxines à deux composés (Vincenot, Saleh et al, 2008).**

### **2.1.2 Les toxines exfoliatives (ET)**

Décrite comme une exotoxine produite par certaines bactéries *Staphylococcus aureus* dans l'épiderme de l'hôte, associée à la perte de kératinocytes et à l'adhérence intercellulaire, entraînant une desquamation et des cloques sur la peau. **(Mariutti, Tartaglia et al, 2017)**

Les toxines exfoliatives appartiennent à la famille des sérines protéases avec une excellente spécificité de substrat qui reconnaissent et hydrolysent les liaisons peptidiques simples dans le fragment extracellulaire de la desmogléine. À ce jour, trois

sérotypes ET distincts (ETA, ETB et ETD) ont été identifiés chez *S. aureus* qui ont déduit des séquences d'acides aminés similaires aux protéases à sérine de type trypsine et sont associés à des infections cutanées staphylococciques telles que SSSS ou mâle. Impétigo (Imanishi, Nicolas et al. 2019).

### 2.1.3 Les superantigènes

Un superantigène est une protéine bactérienne qui établit une interaction entre la molécule du CMH de classe II (domaine *HLA-DR*) du macrophage et la chaîne V-bêta du récepteur des lymphocytes T (TCR), mais à un exotope du point antigénique et à une grande affinité. (Vincenot, Saleh et al. 2008)

*S. aureus* est capable de produire environ vingt SAg. Cette famille comprend les entérotoxines et TSST-1. Les SAg stimulent directement les lymphocytes T avec une haute affinité en établissant un pont entre les molécules du CMH de classe II à la surface des cellules présentatrices d'antigène et la partie variable de la chaîne  $\beta$  des récepteurs des lymphocytes CD4 (Nhan, Gillet et al, 2012).

## 3 Diversité génétique et transmission

Le composant accessoire comprend environ 25 % du génome total de *S. aureus*. Il est constitué d'éléments génétiques mobiles (MGE) tels que les îlots de pathogénicité, les bactériophages, les cassettes chromosomiques, les transposons et les plasmides, qui sont acquis par transfert horizontal entre souches.

Le génome accessoire a tendance à être plus variable et souvent plus spécifique à la souche que le génome central.

Le gain et la perte de déterminants de la virulence portés par les MGE ont un rôle vital dans l'adaptabilité, la virulence et la survie des bactéries. Par exemple, le SARM est défini par la présence de l'élément *mec SCC* de 20 à 65 kb inséré dans le gène *orfX* (une ARN méthyltransférase) de *S. aureus*. Le *mec SCC* contient le complexe de gènes *mecA* (responsable de la résistance à la pénicilline) et un ensemble de gènes de recombinaison spécifiques au site (*ccrA* et *ccrB*) qui sont responsables de sa mobilité.

(Moormeier et Bayles, 2017)

## **4 Résistance aux biocides**

Un biocide est défini comme toute substance ou tout mélange, tel qu'il est livré à l'utilisateur, constitué d'une ou plusieurs substances actives, destiné à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à empêcher leur action ou à les combattre de quelque manière que ce soit par d'autres moyens par des actions autres que de simples actions physiques ou mécaniques (Wallet, 2020).

L'utilisation de biocides, en particulier la chlorhexidine, est la plus largement utilisée dans le lavage des mains et les produits bucco-dentaires et est également utilisée comme antiseptique et désinfectant.

Le gène *NorA* situé sur le chromosome qui code pour la protéine d'efflux des fluoroquinolones *NorA*, il pompe les colorants et les composés d'ammonium quaternaire QAC des cellules bactériennes vers le milieu extérieur (DeMarco, Cushing et al, 2007).

L'efflux est le mécanisme de résistance le plus important chez *S. aureus* et il peut affecter de nombreuses classes de médicaments, y compris les fongicides. Sur la base de l'analyse des données génomiques, il a été proposé que *S. aureus* possède au moins 20 pompes d'efflux MDR, dont les mieux caractérisées sont les principales protéines facilitatrices *NorA* et *QacA/B*. (DeMarco, Cushing et al, 2007)

## **5 Résistance aux antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques pourrait conduire au développement de deux sous-populations de *S. aureus* MRSA résistant à la méticilline et *S. aureus* sensible à la méticilline MSSA (Lu, Wang et al, 2023).

Il existe deux sources fondamentales de résistance bactérienne aux potentielles, naturelles et acquises. Le premier est programmé au niveau du pool génomique, tandis que le second est Développé selon les conditions métaboliques (Davies, 2010). Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en œuvre d'un processus

d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique (**Bouyahya, Bakri et al, 2018**). Il existe deux types de résistance :

### **5.1 La résistance naturelle**

Selon CASFM c'est un caractère qui affecte toutes les bactéries du même genre ou espèce, dont le support génétique est le chromosome bactérien.

La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique, stable et se transmet à la progéniture lors de la division cellulaire (transmission verticale), mais ne peut généralement pas être transférée d'une bactérie à une autre (transmission horizontale). C'est un trait présent dans toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté à partir d'études initiales d'antibiotiques pour déterminer leur activité et aider à définir leur spectre antimicrobien (**Carle, 2009**).

### **5.2 La résistance acquise**

Il s'agit d'un processus par lequel l'information génétique est partagée entre les bactéries en raison de changements dans l'expression des gènes par des mutations ponctuelles ou des mutations acquises, ce qui les rend très adaptables à leurs circonstances environnementales (**Springman, Lacher et al, 2009**).

La résistance acquise est basée sur des mutations chromosomiques ou extra-chromosomiques ou des gènes de résistance mobiles. Alors que les mutations sont transférées verticalement, les gènes de résistance mobile sont transférés horizontalement par transformation, transduction ou conjugaison (**Schwarz et al., 2016**).

### 5.3 Mécanismes de résistance

Certaines synthétases bactériennes inhibent l'action des antibiotiques en les dégradant ou en les modifiant. Le changement d'antibiotiques peut provenir de Différentes voies selon la réaction chimique catalysée (acétylation, glycosylation, nucléotidylation, substitution, ribosylation et/ou phosphorylation). La modification induite, par ces enzymes, peut inactiver certains antibiotiques tels que les aminoglycosides, le chloramphénicol, les streptogramines, les macrolides et les deux Phytothérapie rifampicines ou bien diminuer leurs affinités vis-à-vis de leurs cibles. Les bactéries, en fait, partagent souvent les opérons responsables de l'expression de ces enzymes, même parfois via le transfert horizontal (**Bouyahya, Bakri et al, 2018**).

Le deuxième mécanisme de résistance affecte les cibles des antibiotiques. Dans certains cas, les bactéries modifient l'affinité de leurs protéines de liaison pour certains antibiotiques. D'autres protéines de liaison à la pénicilline ont également été signalées, telles que la protéine dite PBP2a, qui réduit l'affinité de l'oxacilline et d'autres antibiotiques à base de pénicilline chez *S. aureus*. (**Bouyahya, Bakri et al, 2018**).

Le SARM est résistant à toutes les bêta-lactamines (à l'exception des céphalosporines de 5e génération auxquelles le SARM peut être sensible). Cette résistance est souvent associée à une résistance à la gentamicine, aux macrolides, à la ciprofloxacine, au cotrimoxazole et à la rifampicine. Plus de la moitié des souches étaient résistantes à la gentamicine et à la ciprofloxacine (**Jiang, Yin et al, 2018**).

Une étude chinoise a eu comme résultats que les résistances aux aminosides et aux fluoroquinolones dépassaient les 90%.

les glycopeptides, le linézolide et la tigécycline sont les molécules les plus actives, les glycopeptides constituent le traitement de choix pour les infections graves à SARM (**Jiang, Yin et al, 2018**).

## **6 Les biofilms**

Les biofilms bactériens sont définis comme des collections de cellules bactériennes qui sont fixées de manière irréversible à un support ou à une interface, encapsulées par une matrice de substances polymères extracellulaires produites par les bactéries elles-mêmes, et qui présentent des changements significatifs dans le taux de croissance et la transcription des gènes (**Salaün, 2009**).

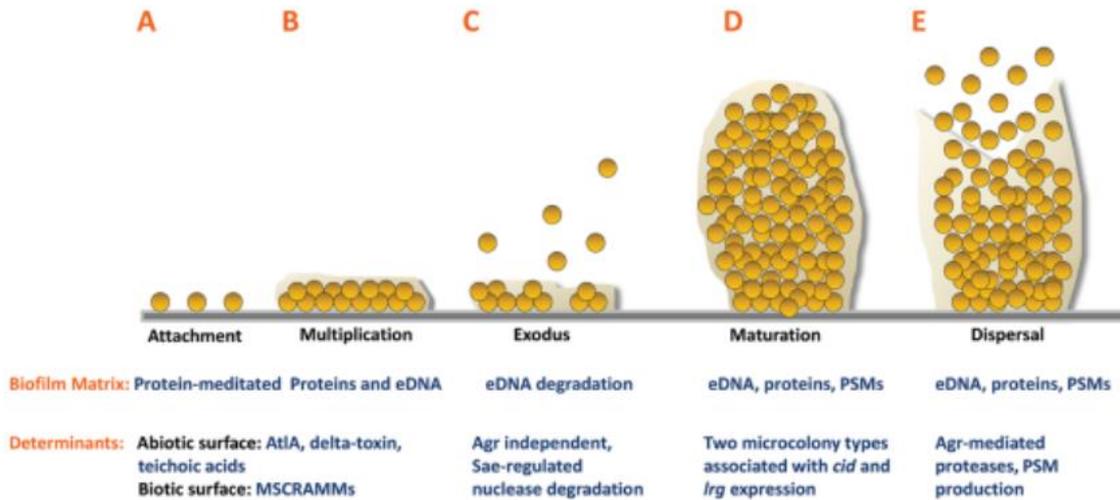
Ce sont des communautés de microorganismes associées à des surfaces recouvertes d'une matrice extracellulaire qui les protège des agressions extérieures. Ils provoquent de diverses infections chez l'homme, qu'elles soient associées à des matériels implantés (cathéters vasculaires ou urinaires, prothèses valvulaires cardiaques) ou non (par ex : pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose) (**Lebeaux, Lucet et al, 2016**).

Difficiles à éliminer par des méthodes physiques et chimiques et posent donc un défi à la communauté médicale, aux processus industriels et aux autres activités et infrastructures humaines. La colonisation bactérienne est souvent initiée par l'adhérence des cellules planctoniques aux surfaces avant la sécrétion de polymères et des protéines extracellulaires, consolidant ainsi leur position. Les glycosides hydrolases fongiques présentent des spécificités uniques pour les polysaccharides et les biofilms de *Staphylococcus aureus* (**Ellis, Bull et al, 2023**).

### **6.1 Formation des biofilms**

La formation du biofilm se déroule en plusieurs étapes. La capacité à former des biofilms est maintenant reconnue comme une caractéristique de plusieurs microorganismes. On estime que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète existe sous forme de biofilms (**Tremblay et al, 2014**), la formation de biofilm est

causée par différents facteurs tels que la carence en nutriments, les changements de température (trop bas ou trop élevés) et la déshydratation (**Rizzato et al, 2019**).



**Figure 02 :** Modèle de développement du biofilm de *Staphylococcus aureus* (**Moormeier et Bayles, 2017**)

Le développement du biofilm de *S. aureus* est décrit en cinq étapes :

**(A) attachement, (B) multiplication, (C) exode, (D) maturation et (E) dispersion.**

**A :** Les cellules de *S. aureus* se fixent aux surfaces abiotiques ou biotiques via des interactions hydrophobes ou des MSCRAMM, respectivement.

**B :** Une fois que les cellules se sont attachées, le biofilm se développe en un "tapis" fusionné avec les cellules composé d'ADNe et d'une matrice protéique.

**C :** Une fois la confluence atteinte, une phase d'exode massif de production cellulaire se produit au cours de laquelle une sous-population de cellules est libérée du biofilm par dégradation de l'eDNA médiée par la nucléase régulée par **Sa regulated**, permettant la formation de microcolonies tridimensionnelles.

**D** : Les microcolonies sont formées par des foyers distincts de cellules qui restent attachées pendant la phase sortante. Cette étape est caractérisée par une division cellulaire rapide, formant de puissants agrégats de protéines, y compris PSM et ADNe.

**E** : La détection de quorum médiée par l'Agr activé qui initie la modulation de la matrice du biofilm et la dispersion des cellules via l'activation de la protéase et/ou le PSM production. AtlA, autolysine A ; MSCRAMM, composants microbiens de surface reconnaissant les molécules de la matrice adhésive ; ADNe, ADN extracellulaire ; PSM, modulines solubles dans le phénol ; Agr, régulateur de gène accessoire.

## **6.2 Composition du biofilm**

La matrice extracellulaire est principalement composée de polysaccharides extracellulaires, adhésion intercellulaire (PIA), acides téichoïques, protéines et ADN. Ces composants sont une barrière protectrice contre sa destruction par les antibiotiques ou bien par la défense de la cellule hôte (**Liu, Zhang et al, 2020**).

## **6.3 Le quorum sensing**

Ce sont les mécanismes qui se déroulent au sein de la cellule, sont matérialisés par des signaux entre cellules et dépendent du nombre de cellules présentes : on parle de mécanismes conscients des quotas. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique. Une fois que le signal atteint un seuil (valeur critique), les régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques.

Les molécules de détection de quorum varient selon les types de bactéries. Les lactones d'acyl homosérine (AHL) sont présentes dans la plupart des bactéries Gram-négatives. La plupart des bactéries Gram-positives utilisent des peptides auto-inductibles, dont la taille varie considérablement (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules de quorum sensing sont dégradées par des enzymes : **AHL lactonases** et **AHLacylases**. Ainsi, une ségrégation spatiale des molécules de détection de quorum est obtenue au sein des biofilms.

## **6.4 Les biofilms et l'antibiorésistance**

En tant qu'agent pathogène nosocomial, et en raison de sa capacité à former des biofilms sur les surfaces biotiques et abiotiques, les infections à *S. aureus* sont complexes et difficiles à éradiquer, en particulier celles causées par des souches résistantes à la méticilline (SARM)(**Rasmussen et al, 2011**).

La perméabilité réduite des médicaments antimicrobiens à travers les biofilms permet aux cellules de *S. aureus* de survivre à des concentrations réduites de médicaments (**Donlan, 2000**). En Outre, le rôle majeur des biofilms bactériens dans la résistance aux médicaments, d'autres facteurs, tels que l'évasion du système immunitaire inné de l'hôte, la plasticité du génome et l'adaptation par l'évolution des gènes et l'échange de matériel génétique, contribuent également au développement et à l'augmentation de la RAM(**Otto, 2008**).

## **Chapitre 2 : Les huiles essentielles**

### **1.1 Généralités**

Ce sont des substances extraites d'un végétal sous forme liquide, odorantes et volatiles. Leur composition moléculaire est complexe, elle n'a aucune valeur nutritionnelle (ne contient ni glucides ni lipides, ni protéines, pas de minéraux et de vitamines).

Leur qualité est déterminée par plusieurs facteurs tels que :

- L'organe producteur de l'huile essentielle qui peut lui donner des propriétés et un usage totalement différent.
- Le mode de culture : c'est un critère qui définit la qualité et la sélection de l'huile essentielle, la qualité varie selon le moment et la région de la culture.
- Le type chimique également appelé le chemotype qui indique les composants chimiques de la plante. Il est repère par analyse chromatographique, on peut avoir les huiles essentielles à composition biochimique variée.
- La garantie de la reconnaissance botanique : elle permet la précision de la diversité utilisée et empêche les confusions. **(Couic-Marinier et Lobstein, 2013)**

### **1.2. Méthodes d'obtention des huiles essentielles**

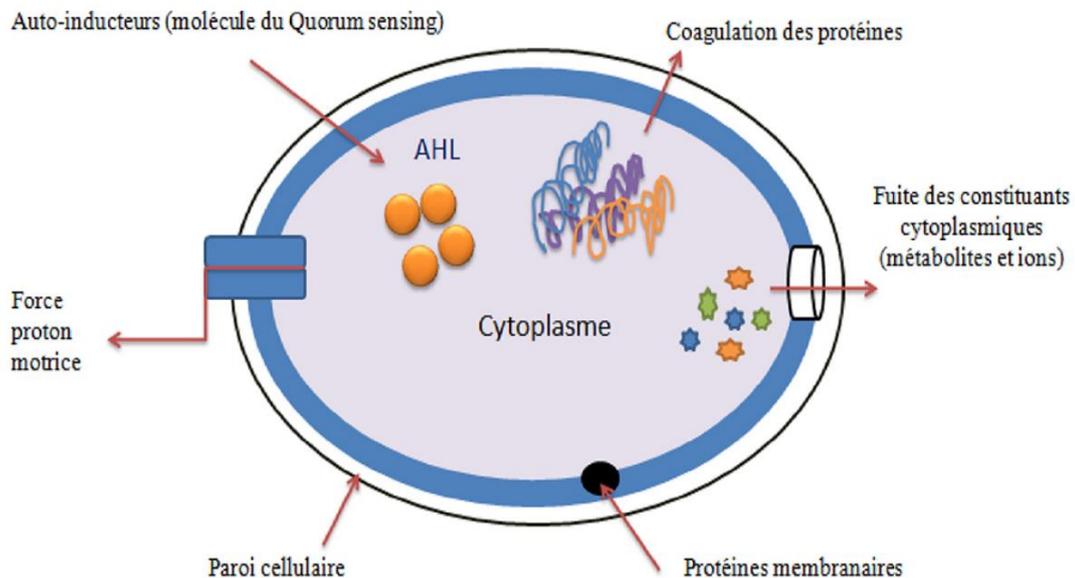
Il existe plusieurs procédés :

1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau
2. Extraction par hydrodistillation
3. Expression à froid
4. Extraction par solvant organique
5. Extraction assistée par micro-ondes
6. Extraction par fluide à l'état supercritique

Les deux méthodes les principalement utilisées sont par entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation et l'expression à froid. **(BOUKHATEM et al, 2019)**

### 1.3. Activité antibactérienne

Les huiles essentielles ont une activité antiseptique importante depuis l'Antiquité et sont utilisées dans de nombreux domaines, notamment les industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (Kaloustian, Chevalier et al, 2008). Plusieurs molécules présentes dans les huiles essentielles ont des propriétés antimicrobiennes, notamment les phénols (comme le carvacrol, le thymol et l'eugénol), les alcools (comme le linalol) et les aldéhydes (comme le cinnamaldéhyde). Les huiles essentielles ont plusieurs cibles inhibitrices de bactéries. Ils peuvent induire la coagulation, agir sur les parois cellulaires, induire une fuite d'ions à travers les membranes, agir sur les protéines membranaires et les acides gras, et agir sur les médiateurs de détection de quorum. Ces mécanismes peuvent être appliqués simultanément, entraînant une amplification des acides gras saturés en C16 et C18 et une diminution de la quantité d'acides gras insaturés en C18 (Betts et al, 2007)



**Figure 03 :** Mécanismes d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Bouyahya, Bakri et al. 2018)

## **2 Les plantes aromatiques**

Les plantes aromatiques constituent une grande partie de la flore naturelle et sont considérées comme des ressources importantes dans divers domaines. Sont toutes les plantes qui contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou comme précurseurs synthétiques de médicaments utiles (**Abayomi, 2010**). Ces plantes jouent un rôle important dans la santé humaine, par leurs composés en tant que métabolites primaires ou secondaires.

Ces composés se répartissent en deux groupes :

- Métabolites primaires (glucides comme la cellulose et les amidons, lipides, enzymes...)
- La composition des métabolites secondaires est plus complexe, Généralement regroupés en grandes familles chimiques telles que Polyphénols, Echelles et Alcaloïdes (**Ouedraogo, Yoda et al, 2021**).

### **2.1 Utilisation des plantes médicinales comme source d'agents antimicrobiens**

En thérapeutique, les plantes médicinales ou leurs extraits sont actuellement une solution idéale dans le traitement de diverses maladies infectieuses en raison de leur activité antibactérienne, Les produits naturels (les essences végétales) consécutif de plantes Médicinales sont un moyen efficace contre les germes résistants aux antibiotiques puisqu'elles possèdent un réservoir de molécules anti infectieuses importants ayant des propriétés contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Bendahou et al, 2013**).

### **2.1.1 *Daucus crinitus***

C'est une plante sauvage qui pousse le long de la côte ouest de l'Algérie, appartenant, la composition chimique des huiles de sa partie aérienne est composée de l'acétate d'octyle (12,3%), l'isobutyrate d'isochavicol (39,0%) et le  $\beta$ -caryophyllène (5,4%) (**El Amine Dib, Djabou et al, 2010**)

Elle est différente parmi d'autres espèces par sa caractérisation morphologiques dans les feuilles qui apparaissent pseudoverticillés ainsi que par la présence de plusieurs sous espèces colonisantes les sables et les falaises. Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour l'expulsion du placenta après l'accouchement (**Dib, Bendahou et al, 2010**)

### **2.1.2 *Artemisia arborescens***

*A. arborescens* est une espèce morphologiquement variable avec des feuilles argentées à gris-vert portant au moment de la floraison (juin-juillet) de petites fleurs jaunes, se présentant sous la forme d'un arbuste à nombreuses branches poussant jusqu'à un mètre de hauteur dans divers habitats de la région méditerranéenne, classée parmi les plantes médicinales traditionnelles, avec une référence ethnopharmacologique remontant au XVIe siècle : par exemple, la décoction de feuilles est utilisée dans le thé, généralement avec de la menthe, comme tonique et sédatif (**Michelakis, Evergetis et al, 2016**)

### **2.1.3 *Ruta chalepensis***

C'est une espèce très abondante dans la région méditerranéenne, vivace est caractérisée par des feuilles ovales, grandes, pennées et bleu-vert qui ont de nombreux lobes oblongs lancéolés. L'inflorescence de cette espèce est sous la forme de cyme (**Benhissen, Habbachi et al, 2019**)

Le criblage phytochimique des espèces de *Ruta* a montré la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de coumarines, de tanins, d'huile volatile, de glycosides, de stérols et de triterpènes comme constituants actifs possibles (**El Guiche, Tahrouch et al, 2015**)

#### **2.1.4 *Lavandula dentata***

Ce sont des plantes aromatiques appartenant à la famille des Lamiacées ou labiées, à la sous-famille des Nepetoideae, au genre *Lavandula*, espèce *Lavandula dentata* (Bessenouci-Danoun et Mesli, 2018)

Il pousse mieux dans un sol limoneux, léger et bien drainé et n'aime pas les sols lourds et gorgés d'eau. Son odeur aromatique serait plus forte lorsqu'elle est cultivée dans des sols calcaires. Il peut supporter des températures basses jusqu'à -5°C (Gamra et Amel, 2021).

#### **2.1.5 *Thymus fontanesii***

En Algérie on l'appelle « Zaateur » et c'est une plante annuelle avec une tige robuste, des feuilles oblongues-lancéolées et des fleurs blanches ou claires, elle pousse principalement sur les sols engazonnés. Le genre *Thymus* Il existe 12 espèces en Algérie (Sifouane et al, 2020)

*T. fontanesii* est utilisé comme conservateur alimentaire et pour traiter certaines maladies gastro-intestinales( Alsemeh et al, 2020)

### **2.2 Combinaison des huiles essentielles lutte contre les *S. aureus***

Plusieurs études ont rapporté l'effet de l'HE sur la resensibilisation des souches résistantes aux antibiotiques (Otto, 2008) En fait, les combinaisons, d'une seule huile essentielle ou d'un mélange de composants principaux purifiés, exposent les bactéries à de nombreux composés qui exercent simultanément différents mécanismes d'action antimicrobiens contre de multiples cibles bactériennes. D'une part, cela peut conduire à une meilleure activité, et cela réduit le risque de résistance adaptative à ces combinaisons. La résistance à plusieurs mécanismes d'action antimicrobiens simultanés est moins probable que la monothérapie (Rather et al, 2013).

L'interaction entre les agents antimicrobiens peut conduire à trois résultats

différents : synergie, addition ou antagonisme. La synergie est obtenue lorsqu'un mélange de deux composés antimicrobiens produit une activité antibactérienne supérieure à la somme des activités des composants individuels. Les effets additifs se produisent lorsque la combinaison d'agents antimicrobiens produit un effet égal à la somme des composés individuels. L'antagonisme se produit lorsque l'effet combiné de deux composés est inférieur à la somme des deux effets individuels (**Rather et al, 2013**)

### **3 Produit pharmaceutique à usage cutané**

En thérapeutique, de nombreux médicaments sont utilisés sur la peau. Ces médicaments se présentent sous de nombreuses formes, les plus couramment utilisées sont : les onguents, les pommades, les crèmes et les gels. Ils présentent l'avantage de permettre au principe actif de pénétrer dans la circulation systémique sans modification hépatique.

#### **Les pommades**

Les pommades sont généralement des systèmes monophasiques non aqueux dans lesquels des substances liquides ou solides peuvent être dispersées (**Sara, 2022**)

Selon la nature des excipients, on peut classer les pommades comme suit :

- **Les pommades hydrophobes ou lipophiles** Ces onguents n'absorbent qu'une faible quantité d'eau. Les excipients les plus couramment utilisés pour leur préparation sont : la vaseline, la paraffine liquide, la paraffine solide, les huiles végétales, les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.
- **Les pommades absorbent l'eau** Ils peuvent absorber de grandes quantités d'eau et leurs véhicules sont des pommades hydrophobes incorporant des émulsifiants eau-dans l'huile (E/H) tels que la graisse de lanoline, l'alcool de lanoline, les esters de sorbitan, les monoglycérides, les esters et les acides gras.
- **Pommades hydrophiles** : Les excipients de ces formulations sont miscibles à l'eau et consistent en un mélange de polyéthylèneglycols liquides et solides (marcogols), qui peuvent contenir des quantités appropriées d'eau (**Dembélé, 2011**).

# *Matériels et méthodes*

## **Partie II. Matériels et Méthodes**

### **1 Matériel**

#### **1.2 Matériel de laboratoire**

- Etuve de 37 c
- Vortex
- Boites de pétri
- Erlenmeyer
- Béchers
- Tubes à essai
- Microplaques 96 puits
- Pipette pasteur
- Anse de platine
- Ecouvillons
- Disques à papier wattman
- Micropipettes de 2-20 et 100-1000
- Balance électronique
- Colorimètre
- Appareil clevenger
- Lames
- Tubes a hémolyse

### **1.3 Matériel biologique**

#### **Souches**

On a utilisé 5 souches de *Staphylococcus aureus* prélevées des pus :

SASM ATCC 25923

Souche clinique 01

Souche clinique 02

Souche clinique 03

Souche clinique 04

Souche clinique 05

#### **1.4 Milieux de culture**

##### **1.4.1 Milieux de culture solide**

Gélose Chapman.

Gélose Muller Hinton.

##### **1.4.2 Milieux de culture liquide**

BN, BHIB.

#### **1.5 Produits chimiques et colorants**

Violet de gentiane, Lugol, fuchsine, alcool 70%.

## 1.6 Matériel végétal

Les plantes étudiées ont été récoltées au mois de Mai 2022, les parties aériennes des plantes ont été coupées à l'aide d'un sécateur, puis ont été séchées à l'ombre pendant 15 jours dans une chambre aérée à l'abri de la lumière.

Les stations de récoltes ainsi que des photos des plantes sont consignées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 01 : Classification et stations des plantes testées**

	<i>Nom vernaculaire</i>	<i>Embranchement</i>	<i>Classe</i>	<i>Ordre</i>	<i>Famille</i>	<i>Stations de récolte</i>	
<i>Artemisia arborescens</i>	Chehiba	Spermaphytes	Eudicots	Asterales	Asteraceae	Région de tlemcen	
<i>Lavendula dentata</i>	Khezama	Spermaphytes	Eudicots	Lamiales	Lamiaceae	Honaine, tlemcen	
<i>Ruta chalpensis</i>	Fijel	Spermaphytes	Eudicots	Sapindales	Rutaceae	Mafrouch, tlemcen	
<i>Daucus crinitus</i>	Bouzeffour	Spermaphytes	Eudicots	Apiales	Apiaceae	Benisnous, tlemcen	
<i>Thymus fontanesii</i>	Zaateur	Spermaphytes	Eudicots	Lamiales	Lamiaceae	Zediga, tlemcen	

## **2 Méthodes**

### **2.1 Repiquage des souches de *S. aureus***

Cinq souches de *S. aureus* ont fait l'objet de ce travail, elles ont été isolées à partir des prélèvements cliniques des pus.

L'isolement a été fait par repiquage successif sur milieu Chapman. Les boîtes ont été incubées par la suite à 37 °C pendant 24h à 72h.

### **2.2 Identification des souches isolées**

#### **2.2.1 Identification macroscopique**

L'identification macroscopique a été faite en observant les colonies et en déterminant leur aspect, forme, couleur, viscosité....

#### **2.2.2 Identification microscopique**

L'identification a été faite en suivant les étapes suivantes :

La première étape consiste à préparer des frottis en faisant un étalement d'une goutte de suspension bactérienne sur une lame propre. Les frottis sont fixés à l'aide de la flamme du bec bunsen puis utilisés pour la coloration de Gram. L'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif (GX 1000) avec l'utilisation d'une goutte de l'huile à émersion. Cette Méthode de coloration permet de colorer les bactéries et de les distinguer par un examen direct à l'aide de la microscopie optique par conclure le type de Gram ainsi que l'aspect des bactéries sous le microscope (**Rasamiravaka, et al, 2011**).

#### **2.2.3 Identification biochimique**

Les différents profils biochimiques des souches ont été déterminés par système Vitek 2 (voir dans Annexes).

#### **Test catalase**

Une colonie a été déposée sur une lame à l'aide d'une pipette pasteur, dans laquelle a été dissociée dans une goutte d'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **Test coagulase**

L'activité de la Coagulase de *Staphylococcus aureus* sur le plasma humain a été prise comme le critère principal pour différencier les espèces du genre *Staphylococcus* à coagulase positif des autres espèces du genre *Staphylococcus* à coagulase négatif.

Le principe de ce test est de mettre en contact du plasma oxalaté une culture bactérienne sur bouillon Coeur –Cerveau.

Technique :

Ajouter 0,5 ml du plasma dans un tube contenant 0,5 ml de culture BHIB additionnée de la souche à tester ensuite homogénéiser et incuber à 37°C pendant 24h, le résultat positif se traduit par la formation d'un caillot sur le fond du tube, le mélange est observé d'heure en heure car le coagulum peut être suivi d'une redissolution du caillot provoqué par la fibrinolyse (Denis et al., 2007).

## **2.3. Antibiogramme**

L'antibiogramme a été effectué selon les recommandations du comité de l'antibiogramme française de la microbiologie (CAFSM, 2022).

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture bactérienne jeune incubée pendant 18 à 24h. La charge microbienne a été préparée à  $10^8$  UFC/ml en mesurant la densité optique qui a été fixée de 0.08 à 0.1 ce qui correspond à  $\approx 10^8$  UFC/ml (0.5 MC Farland). L'ensemencement a été fait par écouvillonnage sur gélose Muller Hinton préalablement coulée dans des boites de pétri de 9cm. Les antibiotiques utilisés sont les suivants :

Oxacilline 1 $\mu$ g

Vancomycine 5 $\mu$ g

Triméthoprime 5 $\mu$ g

Nétilmicine 30 $\mu$ g

Ofloxacin 5 $\mu$ g

Céfoxitine 30 $\mu$ g

Les disques d'ATB ont été déposés aseptiquement sur la surface des géloses. Puis, les boites ont été incubées pendant 18h à 24h à 37 °C.

## 2.5. Obtention de l'huile essentielle

Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation à la vapeur à l'aide d'un équipement de type Clevenger.

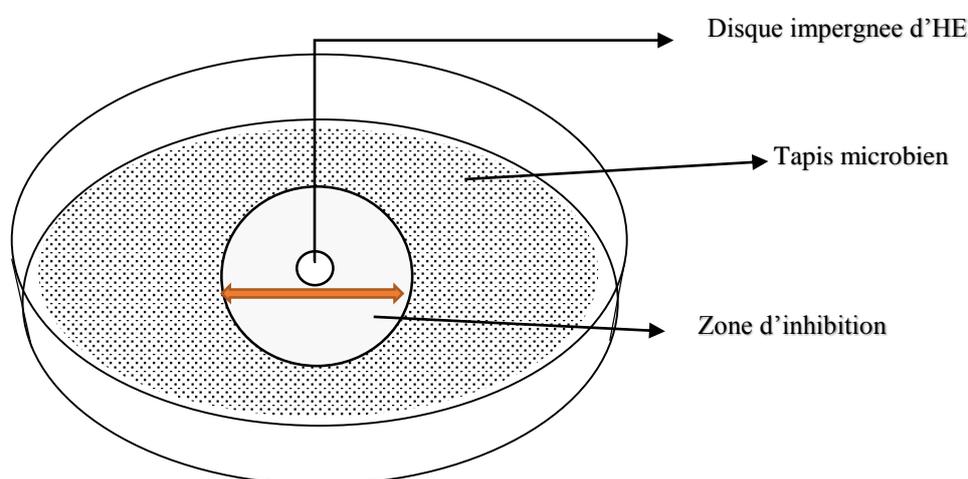
Le procédé est basé sur la mise en contact direct du matériel végétal avec de l'eau chauffée dans un ballon placé au-dessus d'une source de chaleur. Le ballon est lié à une colonne qui communique avec un réfrigérant, permettant la condensation des vapeurs d'eau chargée de gouttelettes d'HE. L'huile est recueillie dans une burette graduée ou le volume est lu directement. Les huiles obtenues ont été récupérées dans un pilulier fumé et conservées à 4 °C, à l'abri de la lumière.



**Figure 04:** Appareil Clevenger d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

## 2.6. Méthode d'aromatogramme

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des plantes ; *Daucus crinitus*, *Artemisia arborescens*, *Lavendula dentata*, *Ruta chalpensis*, *Thymus fontanesii* a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques ou aromatoigramme) comme suit ; les inoculums ont été préparés et optimisés a une charge microbienne égale à  $10^8$  UFC/ml, l'ensemencement a été fait par écouvillonnage. Des disques de 6mm de papier Wattman stériles ont été déposés sur la surface de la gélose Muller Hinton préalablement ensemencée. Puis, un volume de 10  $\mu$ l de chaque HE a été déposé sur la surface les disques. Après les boites sont incubées pendant 18 à 24h, les résultats obtenus ont été lu en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en millimètres. (**Khadir et al, 2013**).



**Figure 05:** Méthode d'aromatogramme illustrée.

## **2.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice**

### **2.7.1 Préparation des dilutions**

Les huiles essentielles ont été diluées en série à 1/2 dans un bouillon Müller-Hinton en ajoutant du Tween 80 à une concentration de 1 % (v/v) pour permettre une miscibilité complète des huiles dans le bouillon. Une seconde solution, dite blanche, a été préparée avec du bouillon Müller-Hinton et 1% de Tween 80. Cette solution a été utilisée pour compléter des dilutions en série de la première solution contenant des huiles essentielles afin que la concentration de Tween 80 reste la même à 1 % dans les différentes concentrations préparées.

### **2.7.2 Préparation de l'inoculum**

L'inoculum préparé pour la CMI a été fait à partir de la suspension de  $10^8$  UFC/ml qui subit une dilution 1/1000 dans le BN, Un volume de 180  $\mu$ l de l'inoculum a été introduit dans la microplaque avec 20  $\mu$ l de l'huile essentielle de chaque dilution.

## **2.8. Etude de la combinaison entre les huiles essentielles des plantes étudiées**

Afin d'évaluer les interactions entre les huiles essentielles nous avons opté pour l'étude de la combinaison entre les huiles essentielles des plantes étudiées, ainsi trois combinaisons ont été effectuées entre les trois plantes, chaque combinaison a étudié l'interaction entre deux plantes.

Les plantes qui ont été utilisées dans la combinaison sont :

- 1) HES de *L. dentata* et *A. arborescens*
- 2) HES de *L. dentata* et *T. fontanesii*
- 3) HES de *A. arborescens* et *T. fontanesii*

Cette combinaison a pour but d'utiliser des mélanges d'huiles essentielles sans craindre d'avoir des interactions négatives (antagonisme) lors de l'élaboration du produit à usage cutané qu'on souhaite de le formuler à la fin de cette étude.

Une série de dilutions (**4MIC, 2MIC, MIC, 1/2MIC, 1/4 MIC, 1/8MIC**) des deux HE ont été préparées séparément, 10µl de chaque dilution d'HE (**v/v**) a été ajouté dans chaque puits de la microplaque horizontalement. 180 µl de l'inoculum bactérien pour chaque souche a été ensuite ajouté dans chaque puit avec une concentration d'environ 10<sup>5</sup> CFU/ml (**Vitale et al, 2005**) , (**Chraibi et al, 2021**)

## **2.9. Formulation du produit à usage cutané**

Afin de formuler le produit à usage cutané, nous avons utilisé les excipients suivants ;

- Un corps gras (huile végétale)
- Un épaississant (cire d'abeille)
- Un Principe actif (trois huiles essentielles) avec des volumes égaux, de telle sorte que la totalité du principe actif représente 5% de concentration dans le produit final.

Le mélange a été fait dans un bécher de 50 ml avec un chauffage modéré.

## ***Résultats et discussion***

## Partie III. Résultat et discussion

### 1. Résultat de l'identification

Les résultats de la coloration de Gram, test catalase et test coagulase sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 02** : Résultats de l'identification microscopique et biochimique

<b>Gram</b>	Positif		Les bactéries étaient de forme sphérique colorées en violet, regroupées en grappe de raisin.
<b>Catalase</b>	Positif		Il y a eu la formation de bulles.
<b>Coagulase</b>	Positif		Formation d'un caillot sur le fond du tube

## 2. Résultats du test d'antibiogramme

Le tableau suivant montre les résultats obtenus d'antibiogramme interprété selon **CLSI 2015**.

**Tableau 03:** Résultat du test de sensibilité des souches

	<b>Ox</b>	<b>Van</b>	<b>Tm</b>	<b>Net</b>	<b>OFX</b>	<b>Fox</b>
<b>Souche 01</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Souche 02</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Souche 03</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Souche 04</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Souche 05</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>ATCC25923</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>

**Van** : Vancomycine.

**Ox** : Oxacilline.

**Tm** : Triméthoprime.

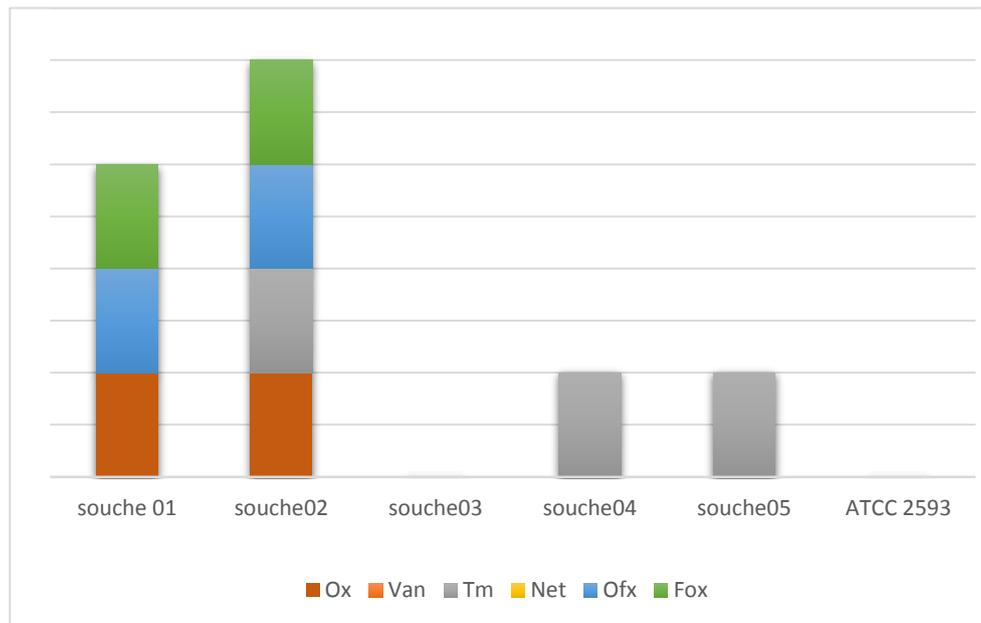
**Net** : Netilmicine.

**OFX** : Ofloxacine.

**Fox** : Céfoxitine.

**R** : Résistante.

**S** : Sensible.



**Figure 06:** Sensibilité des souches étudiées aux antibiotiques

L’histogramme montre qu’il y a une résistance de chaque souche pour chaque antibiotique.

D’après le tableau et l’histogramme de la figure 07 ci-dessus on remarque que toutes les souches étaient sensibles à la Vancomycine et à la Nétilmicine, et que la souche de référence ATCC 25923 était sensible à tous les antibiotiques.

La souche clinique 01 et la souche clinique 02 étaient résistantes à la céfoxitine et l’oxacilline ce qui signifie que ce sont des souches résistantes à la méticilline SARM et contiennent le gène *Mec A* (CASFM 2022) ces deux souches sont également résistantes à d’autres antibiotiques tel que l’ofloxacin et triméthoprim alors que les autres souches cliniques ne sont pas des SARM puisqu’elles sont sensibles à l’oxacilline et la céfoxitine mais elles résistent quand même au triméthoprim.

L’antibiogramme a permis de détecter deux souches SARM hautement résistantes et qui fort possible contient le gène *Mec A*, puisqu’elles sont résistantes aux céphalosporines de troisième génération (céfoxitine).

Nous avons également détecté des souches non SARM mais résistantes à d’autres antibiotiques et enfin nous avons trouvé des souches sensibles aux antibiotiques.

### 3. Résultats d'aromatogramme

Les résultats des zones d'inhibition de chaque huiles essentielles sur toutes les souches sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 04 :** Les diamètres des zones d'inhibition données par les huiles essentielles des cinq plantes (mm)

	<i>L. dentata</i>	<i>A. arborescens</i>	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. chalpensis</i>	<i>D. crinitus</i>
Souche 01	15	9	41	10	6
Souche 02	13	13	28	9	9
Souche 03	14	9	31	9	6
Souche 04	15	13	32	10	6
Souche 05	14	12	31	9	6
ATCC25923	6	18	33	6	6

Le tableau 04 montre les résultats des effets des cinq huiles essentielles testées.

On remarque, l'HE de *Thymus fontanesii* avait le plus grand effet sur les souches de *S. aureus* par rapport aux autres HEs des autres plantes par contre l'HE de *Daucus crinitus* avait l'effet le plus faible puisqu'une seule souche a présenté une faible sensibilité avec un diamètre de 9mm.

Pour l'HE de *Lavendula dentata*, on observe que toutes les souches avaient une sensibilité avec des diamètres d'inhibitions qui variaient entre 13 et 15 mm, sauf la souche de référence ATCC 25923 qui n'y avait aucun effet.

Concernant l'HE d'*Artemisia arborescens*, les résultats ont montré aussi qu'il y avait une variabilité dans les diamètres de 9 mm allant à 18mm.

L'HE de *Lavendula dentata* et de *Thymus fontanesii* ont un effet remarquable contre les souches SARM (souche 01 et souche 02), cela veut dire que ces deux huiles essentielles constituent les huiles les plus efficaces contre les souches multirésistantes en dépit du même profil de résistance des souches

D'après l'étude de (Merghache *et al*, 2012) l'HE de *A.arborescens* avait une zone d'inhibition enregistrée de 15 mm contre *S.aureus*. (Elazzouzi *et al*, 2018) ont aussi étudié l'effet antimicrobien pour d'autres genres d'*Artemisia* (*A. absinthium*, *A. campestris*, *A. scoparia*, *A. santonicum*..... *A. arborescens*) et ils ont constaté que toutes les HEs ont eu un effet antimicrobien sur *S.aureus* et plus particulièrement l'HE d'*A. arborescens* qui a eu un bon effet.

Dans l'étude de (Daoudi *et al*, 2016) Il a rapporté que l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* a un effet inhibiteur sur *Staphylococcus aureus* 17,3mm. Le 2-undécène est le composant principal de l'huile essentielle qui lui donne une forte Activité antibactérienne.

(Bnina *et al*, 2010) ont montré que l'activité antimicrobienne de l'HE *R. chalpensis* était plus efficace contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif.

#### **4. Résultats des CMI**

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices de chaque huile essentielle sur toutes les souches sont présentés dans le tableau 05 ci-dessous.

**Tableau 05 :** Les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles (%)

	<i>L. dentata</i>	<i>A. arborescens</i>	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. chalpensis</i>	<i>D. crinitus</i>
<i>Souche 01</i>	1	0.5	0.25	4	ND
<i>Souche 02</i>	1	1	0.25	8	ND
<i>Souche 03</i>	4	1	0.125	4	ND
<i>Souche 04</i>	4	1	0.125	4	ND
<i>Souche 05</i>	4	2	0.125	8	ND
ATCC25923	0.5	1	0.25	8	ND

D'après les résultats des CMI montrés dans le **tableau 05** l'HE de *T. fontanesii* a les plus basses CMI de toutes les huiles essentielles avec des valeurs entre 0.25% et 0.125% ce qui est logique puisque cette plante a donné les zones d'inhibitions les plus grandes (jusqu'à 41mm).

Les trois huiles essentielles *T. fontanesii*, *A. arborescens*, *L. dentata* ont des CMI intéressantes sur les souches SARM, qui présentent les moyennes de CMI respectivement 0.81%, 1,16 %, 2,41%.

Quant à l'huile de *Ruta chalpensis*, a montré les CMI les plus élevées avec des valeurs entre 4% et 8%.

On remarque que la plupart des résultats mentionnés dans le tableau se concordent bien avec les diamètres de zones d'inhibitions, Car les résultats des CMI les plus faibles ont été trouvés avec les plantes présentant les zones d'inhibition les plus grandes.

L'HE de *Lavendula dentata* et d'*Artemisia arborescens* ont donné des CMI intéressantes mais des zones moins importantes que *T. fontanesii* avec une moyenne de 14.2 mm, 12,33 mm. Cela peut être expliqué par le fait que certaines huiles essentielles ont une viscosité qui leur empêche la diffusion dans la gélose (**Hood, Wilkinson et al, 2003**).

Ces huiles essentielles excrètes de ces plantes testées ont des compositions différentes, ce qui influe sur l'effet antimicrobien d'une plante à l'autre, par exemple chez la plante *Lavendula dentata* des études antérieures ont montré que l'activité antimicrobienne de cette huiles essentielle est due à son composé majoritaire **1,8- cineole** qui possède un effet remarquable contre les bactéries à Gram positif y compris *Staphylococcus aureus* mais aussi les bactéries à Gram négatif (**Imelouane et al, 2009**).

Un travail mené sur la plante *Daucus crinitus* (**Bendiabdellah et al, 2012**) a montré la présence de **decanol** (10.4%), **heptadecane** (9.8%), **dodecanal** (6.3%) les auteurs ont trouvé des résultats antimicrobiens semblables à nos résultats puisque l'effet était faible et seulement sur les Grams positifs ont présenté une sensibilité.

Des travaux faits par (**Militello et al, 2011**) ont montré que l'huile essentielle d'*Artemisia arborescens* est constituée majoritairement de **b-thujone** ce qui a donné un effet antimicrobien à une grande variété de microorganismes Gram positif et Gram négatif.

(**Dob et al, 2006**) ont travaillé sur HE de *Thymus fontanesii* et ils ont noté que le **carvacrol** est le constituant dominant qui est responsable d'un effet antimicrobien remarquable sur tous types de microorganismes sauf *Pseudomonas aeruginosa* qui a présenté un effet très faible.

En ce qui concerne *Ruta chalapensis*. (**Merghache et al, 2008**) ont rapporté que l'huile essentielle de cette plante contient le **2-nonanone** comme constituant majeur et qu'aucune activité antimicrobienne contre *S. aureus* n'a été détectée ce qui est en concordance avec nos résultats.

## 5 . Résultats des combinaisons des huiles essentielles

La combinaison entre les HE a montré des interactions différentes. Le tableau ci-dessous présenté les résultats de cette combinaison exprimée en FiCi en suivant l'interprétation des valeurs obtenus (**Bendahou et al, 2023**).

le FIC a été calculé en utilisant l'équation :

$$FIC_I = FIC_A + FIC_B = \left(\frac{C_A}{CMI_A}\right) + \left(\frac{C_B}{CMI_B}\right)$$

**C<sub>A</sub>** : concentration de l'huile A ; **C<sub>B</sub>** : concentration de l'huile B .

- FICi ≤ 0.5 → Synergie.
- 0.5 < FICi < 4 → Addition.
- 1 < FICi < 4 → Indifférent.
- FICi > 4 → Antagonisme.

**Tableau 06** : Résultats des combinaisons des HE représentés en FiCi

Combinaisons	FiCi = ∑ Fic					
	Souche01	Souche02	Souche03	Souche04	Souche05	ATCC25923
<i>L. dentata /T.fontanesii</i>	0.62	0.62	0.75	0.15	0.37	0.56
	Addition	Addition	Addition	Synergie	Synergie	Synergie
<i>L.dentata/A.arborescens</i>	1.5	0.5	0.31	0.15	0.31	1.5
	Indifférent	Synergie	Synergie	Synergie	Synergie	Indifférent
<i>A.arborescens/T.fontanesii</i>	1.125	0.625	1.5	1.5	0.5	0.625
	Indifférent	Addition	Indifférent	Indifférent	Synergie	Addition

La combinaison entre *L. dentata* et *A. arborescens* a montré l'effet synergétique le plus important sur quatre souches parmi six suivis par la combinaison *L. dentata* /*T. fontanesii* avec un effet synergétique sur trois souches alors que les autres ont présente un effet d'addition et enfin la combinaison *A. arborescens*/ *T. fontanesii* a montré un effet de synergie sur une seule souche alors que les autres souches ont présenté un effet d'addition ou bien indifférent. D'après ces résultats on constate que aucune interaction négative n'a été trouvé lors de la combinaison de ces trois huiles ce qui permet de les utiliser en mélange sans craindre une diminution de l'effet.

## **6. Formulation du produit à usage cutané**

Après la préparation et le mélange des excipients, nous avons obtenu une solution homogène avec viscosité moyenne utilisable facilement comme une pommade et avec une couleur vert/bleu dues à la pigmentation des huiles essentielles et avec une odeur agréable.



**Figure 7 : Le produit final**

# *Conclusion*

## **Conclusion**

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet antibactérien de quelques huiles essentielles sur des souches *Staphylococcus aureus* isolées de Tlemcen.

D'une part, les tests d'activité antimicrobienne que nous avons effectué tel que la méthode d'antibiogramme qui nous a permis de tester la sensibilité ainsi que la résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques et la reconnaissance des souches SARM.

D'autres part, la méthode de diffusion sur gélose nous a permis d'évaluer leur effet antimicrobien et on a pu confirmer leur efficacité en déterminant la concentration minimale inhibitrice de chaque huile essentielle sur toutes les souches y compris les souches SARM avec la méthode des microdilutions en milieu liquide.

Toutes les huiles essentielles des plantes *Thymus fontanesii*, *Lavendula dentata*, *Artemisia arborescens*, *Ruta chalpensis* ont eu des effets antimicrobiens contre ces souches la première avec un effet remarquable était *T. fontanesii*, la deuxième *A.arborescens*, la troisième *L. dentata* et *R. chalpensis* avec un effet moyen.

Le test de combinaison nous a permis de voir si on pourrait mélanger ces huiles essentielles sans avoir aucun effet d'antagonisme. Trois combinaisons ont été faites *L. dentata /T.fontanesii*, *L. dentata /A. arborescens*, *A. arborescens/ T. fontanesii*.

Les résultats des combinaisons ont été calculé et interprété, pour la majorité de ces combinaisons avait un effet synergique, et d'autres addition ou indiffèrent.

De tous les résultats de ce travail in vitro qu'on a obtenu, on a pu formuler un produit naturel à base de ces trois huiles essentielles et on peut dire que les huiles essentielles sont une nouvelle source potentielle et alternative d'agents antimicrobiens naturels. Ceci ouvrent des perspectives prometteuses dans la lutte contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques.

# *Références bibliographiques*

- Abayomi, S. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, KARTHALA Editions.
- ABID, H., S. Toumi, S. M. Maalej, B. Fendri, H. Chaker, I. Agrebi, N. Dammak, K. Kammoun, S. Yaich and A. Hammami (2022). "POS-493 NASAL PORTAGE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN HEMODIALYSIS PATIENTS." Kidney International Reports **7**(2): S218.
- Ahmad-Mansour, N., P. Loubet, C. Pouget, C. Dunyach-Remy, A. Sotto, J.-P. Lavigne and V. Molle (2021). "Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments." Toxins **13**(10): 677.
- Amel Bendiabdellah, Mohammed El Amine Dib, Nawel Meliani, Alain Muselli,
  - Antibacterial Potential of Artemisia arborescens L. Essential Oil. 62:1274–1281.
  - Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thymus fontanesii.
- Benhissen, S., W. Habbachi, K. Rebbas and F. Masna (2019). "Bioactivite des extraits foliaires de Ruta chalepensis L.(Rutaceae) sur la mortalite des larves de Culiseta Longiareolata (Diptera, Culicidae)." Lebanese Science Journal **20**(1): 1.
- Benziane, M. Y., M. Bendahou, F. Benbelaïd, A. Khadir, H. Belhadef, A. Benaïssa, S. Ouslimani, F. Mahdi and A. Muselli (2023). "Efficacy of endemic Algerian essential oils against single and mixed biofilms of Candida albicans and Candida glabrata." Archives of Oral Biology **145**: 105584.
- Bessenouci-Danoun, M. and L. Mesli (2018). "Inventory of arthropodofauna infested at Lavandula dentata in the Ghazaouet in the region of Ghazaouet (Tlemcen)." AgroBiologia **8**(1): 817-824.
- Bioactive principles, antibacterial and anticancer properties of Artemisia arborescens L. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, **51**, 13008-13008.
- Biology. Vol. 44, No. 8, pp. 607–61
- Bnina, E.B., Hammami, S., Daamii-remadi, M., Jannet, H.B. & Mighri, Z. (2010) Chemical composition and antimicrobial effects of Tunisian Ruta chalepensis L. essential oils. Journal de la Société Chimique de Tunisie, **12**, 1-9.
- BOUKHATEM, M. N., A. FERHAT and A. KAMELI (2019). "Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature." Une **3**(4): 1653-1659.

- Bouyahya, A., Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, S. Charfi, J. Abrini and N. Dakka (2018). "Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries." Phytothérapie **16**(S1): S173-S183.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., 2004. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology The Proteobacteria . Part A . Introductory Essays. Second Edition* Springer 2, 207-216.
- Carle, S. (2009). "La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important." Pharmactuel **42**(2): 6-21.
- Cattoir, V., F. Denis, C. Martin, M.-C. Ploy and C. Poyart (2016). Bactériologie médicale: techniques usuelles, Elsevier Health Sciences.
- Chemical Compositions and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Eastern
- Chemistry. , Article ID 149502, 7 pages. Composition and Antimicrobial Activity of *Ruta chalepensis* L. Essential Oil from Algeria. *Asian Journal of Chemistry* Vol. 20, No. 4 (2008), 2989-2996.
- Chraïbi, M., Fikri-Benbrahim, K., Edryouch, A., Fadil, M. & Farah, A. (2021) Caractérisation chimique et activités antibactériennes des huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* et *Myrtus communis* et leur effet antibactérien synergique. *Phytothérapie*, **19**, 171-177.
- Couic-Marinier, F. and A. Lobstein (2013). "Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine." Actualités pharmaceutiques **52**(525): 18-21.
- Daoudi, A., Hrouk, H., Belaidi, R., Slimani, I., Ibjibjen, J. & Nassiri, L. (2016) Valorisation de *Ruta montana* et *Ruta chalepensis*: étude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Materials and Environmental Science*, **7**, 685-1063.
- Davies, J. and D. Davies (2010). "Origins and evolution of antibiotic resistance." Microbiology and molecular biology reviews **74**(3): 417-433.
- DeMarco, C. E., L. A. Cushing, E. Frempong-Manso, S. M. Seo, T. A. Jaravaza and G. W. Kaatz (2007). "Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**(9): 3235-3239.

- Dembélé, D. L. (2011). "Formulation de pommade antalgique et anti-inflammatoire à base de securidaca longepedunculata Fresen (Polygalaceae)."
- Di Pasqua, R., G. Betts, N. Hoskins, M. Edwards, D. Ercolini and G. Mauriello (2007). "Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils." Journal of agricultural and food chemistry **55**(12): 4863-4870.
- Dib, M., M. Bendahou, A. Bendiabdellah, N. Djabou, H. Allali, B. Tabti, J. Paolini and J. Costa (2010). "Partial chemical composition and antimicrobial activity of *Daucus crinitus* Desf. extracts." grasas y aceites **61**(3): 271-278.
- Djabou Nassim, Boufeldja Tabti, and Jean Costa. 2012. Antibacterial Activity of *Daucus crinitus* Essential Oils along the Vegetative Life of the Plant.
- Donlan, R. M. (2000). "Role of biofilms in antimicrobial resistance." ASAIO journal **46**(6): S47-S52.
- El Amine Dib, M., N. Djabou, J.-M. Desjobert, H. Allali, B. Tabti, A. Muselli and J. Costa (2010). "Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation." Chemistry Central Journal **4**: 1-15.
- El Guiche, R., S. Tahrouch, O. Amri, K. El Mehrach and A. Hatimie (2015), "Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of 30 medicinal and aromatic plants located in the South of Morocco." International Journal of New Technology and Research **1**(3): 263695.
- Elazzouzi, H., Khabbal, Y., Bouachrine, M., Zair, T. & Alaoui El Belghiti, M. (2018) Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Artemisia ifranensis* J. Didier essential oil Growing Wild in Middle Moroccan Atlas. *Journal of Essential oil Research*, **30**, 142-151.
- Ellis, J. R., J. J. Bull and P. A. Rowley (2023). "Fungal Glycoside Hydrolases Display Unique Specificities for Polysaccharides and *Staphylococcus aureus* Biofilms." Microorganisms **11**(2): 293.
- Etienne, M.-. and M. Vandenesch (2003). "Le staphylocoque doré résistant à la méticilline d'origine communautaire."

- Gamra, B. and S. Amel (2021). Effet pupicide de l'huile essentielle de Lavandula dentata chez Culiseta longiareolata, Université laarbi tebessi tebessa.
- Giammanco • M. Amparo Bla`zquez • A. Carrubba. 2011. Chemical Composition and
- Hadil , A. (2022). "La résistance aux antibiotiques des Staphylococcus aureus isolées des cafards."
- Heidary, M., A. D. Khosravi, S. Khoshnood, M. J. Nasiri, S. Soleimani and M. Goudarzi (2018). "Daptomycin." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **73**(1): 1-11.
- Hood, J. R., J. M. Wilkinson and H. M. Cavanagh (2003). "Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research." Journal of Essential Oil Research **15**(6): 428-433.
- Imanishi, I., A. Nicolas, A.-C. B. Caetano, T. L. d. P. Castro, N. R. Tartaglia, R. Mariutti, E. Guédon, S. Even, N. Berkova and R. K. Arni (2019). "Exfoliative toxin E, a new Staphylococcus aureus virulence factor with host-specific activity." Scientific Reports **9**(1): 16336.
- Imelouane, B., A. Elbachiri, M. Ankit, H. Benzeid and K. Khedid, 2009. Physico-
- J. Fauchere, Giret, P., F. Roblot, J. Poupet, P. Thomas, M. Lussier-Bonneau, C. Pradere, B. Becq-Giraudon and O. Castel (2001). "Study of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization among intermediate-care facility patients." La Revue de Medecine Interne **22**(8): 715-722.
- Jiang, B., S. Yin, B. You, Y. Gong, G. Huang, Z. Yang, Y. Zhang, Y. Chen, J. Chen and Z. Yuan (2018). "Antimicrobial resistance and virulence genes profiling of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in a burn center: a 5-year study." Microbial pathogenesis **114**: 176-179.
- Journal of Biological and Chemical Sciences **15**(2): 750-772.
- Kaloustian, J., J. Chevalier, C. Mikail, M. Martino, L. Abou and M.-F. Vergnes (2008). "Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne." Phytothérapie **6**(3): 160-164.
- Khadir, A., Bendahou, M., Benbelaid, F., Abdoune, M. & Abdelouahid, D. (2013) Pouvoir antimicrobien de Thymus lanceolatus Desf., récolté en Algérie. *Phytothérapie*, **11**, 353-358.

- Le Loir, Y. and M. Gautier (2010). Staphylococcus aureus, Citeseer.
- Lebeaux, D., J.-C. Lucet and F. Barbier (2016). "Management of biofilm-related infections in the intensive care unit: Current guidelines." Réanimation **25**: 308-317.
- Liu, Y., J. Zhang and Y. Ji (2020). "Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*." Science Progress **103**(1): 0036850419898659.
- Lu, Y., L. Wang, H. Tian and Q. Jiang (2023). "Association between nasal colonization of *Staphylococcus aureus* and surgical site infections in spinal surgery patients: a systematic review and meta-analysis." European Review for Medical and Pharmacological Sciences **27**: 417-425.
- M. Militello • L. Settanni • A. Aleo • C. Mammina • G. Moschetti • G. M.
- Mariutti, R. B., N. R. Tartaglia, N. Seyffert, T. L. de Paula Castro, R. K. Arni, V. A. Azevedo, Y. Le Loir and K. Nishifuji (2017). "Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*." The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*.
- Merghache, S., Djabou, N., Merghache, D., Muselli, A., Tabti, B. & Costa, J. (2012) Chemical composition, antibacterial and antioxydant activities of a new essential oil chemotype of algerian *Artemisia arborescens* L. Afr J Pharm Pharmacol, **6**, 2912-2921.
- Michelakis, E. C., E. Evergetis, S. D. Koulocheri and S. A. Haroutounian (2016). "Exploitation of *Artemisia arborescens* as a renewable source of chamazulene: seasonal variation and distillation conditions." Natural Product Communications **11**(10): 1934578X1601101022.
- Moormeier, D. E. and K. W. Bayles (2017). "Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism." Molecular microbiology **104**(3): 365-376.
- Moroccan *Lavandula dentata*. Int. J. Agric. Biol., **11**: 113–118.
- Nhan, T.-X., Y. Gillet and F. Vandenesch (2012). "Diagnostic et traitement des infections dues aux souches de *Staphylococcus aureus*, productrices de toxines." Journal des Anti-infectieux **14**(2): 58-67.
- Otto, M. (2008). "Staphylococcal biofilms." Bacterial biofilms: 207-228.
- Ouedraogo, S., J. Yoda, T. K. Traore, M. Nitiema, B. C. Sombie, H. Z. Diawara, J. B. Yameogo, A. Djande, L. Belemnaba and F. B. Kini (2021). "Production de matières premières et fabrication des médicaments à base de plantes médicinales.

- Parker, M. W. and S. C. Feil (2005). "Pore-forming protein toxins: from structure to function." Progress in biophysics and molecular biology **88**(1): 91-142.
- Rasmussen, R. V., V. G. Fowler Jr, R. Skov and N. E. Bruun (2011). "Future challenges and treatment of Staphylococcus aureus bacteremia with emphasis on MRSA." Future microbiology **6**(1): 43-56.
- Rather, M. A., B. A. Bhat and M. A. Qurishi (2013). "Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the "one drug to fit all" model breaking down?" Phytomedicine **21**(1): 1-14.
- Rezq, S., A. E. Alsemeh, L. D'Elia, A. M. El-Shazly, D. M. Monti, M. Sobeh and M. F. Mahmoud (2020). "Thymus algeriensis and Thymus fontanesii exert neuroprotective effect against chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats." Scientific Reports **10**(1): 1-15.
- Rizzato, C., J. Torres, E. Kasamatsu, M. Camorlinga-Ponce, M. M. Bravo, F. Canzian and I. Kato (2019). "Potential role of biofilm formation in the development of digestive tract cancer with special reference to Helicobacter pylori infection." Frontiers in Microbiology **10**: 846.
- S. MERGHACHE, M. HAMZA, M. BENDAHOU and B. TABTI. Chemical composition and antimicrobial activity of Ruta chalepensis L. essential oil from Algeria.
- Salaün, S. (2009). Interactions entre la macroalgue brune Laminaria digitata et ses épibiontes bactériens: études moléculaire et spectroscopiques: capacité d'adhésion et de formation de biofilm, Université de Bretagne Sud.
- Sara, N. D. R. (2022). Investigation phytochimique et biologique d'une plante médicinale et préparation des formes pharmaceutiques semi-solides pour application cutanée, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA.
- Schwarz, S., Loeffler, A. & Kadlec, K. (2016) Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. Veterinary Dermatology.
- Servais, P. and J. Passerat (2009). "Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France)." Science of the Total Environment **408**(2): 365-372.

- Sifouane, S., I. Benabdelaziz, M. Benkhaled, S. Gómez-Ruiz, S. Carralero and H. Haba (2020). "A new aryltetralin lignan and other phytoconstituents from *Atractylis humilis*." Biochemical Systematics and Ecology **90**: 104018.
- Springman, A. C., D. W. Lacher, G. Wu, N. Milton, T. S. Whittam, H. D. Davies and S. D. Manning (2009). "Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes." Journal of bacteriology **191**(17): 5419-5427.
- T. Dob, D. Dahmane, T. Benabdelkader, and C. Chelghoum. 2006. Composition and
- Tremblay, Y. D., S. Hathroubi and M. Jacques (2014). "Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique." Canadian Journal of Veterinary Research **78**(2): 110-116.
- Vincenot, F., M. Saleh and G. Prévost (2008). "Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*." Revue francophone des laboratoires **2008**(407): 61-69.
- Vitale, R.G., Afeltra, J. & Dannaoui, E. (2005) Antifungal Combinations. In Ernst, E.J., Rogers, P.D. (eds) *Antifungal Agents: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 143-152.
- Wallet, F. (2020). "Pesticides/Biocides." Environnement, Risques & Santé **19**(2): 147-148.
- Yves, L. L. and G. Michel (2009). Staphylococcus aureus, Lavoisier.

## Annexes

### Profils biochimiques des souches isolées

Souche clinique 02 (*S. aureus*)

AMY	-	PIPLC	-	dxyl	-	ADH1	+	BGAL	+	AGLU	+
APPA	-	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	+
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	+	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	-	dSORB	-	URE	+	POLYB	+	dGAL	+
dRIB	+	ILATK	+	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	+	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	O129R	+	SAL	-	SAC	+	dTRE	+	ADH2s	-
OPTO	+										

Souche clinique 03 (*S. aureus*)

AMY	-	PIPLC	-	dxyl	-	ADH1	+	BGAL	+	AGLU	-
APPA	-	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	+
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	+	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	-	dSORB	-	URE	-	POLYB	+	dGAL	+
dRIB	+	ILATK	+	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	-	NC6.5	+	dMAN	+	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	O129R	+	SAL	-	SAC	+	dTRE	+	ADH2s	-
OPTO	+										

Souche clinique 04 (*S. aureus*)

AMY	-	PIPLC	-	dxyl	-	ADH1	+	BGAL	+	AGLU	-
APPA	-	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	+
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	+	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	-	dSORB	-	URE	+	POLYB	+	dGAL	+
dRIB	+	ILATK	+	LAC	+	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	-	NC6.5	+	dMAN	+	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	O129R	+	SAL	-	SAC	+	dTRE	+	ADH2s	+
OPTO	+										

Souche clinique 05 (*S. aureus*)

AMY	-	PIPLC	-	dxyl	-	ADH1	+	BGAL	-	AGLU	+
APPA	-	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	+
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	+	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	-	dSORB	-	URE	+	POLYB	+	dGAL	+
dRIB	+	ILATK	+	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	+	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	O129R	+	SAL	-	SAC	+	dTRE	+	ADH2s	-
OPTO	+										

Souche clinique 01 *S. aureus*

AMY	-	PIPLC	-	dxyl	-	ADH1	+	BGAL	+	AGLU	-
APPA	-	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	+
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	+	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	-	dSORB	-	URE	+	POLYB	+	dGAL	+
dRIB	+	ILATK	+	LAC	+	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	-	NC6.5	+	dMAN	+	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	O129R	+	SAL	-	SAC	+	dTRE	+	ADH2s	+
OPTO	+										



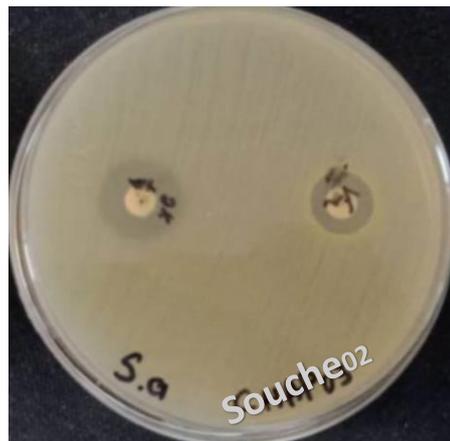
effet de l'HE de *T. fontanesii*  
Sur ATCC 25923



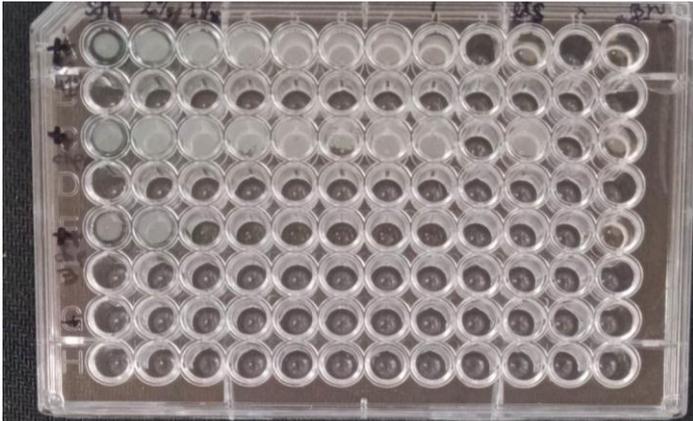
effet de l'HE de *R. chalpensis*, *L. dentata*  
Sur souche 04



Effet de l'HE de *T. fontanesii*  
Sur la souche SARM



Antibiogramme de la souche 02  
Vancomycine et Oxacilline



La CMI des souches exposées à *A. arborescens*



Effet des HEs *A. arborescens* et *D. crinitus*  
Sur souche 04



La CMI des souches exposées à *R. chalpensis*



CMI de combinaison *L. dentata* et *T. fontanesii*



CMI de combinaison *A. arborescens* et *T. fontanesii*



CMI de combinaison *A. arborescens* et *L. dentata*



Formulation du produit à base des huiles essentielles contre  
*S. aureus*

*Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène à Gram positif qui peut causer diverses infections chez l'homme, allant des infections cutanées mineures aux infections plus graves. Ces infections sont généralement accompagnées avec des résistances aux antibiotiques notamment la méticilline. Dans ce travail nous avons évalué l'activité de cinq huiles essentielles (HEs) sont *Thymus fontanesii*, *Daucus crinitus*, *Artemisia arborescens*, *Lavendula dentata*, *Ruta chalpensis* sur des souches de *S. aureus* par la méthode de diffusion sur gélose, CMI et combinaison des huiles essentielles et à la fin nous avons formulé un produit à usage cutané à base de HEs actives pour lutter contre ces souches.

Toutes les huiles essentielles testées ont montré une activité inhibitrice contre les souches de *S. aureus*, y compris les souches SARM, cependant cette activité était différente d'une huile à une autre *T. fontanesii* était l'huile la plus active alors que *D. crinitus* était la moins active. La combinaison entre les trois huiles les plus actives n'a montré pas d'interactions négatives ce qui a permis de combiné trois huiles les plus actives dans un produit à usage cutané sous forme d'une pommade.

**Mots clés :** *S. aureus*, SARM, activité inhibitrice, Les huiles essentielles, Pommade, combinaison des HE, HE actives.

---

### Abstract

*Staphylococcus aureus* is a Gram-positive pathogenic bacterium that can cause various infections in humans, ranging from minor skin infections to more severe infections. These infections are often accompanied by resistance, particularly methicillin resistance. In this study, we evaluated the activity of five essential oils (EOs), namely *Thymus fontanesii*, *Daucus crinitus*, *Artemisia arborescens*, *Lavendula dentata*, and *Ruta chalpensis*, against *S. aureus* strains using the agar diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC), and combination of essential oils. Ultimately, we formulated a topical product based on active EOs to combat these strains.

All tested essential oils demonstrated inhibitory activity against *S. aureus* strains, including methicillin-resistant strains. However, the activity varied among different oils, with *T. fontanesii* exhibiting the highest activity while *D. crinitus* showed the least activity. The combination of the three most active oils showed no negative interaction, allowing for their incorporation into a topical product in the form of an ointment.

**Key words :** *S. aureus*, SARM, inhibitory activity, Essential oils, ointment, combination of essential oils, active essential oils.

---

### ملخص

سٹافیلوکوکس اوربوس هو بكتيريا ذات صبغة ايجابية تسبب مجموعة متنوعة من العدوى في الإنسان، بدءًا من العدوى الجلدية البسيطة إلى العدوى الأكثر خطورة. عادة ما تترافق هذه العدوى مع مقاومة للميثيسيلين وغيرها من المضادات الحيوية. في هذا العمل، قمنا بتقييم نشاط خمس زيوت عطرية، وهي *Thymus fontanesii*، *Artemisia arborescens*، *Daucus crinitus*، *Lavendula dentata*، *Ruta chalpensis*، على سلالات من سٹافیلوکوکس اوربوس باستخدام طريقة الانتشار على الزلال وتحديد الحد الأدنى لتنشيط النمو وتركيبية الزيوت العطرية المختلطة. وفي النهاية، قمنا بتطوير منتج قائم على الزيوت العطرية الفعالة للاستخدام على الجلد لمكافحة هذه السلالات. أظهرت جميع الزيوت العطرية المختلطة نشاطًا مثبطًا ضد سلالات سٹافیلوکوکس اوربوس، بما في ذلك سلالات سٹافیلوکوکس المقاومة للميثيسيلين، ومع ذلك كان هذا النشاط مختلفًا من زيت إلى آخر، حيث كان زيت *Thymus fontanesii* الأكثر نشاطًا بينما كان زيت *Ruta chalpensis* الأقل نشاطًا. لم تظهر المزيج بين الزيوت الثلاثة الأكثر فعالية أي تفاعل سلبي، مما سمح بدمجها في منتج قابل للاستخدام على الجلد على شكل مرهم.

**الكلمات المفتاحية :** سٹافیلوکوکس اوربوس ، نشاطا مثبطا ، الزيوت الفعالة ، تركيبية الزيوت العطرية ، SARM ، مرهم .