



UNIVERS ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

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

THESE

Présentée par

Mr KHADIR Abdelmounaim

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie cellulaire et biochimie
Option : maîtrise du développement microbien

Effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de
Staphylococcus aureus résistantes à la méticilline SARM isolées du CHU de Tlemcen

Soutenue le .../.../...

Devant le jury

Président	Abdelouahid D.E.	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Abbouni B.	Professeur	U. de Sidi Belabess
Examineur	Yousfi M.	Professeur	U. de Laghouat
Examineur	Bensoltane A.	Professeur	U. d'Oran
Examinatrice	Hassaine H.	Professeur	U. de Tlemcen
Directeur de thèse	Bendahou M.	Professeur	U. de Tlemcen

DEDICACES

Cette Thèse est dédiée

À ma maman

À ma famille

Et à mes amis

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédicale et à l'environnement (LAMAABE), université **ABOU BEKR BELKAID (ABB)** de Tlemcen. La caractérisation moléculaire des souches bactériennes a été faite à l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergents (URMITE), Université Aix Marseille II France, dirigé par le professeur Didier Raoult.

Je remercie le professeur Moussa-Boudjemaa Boumediène directeur du laboratoire LAMAABE et responsable de la formation doctorale « Maitrise du développement microbien » de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire et pour les moyens matériels mis à ma disposition.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à monsieur Bendahou Mourad professeur à l'université ABB de Tlemcen (laboratoire LAMAABE) pour avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir initié et guidé sur les chemins de la recherche en me poussant à valoriser mon travail.

J'adresse mes remerciements et mes respects à monsieur Abdelouahid Djamal Eddine professeur à l'université ABB de Tlemcen (laboratoire LAMAABE) pour ces conseils précieux et pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Un grand merci à Mr Abbouni Bouziane professeur à l'université de Sidi Belabess pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je remercie également Mr Yousfi Mohamed professeur à l'université de Laghouat pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je remercie vivement Mr Bensoltane Ahmed professeur à l'université d'Oran pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à madame Hassaine Hafida Professeur à l'université ABB de Tlemcen (laboratoire LAMAABE) pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je suis sincèrement reconnaissant envers Mr Jean Marc Rolain professeur à l'université Aix Marseille II pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire et pour m'avoir initié l'identification microbienne par MALDI-TOF-MS et l'utilisation de la PCR.

Je remercie l'équipe de chimie des substances naturelles dirigée par le professeur Jean Costa de l'université de Corse pour l'analyse des huiles essentielles.

Je remercie également le personnel du CHU de Tlemcen qui m'a facilité l'accès dans leurs services en particulier le Dr Smahi.M.C, Dr Chabni. N et Dr Kendouci-Tani M.

Je remercie le Dr Medjahedi Boumediène du département de foresterie, Université de Tlemcen pour l'identification des plantes.

Je remercie tous les enseignants et amis du laboratoire LAMAABE, en particulier, Mr Benbelaid Fethi, Abdoune Mohamed Amine, Bellahcène Chafika et Zenati Fatima pour leur conseil et leur collaboration.

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Introduction	1
Partie I. Synthèse bibliographique	1
Chapitre 1 : <i>Staphylococcus aureus</i> aspects cliniques et mécanismes de résistances	3
1. Présentation du germe <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2. Classification.....	4
3. Réservoir.....	4
4. Identification de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	5
4.1. Nouvelles techniques d'identification de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	6
5. Facteurs de virulence et d'infections.....	9
5.1. Les toxines formant des pores ou « pore-forming toxins (PFTs) ».....	10
5.1.1. Les alpha-PFTs.....	10
5.1.2. Les bêta-PFTs.....	10
5.1.2.1. L'alpha-toxine ou alpha-hémolysine.....	10
5.1.2.2. Les leucotoxines à deux composés.....	11
5.1.2.2.1. La gamma-hémolysine.....	11
5.1.2.2.2. La leucocidine de Panton Valentine.....	11
6. Autres types de toxines.....	12
6.1. Les toxines à activité protéolytique « Les épidermolysines ».....	12
6.2. Les Superantigènes.....	12
7. Les antibiotiques	13
7.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques.....	13
7.2. Les cibles bactériennes des antibiotiques (mécanisme d'action).....	13
7.3.β lactamines.....	15
7.3.1. Mécanismes d'action.....	16
7.3.2. Méricilline et Oxacilline.....	16
7.4. L'antibiogramme.....	17
7.5. Résistance aux antibiotiques.....	17
7.5.1. Résistance naturelle.....	18
7.5.2. Résistance acquise.....	18
8. Émergence de la résistance aux antibiotiques.....	18
9. Les infections nosocomiales.....	19
9.1. Définition de l'infection nosocomiale.....	19

9.2. Les infections nosocomiales causées par le SARM.....	20
9.3. Les infections à SARM communautaires SARM-C.....	20
10. Résistance à la méticilline.....	21
10.1. Définition.....	21
10.2. Historique.....	22
10.3. Les mécanismes de la résistance à la méticilline.....	23
10.3.1. La résistance intrinsèque par production de PLP2a ou PLP2'.....	23
10.3.2. Régulation de l'expression de PLP2a ou PLP2'.....	25
10.3.3. Résistance par hyperproduction de pénicillinase staphylococcique.....	25
10.3.4. Résistance par production d'une méthicillinase.....	25
10.3.5. Résistance par des mutations affectant le gène PLP2.....	26
10.4. Typage moléculaire des SARM.....	26
10.4.1. L'électrophorèse en champs pulsés (Pulsed-Field Gel Electrophoresis PFGE).....	26
10.4.2. Typage <i>Spa</i>	28
10.4.3. Typage génomique multilocus (Multi-Locus Sequence Typing MLST).....	29
Chapitre 2 : produits naturels et effet anti-SARM.....	30
1. Produits naturels et recherche de nouvelles molécules antibactériennes.....	30
1.1 . Importance de recherches des substances naturelles antibactérienne.....	30
1.2. La production des antibiotiques se ralentit.....	31
1.3 Les substances naturelles antibactériennes d'origine végétale (plantes aromatiques et médicinales PAM).....	32
1.3.1. Les principaux groupes de composés antimicrobiens de plantes.....	33
1.3.2. les substances naturelles végétales inhibitrices du SARM.....	34
2. Les huiles essentielles et leur activité biologique	35
2.1. Définition.....	35
2.2. Composition chimique des huiles essentielles.....	36
2.3. Méthodes d'obtention des huiles essentielles.....	37
2.3.1. La Distillation à la vapeur.....	37
2.3.2. L'hydrodistillation.....	37
2.3.3. L'enfleurage.....	37
2.3.4. L'extraction par fluide supercritique.....	37
2.3.5. Extraction des huiles essentielles par microondes.....	38
2.4. Les huiles essentielles comme des antimicrobiens.....	38

2.5. Les huiles essentielles comme outil de lutte contre le SARM.....	39
2.6. Activité <i>in vivo</i> des huiles essentielles contre le SARM.....	41
2.7. Combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques et lutte contre le SARM.....	42
Partie II. Matériels et méthodes.....	46
1. Matériels.....	46
1.1. Souches de références.....	46
1.2. Milieux de culture.....	46
1.2.1. Milieux de culture liquides.....	46
1.2.2. Milieux de culture solides.....	46
1.3. Tests biochimiques.....	46
1.4. Antibiotiques.....	46
1.4.1. En disque.....	46
1.4.2. En poudre.....	47
1.5. Solvants organiques et solutions chimiques.....	47
2. Méthodes.....	47
2.1. Prélèvements.....	47
2.2. Souches bactériennes.....	47
2.2.1 Isolement.....	47
2.2.2 Identification.....	48
2.2.2.1 L'identification par Galerie APIstaph.....	48
2.2.2.2 L'identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF.....	48
2.2.2.2. A. Préparation de la matrice.....	48
2.2.2.2. B. Préparation des souches.....	48
2.2.2.2. C. Préparation de la cible.....	48
3. Les tests de sensibilité aux antibiotiques.....	49
4. La recherche des gènes <i>mecA</i> , PVL et TSST-1 par PCR.....	49
4.1 Extraction d'ADN automatisé « QIAGEN ».....	49
4.1.1 préparation du mixte.....	49
4.1.2. Extraction par l'appareille QIAGEN.....	49
4.2. Amplification.....	50
4.2.1 Préparation des Amorces.....	50
4.2.2 Préparation du mixte.....	51
4.2.3 Amplification génique.....	51

5. Recherche de la dégradation de l'oxacilline par spectrométrie de masse.....	51
6. Effet des huiles essentielles et des extraits éthanoliques des plantes aromatiques retenues sur les souches SARM.....	52
6.1. Plantes aromatiques	52
6.2. Obtention des huiles essentielles.....	53
6.3. L'extraction par solvant organique (Ethanol).....	53
6.4. Analyse chimique des huiles essentielles.....	54
6.5. Tests <i>in vitro</i> anti SARM.....	55
6.5.1. Technique de diffusion en gélose « Bauer & Kirby ».....	55
6.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI ».....	55
6.5.3. Test d'activité en phase vapeur et calcul de la dose minimale inhibitrice DMI.....	55
6.5.4. Cinétique de destruction du SARM avec les huiles essentielles.....	56
6.5.5. Étude de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques.....	57
6.6. Tests <i>in vivo</i> Anti-SARM	57
6.6.1. L'induction de l'infection.....	58
6.6.2. Traitement.....	58
Partie III. Résultats et discussion.....	59
1. Identification des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées du CHU de Tlemcen.....	59
1.1. Identification par Galerie API staph.....	59
1.2. Identification et typage par MALDI-TOF MS.....	59
2. Les tests de sensibilité aux antibiotiques.....	61
3. Recherche des gènes <i>mecA</i> , <i>LPV</i> et <i>TSST-1</i> par PCR.....	64
4. Recherche de la dégradation de l'oxacilline par spectrométrie de masse.....	68
5. Conclusion.....	71
6. Effet des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de certaines plantes aromatiques et médicinales sur les souches SARM.....	72
6.1. Résultats d'extraction.....	72
6.2. Analyse chimique des huiles essentielles.....	72
7. Effets des huiles essentielles des six plantes sur les souches SARM.....	76
7.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose	76
7.2. Résultats des concentrations minimales inhibitrices.....	79
8. Effets des extraits de l'éthanol des six plantes sur les souches SARM.....	83
8.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose et des concentrations minimales	83

inhibitrices.....	
9. Résultats des tests d'activités en phase vapeur (calcul de la dose minimale inhibitrice « DMI »).....	86
10. Cinétique de destruction du SARM avec les huiles essentielles.....	88
11. Résultats des tests <i>in vivo</i>	92
12. Étude de la combinaison des huiles essentielles avec la vancomycine.....	95
13. Conclusion.....	98
Conclusion générale	100
Références	102
Annexes	119
Annexe 1 : Résultats d'identifications API	120
Annexe 2 : Chromatogrammes CG/SM des huiles essentielles étudiées	122
Annexe 3 : Publications	125

Liste des abréviations

BORSA : Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
Buffer : Solution Tampon
CC : complexe clonal
CFI : Concentration fractionnelle inhibitrice
CG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CMI : concentrations minimales inhibitrices
DMI : Dose minimale inhibitrice
ET : toxines exfoliatines
H.E : Huiles essentielles
HCCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
IDSA : Infectious Diseases Society of America
LPV : leucocidine de Panton Valentine
MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
MDR : multirésistance aux antibiotiques
MLST : Typage génomique multilocus
MODSA : Modified PBPs *Staphylococcus aureus*
PAM : Plantes aromatiques et médicinales
PB : Paires de bases
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PFGE : Electrophorèse en champs pulsés
PLP : protéine liant la pénicilline
PTFs : Les toxines formant des pores
SAGs : Superantigènes
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SARM-C *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline d'origine communautaire
SARM-H : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline d'origine hospitalière
SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
SCCmec : Cassette chromosomique staphylococcique
TSST1 : syndrome du choc toxique staphylococcique
UFC : Unité Formant Colonie

VISA : *Staphylococcus aureus* a sensibilité intermédiaire à la vancomycine

VNTRs : Répétitions variable en tandem

VRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine

Liste des Figures

Figure 1 : <i>S aureus</i> au microscope. (A) La coloration de Gram à partir de tissus infecté avec CA-MRSA. Notez l'absence de granulocytes polymorphonucléaires. (B) un frottis sanguin montrant <i>S aureus</i> lors d'une infection intracellulaire. (C) micrographie électronique à transmission de <i>S aureus</i>	3
Figure 2 : Taux de portage de <i>S. aureus</i> par partie du corps chez les adultes.....	5
Figure 3 : Étapes d'identification et de typage des bactéries avec la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	8
Figure 4 : Structure chimique de l'oxacilline.....	17
Figure 5 : Les mécanismes biologiques de la résistance.....	19
Figure 6: Évolution des infections nosocomiales et communautaires à <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline SARM.....	21
Figure 7: Les quatre vagues de la résistance aux antibiotiques chez <i>S. aureus</i>	23
Figure 8 : Structure de cinq principaux types de l'élément chromosomique staphylococcique mec cassette (<i>Scmec</i>).....	24
Figure 9 : Dendrogramme représentant le regroupement des souches BORSA qui causent les infections en dermatologie collectées de dix hôpitaux différents, typés par électrophorèse en champs pulsés.....	27
Figure 10: Les clones épidémiques de SARM qui cause la plupart des maladies dans le monde entier, typé par le séquençage de la protéine A « <i>Spa</i> ».....	28
Figure 11 : (A) : Approbations d'antibiotiques à partir de 1983 jusqu'au présent (données obtenues à partir du rapport d'IDSA) dans lequel la plupart de ces médicaments (75 %) proviennent de deux classes, β -lactamines et les quinolones. (B) : Histoire de l'introduction de produits antibactériens et d'approbation.....	32
Figure 12 : Le gallate d'épicatchine.....	35
Figure 13 : Dynamique des publications de PubMed sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	39
Figure 14 : La microscopie électronique de bactéries de <i>S. aureus</i> traités par le composé majeur de l'huile essentielle de <i>Melaleuca alternifolia</i> « terpinène-4-ol ».....	40
Figure 15 : Isoboles de zéro interaction, Synergie et l'antagonisme.....	44
Figure 16 : Un exemple de l'effet de synergie entre l'huile essentielle de <i>Zataria multiflora</i> et la vancomycine contre une souche de SARM et une autre SASM.....	44
Figure 17 : L'appareil d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation « Clevenger ».....	53
Figure 18 : Identification d'un nombre de souches comme étant l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> par MALDI-TOF MS de type MICROFLEX et par analyse sur le Logiciel Biotyper version 2.0.....	59
Figure 19 : Dendrogramme de 52 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la méthicilline de type BORSA. Les spectres ont été traités en utilisant le logiciel MALDI Biotyper version 2.0 (Bruker Daltonik Allemagne).....	60
Figure 20 : Dendrogramme de 126 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées du CHU de Tlemcen (Algérie).....	61

Figure 21 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> prélevées au CHU de Tlemcen.....	64
Figure 22 : Résultats de la PCR standard sur la recherche du gène <i>mec A</i>	65
Figure 23 : Résultats de la PCR en temps réel sur la recherche du gène <i>mec A</i>	65
Figure 24 : Résultats de la PCR en temps réel sur la recherche du gène LPV.	66
Figure 25 : Résultats de la PCR en temps réel sur la recherche du gène TSST1.	66
Figure 26 : Structures chimiques de l'oxacilline et ses produits de dégradations.....	69
Figure 27 : Les spectres établis par MALDI-TOF Ultraflex de la souche 101 (SARM) à 0,125 et 0,0625 mg/ml dans le temps T4.....	70
Figure 28 : Les spectres établis par MALDI-TOF Ultraflex de la souche Sa34 (SASM) à 0,125 et 0,0625 mg/ml dans le temps T4.....	71
Figure 29 : Effet des huiles essentielles étudiées sur des souches SARM.....	78
Figure 30 : Dose minimale inhibitrice de la souche SARM1 exposé à l'huile d' <i>O. v. subsp. glandulosum</i>	88
Figure 31a : Cinétique de destruction de la souche SARM ATCC 43300 exposée à quatre huiles essentielles (<i>O. v. subsp. glandulosum</i> , <i>T. m. subsp. Ciliatus</i> , <i>L. multifida</i> et <i>A. verticillata</i>) dans les temps 15', 30', 60', 120' et 240' aux concentrations 1 et 0.5%.....	89
Figure 31b : Cinétique de destruction de la souche SARM ATCC 43300 exposée à quatre huiles essentielles (<i>O. v. subsp. glandulosum</i> , <i>T. m. subsp. Ciliatus</i> , <i>L. multifida</i> et <i>A. verticillata</i>) dans les temps 15', 30', 60', 120' et 240' aux concentrations 0.25 et 0.125%.....	90
Figure 32 : L'effet de l'huile essentielle d' <i>O. v. subsp. glandulosum</i> sur la réduction du nombre d'UFC des plaies infectées du rat Wistar par <i>Staphylococcus aureus</i> LPV positif.....	92
Figure 33a : isobogrammes démontrant la synergie des huiles essentielles de <i>T. m. subsp. ciliatus</i> et d' <i>A. verticillata</i> avec la vancomycine contre une souche de SARM ATCC 43300.....	96
Figure 33b : isobogrammes démontrant la synergie des huiles essentielles d' <i>O. v. subsp. glandulosum</i> et de <i>L. multifida</i> avec la vancomycine contre une souche de SARM ATCC 43300.....	97

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classes d'antibiotiques en fonction de leur introduction en clinique, de leurs origines et de leurs mécanismes d'action.....	14
Tableau 2 : Les grandes classes de composés antimicrobiens provenant des plantes médicinales.....	33
Tableau 3 : Les amorces spécifiques utilisées pour le <i>mec A</i> la LPV et la TSST1	50
Tableau 4 : Méthode de la préparation du mixte pour la PCR standard.....	51
Tableau 5 : Les stations géographiques de récolte des plantes médicinales.....	52
Tableau 6 : Souches de <i>Staphylococcus aureus</i> identifiées déferrement par MALDI-TOF.MS et API Staph.....	60
Tableau 7 : résultats des antibiogrammes, de la CMI à l'oxacilline et de la PCR.....	62
Tableau 8 : Rendements en huiles essentielles des plantes étudiées.....	72
Tableau 9 : Composition chimique des huiles essentielles des PAM retenues.....	73
Tableau 10 : Diamètres d'inhibitions des huiles essentielles des six plantes médicinales récoltées dans l'ouest algérien.....	76
Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de six plantes médicinales récoltées dans l'Ouest algérien.....	79
Tableau 12 : Diamètres d'inhibitions des extraits à l'éthanol de <i>T. m. subsp.ciliatus</i> , <i>O. v. subsp. glandulosum</i> , <i>A. verticillata</i> <i>L. multifida</i> contre les souches SARM.....	83
Tableau 13 : Concentrations minimales inhibitrices des extraits à l'éthanol de <i>T. Ciliatus</i> , <i>O. glandulosum</i> , <i>A. verticillata</i> <i>L. multifida</i> contre les souches SARM.....	84
Tableau 14 : Doses minimales inhibitrices des huiles essentielles de <i>T. m. subsp.ciliatus</i> , <i>L. multifida</i> , <i>O. v. subsp. glandulosum</i> et <i>A. verticillata</i>	87

Introduction

Introduction

Les maladies infectieuses sont des pathologies qui affectent la santé des humains et des animaux et qui existaient depuis l'antiquité. L'homme n'a jamais cessé de lutter contre ces maladies par les traitements qui visent à éradiquer les microbes de l'organisme. Des épidémies ont envahi tout le monde et ont causé des dégâts humains avec des milliers. La découverte des antibiotiques par Alexander Flemming qui a mis en évidence la pénicilline contre une culture de Staphylocoque doré à sauver le monde de ces pathologies infectieuses mortelles surtout les plus dévastatrices telle que la peste, le choléra et le typhus. Actuellement ils font partie de ce qu'on nomme la paléomicrobiologie.

La découverte des antibiotiques a laissé les gens penser qu'il aura pour chaque maladie infectieuse un antibiotique spécifique active. Cependant, l'apparition des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques à soupçonner cette opinion et depuis ce temps, on assiste à l'émergence et à l'élargissement de la résistance pour tous les germes à Gram positif et à Gram négatif. Pour se défendre, les bactéries ont développé plusieurs mécanismes de résistance pour chacune des molécules d'antibiotiques. Ces mécanismes sont de natures enzymatiques telles que les β -lactamases qui inactivent les β -lactamines par modification chimique ou bien non enzymatiques causés par des mutations ou par des gènes d'origine inconnue qui s'intègre au niveau du génome bactérien. Aujourd'hui, on connaît plus de 290 types de β -lactamases réparties en 4 classes (A-D). Le gène *mec A* responsable de la synthèse de la PLP2a chez le SARM est un exemple édifiant (Boerlin et Reid-Smith, 2008). Ces mécanismes se diffuse généralement par des gènes mobiles tels que les transposons, les intégrons, les plasmides et les bactériophages (Levy et Marshall, 2004).

L'apparition des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) en 1961 a déclaré l'air des infections nosocomiales causé par les germes multirésistants aux antibiotiques. Devant ce problème de résistance, la découverte de nouvelles molécules d'antibiotiques et plus que nécessaire étant donné que l'industrie pharmaceutique à déclarer la difficulté de découverte de nouveaux agents antimicrobiens à chaque fois qu'un antibiotique sur le marché échoue à traiter une infection. Depuis, des études sont menées pour la recherche de nouveaux inhibiteurs contre les microorganismes et en particulier contre le SARM.

Plusieurs inhibiteurs de microorganismes pathogènes sont proposés comme les dérivés des pénèmes et des céphalosporines mais l'abus d'utilisation et le surdosage rendent les bactéries plus résistantes. C'est pourquoi, les chercheurs se sont penchés vers une voie alternative et

complémentaire qui est la valorisation des substances d'origine végétale. En effet, le règne végétal et en particulier les plantes aromatiques et médicinales « PAM » ont été le seul moyen pour traiter les infections mêmes avant de découvrir les microbes. C'est vrai que la médecine traditionnelle est plus accessible pour les démunis, mais on assiste aujourd'hui à un retour même de la population occidentale vers cette médecine. A l'unanimité scientifique, le monde végétal constitue un gigantesque réservoir naturel de molécules bioactives.

Pas mal de travaux ont été effectués sur l'action antimicrobienne des extraits des plantes sur les microorganismes mais peu d'études ont été faites sur un exemple clinique bien déterminé tel que le SARM.

Dans le même axe de recherche et de valorisation des substances naturelles antimicrobiennes d'origines végétales, nous nous sommes proposé d'évaluer l'effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline SARM isolées du CHU de Tlemcen. Le but de ce travail est d'essayer de voir si les extraits des plantes aromatiques retenues en l'occurrence les huiles essentielles des plantes aromatiques choisies et leurs extraits éthanolique ont une bonne action sur les souches de SARM ? Est ce qu'il y a des interactions positives ou négatives avec les antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des infections à SARM ? Et est-ce qu'une application in vivo des huiles est possible ?

Pour cela le présent travail est divisé en trois parties :

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

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : *Staphylococcus aureus* aspects cliniques et mécanismes de résistances

1. Présentation du germe *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif sphériques et immobiles de 0,5-1,5 μm de diamètre, pouvant être isolés, ou organisés en diplocoques, en chaînettes ou en grappes (figure1). Ce sont des aéro-anaérobies facultatifs. *Staphylococcus aureus* est un microorganisme qui pousse facilement sur la gélose au sang des moutons, caractérisé par une couleur dorée des colonies. Cette dernière est produite par les pigments caroténoïdes et elle est responsable du nom de l'espèce *aureus* (Hammond et White, 1970). Le pigment doré du staphylocoque semble toxique pour les granulocytes polymorphonucléaires et favorise ainsi la virulence par ses propriétés antioxydantes (Liu, 2005). En outre, *S. aureus* produit généralement une hémolyse bêta sur la gélose au sang. L'identification de *S. aureus* se fait généralement par des méthodes phénotypiques, qui comprennent le test de coagulase et les tests d'agglutination qui détectent la présence de déterminants de surface, telle que les facteurs d'agglutination, la protéine A et les polysaccharides (Kwok, 2003). D'autres tests biochimiques peuvent être utilisés comme la fermentation du mannitol et la présence de désoxyribonucléase thermostable qui constitue également un critère pour une identification plus rapide de *S. aureus* à partir d'hémocultures (Stratton et Ratner, 1985).

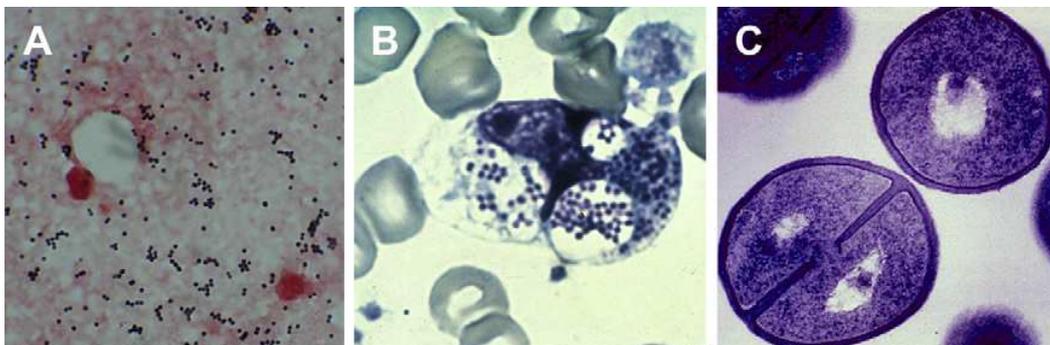


Figure 1 : *S. aureus* au microscope. (A) La coloration de Gram à partir de tissus infectés avec CA-MRSA. Notez l'absence de granulocytes polymorphonucléaires. (B) un frottis sanguin montrant *S. aureus* lors d'une infection intracellulaire. (C) micrographie électronique à transmission de *S. aureus* (Tang et Stratton, 2010).

2. Classification :

Selon l'ouvrage de référence pour la taxonomie bactérienne « Bergey's Manuel of systematic bacteriology » l'espèce *Staphylococcus aureus* est classé comme suit :

Domaine : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : Staphylococcus

Espèce : *Staphylococcus aureus* (Brenner et al., 2004)

3. Réservoir

S. aureus colonise la peau et les muqueuses de l'homme et de plusieurs espèces animales. Bien que des sites multiples du corps puissent être colonisés chez les êtres humains (figure 2), les fosses nasales du nez sont le site le plus fréquent pour le transport de *S. aureus*. Les autres sites extranasales sont la peau, le périnée et le pharynx. D'autres sites moins fréquents existent tels que le tractus gastro-intestinal, le vagin et les aisselles (Wertheim et al., 2005).

Les études ont montré que si on élimine le germe des narines il disparaît des autres parties de l'organisme. Trois types de portage peuvent être distingués : (i) environ 20% des personnes portent presque toujours un type de souche et sont appelés porteurs persistants. (ii) une proportion importante de la population ($\pm 60\%$) porte *S. aureus* par intermittence, et le changement de souches se fait avec une fréquence variable. Ces personnes sont appelées porteurs intermittents. (iii) enfin, une minorité de personnes ($\pm 20\%$) ne porte jamais des souches de *S. aureus* et ils sont appelés non-porteurs. Le portage persistant est plus fréquent chez les enfants que chez les adultes, et beaucoup de gens changent leurs habitudes de portage entre l'âge de 10 et 20 ans. *Staphylococcus aureus* peut être cultivé à partir des différents sites de l'organisme surtout les mains et les muqueuses chez les personnes ayant un portage nasal de cette espèce (Kluytmans et al., 1997).

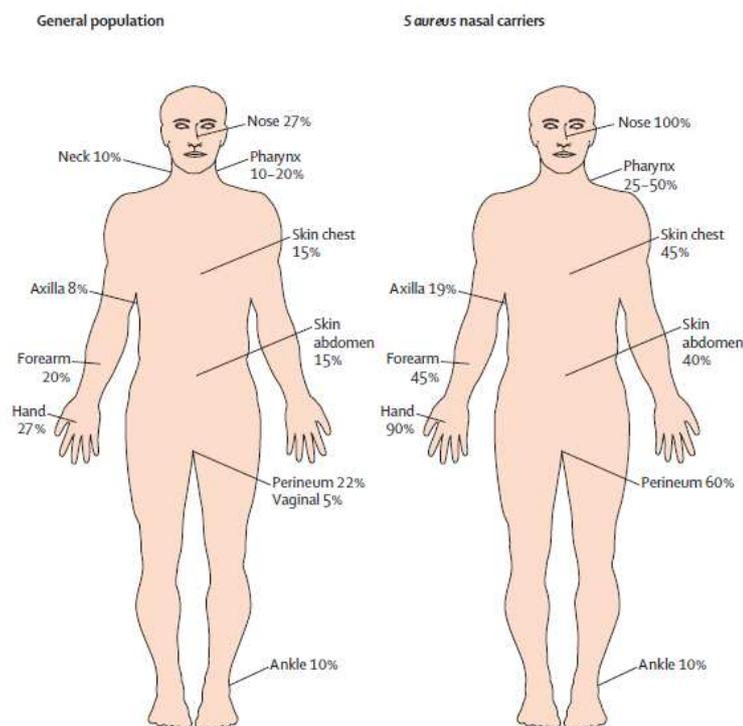


Figure 2 : Taux de portage de *S. aureus* par partie du corps chez les adultes

(Wertheim *et al.*, 2005)

4. Identification de l'espèce *Staphylococcus aureus*

Depuis le début du 20^e siècle et avec les progrès menés en microbiologie, la recherche sur l'identification du germe *Staphylococcus aureus* avait un intérêt clinique important. Pour cela des travaux ont été réalisés par Fairbrother et Chapman qui ont déterminé le caractère coagulant du plasma chez l'espèce *Staphylococcus aureus* comme un critère de pathogénicité et de classification (Chapman *et al.*, 1934; Fairbrother, 1940 ; Chapman *et al.*, 1941). Aussi Chapman a élaboré un milieu de culture gélosé qui permet facilement d'isoler les souches de *Staphylococcus aureus* du faite de sa composition élevée en chlorite de sodium qui inhibe la majorité des autres bactéries (Chapman, 1945). Cette gélose est utilisée jusqu'à présent en bactériologie clinique pour l'isolement des Staphylocoques dorés. Toutefois, après quelques années, d'autres travaux ont montré que le caractère coagulant de plasma peut être exercé par d'autres espèces appartenant au même genre *Staphylococcus* (Bayliss et Hall, 1965). A cet effet d'autres caractères biochimiques devraient être ajoutés comme critère d'identification. Cependant les procédés d'identification par les caractères biochimiques commençaient à devenir lourds en pratique du fait qu'une multitude de testes biochimique devrait être faites pour l'identification. Pour cela l'idée de miniaturisé une galerie d'identification biochimique

dans une microméthode a pris naissance dans les années 1970 par la mise en évidence du système API ZYM (Analytical profile index ZYM) pour la détection des enzymes (Humble et al., 1977). Dans cette période Kloos et Wolfshohl (1982) ont élaboré une minigalerie biochimique spécifique pour les staphylocoques appelée « API Staph-Ident System » qui permet d'identifier les dix espèces appartenant au genre *Staphylococcus* mais cette technique nécessitait plus de trois jours d'incubation. La société « Analytab Products » a développé un schéma de cette microméthode qui permet d'identifier correctement 90,4 % des souches de *Staphylococcus* après 24 h d'incubation et 80,9 % des souches après 5 h d'incubation (Doern et al., 1983).

Les progrès menés dans la biologie moléculaire en particulier la mise en évidence de l'amplification des gènes par la PCR (Saiki et al., 1988) et le développement du séquençage en particulier de l'ARN 16S et du RPOB « RNA polymerase β -subunit » (Clarridge, 2004 ; Adekambi et al., 2009) ont pu ajouter plusieurs nouvelles espèces dans la taxonomie du genre *Staphylococcus* et récemment l'identification par le biais du gène RPOB qui code la sous-unité β de l'ARN polymérase a permis de différencier les espèces qui apparaissaient phylogénétiquement étroites avec le séquençage de l'ARN 16s (Adekambi et al., 2009). Cependant ces techniques sont difficiles à pratiquer en routine. En plus de cela, les tests biochimiques et phénotypiques disponibles sont limités à la caractérisation des espèces du genre *Staphylococcus* est parfois ces tests sont inadéquats et imprécis, par conséquent le développement d'autres méthodes plus rapides, plus précises et faciles à pratiquer en routine est nécessaire (Janda et Abbott, 2002).

4.1. Nouvelles techniques d'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus*

Devant l'émergence des souches résistantes aux antibiotiques, il y a un besoin accru d'une identification des germes rapide et précise. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) est une technique récente d'identification en microbiologie ; son application a été rapportée pour la première fois comme un outil très rapide et efficace pour l'identification en routine dans la revue Nature Biotechnology (Claydon et al., 1996). Pourtant ça fait plus de 30 ans qu'il a été démontré qu'il est possible d'identifier les espèces microbiennes par le biais de leur phénotype protéique en utilisant la spectrométrie de masse, toutefois le coût de l'appareillage et le temps d'évolution en programmes informatiques ont retardé son utilisation jusqu'au début du 21^e siècle. Actuellement trois spectromètres MALDI-TOF-MS sont sur le marché

pour l'identification en microbiologie de routine : MALDI BioTyper™ « Bruker Daltonics », SARAMIS™ « Shimadzu & Anagnostec » et le MALDI micro MX™ « Waters Corporation » (Seng et al., 2010). Cette technologie est basée sur la détection de la plupart des protéines ribosomiques bactérienne par la spectrométrie de masse. Les motifs de masse de protéines sont généralement de l'ordre de 1.000 m/z (masse sur charge) jusqu'à 20,000 m/z et ainsi les profils protéique ribosomales sont caractéristique pour chaque genre, espèce et même souche (Sauer et Kliem, 2010).

Pour la classification, la méthode des clusters permet d'établir des dendrogrammes comme un typage des souches différentes (figure 3). Généralement les mêmes dendrogrammes sont obtenus avec le séquençage de l'ARN 16s à cause de la coévolution des protéines ribosomiques et des acides nucléiques ribosomiaux (Sauer et al., 2008). L'analyse par cette appaillage est très rapide, une colonie pourra être identifié dans une minute et 100 échantillons dans environ une heure, ainsi que cette méthode permet d'identifier facilement des espèces difficilement identifiables avec la méthode phénotypique classique et qui sont pathogène pour l'homme tel que *Bacteroides fragilis* (Nagy et al., 2009).

En comparant cette technique récente avec d'autres méthodes d'identification microbienne, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS a plusieurs avantages ;

- C'est une technique très rapide qui permet d'identifier une espèce dans une minute, cette rapidité est très importante lorsqu'il s'agit d'un diagnostic d'une pathologie infectieuse.
- L'identification ne dépend d'aucun test préliminaire tel que la coloration de Gram ou des tests biochimique tel que la catalase, l'oxydase, la coagulase ou l'observation microscopique, n'importe quelle colonie peut être déposé directement sur la cible, ajouter la matrice et la placer dans l'appareil pour l'identification.
- Technique simple par rapport aux techniques moléculaires tel que le séquençage de l'ARN 16s ou le séquençage du gène RPOB qui donnent de bons résultats, mais qui prennent beaucoup de temps.
- Elle permet d'étudier la similarité des souches directement et elle est plus rapide que l'électrophorèse en champ pulsé qui nécessite au moins trois jours pour le faire.
- Cette méthode ne nécessite pas des extractions ou des purifications préalables puisque chaque colonie pourra être identifiée en la déposant sur la cible.
- Le coup de l'identification est beaucoup plus faible en comparant avec les techniques classiques telles que le système API puisque la même matrice HCCA (Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) est utilisée pour tous les microorganismes (Seng et al., 2010).

- Elle permet de développer la recherche scientifique puisqu'elle identifie toutes les espèces mêmes qui sont rares et qui sont difficilement identifiables en routine (Seng et al., 2013).

La technologie de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS permet une excellente identification de l'espèce *Staphylococcus aureus*. Une étude faite sur 95 isolats de *Staphylococcus aureus* identifiés par séquençage de l'ARN 16s ont donné des profils identiques (Carbonnelle et al., 2007; Rajakaruna et al., 2009). Aussi cette technique permet de différencier les souches appartenant à la même espèce telle que le typage des lignés de *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline SARM. L'analyse des souches appartenant au complexe clonaux différent (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45) déduit par typage de SPA (protéine A) a donné des profils distincts et reproductibles et chaque clone présente une empreinte digitale sous forme d'un spectre de masse caractéristique. C'est une importante révolution en bactériologie clinique puisque cette méthode permet une caractérisation rapide du clone de SARM épidémique qui circule dans les établissements de santé (Wolters et al., 2011).

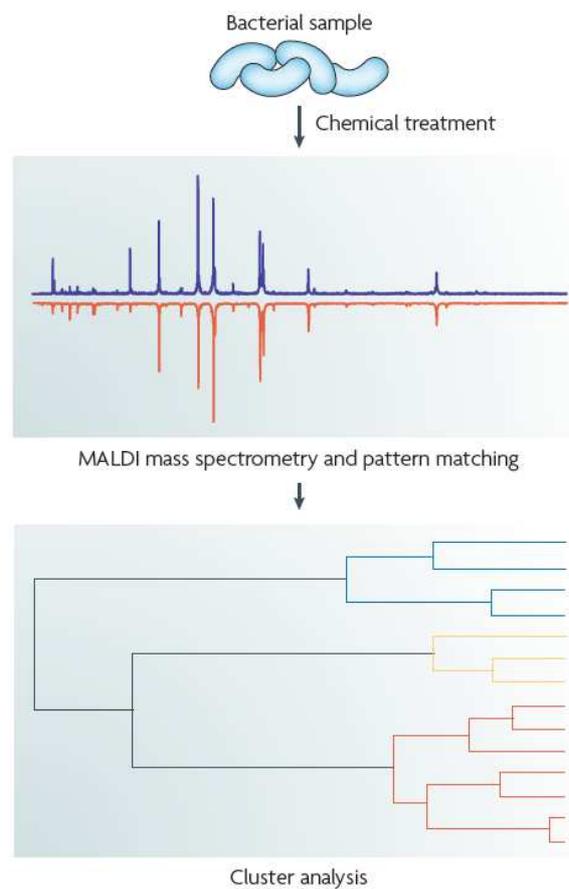


Figure 3 : Étapes d'identification et de typage des bactéries avec la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS (Sauer et Kliem, 2010)

5. Facteurs de virulence et d'infections

Staphylococcus aureus est un agent pathogène surprenant qui a su s'adapter et s'évoluer en fonction de ses caractéristiques de résistance aux antibiotiques et de facteurs de virulence qu'ils ont permis d'être parmi les plus importantes causes d'infections humaines dans le 21^e siècle (Deresinski, 2005). La pathogénie de l'infection à *Staphylococcus aureus* commence par la fixation de ce microbe sur la peau et les muqueuses. Ces sites comprennent des surfaces revêtues de fibronectine, de cellules endothéliales et de cellules épithéliales nasales (Hoefnagels-schuerman et al., 1999). Malgré cette capacité à se fixer aux surfaces de la peau et des muqueuses, *S. aureus* semble difficile à cultiver sur ces surfaces, probablement en raison de la présence de la flore résidente, telles que *S. epidermidis* (Holland et al., 2009).

Ainsi, *S. aureus* est souvent un colonisateur transitoire de la peau humaine et les tissus muqueux. Chez certains patients, cette colonisation semble être de longue durée (en années). Chez l'homme porteur du germe, une altération des défenses normales de la peau d'accueil peut faciliter l'infection par *S. aureus*. Par exemple, l'hydratation de la couche cornée permet la croissance de *S. aureus*, qui produit alors les toxines qui pénètrent dans la couche cornée et produisent une réaction d'irritation. Cette réaction d'irritation est suivie par une réponse inflammatoire dans laquelle les granulocytes neutrophiles jouent un rôle majeur dans la maîtrise de cette invasion des tissus par *S. aureus*. Sinon, une simple pause sur la surface de la peau, telle que celle causée par une coupure ou une abrasion, permet l'invasion tissulaire directe par *S. aureus* (Tang et Stratton, 2010).

Lorsque les circonstances favorisent l'invasion de la surface de la peau par *S. aureus*, ce pathogène est bien équipé pour échapper aux défenses innées de l'hôte en raison de plusieurs facteurs de virulence. Les facteurs de virulence sont le biofilm, la capsule, la coagulase, la lipase, la hyaluronidase, la protéine A, la protéine de liaison à la fibronectine et de multiples toxines (Larkin et al., 2009).

Les toxines produites par l'espèce *Staphylococcus aureus* sont classées en trois classes selon leur structure et activité biologique : les toxines formant des pores, les toxines à activité protéolytique et les superantigènes.

5.1. Les toxines formant des pores ou « pore-forming toxins (PFTs) »

Ce sont des toxines à activité cytolytique qui ont l'aptitude d'attaquer les cellules immunitaires et les détruire par la formation des pores dans leurs membranes cellulaires sécrétées sous forme de monomères « les PTFs ». Selon la nature des PTFs sécrétés, les facteurs lipidiques ou protéiques interviennent pour permettre l'interaction de ces toxines avec les membranes de leurs cibles cellulaires. Les monomères se concentrent à la surface cellulaire par oligomérisation, un pore membranaire hydrophobe se forme et la virulence de la toxine peut alors s'exprimer (Lesieur et al., 1997; Parker et Feil, 2005).

Classiquement, on distingue deux grands groupes de PFTs en fonction de leur structure tridimensionnelle :

5.1.1. Les alpha-PFTs

Les alpha-PFTs ont une structure secondaire sous forme d'une simple hélice alpha hydrophobe. On distingue plusieurs variétés comme la delta-hémolysine et les PSM peptides « phénol solubles peptides » (Wang et al., 2007).

5.1.2. Les bêta-PFTs

Les bêta-PFTs appelés aussi leucotoxines sont constitué majoritairement de brins bêta s'assemblant en tonneaux bêta ; qui se diffèrent selon leurs structures, mais pour la majorité, les bêta-PFTs ont une cible en commun qui sont les leucocytes (Parker et Feil, 2005). Il y a plusieurs types de toxines appartenant à cette catégorie :

5.1.2.1. L'alpha-toxine ou alpha-hémolysine

La sécrétion de l'alpha-toxine aura lieu à la fin de la phase exponentiel chez la plupart des souches de *S. aureus* (90 %), cette toxine se caractérise par une activité hémolytique et aussi de nombreuses autres cellules peuvent être lysées, notamment les lymphocytes T, les plaquettes, les kératinocytes et les fibroblastes (Bhakdi et al., 1996).

5.1.2.2. Les leucotoxines à deux composés

Ces toxines sont constituées de deux protéines différentes, une protéine de « classe S » (31-32 kDa) et une protéine de « classe F » (34-35 kDa). Leur dénomination vient du fait que le composé S (slow eluted) est élué lentement en chromatographie échangeuse de cations et que le composé F (fast eluted) est élué plus rapidement. Dans ces conditions l'activation synergique de ces deux composés individualisés conduit à la formation d'un pore actif (Gravet et al., 1998; Joubert et al., 2006).

5.1.2.2.1. La gamma-hémolysine

Cette toxine a une activité lytique des érythrocytes et elle est produite chez plus de 99 % des souches de *S. aureus*. Ils existent trois toxines variantes structurales qui appartiennent au gamma-hémolysine, parmi ces dernières la gamma-hémolysine LukE-LukD qui a été mise en évidence par Gravet et al., (1998) et qui est produite par 30 % des souches hospitalières de *S. aureus*. Elle possède un spectre d'activité assez large de par son action sur les lymphocytes T, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Isolée chez plus de 75 % des souches de *S. aureus* responsables d'impétigo bulleux et chez plus de 90 % des souches de *S. aureus* associées à une diarrhée post-antibiotique et productrices également d'entérotoxines (Gravet et al., 1999 ; Gravet et al., 2001).

5.1.2.2.2. La leucocidine de Panton Valentine « LPV »

La leucocidine de Panton Valentine « LPV » a été mise en évidence pour la première fois en 1932 par Panton et Valentine (1932) chez certaines souches de *S. aureus* isolées de furoncles ayant une capacité leucocytaire importante. Quatre ans après, Wright nome cette toxine par les noms de ses deux découvreurs en 1936. La LPV est la première leucotoxine à être purifiée et caractérisée (Prevost et al., 1995), elle est formée de deux composés S et F : LukS-PV et LukF-PV codés par deux gènes lukS-PV et lukF-PV. Cette toxine est transportée horizontalement par un bactériophage « Φ SLT » qui n'est présent que chez 1 à 2 % des souches cliniques de *S. aureus* (Prevost et al., 1995 ; Sachiko Naritaa et al., 2001). Cette toxine détruit les polynucléaires neutrophiles, les métamyélocytes, les macrophages et les monocytes (Badiou, 2008).

La toxine LPV est sécrétée par des souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline SASM et résistantes à la méthicilline SARM circulant dans la communauté et

dans les établissements de santé (Lo et al., 2009). Cette toxine est associée à plusieurs maladies de la peau telles que la furonculose, la cellulite et les abcès de la peau (del Giudice et al., 2009 ; Del Giudice et al., 2011). Elle est exprimée à des niveaux toxiques élevés dans les abcès de la peau humaine (Badiou et al., 2008).

Les affections les plus dangereuses de la toxine LPV sont les pneumonies nécrosantes fatales qui sont caractérisées par des nécroses extensives du tissu pulmonaire (Labandeira-Rey et al., 2007).

6. Autres types de toxines

6.1. Les toxines à activité protéolytique « Les épidermolysines »

Les épidermolysines ou appelé autrement les toxines exfoliatines « ET » sont responsables du syndrome de la peau ébouillantée en Anglais « staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) » cette pathologie a été décrite depuis longtemps, mais il a fallu près d'une centaine d'années pour découvrir les toxines responsables, et leurs cibles épidermique n'ont été identifiées qu'en 2000 (Ladhani, 2003). Le syndrome de la peau ébouillantée est initialement une maladie des nouveau-nés et des enfants, elle est aussi connue sous l'appellation : Impétigo bulleux, tropical impétigo bulleux et la rougeole pemphigoïde (Ladhani et al., 1999). L'injection des souches de *Staphylococcus aureus* productrices d'exfoliatines dans la peau des animaux provoque une division intra-épidermique ressemblant à la maladie humaine. Deux sérotypes d'ET : ETA et ETB, ont été identifiés. Les analyses génomiques ont révélé que le gène ETA est situé dans le chromosome, tandis que le gène ETB est situé sur des plasmides (Nishifuji et al., 2008). L'ETA est une protéine très stable qui résiste à la chaleur extrême, alors que l'ETB est sensible à la chaleur (Plano, 2004).

6.2. Les Superantigènes

Les Superantigènes Staphylococciques causent le syndrome du choc toxique staphylococcique (TSST1), mais aussi les intoxications alimentaires. Les Superantigènes (SAGs) sont des enterotoxines microbiens qui stimulent des sous-populations importantes des cellules lymphocyte T, ce qui provoque la libération massive de cytokines qui se termine par un choc toxique (Holtfreter et Broker, 2005). Les SAGs sont distingués des autres antigènes du fait qu'ils ne nécessitent pas un traitement par des cellules présentatrices d'antigènes et ils se lient facilement au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Ils stimulent les

cellules T en fonction de leurs récepteurs « V β ». Ces propriétés expliquent leurs potentiels dangereux remarquables, et comme un large pourcentage des cellules T ayant des récepteurs similaires. 10 % de toutes les cellules T peuvent répondre à un SAG donné. Le résultat et des niveaux élevés de cytokines résultant de cette stimulation par les SAGs sont considérés comme la cause principale de syndrome du choc toxique staphylococcique (TSST1) (Banks, et al., 2003), mais aussi d'autres pathologies telles que la dermatite atopique, le syndrome de Kawazaki, une polypose nasale et certaines maladies auto-immunes (Schlievert et Case, 2007).

7. Les antibiotiques

Avant la découverte des antibiotiques, les pathologies infectieuses bactériennes entraînaient dans la majorité des cas la mort ; la peste au moyen âge, la tuberculose, les blessures infectées sur les champs de bataille en sont des exemples. Avec la découverte des sulfamides et, plus tard la pénicilline, on est passé à l'ère antibiotique au cours de laquelle la guérison des pathologies bactérienne est considérée comme habituelle (Gaudy et Buxeraud, 2005). Par définition, les antibiotiques sont des molécules, capables de tuer les microorganismes sensibles ou d'inhiber leur croissance en faible dose, en bloquant certaines étapes métaboliques indispensables à leur survie ou à leur croissance. Leur action étant spécifique et dirigée contre les microorganismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Prescott et al., 2002).

7.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques peuvent être des molécules d'origines naturelles ou de leurs dérivés comme ils peuvent être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Newman et al., 2003; Singh et Barrett, 2006). Les premiers antibiotiques introduits dans l'usage clinique étaient en 1935, leurs origines est synthétique « les sulfamides ». Alors que le premier antibiotique d'origine naturelle utilisé dans la médication est « la pénicilline » en 1940 (Butler et Buss, 2006).

7.2 . Les cibles bactériennes des antibiotiques (mécanisme d'action)

Le mode d'action des antibiotiques est nécessaire pour l'efficacité de l'action de la molécule, mais aussi comme un critère de la classification des antibiotiques en famille et

sous-famille (Tableau1), qui prend d'abord en compte la structure chimique comme un premier critère. On distingue quatre catégories principales de molécules :

- Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.
- Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.
- Antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'ADN.
- Antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique.

L'action d'un antibiotique est le résultat d'interaction organisme-antibiotique d'une part et antibiotique-bactérie d'autre part (Gaudy et Buxeraud, 2005).

Tableau 1 : Classes d'antibiotiques en fonction de leur introduction en clinique, de leurs origines et de leurs mécanismes d'action (Butler et Buss, 2006)

Classe d'antibiotiques	Introduction	Dérivation	Exemple	Mécanisme
Sulfamides	1935	Synthétique	Sulfapyridine	Antifolique
β-Lactamines	1941	Dérivé de PN	Penicillin	Paroi cellulaire
Peptides bactériens	1942	Dérivé de PN	Bacitracin	Paroi cellulaire
Peptide bactériens	1942	Dérivé de PN	Polymixin	Membrane cellulaire
Aminoglycosides	1944	Dérivé de PN	Streptomycin	Synthèse protéique
Céphalosporines	1945	Dérivé de PN	Céphalosporines	Paroi cellulaire
Nitrofurane	1947	Synthétique	Nitrofurantoin	Divers
Hexamine	1947	Synthétique	Metélate de Méthénamine	Dégagement de formaldéhyde
Chloramphénicol	1949	Dérivé de PN	Chloramphénicol	Synthèse protéique
Tétracycline	1950	Dérivé de PN	Chlortétracycline	Synthèse protéique
L'isoniazide	1951	Synthétique ^a	L'isoniazide	Biosynthèse des acides Gras
Viomycine	1951	Dérivé de PN	Viomycine	Synthèse protéique
Macrolide	1952	Dérivé de PN	Erythromycine	Synthèse protéique
Lincosamide	1952	Dérivé de PN	Lincomycine	Synthèse protéique
Streptogramine	1952	Dérivé de PN	Virginiamycine	Synthèse protéique
Cycloserine	1955	Dérivé de PN	Cycloserine	Paroi cellulaire
Glycopeptide	1956	Dérivé de PN	Vancomycine	Paroi cellulaire
Novobiocine	1956	Dérivé de PN	Novobiocine	Synthèse de l'ADN
Ansamycine	1957	Dérivé de PN	Rifamycine	Synthèse de l'ARN

Nitroimidazole	1959	Synthétique	Tinidazole	Synthèse de l'ADN
L'Ethambutol	1962	Synthétique	L'Ethambutol	Paroi cellulaire
Quinolone	1962	Synthétique	l'acide Nalidixique	Synthèse de l'ADN
Fusidane	1963	Dérivé de PN	L'acide Fusidique	Synthèse protéique
Diaminopyrimidine	1968	Synthétique	Triméthoprim	Antifolique
Phosphonates	1969	Dérivé de PN	Fosfomycine	Paroi cellulaire
L'acide Pseudomonique	1985	Dérivé de PN	Mupirocin	Synthèse protéique
Oxazolidinone	2000	Synthétique	Linezolid	Synthèse protéique
Lipoptides	2003	Dérivé de PN	Daptomycine	Paroi cellulaire

PN : produits naturels ; ^a Isoniazide est basé sur la structure de nicotinamide (vitamin B2).

7.3 Les β -lactamines

Les β -lactamines constituent une vaste famille d'antibiotiques. Elles partagent une structure commune qui comprend de façon constante un cycle β -lactame et pour la plupart d'entre elles, un second cycle. Ainsi, en fonction des cycles et des chaînes latérales associées, on distingue :

- les pénicillines, également appelées pénames : les molécules de ce groupe comportent un noyau thiazolidine à côté du cycle β -lactame. Selon la nature des chaînes latérales, on distingue : les pénicillines G, les pénicillines M et les pénicillines A;
- Les céphalosporines : les molécules de ce groupe possèdent un noyau thiazine associé au cycle β -lactame ;
- les clavames : leur représentant est l'acide clavulanique. À l'exception des clavames, toutes les β -lactamines possèdent une ou plusieurs chaînes latérales reliées au noyau β -lactam. Les chaînes latérales peuvent être similaires, voire identiques pour des membres de classes différentes, ce qui expliquerait l'existence de réactions croisées entre molécules de familles différentes (Cavallo et al., 2004).

7.3.1. Mécanismes d'action

La cible des β -lactamines est un ensemble d'enzymes de la membrane cytoplasmique nécessaires à la formation du peptidoglycane de la paroi. Les β -lactamines se fixent d'une manière irréversible à l'une ou à l'autre de ces protéines appelées, pour cette raison, « protéine liant la pénicilline » (PLP). Le substrat normal de ces PLP est l'acétyl-Dalanyl-D-alanine. La pénicilline et les autres β -lactamines agissent comme des analogues de substrats empêchant la synthèse de la paroi cellulaire (Hiramatsu et al., 2001).

Les β -lactamines assurent une inhibition compétitive de la transpeptidase en se fixant de façon covalente sur l'enzyme. Ceci est rendu possible par le fait que ces antibiotiques ont une analogie structurale importante avec la séquence terminale D-Ala-D-Ala du pont qui relie les chaînes glycaniques, et qui est en fait le substrat de l'enzyme. La fixation de la β -lactamine sur la transpeptidase va empêcher la réaction de transpeptidation (donc, bloquer la polymérisation de la paroi bactérienne), altérer la structure de la paroi en la rendant notamment moins stable, plus fragile et incapable de résister à la pression osmotique interne très élevée, ceci provoquera secondairement la lyse de la bactérie (Sevin, 1999 ; Nour et al., 2005).

7.3.2. Mécicilline et Oxacilline

L'addition de nouvelles chaînes en position 6 au noyau pénicilline a permis d'empêcher l'attachement des pénicillinases des staphylocoques et ainsi d'obtenir des pénicillines qui résistent à l'hydrolyse (figure 4).

Le premier produit obtenu, la diméthoxybenzylpénicilline (mécicilline) n'était administrable que par voie parentérale du fait d'une destruction rapide par les sucs gastriques, alors que les isoxazolylpénicillines comme l'oxacilline, la cloxacilline, la dicloxacilline ou la flucloxacilline sont utilisables par voie orale. Cependant, ce sont des pénicillines à spectre étroit, car, en dehors de *Staphylococcus aureus* producteur de pénicillinase (plus de 90 % des *Staphylococcus aureus*), ces produits ont une moins bonne activité intrinsèque que la pénicilline G et ses dérivés (Cavallo et al., 2004).

L'oxacilline est un antibiotique semi-synthétique. C'est une pénicilline qui est administrée par voie intramusculaire, intraveineuse ou par voie orale pour le traitement contre les cocci à Gram positif aérobies. Il est utilisé principalement pour le traitement des infections cutanées, l'ostéomyélite et l'endocardite (Castle, 2007).

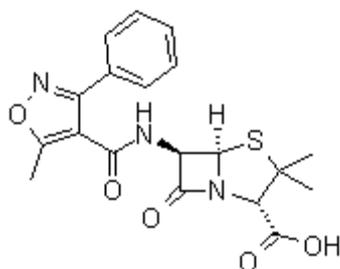


Figure 4 : Structure chimique de l'oxacilline (Castle, 2007)

7.4. L'antibiogramme

L'antibiogramme est un test particulier en biologie clinique, car il s'adresse à des êtres vivants infectieux et non au corps humain. Il constitue l'outil de mesure de la résistance bactérienne. Sa pratique et son interprétation font appel à de nombreuses connaissances cliniques, pharmaceutiques, bactériologiques, biochimiques et génétiques.

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

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

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

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

7.5. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques peut être expliquée par une équation simple, avec deux composantes principales ; le médicament antibiotique ou antimicrobien, qui inhibe les microorganismes sensibles, et la sélection des résistants et des déterminants génétiques de la

résistance par l'agent antimicrobien. La résistance aux antibiotiques apparaît seulement lorsque les deux composants sont réunis dans un environnement ou hôte, ce qui peut conduire à un problème clinique. Les gènes de résistance sélectionnés et leurs hôtes se propagent sous une sélection continue avec l'agent antimicrobien, le résultat est amplifié et le problème s'étend à d'autres hôtes et à d'autres lieux géographiques (Levy et Marshall, 2004).

7.5.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle signifie que chaque membre d'une espèce bactérienne est résistant à cet antibiotique naturellement et sans aucune modification génétique supplémentaire, c'est une caractéristique propre à une espèce bactérienne, qui est partagée par toutes les souches normales de cette espèce (Gaudy et Buxeraud, 2005). Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification, elle se traduit habituellement par des CMI supérieures à la valeur critique basse de concentrations (c) de l'antibiotique concerné (CASFM, 2010).

7.5.2. Résistance acquise

La Résistance acquise des antibiotiques se fait soit par des mutations (mutations ponctuelles, délétions, inversions, insertions) dans le génome bactérien ou par transfert horizontal des gènes de résistances (Normark et Normark, 2002).

8. Émergence de la résistance aux antibiotiques

La prestigieuse ère des antibiotiques est marquée par le développement des anti-infectieux et la guérison de nombreuses maladies infectieuses. Il semble que l'ère de la résistance lui succède aujourd'hui, menace grandissante dans le traitement des infections bactériennes, mais aussi virales et fongiques. Aussi bien les médecins que les patients ont pu longtemps penser que les antibiotiques allaient permettre de traiter toujours plus efficacement la plupart des infections et éradiquer la quasi-totalité des maladies infectieuses. Toutefois, une évolution s'est produite vers l'émergence puis l'extension progressive de résistances aux antibiotiques chez la quasi-totalité des espèces bactériennes pathogènes, et ce, vis-à-vis de la plupart des antibiotiques disponibles. De nouveaux mécanismes de résistance ont été observés pour chacune des nouvelles molécules (Bergogne-Bérézin, 2004) (figure 5).

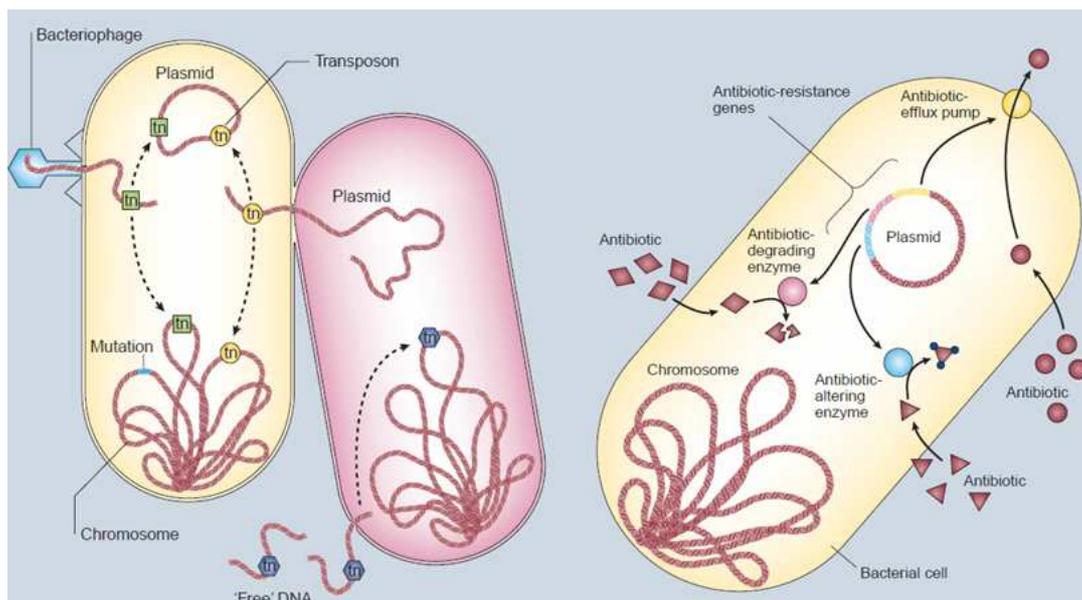


Figure 5 : Les mécanismes biologiques de la résistance (Levy et Marshall, 2004)

Bien que la résistance aux médicaments antimicrobiens soit d'abord émergée dans les hôpitaux, elle est vite apparue dans la communauté. Par exemple dans les années 1980, un degré élevé de résistance à la pénicilline de *Streptococcus pneumoniae*, la cause bactérienne la plus fréquente des infections respiratoires basses chez l'adulte et l'otite moyenne chez les enfants a émergé dans la communauté. Dans les années 1990, cette résistance atteint des taux de prévalence de plus de 40 % dans la communauté des nombreux pays. De même les rapports d'infections à SARM communautaire sont supérieurs à 50 % dans certaines régions des États-Unis (Low, 2006).

9. Les infections nosocomiales

9.1. Définition de l'infection nosocomiale

Le terme « nosocomial » provient du latin Nosocomium qui signifie hôpital, établissement pour les malades (Ellenberg, 2004). L'infection nosocomiale (IN) se définit comme une maladie infectieuse causée par un microorganisme acquis lors d'un séjour dans une structure de soin, un délai arbitraire de 48 à 72 heures entre l'admission et le début de l'infection permettant d'identifier au mieux le diagnostic. De même, est dit IN tout épisode infectieux se situant en aval de la fin de l'hospitalisation, notamment en postopératoire ; un délai de 30 jours après l'intervention est classiquement admis, pouvant aller jusqu'à 1 an après implantation de matériel étranger (Bosserey et Micoud, 2000).

9.2. Les infections nosocomiales causées par le SARM

Le *S. aureus* résistant à la méticilline SARM est une bactérie pathogène nosocomiale mondiale. Le centre de lutte contre les maladies infectieuses (CDC) et le système national de surveillance des infections nosocomiales des États-Unis rapporte que le SARM dans les hôpitaux des États-Unis a augmenté de 2,4 % en 1975 jusqu'à 29 % en 1991 avec un degré de résistance élevé dans les unités de soins intensifs. Les données du réseau international pour les études et la prévention de la résistance aux antibiotiques (INSPEAR) affirment qu'entre 1990 et 1997 l'incidence du SARM a augmenté avec 260 % (Graffunder, 2002).

Les données épidémiologiques sur SARM en Afrique sont rares. La prédominance de SARM a été déterminée dans huit pays africains entre 1996 et 1997 et était relativement haut en Nigeria, Kenya, et Cameroun (21 à 30 %) et au-dessous de 10 % en Tunisie et en Algérie (Kesah et al., 2003). En Algérie, l'augmentation du taux des infections à SARM était de 14 % en 2001 (Ramdani-Bouguessa et al., 2006). De plus des études récentes ont mis en évidence les premières souches de SARM résistantes à la vancomycine en Algérie (Rebiahi et al., 2011).

9.3. Les infections à SARM communautaires SARM-C

Le SARM est habituellement associé à l'hôpital « SARM-H » mais malgré cela des souches communautaires (SARM-C) sont apparus dans la communauté depuis le milieu des années 1990 (figure 6), provoquant souvent des abcès de la peau et la furonculose, des chocs septiques et des pneumopathies nécrosantes. Ces dernières causent la mort dans la majorité des cas. Ces nouvelles souches de SARM-C sont généralement résistantes aux β -lactamines, mais sensibles à d'autres classes d'antimicrobiens et portent essentiellement la cassette chromosomique staphylococcique (*SCCmec*) de type IV. Les souches de SARM-C sont également plus susceptibles de posséder des combinaisons uniques de facteurs de virulences telles que la LPV et la TSST1 et semblent être génétiquement différentes de SARM-H (Palavecino, 2007).

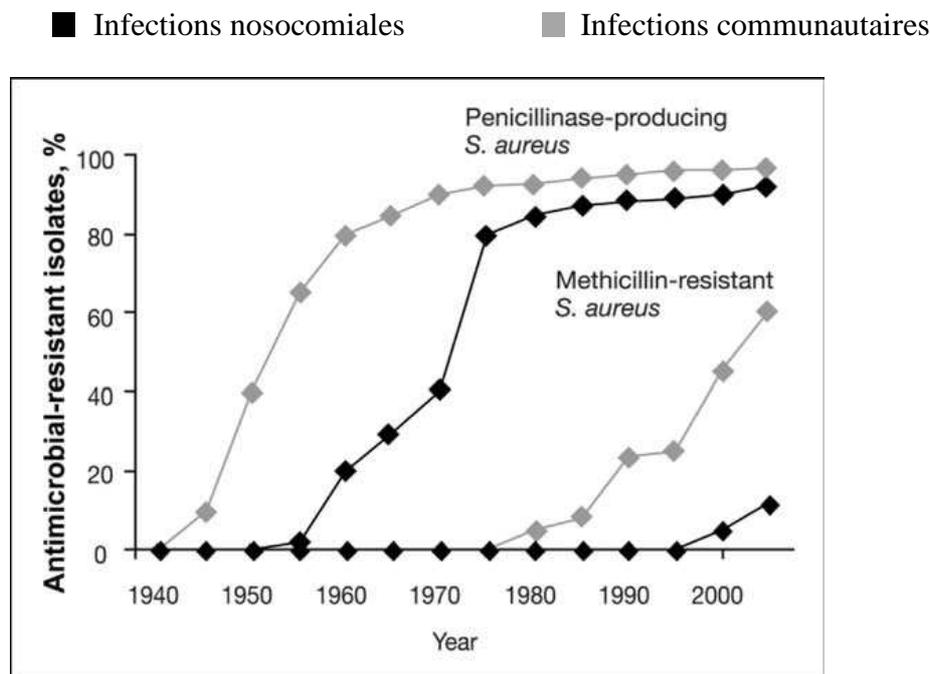


Figure : 6. Évolution des infections nosocomiales et communautaires à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Weigelt, 2007)

10. Résistance à la méticilline

10.1. Définition

Une souche est dite « résistante à la méticilline » lorsqu'elle présente une résistance aux pénicillines du groupe M (diméthoxylbenzylpénicilline « méticilline » et les isoxazolylpénicillines « oxacilline ») et par extension à toutes les β -lactamines. Elle se définit par une concentration minimale inhibitrice supérieure à 2 $\mu\text{g/ml}$ pour l'oxacilline et la pénicilline M de référence (Forestier et al., 2007). Toutefois les souches présentant une résistance de type borderline « BORSA » avec des CMI qui varie entre 0,5 et 2 $\mu\text{g/ml}$ sont aussi considérés comme des SARM (Nadarajah et al., 2006).

Les isolats de SARM sont le plus souvent résistants à d'autres classes d'antibiotiques (Speller et al., 1997). Elles sont considérées comme des bactéries multirésistantes, et la résistance à la méticilline est depuis lors utilisée comme marqueur de multirésistance.

La multirésistance aux antibiotiques se définit par la résistance à au moins trois familles d'antibiotiques (Grohs, 2009).

10.2. Historique

Depuis l'introduction des antibiotiques pour l'usage clinique au milieu des années 1940, *S. aureus* a montré des capacités remarquables pour se protéger de ces agents antimicrobiens en acquérant et développant la résistance. En 1942, la résistance à la pénicilline a été rapportée après seulement un mois de son utilisation en clinique (Rammelkamp et Maxon, 1942). En 1953, puisque la consommation de la pénicilline a connu une vulgarisation mondiale, 64 % à 84 % des isolats d'origine clinique de *S. aureus* étaient résistants à la pénicilline, mais aussi à d'autres antibiotiques tels que la tétracycline et l'érythromycine (Bradley, 1992). En 1960 et malgré l'utilisation de mesures sévères de contrôle des infections, la résistance aux antibiotiques est devenue la cause la plus commune des infections nosocomiales dans le monde entier (Wise et al., 1989 ; Bradley 1992). Dans la même année la méthicilline qui est un β -lactame efficace contre les souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline, est devenu largement disponible. De la même manière du développement de la résistance à la pénicilline, après quelques années de son introduction, les premières souches résistantes à la méthicilline ont été signalées au Royaume-Uni (Barber, 1961). Des rapports sporadiques d'isolats cliniques de SARM ont été rapidement observés aux États-Unis (Bulger, 1967). En 1968, lors de la première épidémie à SARM bien documentée aux États-Unis, ces souches étaient résistantes à toute la classe des β -lactamines (Barrett et al., 1968). Au milieu des années 80 et avec l'augmentation des infections à SARM, cela a conduit à une utilisation accrue de la vancomycine le dernier antibiotique efficace sur les souches de SARM. Cette utilisation abusive de cet antibiotique a entraîné l'émergence des souches à sensibilité intermédiaire à la vancomycine « VISA » (figure 7) qui ne sont pas inhibées in vitro à des concentrations de vancomycine inférieures à 4-8 $\mu\text{g/ml}$ (Hiramatsu et al., 1997) et les souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine « VRSA » qui sont inhibés à des concentrations de 16 $\mu\text{g/ml}$ ou plus (Weigel et al., 2003).

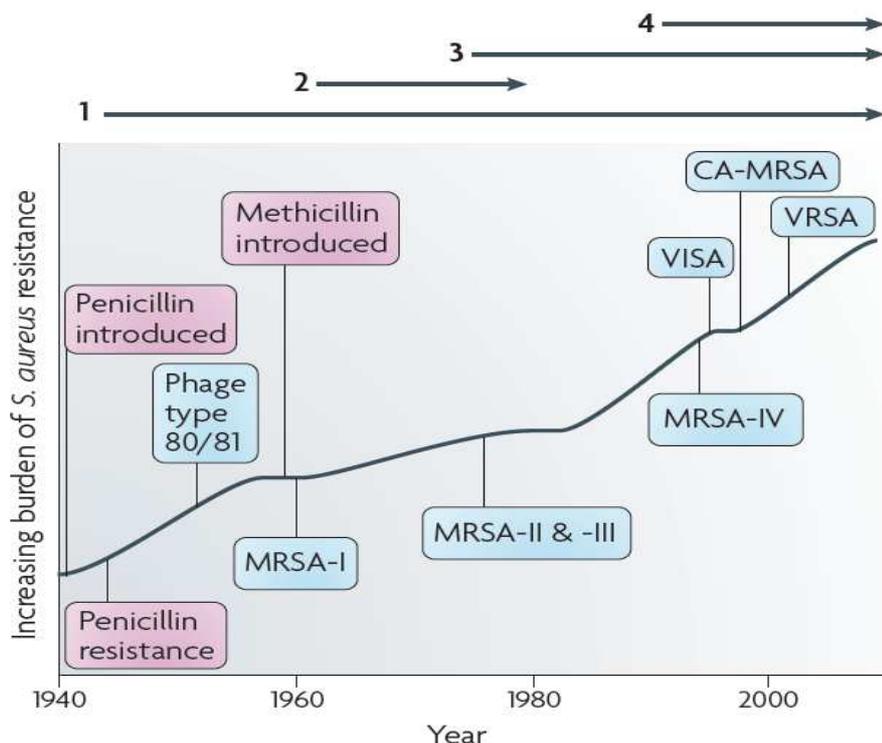


Figure : 7. Les quatre vagues de la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* (Chambers et Deleo, 2009).

10.3. Les mécanismes de la résistance à la méticilline

10.3.1. la résistance intrinsèque par production de PLP2a ou PLP2'

Le mécanisme le plus fréquent et le mieux saisi de la résistance à la méticilline chez *S. aureus* est la production d'une unique protéine de faible affinité avec la protéine-liant la pénicilline appelée PLP2a ou PLP2' (Nour et al., 2005). Les protéines liant les pénicillines « normaux » de staphylocoques comprennent des protéines qui fonctionnent comme des transpeptidases, endopeptidases ou carboxypeptidases utilisées pour à la réticulation des macromolécules dans la paroi cellulaire pendant la division cellulaire. La résistance intrinsèque à la méticilline résulte de la production d'une PLP unique de taille moléculaire légèrement différente qui a une affinité très faible pour les diverses liaisons avec les β -lactamines (Jorgensen, 1991). La base génétique de l'expression de cette protéine est un déterminant génétique chromosomique *mecA*. Dans toutes les souches SARM, le déterminant de la résistance à la méticilline *mecA* fait partie d'une cassette complexe hétérologue, *SCC mec* (S : taphylococcal, C : assette, C : chromosome, mec) qui s'intègre dans le chromosome de la souche receveuse *S. aureus* à une spécification du site c proche de orfX l'origine de

réplication chromosomique. Alors que la séquence d'ADN du gène *mecA* semble être conservé et pratiquement identique dans toutes les souches de SARM examinées. La structure de la cassette *SCC mec* peut varier considérablement d'un clone SARM à l'autre. La nature des *SCC mec* « donateurs » et le mécanisme de leur livraison dans un *S. aureus* destinataire ne sont pas connus jusqu'à l'heure actuelle (Oliveira et al., 2012). Depuis la découverte du premier élément *SCCmec* de la souche SARM N315 en 1999, plusieurs types d'éléments *SCCmec* ont été identifiés par la détermination de l'ensemble de leurs séquences nucléotidiques (figure 8). L'élément de *SCCmec* contient le complexe du gène *mec* (le gène *mecA* et ses régulateurs) et le complexe *ccr*, qui code pour les sites spécifiques de recombinaisons responsables de la mobilité de *SCCmec*. Quatre classes du complexe du gène *mec* ont été identifiées par PCR, en utilisant l'ADN chromosomique provenant des staphylocoques à coagulase négatifs résistant à la méthicilline en tant que modèles. Les différents complexes de gènes *mec* sont structurés comme suit : class A, IS431-*mecA-mecR1-mecI* ; class B, IS431-*mecA-mecR1-IS1272* ; class C, IS431-*mecA-mecR1-IS431* ; et class D, IS431-*mecA-mecR1* (Ito et al., 2004) Il y a quatre allotypes dans chacun des gènes *ccrA* et *ccrB*. Pour *ccrA* : *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3*, et *ccrA4* et *ccrB1* : *ccrB2*, *ccrB3*, et *ccrB4* pour *ccrB*. *SCCmec* est classé sous forme d'allotypes selon la combinaison de la classe du complexe *mec* et le type du complexe *ccr* qu'il possède (Ma et al., 2002).

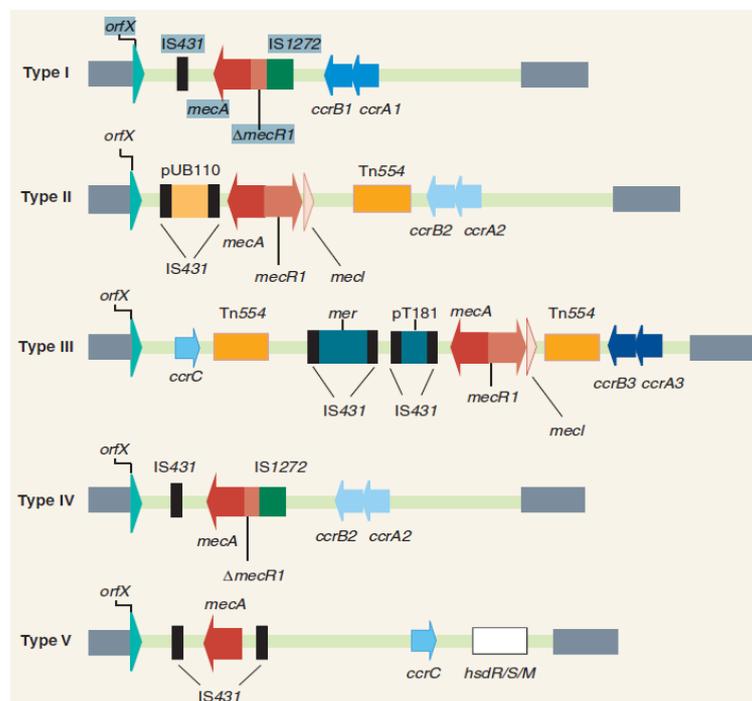


Figure 8 : Structure de cinq principaux types de l'élément chromosomique staphylococcique *mec* cassette (*Sccmec*) (Pantosti et al., 2007)

10.3.2. Régulation de l'expression de PLP2a ou PLP2'

L'expression de la protéine liant la pénicilline PLP2' dépend d'une régulation par deux systèmes qui agissent sur la transcription : le système de gènes *mecI* et *mecRI* situé en amont du gène *mecA* et le système de gènes *blaI* et *blaRI* situé en amont du gène *blaZ* de la pénicillinase (Weller, 1999). La protéine MecR1, produit du gène *mecR1*, agirait comme transducteur de signal : MecRI détecte la présence de b-lactamine grâce à son domaine extracellulaire. Une fois l'antibiotique lié, il y a activation du domaine intracellulaire. Celui-ci subirait une activation par protéolyse limitée lui conférant une activité protéasique. Cette dernière conduit à la dégradation du MecI (represseur de la transcription codé par *mecI*) qui est fixé au niveau de l'opérateur d'où libération de ce dernier et expression du gène *mecA* (Nour et al., 2005).

10.3.3. Résistance par hyperproduction de pénicillinase staphylococcique

Un second mécanisme de diminution de la sensibilité à la méticilline a été décrit par McDougal et Thornsberry comme une hyperproduction de pénicillinase staphylococcique normale, ces souches ont été référées comme démontrant une résistance limite à la méticilline et ont été appelés BORSA pour Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (McDougal et Thornsberry, 1986). Alors que les pénicillines antistaphylococciques ont été développées pour résister à l'action hydrolytique de pénicillinase staphylococcique, il semble que certaines souches contemporaines produisent de telles quantités de l'enzyme et le résultat c'est que la méticilline et l'oxacilline sont lentement, mais nettement dégradées. Ce mécanisme diffère aussi du fait que la méticillino-résistance intrinsèque est d'origine chromosomique alors que le phénotype BORSA est d'origine plasmique (Jorgensen, 1991). Ces souches peuvent être détectées en utilisant les inhibiteurs de β -lactamases qui les rendent sensible aux pénicillines (Montanari et al., 1990).

10.3.4. Résistance par production d'une méthicillinase

Toutefois le phénotype BORSA ne peut pas être attribué uniquement à l'hyperproduction de pénicillinase classique puisqu'une seconde β -lactamase hydrolysant la méticilline (méthicillinase) pourrait être à l'origine de cette résistance et qui est présente chez certaines souches (Massidda et al., 1992).

10.3.5. Résistance par des mutations affectant le gène PLP2

En dépit de l'adaptation de l'espèce *S. aureus* en termes environnementaux et en absence de plasmides et de transposons responsable de la résistance aux antibiotiques intrinsèque ou plasmidique des souches de de cette espèce, cela conduit à l'apparition d'une autre résistance de bas niveau par l'acquisition des mutations dans leurs chromosomes (Levy et Marshall, 2004). C'est des mutations affectant le gène PLP2 et qui peuvent être à l'origine d'un phénotype BORSA appelé autrement MODSA (Modified PBPs *Staphylococcus aureus*) (Hackbarth et al., 1995; Tomasz et al., 1989).

Les souches ayant un phénotype BORSA ont été considérées comme étant facilement traitables par certains β -lactamines. Néanmoins, des études récentes ont montré que ce type de souches peut causer des échecs thérapeutiques graves tels que les endocardites (Skinner et al., 2009), les infections chez les patients atteints de fibrose kystique (Dasenbrook 2011; Leahy, et al., 2011) en dermatologie (Balslev et al., 2005; Thomsen et al., 2006) et en chirurgie (Kernodle et al., 1998).

10.4. Typage moléculaire des SARM

10.4.1. L'électrophorèse en champs pulsés (Pulsed-Field Gel Electrophoresis PFGE)

L'électrophorèse en champs pulsée est effectuée dans un appareil d'électrophorèse sur gel spécial dans lequel l'orientation du champ électrique à travers les changements de gel périodiquement permettant une résolution efficace de fragments d'ADN de grande taille (>25 kb) par rapport à une électrophorèse classique (Schwartz et Cantor, 1984).

Le typage par PFGE des isolats bactériens est basé sur la digestion de l'ADN total avec une endonucléase, qui produit un ensemble discret de fragments d'ADN « empreinte digitale » et une reproductibilité des isolats. Pour *S. aureus* et de nombreuses autres espèces, l'endonucléase *SmaI* qui reconnaît la séquence CCCGGG rare, est largement utilisé afin d'avoir des motifs de 12-20 de brins dans une gamme de 48,5 à 582 kb (Oliveira et al., 2012).

Les profils d'électrophorèse en champs pulsés réalisés par *SmaI* peuvent être considérés comme empreintes d'ADN chromosomique qui reflètent la distribution des séquences de reconnaissance *SmaI* rares dans le génome et/ou les distances entre eux (figure 9). Bien que le profil PFGE peut changer par mutation ponctuelle ou de l'insertion/suppression dans le chromosome (par exemple prophage intégration), les modèles sont relativement stables chez

les lignées génétiques permettant la définition et le suivi des clones avec un degré élevé de discrimination (Oliveira et al., 2012). En comparant cette technique avec d'autres méthodes récentes de typage on s'aperçoit que malgré que l'électrophorèse en champs pulsés est une technique très discriminante, mais elle requière plusieurs jours pour voir les résultats (Walker et al., 2002), de plus elle nécessite relativement un matériel coûteux et spécialisé (Oliveira et al., 2012). Par contre, la technique de MALDI-TOF-MS est une méthode récente très rapide et immédiate et elle permet de différencier les souches hétérogènes isolées de plusieurs environnements qui ne sont pas différenciés par l'électrophorèse en champs pulsés (Wong et al., 2004).

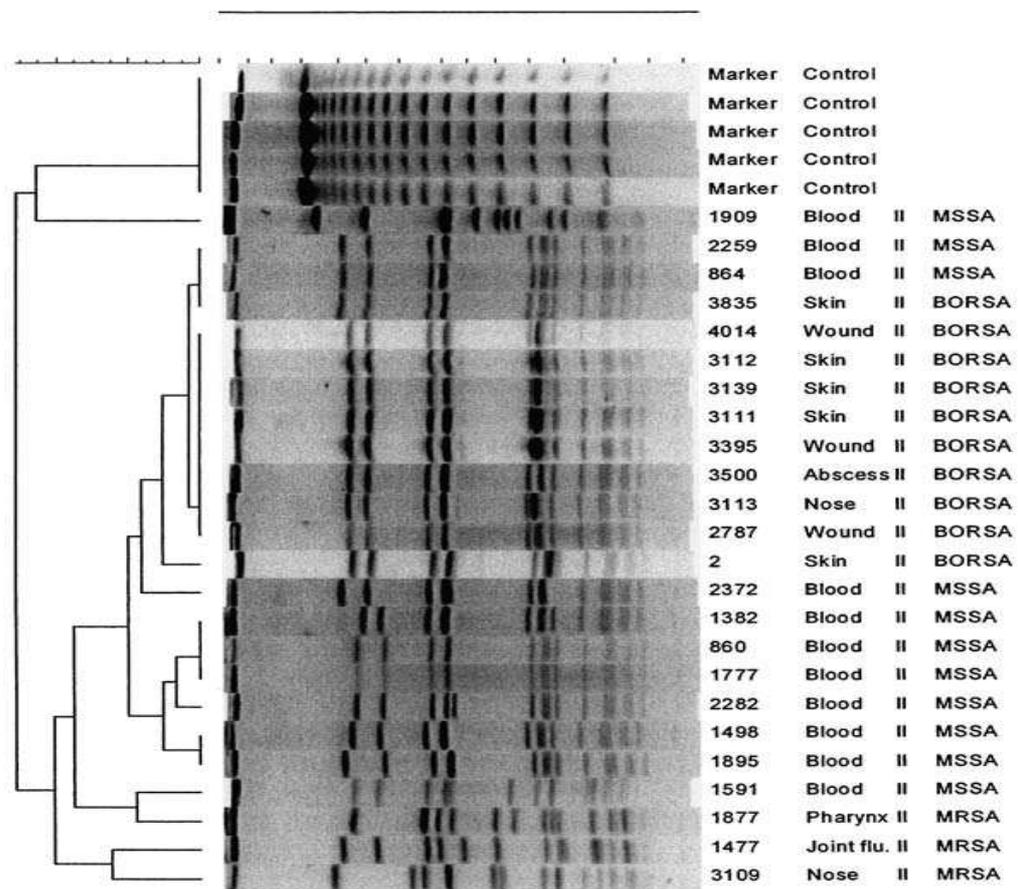


Figure 9 : Dendrogramme représentant le regroupement des souches BORSA qui causent les infections en dermatologie collectées de dix hôpitaux différents, typés par électrophorèse en champs pulsés (Balslev et al., 2005).

10.4.2. Typage *Spa*

La première méthode de séquençage d'ADN développé chez l'espèce *S. aureus* a été un procédé spécialement conçu pour la caractérisation de la protéine A ; ce procédé englobe l'amplification PCR et le séquençage de la région polymorphe de la protéine A (région X), qui est spécifique de l'espèce *S.aureus*. La région X (région de répétition) de la protéine A est constituée d'un nombre variable de répétitions en tandem (VNTRs) de 21–27 pb et des séquences polymorphiques (Harmsen et al., 2003). Le typage *Spa* semble stable et plus particulièrement associé à des lignées de SARM, ce qui rend cette méthode également utile pour des études globales et à long terme (Cookson et al., 2007). Ce typage a permis de diviser les souches épidémiques qui circulent dans le monde entier en plusieurs clones (figure 10). Par exemple, le clone de SARM *ibérique* a été remarqué pour être le clone dominant dans les hôpitaux dans le sud de l'Europe, tandis que le clone dénommé E-MRSA-16 a été le plus fréquemment retrouvé dans les hôpitaux du Royaume-Uni, le Canada et le Mexique (Chung et al., 2004).

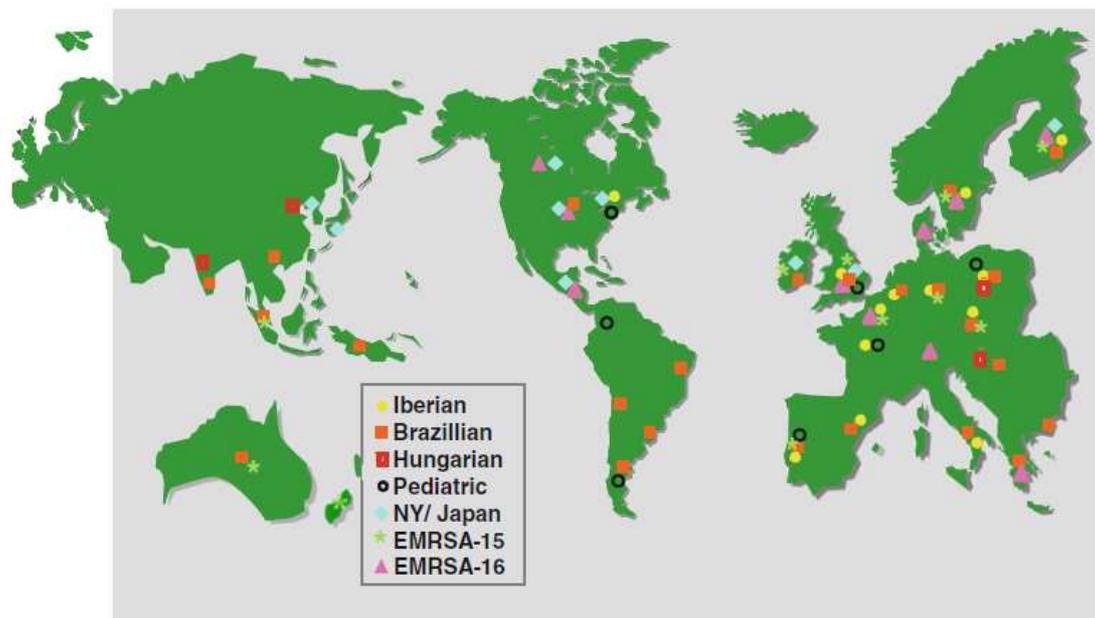


Figure 10 : Les clones épidémiques de SARM qui cause la plupart des maladies dans le monde entier, typé par le séquençage de la protéine A « *Spa* » (Oliveira et al., 2012)

10.4.3. Typage génomique multilocus (Multi-Locus Sequence Typing MLST)

La technique MLST consiste à la recherche d'allèles de sept gènes de ménages « house-keeping genes » par amplification par PCR suivie par le séquençage nucléotidique de fragments internes obtenus (Maiden et al., 1998). L'analyse d'un gène unique fournit trop peu de discrimination et les niveaux élevés discriminatoires ne sont obtenus qu'en utilisant plusieurs loci. Le rapport de puissance élevée discriminatoire, ainsi que le fait que les variations de séquences s'accumulent lentement, cela rend la technique MLST un outil de typage très approprié pour les clones mondiaux ou à long terme des études épidémiologiques (Ruimy et al., 2009; Spratt, 1999). La plupart des schémas MLST sont centralisés dans une base de données en ligne (www.mlst.net) et utilisent un langage universel. Les isolats ayant des séquences identiques à tous les sept loci sont considérés comme étant un clone et se voient attribuer un type de séquence unique (ST). ST qui diffère par polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) à moins de trois loci est considéré comme étroitement lié et est regroupé en complexes clonaux (CC). Ce regroupement est réalisé par l'algorithme ebURST (<http://eburst.mlst.net/>), qui utilise les données MLST des souches étroitement apparentées au groupe CC.

Malgré cet avantage, MLST est encore relativement laborieuse et coûteuse, car elle implique 7 réactions PCR et 14 réactions de séquençage par isolats, et comme telle, elle ne pourrait pas être la méthode favorable pour le typage des isolats cliniques de routine. Cependant, l'amélioration continue et rapide de l'extraction d'ADN automatisée, amplification et des techniques de séquençage, peut rendre la méthode MLST, dans un proche avenir, une option tout à fait accessible en termes de coût et de simplicité (Oliveira et al., 2012).

Chapitre 2 : produits naturels et effet anti-SARM

1. Produits naturels et recherche de nouvelles molécules antibactériennes

1.1 Importance de recherches des substances naturelles antibactériennes

L'émergence des microorganismes résistants a réduit l'efficacité des antibiotiques ces dernières années, de ce fait la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes est devenue une priorité. Les compagnies pharmaceutiques ont récemment relancé les efforts pour développer de nouveaux antibiotiques qui sont maintenant une urgence en raison de l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques, tels que *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (Amabile-Cuevas, 2003).

Les composés qui présentent des activités biologiques et qui sont dérivés de sources naturelles, par exemple, les plantes, les animaux et les microorganismes sont définis comme étant des produits naturels (Baker et al., 2007) ; ces produits constituent une source indispensable de molécules thérapeutiques utilisées depuis l'antiquité et un réservoir important de divers composés à activité antimicrobienne (Cowan, 1999). Les causes d'exploration du monde naturel afin de mettre en évidence de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique contre les maladies infectieuses sont multiples, entre autres : la diversité chimique du monde animal, végétal et microbien, et le fait que les plantes médicinales n'ont pas été explorées totalement de point de vue de l'activité biologique et de la composition chimique. Pour cette raison, la recherche dans ces ressources peut contribuer à la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes qui peut être utilisées comme des antibiotiques ou bien ils constituent une origine de synthèse d'autres molécules d'antibiotiques par chimie combinatoire (Koehn et Carter, 2005).

Les produits naturels ont apporté une valeur considérable pour l'industrie pharmaceutique au cours du demi-siècle passé. En particulier, les domaines thérapeutiques des maladies infectieuses ont bénéficié de nombreuses classes de médicaments provenant de sources de produits naturels (Baker et al., 2007).

Les études menées sur les productions des molécules anti-infectieuses ont montré que 28 % des produits pharmaceutiques sont d'origine naturelle et 24 % des produits pharmaceutiques synthétiques ont été produits par l'analyse de pharmacophores issues de produits naturels c'est-à-dire la combinaison des deux pourcentages (52 % des produits

pharmaceutiques) cela suggère que les produits naturels sont une source très importante pour la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes (Chin et al., 2006).

1.2. La production des antibiotiques se ralentit

L'émergence rapide d'une résistance cliniquement significative au cours des six dernières décennies s'est accompagnée d'un manque de nouveaux agents antimicrobiens (Talbot et al., 2006). Il y a un besoin perpétuel de nouveaux antibiotiques pour que la plupart des antimicrobiens soient toujours aussi efficaces à l'avenir comme ils le sont aujourd'hui. L'inévitable augmentation de la résistance va éroder l'utilité des antibiotiques (Falagas et al., 2005).

Les antibiotiques actuels sont des dérivés de molécules introduites entre les années 1930 et le début des années 1960, mis à part l'introduction des carbapénèmes en 1985. Tous les antibiotiques approuvés pour une utilisation clinique entre les années 1960 et 2000 étaient des dérivés synthétiques de molécules existantes (Fischbach et Walsh, 2009).

Parmi les causes du ralentissement de la production d'antibiotiques par les compagnies pharmaceutiques, c'est que (i) les antibiotiques sont utilisés en petites quantités que d'autres médicaments. Les prescriptions pour les maladies chroniques peuvent durer des années, voire des décennies, alors que la durée standard d'utilisation d'antibiotiques dure que quelques semaines et par conséquent, les antibiotiques donnent une baisse des revenus par rapport à la plupart des médicaments. Alors que la plupart des médicaments nouvellement approuvés peuvent être prescrits à tous ceux qui pourraient en bénéficier, (ii) l'utilisation d'un antibiotique nouvellement approuvé peut être limitée au traitement des infections bactériennes graves. Le résultat est une impasse : la résistance est à la hausse alors que la découverte et le développement des antibiotiques sont sur le déclin (Nathan 2004; von Nussbaum et al., 2006) (figure 11). Les conditions économiques défavorables de développement d'antibiotiques ont eu un effet dissuasif sur les programmes de recherche industrielle pour inverser ce déclin qui mérite l'attention (Nathan, 2004).

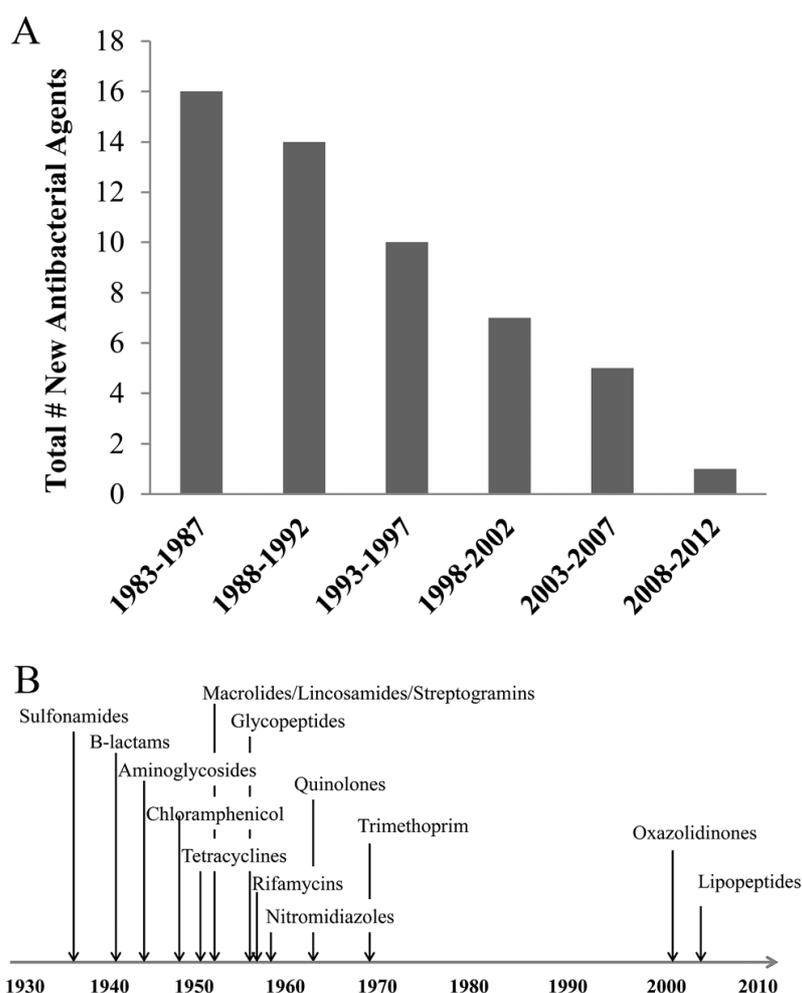


Figure 11 : (A) : Approbations d'antibiotiques à partir de 1983 jusqu'à présent (données obtenues à partir du rapport d'IDSA) dans lequel la plupart de ces médicaments (75 %) proviennent de deux classes, β -lactamines et les quinolones. (B) : Histoire de l'introduction de produits antibactériens et d'approbation (Abreu et al., 2012).

L'augmentation de pathogènes résistants devrait redoubler nos efforts sur non seulement la découverte de nouveaux antibiotiques, mais de nouvelles classes d'antibiotiques (Fischbach et Walsh, 2009).

1.3 Les substances naturelles antibactériennes d'origine végétale (plantes aromatiques et médicinales PAM)

Les plantes synthétisent plus de 100000 petites molécules dont la majorité présente une activité antimicrobienne (Lewis et Ausubel, 2006). Les plantes médicinales ont été utilisées comme source de substances médicamenteuses depuis des milliers d'années, ces substances ont d'abord pris la forme de médicaments bruts tels que teintures, des poudres, des formulations à base d'herbes et d'autres (Balunas et Kinghorn, 2005). Les recherches actuelles

sur les molécules antimicrobiennes d'origine naturelle se concentrent principalement sur les plantes, car ils peuvent être achetés plus facilement et seront sélectionnés sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle (Verpoorte et al., 2005).

1.3.1 Les principaux groupes de composés antimicrobiens de plantes

La plupart des substances synthétiser par les plantes ayant des activités inhibitrices des microorganismes sont des métabolites secondaires, dont au moins 12.000 ont été isolés, un nombre estimé à moins de 10 % du nombre total (Cowan, 1999). Dans de nombreux cas, ces substances servent de mécanismes de défense des plantes contre la prédation par les microorganismes (Tableau 2), les insectes et les herbivores. Certains, comme les terpènes, donnent aux plantes leurs odeurs, d'autres (quinones et des tanins) sont responsables de pigment végétal (Dixon, 2001).

Tableau 2 : Les grandes classes de composés antimicrobiens provenant des plantes médicinales (Cowan, 1999)

Classe	Sous-classe	Exemple	Mécanisme d'action
Les composés phénoliques	phénols simples	catéchol	privation de Substrat
		épicatechine	
	Les acides phénoliques	L'acide cinnamique	rupture de la membrane
	Quinones	hypéricine	Lier aux adhésines, forme un complexe avec la paroi cellulaire, inactiver les enzymes
	Les flavonoïdes	Chrysin	Lier aux adhésines
	Flavones	-	Forme un complexe avec la paroi cellulaire, inactiver les enzymes
	-	Abyssinone	Inactive les enzymes, Inhibition de la transcriptase inverse du VIH
Les flavonols	Totarol	-	
Tanins	Ellagitannin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se lier aux protéines ▪ Se Lier aux adhésines 	

			<ul style="list-style-type: none"> ▪ inhibition de l'enzyme ▪ Privation de substrat ▪ Forme un complexe avec la paroi cellulaire, inactiver les enzymes ▪ rupture de la membrane ▪ Complexation d'ions métalliques
	Coumarines	warfarine	Interaction avec l'ADN eucaryote (activité antivirale)
Terpènes, les huiles essentielles	-	Carvacrol	rupture de la membrane
Alcaloïdes	-	Berberine La pipérine	S'intercaler dans la paroi cellulaire et / ou de l'ADN
Lectines et des polypeptides	-	mannose Spécifique agglutinine	Bloquer la fusion virale ou adsorption
		Fabatin	Forme des ponts disulfures
Polyacétylènes	-	8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diyne-1,8-diol	?

1.3.2 les substances naturelles végétales inhibitrices du SARM

Beaucoup de travaux ont été menés sur la capacité de thé vert et de ses composants d'inhiber *S. aureus* résistant à la méticilline SARM (Yam et al., 1998 ; Hamilton-Miller et Shah 1999). Le gallate d'épicatchine (figure12) est un composé qui a en plus de sa faible CMI (280 µg/ml) sur les souches SARM, l'aptitude de renverser la résistance en une sensibilité (Hamilton-Miller et Shah, 2000). L'action de ce composé semble être causée par

l'inhibition de synthèse de PLP2a, ce qui rend les SARM sensible aux β -lactamines. La microscopie électronique montre que ce composé attaque la morphologie de la paroi cellulaire des souches résistantes alors que les souches sensibles ne sont pas affectées (Gibbons, 2004).

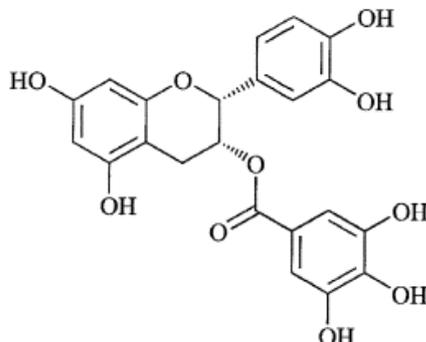


Figure 12 : Le gallate d'écatechine (Gibbons, 2004)

Le Totarol est un diterpène qui a également un effet sur la production de PLP2a chez des souches SARM lorsqu'il a été incorporé dans un milieu liquide à une concentration de 1 μ g/ml. Ce composé a une capacité d'augmenter huit fois l'activité de la méticilline chez les SARM sachant qu'il présente aussi une activité sur ces germes avec une CMI de 2 μ g/ml (Nicolson et al., 1999).

Shiota et al, (2000) ont démontré que le Tellimagretine et le corilagine qui sont des tanins hydrolysables ont un effet de synergie avec toute la classe des β -lactamines sur des souches SARM et cet effet était négatif avec les SASM ; les auteurs suggèrent que cette activité est due à l'inhibition des PLP2a.

Stermitz et Lewis (2000) ont décrit un certain nombre d'inhibiteurs de transporteurs de MDR chez *S. aureus* ou ils ont étudié la synergie de la Berberine, un alcaloïde végétal antibactérien quaternaire produit par *Berberis fremontii* et un autre produit naturel le 5-méthoxyhydno-carpine également présent dans cette espèce contre les souches possédant le transporteur MDR « MDR Nora » du système d'efflux. Des cellules bactériennes ont été complètement inhibées par ce produit naturel.

2. Les huiles essentielles et leur activité biologique

2.1. Définition

Les huiles essentielles sont un groupe de métabolites secondaires des plantes connus depuis l'antiquité d'avoir des activités biologiques. Elles sont également connues par « les

huiles volatiles ou étherées », le terme « Huile essentielle » dérive de l'expression latine « Quinta essentia » qui signifie le composant efficace d'un médicament. Conçu au XVI^e siècle par le médecin et alchimiste suisse Paracelse von Hohenheim (Bauer et al., 2007). Ces composés volatils ont été régulièrement utilisés dans l'ancienne Égypte, la Chine, l'Inde, Rome, la Grèce et le Moyen-Orient comme des parfums, déodorants, conservateurs alimentaires, des produits pharmaceutiques et des antiseptiques. L'essence de térébenthine a été mentionnée par les historiens grecs et romains.

Au XIV^e siècle, la distillation a été développée en Espagne et en France pour produire des essences concentrées de romarin et de sauge. Les huiles essentielles ont été mentionnées dans les premières publications telles que *The Book of Nature* en 1430. En 1550, l'huile de lavande a été produite en France comme un produit commercial. À cette époque, les saveurs et les arômes ont été distillés à partir d'un nombre croissant de sources végétales. En outre, les scientifiques et les médecins ont commencé des études sur les propriétés physicochimiques et médicinales des huiles essentielles pendant cette période (Baby et George, 2009).

2.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes d'hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, des mono-, sesqui-, diterpènes, et leurs dérivés oxygénés. Les terpénoïdes sont composés d'unités isoprène. Les monoterpènes sont constitués par trois unités isoprène. Certaines huiles essentielles n'ont pas de mono et sesquiterpènes, au contraire, ils ont des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques et leurs dérivés. Les techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie à haute performance sur couche mince (HPTLC), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie sur colonne, sont utilisées pour la séparation des composants individuels du complexe parfumé. Des techniques telles que la chromatographie gazeuse à détection ionisation de flamme (GC-FID) et la GC-MS permettent une meilleure séparation du mélange volatil, l'identification et la quantification ultérieure de ses constituants individuels (Sabulal et al., 2007). L'identification des constituants de l'huile essentielle peut également être réalisée par infrarouge (IR) et par la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Baby et George, 2009).

2.3. Méthodes d'obtention des huiles essentielles

2.3.1. La distillation à la vapeur

La distillation à la vapeur se fait en passant la vapeur sèche à travers le spécimen végétal, dans lequel les molécules aromatiques sont volatilisées, ensuite, condensées et recueillies dans un récepteur (Guenther, 1950). La distillation à la vapeur a été utilisée pour l'extraction des huiles essentielles pendant des années. Parmi les exemples récents de la littérature, sont l'extraction des huiles de *Rosmarinus officinalis* (romarin) et *Satureja fruticosa* (Boutekedjiret et al., 2003; Coelho et al., 2007).

2.3.2. L'hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à faire bouillir la matière végétale avec de l'eau. Les matières volatiles dans l'échantillon végétal sont entraînées avec la vapeur d'eau, qui est condensée par la circulation de l'eau froide. L'huile essentielle est récupérée après décantation. Ce procédé utilise l'appareil de type « Clevenger » qui est la technique la plus couramment utilisée à l'échelle des laboratoires d'extraction d'huiles essentielles (Hudaib et Aburjai, 2007). De plus cette méthode est recommandée par les pharmacopées européennes (European Pharmacopoeia, 2005).

2.3.3. L'enfleurage

La technique d'enfleurage est utilisée pour extraire des traces d'huiles volatiles de parties de plantes très fragiles telles que des fleurs. Les pétales de fleurs sont placés sur des plaques de verre en couches avec de la matière végétale sans odeur ou de graisses animales, qui va absorber son huile essentielle. Après que la graisse a absorbé autant de l'huile essentielle que possible, en quelques heures ou quelques jours, les pétales épuisés sont supprimés et remplacés par des neuves. Ceci se poursuit jusqu'à ce que la graisse soit saturée de l'huile essentielle. Ensuite, l'huile essentielle est extraite de la matière grasse par addition d'alcool (Eltz et al., 2007).

2.3.4. L'extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique a été introduite dans les années 1980, cette méthode est basée sur l'utilisation du CO₂ sous très haute pression pour extraire les huiles essentielles. Il s'agit d'un haut rendement énergétique. Le spécimen de la plante est placé dans un réservoir

en acier inoxydable et le CO₂ est injecté dans ce réservoir. Sous haute pression, le CO₂ se transforme en CO₂ liquide et agit comme un solvant pour extraire l'huile essentielle de la plante. Lorsque la pression est diminuée, le CO₂ retourne à l'état gazeux et ne laissant que l'huile volatile et aucun résidu autres derrière. Ces extractions au CO₂ à des températures plus basses sont plus douces sur des échantillons de plantes par rapport à la distillation à la vapeur, donnant une huile fraîche, propre et qui rappelle l'arôme naturels de la plante aromatique. Des études ont montré que l'extraction au CO₂ produit des huiles essentielles très puissantes avec de bons effets thérapeutiques. De plus, ce procédé donne de bonne rendements en huiles essentielles, et rend certains matériaux (gomme, résine) plus faciles à manipuler. Beaucoup d'huiles essentielles qui ne peuvent pas être extraites par distillation à la vapeur sont obtenues avec extraction au CO₂ (Moyler, 1993).

2.3.5. Extraction des huiles essentielles par microondes

L'extraction aux microondes sans solvant (SFME) est une autre technologie verte développée récemment dans laquelle une combinaison du chauffage à microondes et de la distillation à sec à la pression atmosphérique permettant une extraction des huiles essentielles à partir d'échantillons de plantes (Lucchesi et al., 2004).

2.4. Les huiles essentielles comme des antimicrobiens

Les huiles essentielles, biosynthétisées par les plantes sont très efficaces contre les phytopathologies causées par les microorganismes. Par exemple les germes pathogènes des plantes pourraient pénétrer facilement dans les sites des blessures des plantes causées par les herbivores, cependant ces blessures exercent une rupture des glandes d'huile essentielle de la plante qui s'écoule sur ces sites et neutralise les pathogènes. Les effets antimicrobiens des huiles essentielles sont utilisés maintenant dans la conservation alimentaire, la désinfection, comme antiseptiques et thérapeutiques en aromathérapie et en cosmétique. Parmi les produits commerciaux à la base d'huile essentielle utilisés pour la conservation (« DMC Base Natural », « Protecta One », « Protecta Tw », etc.), et comme antiseptique « dental root canal sealers » et « feed supplements » (Burt, 2004). Les huiles essentielles sont utilisées cliniquement en dermatologie, en urologie, contre les infections pulmonaires, contre l'asthme, et contre les infections gastro-intestinales (Steflitsch et Steflitsch, 2008). Actuellement les

travaux sur l'évaluation des effets antimicrobiens des huiles essentielles sont en augmentation continue (figure 13).

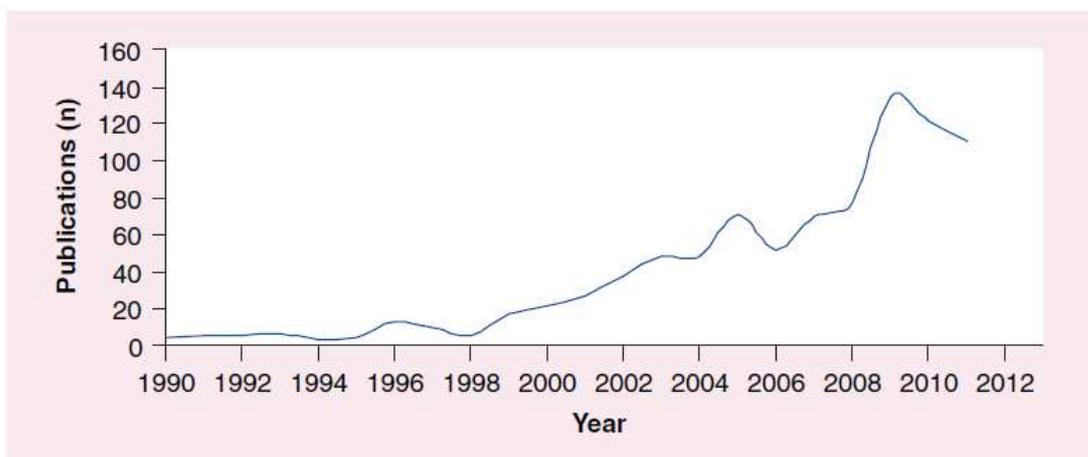


Figure 13 : Dynamique des publications de PubMed sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles (Kon et Rai, 2012).

2.5. Les huiles essentielles comme outil de lutte contre le SARM

Les études cliniques et in vitro ont montré un pouvoir bactéricide antibactérien et antimycotique important des huiles essentielles sur les pathogènes nosocomiales (Warnke et al., 2009) tels que *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline, *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine et *Candida albicans* résistant aux azolés (Inouye et Abe, 2007).

La première huile essentielle qui a montré une activité contre le SARM est l'arbre de thé *Melaleuca alternifolia*. Cette huile a été testée contre 64 SARM isolées de l'Australie et de l'Angleterre. Parmi ces souches 33 sont résistantes à la Mupirocine. Les Concentrations minimales inhibitrices « CMI » et les concentrations minimales bactéricides « CMB » étaient 0.25-0.313 % et 0.5-0.625 % respectivement, ce qui indique la sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'huile d'arbre à thé (Carson et al., 1995). Cinq ans après May et al. (2000), ont publié des résultats d'une étude de l'huile essentielle de l'arbre de thé *Melaleuca alternifolia* sur des souches bactériennes multirésistantes différentes contenant des souches de SARM. Les auteurs ont observées que toutes les souches ont été détruites durant 6 h d'exposition à l'huile et que l'huile modifiée en terpinen-4-ol concentrée et en Cineole à

faible concentration était plus active que l'huile d'origine sur les souches résistantes y compris les souches SARM (figure 14).

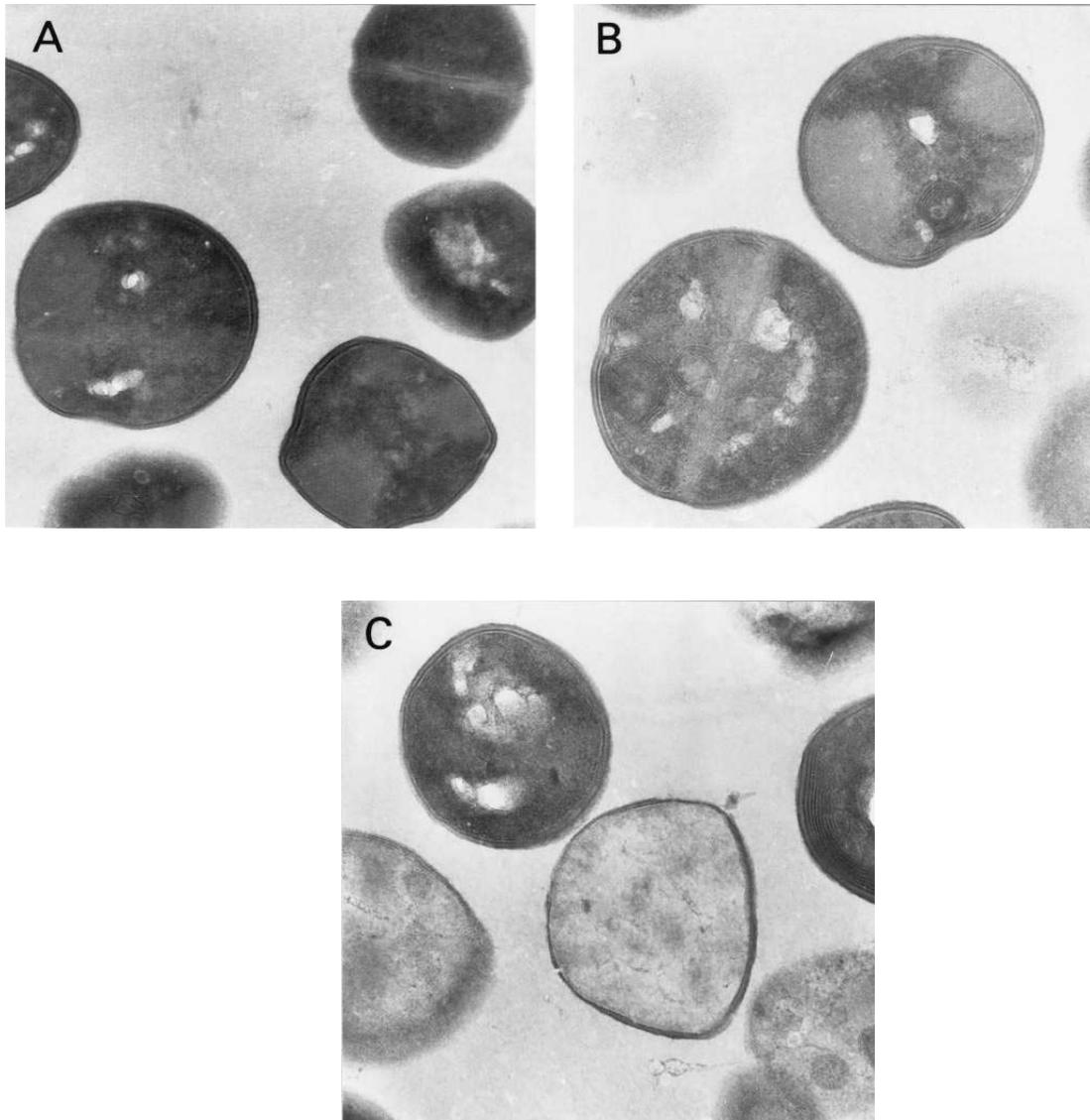


Figure 14 : La microscopie électronique de bactéries de *S. aureus* traités par le composé majeur de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* « terpinène-4-ol » (Carson et al., 2002).

Les cellules de *S. aureus* traitées par le terpinène-4-ol ont montré des structures mesosomiques (Fig. 14 B et C) qui n'ont pas été vues dans les cellules non traitées (figure 14 A). En outre, le contenu de certaines cellules traitées est apparu épuisé et amorphe (figure 14 C) (Carson et al., 2002).

Depuis 2000, les études sur les activités anti-SARM des huiles essentielles sont devenues abondantes, et plusieurs types d'huiles essentielles appartenant à plusieurs familles ont montrés une activité anti-SARM. Chao et al (2008) ont criblé 91 huiles essentielles contre le SARM. 78 présentaient des zones d'inhibition contre le SARM. Les huiles essentielles les plus actives sont la citronnelle, le myrte citronné, la sarriette des montagnes et la cannelle. Les même auteurs ont souligné que l'activité des H.E est due essentiellement à leurs composition chimique multiple qui rend les microorganismes incapable de développer une résistance. En outre, l'action combinée des composants des H.E peut avoir des effets synergiques. Mulyaningsih et al, (2010) ont démontré l'effet synergique de l'aromadendrene et du 1,8-cineole contre neuf souches de SARM d'origine clinique. Les résultats ont montré que la combinaison de ces deux composés exerce une diminution significative de la CMI par rapport à la CMI de ces composés séparés.

2.6. Activité *in vivo* des huiles essentielles contre le SARM

En dépit de la présence d'un grand nombre de publications relatives à l'efficacité *in vitro* des huiles essentielles contre les microorganismes multirésistants, il y a un manque important de la recherche dans leur efficacité *in vivo*, soit sur des animaux de laboratoire ou dans l'application clinique (Kon et Rai, 2012). La majorité des études *in vivo* ont été conçues pour évaluer l'effet d'une seule huile, celle de l'arbre à thé sur le SARM. Dans certaines de ces études, un bon effet de l'application d'huile d'arbre à thé a été observé (Warnke et al., 2009). Sherry et al, (2001) ont rapporté le traitement de l'ostéomyélite chronique SARM avec de l'huile d'arbre à thé et d'eucalyptus issus de formulations commerciales nommées polytoxinol.

Le groupe de Dryden a comparé l'effet de pommade nasale de mupirocine à 2 %, savon gluconate de chlorhexidine à 4 %, la sulfadiazine argentique crème à 1 % par rapport à un traitement avec l'huile d'arbre à thé, a une concentration de 10 % et 5 % sous forme d'un gel nettoyant dans le but de décolonisation du portage de SARM. La Mupirocine éradique 78 % des germes nasaux tandis que la crème d'arbre à thé élimine 47 % ($p = 0,0001$), mais en compensation des sites superficiels de la peau et des lésions cutanées, le traitement de l'huile d'arbre à thé est plus efficace que la chlorhexidine ou la sulfadiazine d'argent (Dryden et al., 2004). Edmondson et al, (2001) ont publié les résultats d'une étude sur l'efficacité de la solution à thé d'huile 3 % d'arbre utilisé pour la décolonisation des blessures SARM positives. La solution d'eau miscible d'huile d'arbre à thé a été appliquée sur onze patients pour le nettoyage des plaies lors de chaque changement de pansement. L'huile d'arbre à thé a

démontré de bonnes propriétés anti- SARM et de cicatrisation qui a été déduite par les réductions de taille de la plaie après le traitement.

Certaines études ont évalué l'application des huiles essentielles pour le traitement de différentes infections indépendamment de la résistance aux antibiotiques des agents étiologiques, et ces études sont également intéressantes, car ils démontrent l'efficacité clinique générale des HE dans les maladies infectieuses. Les composés antimicrobiens d'origine naturels ne peuvent pas remplacer les antibiotiques surtout lors des infections systémiques graves. Toutefois, ils peuvent être utiles dans le traitement des tissus de la peau, les blessures, gynécologiques, les infections respiratoires et d'autres où l'application locale d'un agent antimicrobien est possible (Kon et Rai, 2012).

Orafidiya et al, (2003) ont démontré les propriétés curatives de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* lors de l'application topique sur la surface de la plaie dans des expériences sur des lapins.

2.7. Combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques et lutte contre le SARM

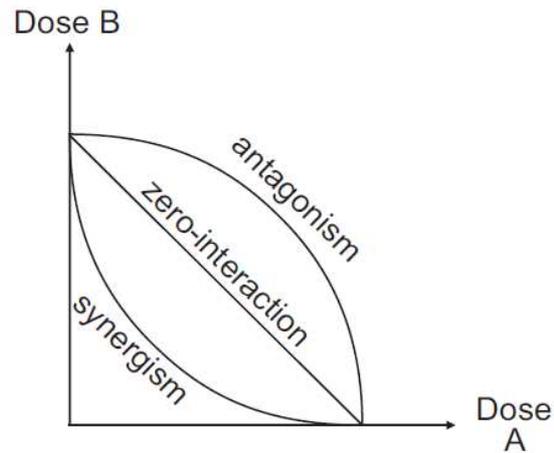
Du fait de l'augmentation continue de la résistance aux antibiotiques, il devient encore plus évident de tester les combinaisons d'huiles essentielles ou de leurs composants avec des antibiotiques. En général, l'utilisation combinée d'agents antimicrobiens ouvre une perspective pour augmenter l'activité antimicrobienne et réduire la toxicité de l'un des deux agents envers les cellules humaines (Schwalbe et al., 2007).

En dépit de la présence d'une grande quantité de travail consacrée soit à l'activité antibactérienne des huiles essentielles, des antibiotiques ou aux antibiotiques-antibiotiques combinaisons, il y a un manque d'études sur l'effet antibactérien de combinaisons entre les huiles essentielles et les antibiotiques (Kon et Rai, 2012). La valeur thérapeutique des interactions synergiques est connue depuis l'antiquité, et de nombreuses méthodes de guérison culturelle se sont appuyées sur ce principe dans la croyance que la thérapie combinée peut améliorer l'efficacité. Les anciens textes relatifs à l'*Ayurveda* (médecine traditionnelle indienne) et la médecine traditionnelle chinoise à base de plantes décrivent des formules composées de mélanges complexes qui peuvent contenir des ingrédients à base de plusieurs végétaux. Les guérisseurs traditionnels africains comptent rarement sur une seule plante pour les schémas thérapeutiques, mais souvent combinent diverses parties des plantes et des espèces différentes afin d'obtenir des résultats optimaux. Le principe fondamental de

l'aromathérapie est la combinaison de différents complexes d'huiles essentielles pour obtenir un effet thérapeutique (van Vuuren et Viljoen, 2011).

En général, une interaction entre agents biologiquement actifs « est définie comme étant présente lorsque l'effet d'une combinaison d'agents différents présente un changement dans les courbes « dose-réponse » (Berenbaum, 1989). Les interactions peuvent être classées comme plus additives (par exemple, synergique), ou moins additifs (par exemple, antagoniste). Bien que l'étude des interactions entre les agents biologiquement actifs semble être relativement simple un certain nombre de questions doivent être abordées lors de la conception des expériences pour évaluer les interactions médicamenteuses (Tallarida et al., 1989). Certaines des méthodes d'analyse qui ont été employées pour étudier les interactions médicamenteuses comprennent : l'analyse isobologique (Tallarida, 1993).

Pour construire un isobogramme pour l'évaluation des interactions entre deux effets biologiques, par exemple des médicaments A et B ; les points uniques représentant des doses de A et de B qui produisent les mêmes effets biologiques sont placés sur les X de l'isobogramme (voir Fig. 15 et 16) ; doses de médicament A se trouvent sur l'axe X et doses de médicament B sont sur l'axe y). La relation additive entre les médicaments A et B est décrit par l'équation d'une droite joignant les doses de A et B qui produisent le même effet. Si une association à dose de A et B est additif, synergique ou antagoniste est déterminée par le point représentant l'effet de la combinaison à dose se situe, sur, ci-dessous, ou au-dessus respectivement de la ligne d'additivité joignant les doses de A et B qui produit un effet égal. Quand une combinaison de A et B est synergique, le point représentant l'effet de la dose de la combinaison se situe en dessous de la ligne de dose d'additivité (moins de quantité des deux médicaments est nécessaire pour produire le même effet). Lorsqu'une combinaison est antagoniste. le point représentant l'effet de la combinaison à dose se situe au-dessus de la ligne de dose d'additivité (plus de quantité des deux médicaments est nécessaire pour produire le même effet (Miaskowski et Levine, 1992).



Antagonisme = interaction négative

Synergie = interaction positive ou potentialisation

zéro-interaction = effets ajout de composants individuels

Figure 15 : Isoboles de zéro interaction, Synergie et l'antagonisme (Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009).

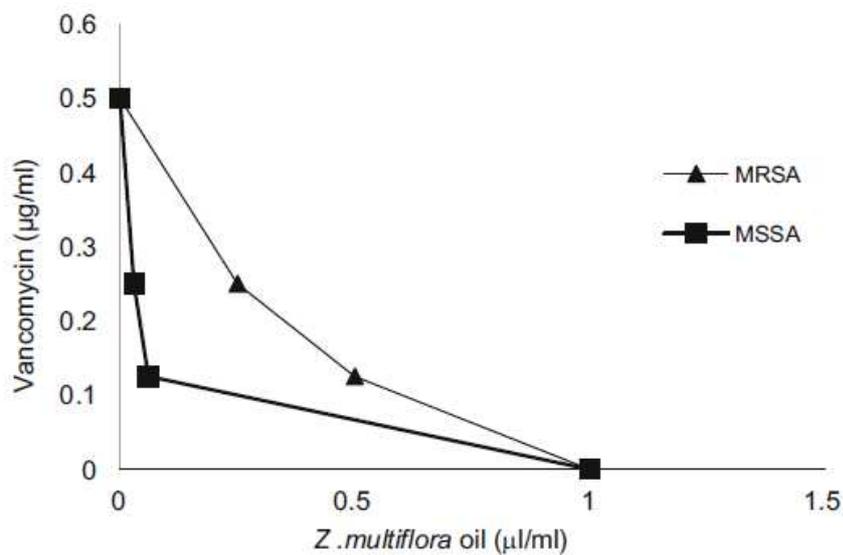


Figure 16 : Un exemple de l'effet de synergie entre l'huile essentielle de *Zataria multiflora* et la vancomycine contre une souche de SARM et une autre SASM (Mahboubi et Ghazian Bidgoli, 2010).

La concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) ou en Anglais (FICI) pour « fractional inhibitory concentration index » permet également de déterminer la synergie.

La CFI est interprété comme montrant l'effet synergique si elle est ≤ 0.5 , l'effet indifférent quand elle est de $>0,5-2$ et comme antagonistes quand elle est de >2 (Mahboubi et Ghazian Bidgoli, 2010).

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1 Souches de références

Dans notre travail nous avons utilisé les souches de références ATCC (American Type Culture Collection) suivantes :

ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* SASM de phénotype sauvage)

ATCC 33862 (*Staphylococcus aureus* SASM de phénotype sauvage)

ATCC 43300 (*Staphylococcus aureus* SARM)

ATCC 43866 (*Staphylococcus aureus* SARM)

Nous avons également utilisé la souche de référence *Staphylococcus aureus subsp. aureus* COL (SARM) (parmi les premières souches de SARM isolé et séquencé, elle a été isolée dans un hôpital de Colindale, Royaume-Uni).

1.2. Milieux de culture

Pour cultiver les souches nous avons utilisé les milieux liquides et solides suivants :

1.2.1. Milieux de culture liquides :

Bouillon nutritif (BN) (Fluka Biochemica, Spain)

Bouillon Cœur cerveau (BHIB) (Fluka Biochemica, Spain)

Bouillon de Trypticase soja (TSB)

1.2.2. Milieux de culture solides :

Gélose nutritive (Fluka Biochemica, Spain)

Gélose Chapman (Merck, France)

Gélose Muller Hinton (Fluka Biochemica, Spain)

Gélose Columbia au sang de mouton à 5% (bioMérieux, France)

1.3. Tests biochimiques

Pour l'identification biochimique, nous avons utilisé la Galerie API staph (BioMérieux, Marcy, étoile de France)

1.4. Antibiotiques

1.4.1 En disque (OXOID, Angleterre)

Oxacilline, Vancomycine, Cefoxitine, Gentamycine, Amoxicilline, Amoxicilline-acide clavulanique, Chloramphénicol

1.4.2 En poudre (Merck, France)

Oxacilline, Vancomycine

1.5. Solvants organiques et solutions chimiques

Acétate d'éthyle 98% (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Éthanol 98%. Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) (Sigma-Aldrich, Lyon, France), Acétonitrile (Sigma-Aldrich, Lyon, France), Acide trifluoroacétique (Sigma-Aldrich, Lyon, France) Paraffine pure (BIOCHEM Chemopharma).

2. Méthodes

2.1. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués par écouvillonnage sur les plaies postopératoires et dans les fosses nasales ou par incubations des cathéters veineux centraux des patients hospitalisés dans plusieurs services du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen à savoir les services de Pédiatrie, de Néonatalogie, de Pneumologie, de Maternité, de Dermatologie et de Médecine interne dans une période de 14 mois : Du mois d'Avril 2010 jusqu'au Juin 2011.

2.2. Souches bactériennes

2.2.1. Isolement

Les prélèvements collectés ont été incubés dans le milieu BHIB, ensuite les souches de *S. aureus* ont été isolées sur gélose Chapman. Les colonies jaunes dorées ont été sélectionnées pour des tests initiaux tels que la coloration de Gram, le test du coagulase et le test de catalase. Ensuite les souches ont été purifiées par repiquage successif sur bouillon nutritif et gélose Chapman.

2.2.2. Identification

2.2.2.1. L'identification par Galerie APIstaph

L'identification par Galerie APIstaph bioMérieux, et l'étape de l'identification préliminaire. Cette méthode repose sur l'utilisation d'une galerie biochimique qui comporte

20 microtubes contenant des substrats déshydratés. L'inoculum de la souche pure à identifier est préparé en mettant une colonie dans une ampoule de l'eau physiologique de 1 ml. L'ensemencement s'effectue en inoculant les microtubes à l'aide d'une pipette de pasteur stérile. La lecture des plaques est basée sur les virages des indicateurs colorés et aussi en ajoutant les réactifs spécifiques tels que VP1 et VP2, nitrate1 e nitrate2 et ZYM A et ZYM B, cette révélation s'effectue en suivant le prospectus qui accompagne les plaques APIstaph.

2.2.2.2. L'identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS

2.2.2.2. A. Préparation de la matrice

Dans un tube à Eppendorf (1.5 ml) stérile on ajoute deux spatules de la matrice HCCA en poudre (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) Sigma aldrich France.

- Ajouter 500 μ l de TFA (Acide trifluoroacétique) 10 %.
- Ajouter 250 μ l d' H_2O HPLC.
- Agiter au Vortex.
- Mettre aux ultras sons pendant 10 minutes jusqu'à que la solution deviens trouble.
- Centrifuger 5 minutes à 13000g.
- Transférer 1.5 ml du surnageant dans un tube propre et donc la matrice est prête.

2.2.2.2. B. Préparation des souches

L'identification par la spectrométrie de masse de types MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) a été faite en ensemençant les souches sur gélose Columbia au sang de mouton à 5 % (bioMérieux) et les incubant pendant 24 heures à 37 °C.

2.2.2.2. C. Préparation de la cible

En utilisant des embouts stériles, prendre une colonie et l'étaler sur le cercle graver sur la cible (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne). Ensuite, deux microlitres de la solution de la matrice ont été ajoutés sur les taches cibles de l'analyse. Après que la cible est sèche, elle est placée dans l'appareil (MALDI-TOF-MS Bruker Microflex Daltonics, Bremen, Allemagne). L'analyse des données MALDI-TOF-MS et le typage des souches résistantes et sensibles de *S. aureus* ont été réalisées en comparant la position des pics et l'intensité des spectres résultants, un dendrogramme est généré par le logiciel Biotyper 2.0 (Seng et al., 2009).

3. Les tests de sensibilité aux antibiotiques

La recherche de la résistance à la méticilline a été effectuée par la méthode d'antibiogramme en utilisant un disque d'oxacilline (5 µg) et un disque de céfoxitine (30 µg). Nous avons également testé la résistance à la gentamicine et au chloramphénicol. La CMI pour l'oxacilline a été déterminé à l'aide du E-test (bioMérieux, Marcy l'étoile de France). Tandis que la recherche de production de β-lactamases a été étudiée en utilisant un disque d'amoxicilline (25 µg) et un disque d'amoxicilline-acide clavulanique (20 µg) (Leahy et al., 2011) et en utilisant des disques nitrocephin (Cefinase, bioMérieux). La souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SASM) a été utilisée comme contrôle de la qualité. Les résultats ont été interprétés selon les directives du Comité de l'antibiogramme « Clinical Laboratory and Standards Institute » (CLSI, 2011).

4. La recherche des gènes *mecA*, LPV et TSST-1 par PCR

4.1. Extraction d'ADN automatisé « QIAGEN »

4.1.1 préparation du mixte

1. Mettre 100 µl d'eau distillée stérile dans un tube Eppendorf stérile
2. Ajouter une colonie de la souche bactérienne
3. Ajouter 100 µl de Buffer (solution tampon)
4. Ajouter 10 µl de Protéinase K (agiter au vortex)
5. Incuber à 70 °C pendant 15 min

4.1.2 Extraction par l'appareille QIAGEN

1. Introduction des plaques du Kit d'extraction
2. Ouvrir et placer les tubes de mixtes dans la position « 1 »
3. Laisser la position « 2 » vide et placer dans la position « 3 » les Tubes d'élution
4. Placer dans la position 4 les tubes Eppendorf à icône
5. Fermer l'appareille et lancer l'extraction.

4.2. Amplification

La recherche de gène *mecA* a été réalisée par deux méthodes d'amplification ; la PCR standard et la PCR en temps réel. Pour la PCR en temps réel, nous avons recherché aussi les gènes de la LPV et de TSST1 en utilisant les amorces spécifiques comme ils sont décrits

précédemment par Deurenberg et al., (2005) et par Francois et al., (2004) (Tableau 3). L'amplification a été réalisée à l'aide de l'appareil Stratagene MX 3000.

Tableau 3 : Les amorces spécifiques utilisées pour le *mec A* la LPV et la TSST1

L'amorce	La séquence (5' → 3')
Le gène <i>mecA</i> (Bittar et al., 2009)	
mecAF	GTTAGATTGGGATCATAGCGTCATT
mecAR	TGCCTAATCTCATATGTGTTTCCTGTAT
mecA ^b	TTCCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCAT
La toxine LPV (Francois et al., 2004)	
F_LPV	AAAATGCCAGTGTTATCCAGAGGTA
R_LPV	TTTGCAGCGTTTTGTTTTTCG
P_LPV ^b	CTTCAATCCAGAATTTATTGGTGT
La toxine TSST1 (Deurenberg et al., 2005)	
F_TSST-1	TCATCAGCTAACTCAAATACATGGATT
R_TSST-1	TGTGGATCCGTCATTCATTGTT
P_TSST-1 ^b	TCCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTGAA
^b : la sonde fluorescente	

Pour la PCR standard, nous avons désigné et utilisé les amorces spécifiques pour le gène *mec A* ;

Amorce 1 : F > TCACCTTGTCGTAACCTGA. (T °F = 60 °C).

Amorce 2 : R > TGAAGACTATATCAAACAACAAATGGA. (T °R = 47.1 °C).

4.2.1 Préparation des Amorces

Les amorces lyophilisées se préparent de la manière suivante :

On ajoute la même quantité d'eau distillée stérile en µl que celle de l'ADN lyophilisé en nanomole (agiter au vortex). Faire une dilution au 1/50 dans deux tubes Eppendorf pour les deux amorces F et R puis on calcule la moyenne de température des deux amorces afin de désigner une température d'hybridation compatible avec ces amorces.

4.2.2 Préparation du mixte

Nous avons utilisé le Kit QIAGEN « QuantiTect Probe PCR Kits » qui contient les dntp (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP/dUTP), la Tac polymérase, Tris·Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄ et le MgCl₂ préalablement préparés. Le reste du mixte se prépare selon la manière indiquée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Méthode de la préparation du mixte pour la PCR standard

Une souche	60 souches
QuantiTect 12.5 µl	750 µl
Amorce R 0.5 µl	30 µl
Amorce F 0.5 µl	30 µl
Eau distillé stérile 6.5 µl	390 µl

4.2.3. Amplification génique

Pour l'Amplification génique, nous avons utilisé le programme suivant : 95 °C pendant 15 min ; 35 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 1 min, hybridation à 55 °C pendant 50 s, extension à 72 °C pendant 1 min et une seule extension finale à 72 °C pendant 7 min par « MultiGene Labnet international apparatus ». La souche de *Staphylococcus aureus* COL (SARM) a été utilisée comme contrôle de la qualité.

5. Recherche de la dégradation de l'oxacilline par spectrométrie de masse

Afin de rechercher la dégradation de l'oxacilline par spectrométrie de masse, trois solutions d'oxacilline ont été préparées allant de 0,0625 mg/ml à 0,25 mg/ml dans de l'eau stérile à 0,45 % de NaCl, les cultures des souches de *S.aureus* résistantes ont été incubées pendant la nuit sur des boîtes de gélose au sang (bioMérieux, Lyon, France) à 37°C°. Ensuite, une anse en plastique stérile de 10 µl chargée d'une quantité de bactéries a été ajoutée à 1 ml de la solution d'antibiotique contenant 0,45 % de NaCl de chaque souche testée dans un tube Eppendorf. Puis les tubes ont été incubés avec agitation (T0 = sans incubation, T2 = 2 h d'incubation, T4 = 4 h d'incubation et T6 = 6 h d'incubation).

Après chaque temps d'incubation, les tubes ont été centrifugés à 13000 tr/min pendant 5 min. 1 µl du surnageant de chaque tube a été déposé sur la cible pour être analysés par Ultraflex (Bruker Daltonics Allemagne).

Pour améliorer la performance de la technique, nous avons changé l'eau stérile par le bouillon trypticase soja qui a permis la prolongation de l'incubation à 12 heures pour permettre une dégradation complète de l'antibiotique. Puis nous avons ajouté 2 % de NaCl dans le bouillon pour optimiser l'activité enzymatique de la souche puisque les souches de

type BORSA sont sel-dépendantes (Petersson et al., 1999). Nous avons utilisé la matrice HCCA (l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) (Sigma-Aldrich Lyon, France) comme elle a été décrite par Kempf et al, (2012). Les pics obtenus ont été réalisés par l'analyse des spectres en utilisant le logiciel « Flex analysis » (Bruker Daltonics, Allemagne).

6. Effet des huiles essentielles et des extraits éthanoliques des plantes aromatiques retenues sur les souches SARM

6.1. Plantes aromatiques

Les espèces de plantes aromatiques utilisées dans ce travail ont été récoltées dans le Nord-Ouest algérien. Les plantes sont *Lavandula multifida*. L. (Kohila), *Origanum vulgare subsp. glandulosum* Desf., (Zatar el berhouche) *Ammoides verticillata* Desf. (Nounkha) *Cymbopogon schoenanthus* L. (Idkhir) *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* Desf., (Zaatar) et *Eucalyptus globulus* Labill (Calitous) (Tableau 5). Les plantes récoltes ont été séchées à l'air libre, à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Ce choix des plantes aromatiques a été basé sur :

- La disponibilité du matériel végétal.
- La composition chimique des huiles essentielles riches en composés oxygénés de nature phénolique.
- Le criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.
- A notre connaissance il n'y a pas de travaux antérieurs sur l'étude de l'effet inhibiteur de ces plantes sur le SARM.

Tableau 5 : Les stations géographiques de récolte des plantes aromatiques

Plantes aromatiques	Parties de la plante	Stations	Année de récolte
<i>Ammoides verticillata</i> Desf.	(Feuilles et fleurs)	Mefrouche, Tlemcen	2010
<i>Cymbopogon schoenanthus</i> L.	(Feuilles)	Djebel Mekhter, Ain-Esafra	2010
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	(Feuilles)	Bouhanak, Tlemcen	2011
<i>Lavandula multifida</i> . L	(Feuilles et fleurs)	Bouhanak, Tlemcen	2011
<i>Origanum glandulosum</i> Desf.	(Feuilles et fleurs)	Mefrouche, Tlemcen	2011
<i>Thymus ciliatus</i> Desf.	(Feuilles et fleurs)	Bouhanak, Tlemcen	2011

6.2. Obtention des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été obtenues par Hydrodistillation dans un appareil de type « Clevenger » (figure 17). 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 a été effectuée pendant trois heures (European Pharmacopoeia, 2005) sur les parties aériennes des plantes aromatiques. Les huiles obtenues ont été déshydratées sur le sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et conservées à 4 °C et à l'abri de la lumière.



Figure 17 : L'appareil d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation « Clevenger »

6.3. L'extraction par solvant organique (Ethanol).

Les parties aériennes sèches (100 g) des plantes étudiées ont été soumises à l'extraction par l'éthanol en utilisant un appareil « Soxhlet » de 250 ml. Après extraction, les extraits ont été filtrés à l'aide de papier-filtre Whatman N ° 1 et concentrée à l'évaporateur rotatif. Les résidus obtenus ont été récupérés aseptiquement avec du DMSO et conservés à -18 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

6.4. Analyse chimique des huiles essentielles

Les analyses GC ont été effectuées en utilisant un appareil Perkin Elmer GC Autosystem équipé d'un injecteur unique et de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID). L'appareil est doté de deux colonnes de silice fondue capillaires (60 m x 0,22 mm de diamètre, épaisseur de film 0,25 μ m) avec différentes phases stationnaires : Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Programme de température : 60-230 °C à 2 °C / min puis maintenus isotherme à 230 °C (30 min). Gaz vecteur : hélium (1 ml/min). Températures d'injecteur et du détecteur ont eu lieu à 280 °C. Injection a été réalisée avec un rapport de division de 1:80. Volume injecté : 0,1 μ l.

Les analyses CG/SM ont été effectuées à l'aide d'un détecteur Perkin Elmer TurboMass, directement couplé à un XL Perkin Elmer Autosystem équipé de colonnes de silice fondue capillaires (60 m x 0,22 mm de diamètre, épaisseur du film 0,25 μ m), Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Autres conditions CG étaient les mêmes que décrit ci-dessus.

CG/SM (IE) les conditions : température de la source d'ions : 150 °C ; énergie d'ionisation : 70 eV ; spectres électroniques de masse à ionisation ont été acquises sur la gamme de masse de 35 à 350 Da. Temps de numérisation : 1 s. L'injection a été réalisée avec un rapport de division de 1:80.

L'identification des composants est fondée : (i) la comparaison de leurs indices de rétention (RI GC) sur des colonnes apolaires et polaires, déterminée par rapport au temps de rétention d'une série de n-alcanes avec une interpolation linéaire, avec les composés authentiques ou des données de la littérature, et (ii) sur l'ordinateur correspondant à des bibliothèques spectrales de masses commerciales (Adams 1995; Köning et al., 2001; Mc Lafferty et Stauffer, 1994; NIST, 1999) et avec la comparaison des spectres avec ceux de notre bibliothèque personnelle. La quantité relative de chaque composant a été réalisée sur la base de leurs surfaces de pics sur les deux colonnes GC capillaires Rtx-1 et Rtx-Wax, sans correction du facteur de réponse du FID.

6.5. Tests in vitro anti SARM

6.5.1. Technique de diffusion en gélose

L'activité anti-SARM de l'huile a été évaluée par la technique de diffusion en gélose (Bauer et al., 1966) appelé aussi aromatoگرامme ou méthode de Vincent. Une culture de 18 à 24 h de la souche à tester sur bouillon Müller-Hinton a été préalablement préparée à une concentration $\approx 10^8$ UFC/ml en mesurant la DO à 620 nanomètre entre 0,08 et 0,1 (Larif et al., 2013). Ensuite les souches sont ensemencées sur gélose Müller-Hinton par écouvillonnage selon les recommandations de CLSI (CLSI, 2011). Un disque de papier filtre stérile (Whatman No. 3) de 6 mm de diamètre imprégné de 2 μ l de l'huile a été déposé au centre de la boîte ensemencée. Nous avons testé 21 souches, dont 16 SARM cliniques, deux SARM de référence mec A positif et deux SASM de référence et un SASM clinique.

6.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI »

La concentration minimale inhibitrice a été calculée par la méthode de microplaque à 96 puits à fond rond (Wiegand et al., 2008). L'huile essentielle a subi des dilutions successives au $\frac{1}{2}$ dans le bouillon Müller-Hinton (Fluka BioChemika, Espagne) en ajoutant le Tween 80 pour une concentration de 1% dans le but d'avoir une miscibilité totale de l'huile dans le bouillon. Une deuxième solution dite blanche a été préparée avec le bouillon Müller-Hinton et le Tween 80 avec une même concentration de 1%. Cette solution a été utilisée pour compléter les dilutions successives de la première solution qui contiennent l'huile essentielle et afin que la concentration de Tween 80 reste la même à 1% dans les différentes concentrations préparées.

L'inoculum à 10^8 UFC/ml a été dilué au 1/1000 pour avoir une concentration $\approx 10^5$ UFC/ml. Un volume de 180 μ l de la suspension bactérienne à 10^5 UFC/ml a été déposé à l'intérieur des puits de la microplaque. Ensuite, 20 μ l de la solution de l'huile essentielle a été ajouté. La concentration finale de Tween 80 est de 0,1 % dans chaque puits et les concentrations finales de l'huile essentielle sont de 4 % jusqu'à 0,0039 %.

6.5.3. Test d'activité en phase vapeur et calcul de la dose minimale inhibitrice DMI

L'évaluation de l'activité des huiles essentielles en phase vapeur a été faite suivant la méthode de Kloucek et al., (2012) avec quelques modifications. Cette méthode rapide consiste à ensemencer des boîtes de Pétri à quatre compartiments par les différentes souches à

tester en déposant 20 µl de la suspension préparée à 10^6 UFC/ml et en laissant un compartiment comme contrôle négatif. Dans notre expérimentation nous avons utilisé des boîtes à trois compartiments. Dans chaque compartiment 6.6 ml de gélose Müller-Hinton est introduit et 5 ml de la même gélose est introduit également dans les couvercles des boîtes afin de servir comme un support pour le disque de papier filtre à 85 mm de diamètre.

Les dilutions des huiles essentielles se font dans l'acétate d'éthyle. Les concentrations préparées sont 32, 16, 8, 4, 2, 1 et 0,5 µl dans 250 µl du solvant. Dans chaque boîte, 250 µl sont déposés au centre du disque de papier filtre et laissés pendant une minute afin de permettre une bonne dispersion de l'huile sur le disque, ensuite, les boîtes seront fermées et scellées par le parafilm pour garder l'huile constamment dans la boîte. Des disques de papier filtre avec ou sans acétate d'éthyle ont servi comme un contrôle négatif. La lecture de ce test est basée sur la dose minimale inhibitrice DMI exprimée en $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ et qui est définie comme la plus faible dose qui inhibe la croissance d'une souche exposée à l'action de l'huile en phase vapeur et qui donne une zone $\geq 6\text{mm}$, cette dose est divisée sur le volume de l'air existant dans la boîte de pétri remplie par la gélose qui est de 60,5 ml (Kloucek et al., 2012; Laird et Phillips, 2012). Tous les tests d'activité ont été répétés trois fois.

6.5.4. Cinétique de destruction du SARM avec les huiles essentielles

La cinétique de destruction du SARM exposé aux huiles essentielles testées au cours de notre travail a été évaluée suivant le protocole expérimental de Christoph et al., (2001).

La préparation de l'inoculum a été faite en cultivant la souche à tester dans 10 ml de bouillon trypticase Soja pendant 18 h d'incubation, ensuite la culture est centrifugée pendant 10 min à 250 rpm à 25 °C. Après, le culot est récupéré ensuite il est suspendu dans 0.9 ml d'eau physiologique stérile pour avoir une suspension concentrée de bactéries à 3×10^9 UFC/ml (Christoph et al., 2001)

Les bactéries (100 µL de l'inoculum final) ont été inoculées dans 50 ml de l'eau distillée stérile contenant les concentrations 1, 0.5, 0.25, et 0.125% d'huiles et de Tween 80 (0,5 %). Après une incubation sous agitation en continu de 5, 10, 15, 30, 60, 120, et 240 min à température 37°C, des aliquotes de 1 ml ont été prélevés et transférés dans un bouillon d'inactivation (9 ml de bouillon nutritif) puis agiter par vortex. Après 2 min, une série de dilutions ont été préparées dans l'eau physiologique, et 100 µL de chaque dilution et le bouillon d'inactivation ont été étalés sur le milieu Chapman pour énumérer les colonies

(Christoph et al., 2001). Pour ce travail nous avons utilisé la souche de référence SARM *mecA* positive ATCC 43300.

6.5.5. Étude de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques

Le test de combinaison a été effectué en combinant les huiles essentielles avec un antibiotique qui est la vancomycine selon la méthode de Vitale et al, (2005) et Mahboubi et Ghazian Bidgoli, (2010) ; Sur microplaques de 96 puits, on introduit verticalement 10 µl des concentrations de l'antibiotique a des concentrations décroissantes qui débutent de 16 µg/ml et horizontalement 10 µl des concentrations de l'huile essentielle avec des concentrations décroissantes qui débutent de 4000 µg/ml. En fin on ajoute 180 µl de l'inoculum à 10⁵ UFC/ml dans tous les puits. : L'interprétation des résultats se fait en calculant la concentration fractionnelle inhibitrice CFI en Anglais FIC pour « Fractional inhibitory concentrations ».

$$\text{CFI de l'huile} = \frac{\text{CMI de l'huile combiné avec la vancomycine}}{\text{CMI de l'huile seul}}$$

$$\text{CFI de la vancomycine} = \frac{\text{CMI de la vancomycine combiné avec l'huile}}{\text{CMI de la vancomycine seul}}$$

$$\text{CFI} = \text{CFI de l'huile} + \text{CFI de la Vancomycine} \quad (\text{Mahboubi et Ghazian Bidgoli, 2010})$$

6.6. Test in vivo Anti-SARM

Ce test a pour but de traiter des rats infectés au niveau dermique par une souche de *S. aureus* productrice de la LPV en utilisant l'huile essentielle d'*O. v. subsp. glandulosum*. Pour cela, douze rats Wistar d'un poids compris entre 20 et 22 g mâles adultes ont été utilisés pour cette expérience. Les souches ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie. Les rats ont été laissés pendant 48 h avant l'expérience comme une phase d'acclimatation, l'eau et les aliments ont été fournis aux rats. Les expériences sur les animaux ont été effectuées conformément au décret européen des règles éthiques 86/609/CEE. Les rats ont été divisés en deux groupes: le premier groupe est composé de six rats. Cinq rats ont subi une infection et le

rat non infecté représente le contrôle négatif. Parmi les rats infectés dans ce groupe, un rat a été utilisé comme contrôle positif. Le deuxième groupe a subi les mêmes conditions, sauf pour le contrôle positif, qui en plus de l'infection, ce rat a été exposé à un traitement avec de l'huile de paraffine (Biochem Chemopharma) seul. Le contrôle négatif du premier groupe n'a été ni infecté ni subi incisions et il a été traité à l'huile essentielle diluée à 5% dans de la paraffine, tandis que le contrôle négatif du second groupe a subi des incisions mais n'a pas été infecté.

6.6.1. L'induction de l'infection

Les rats utilisés pour l'expérience ont subi une anesthésie locale (Suntar et al., 2011). Ensuite, ils ont été rasés à la partie arrière dorsale avec un rasoir électrique et nettoyé avec de l'éthanol à 70 %, trois incisions superficielles ont été faites en utilisant une lame chirurgicale stérile (Varshney et al., 2010). Après, 20 µl de la suspension bactérienne de *S. aureus* LPV positif à 10⁷ UFC/ml ont été introduit directement dans les incisions dans les plaies pour le développement d'une infection à *Staphylococcus aureus* LPV positive. Ensuite, chaque rat a été isolé dans une cage séparée pour éviter toute contamination entre les rats. Les cages ont été soumises à des nettoyages réguliers avec des détergents.

6.6.2. Traitement

Le traitement a été effectué par la préparation de quatre concentrations de l'huile essentielle d'*O. v. subsp. glandulosum* (5 %, 1 %, 0,5 % et 0,25 %) dans la paraffine pure (BIOCHEM Chemopharma).

Le traitement a été appliqué à des rats infectés par la diffusion de 500 µl de la solution directement sur les plaies infectées. Avant chaque traitement, un écouvillonnage est effectué ensuite l'écouvillon est inséré dans un tube de 5 ml de sérum physiologique stérile et la solution est agité au vortex. Pour chaque prélèvement, quatre dilutions successives ont été faites, 100 µl de chaque dilution est ensuite déposé sur une gélose Chapman (Merck, France). L'inoculation est ensuite effectuée par un écouvillon stérile et l'incubation a été de 24 h à 37 °C pour le dénombrement.

Résultats et discussion

1. Identification des souches de *Staphylococcus aureus* isolées du CHU de Tlemcen

1.1. Identification par Galerie API staph

Cent-quarante souches ont été identifiées par système APIstaph bioMérieux comme étant l'espèce *S. aureus* avec une diversité de biotypes. Le biotype 6336153 est le plus répondu (annexe 1). Les résultats de l'identification ont été traités par les formules d'identification API sur Microsoft Excel.

1.2. Identification et typage par MALDI-TOF-MS

Sur les 140 souches identifiées par APIstaph, 126 souches ont été correctement identifiées par MALDI-TOF-MS comme étant l'espèce *S. aureus* avec un score compris entre 1,9 et 2,2 (figure 18). Les autres souches ont été identifiées comme étant d'autres espèces du genre *Staphylococcus* telles que *S. hyicus*, *S. hominis* et *S. xylosus* (tableau 6).

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info

Project Name: 120110-sn02304-mouim1
 Project Description:
 Project Owner: tof-user@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2012-01-10T11:57:05.921
 Project Analyte Count: 96
 Project Type: Development
 Validation: not present
 Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>1</u> (++) (A)	1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>2.225</u>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>2.225</u>
<u>1</u> (++) (A)	1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>2.182</u>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>2.154</u>
<u>1</u> (++) (A)	1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>2.254</u>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>2.252</u>

Figure 18 : Identification d'un nombre de souches comme étant l'espèce *Staphylococcus aureus* par MALDI-TOF-MS de type MICROFLEX et par analyse sur le Logiciel Biotyper version 2.0.

Tableau 6 : Souches de *Staphylococcus aureus* identifiées différemment par MALDI-TOF-MS et API Staph

Souche	Identification API	Identification MALDI-TOF-MS
Sa214	<i>S. aureus</i>	<i>S. xylosus</i>
Sa102	<i>S. aureus</i>	<i>S. lentus</i>
Sa305	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
Sa355	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>
Sa306	<i>S. aureus</i>	<i>S. sciuri</i>
Sa32	<i>S. aureus</i>	<i>S. sciuri</i>

Nous avons typé les souches de *S. aureus* en traçant deux dendrogrammes :

Le dendrogramme des souches résistantes BORSA a montré une diversité claire, sauf pour les souches (38, 35, 102, 40, 99, 67, 30, 58 et 105) qui ont montré une forte similitude (figure 19). Un deuxième dendrogramme général de toutes les souches a été constitué pour le but de voir le regroupement des souches en fonction de leurs résistances (Figure 20).

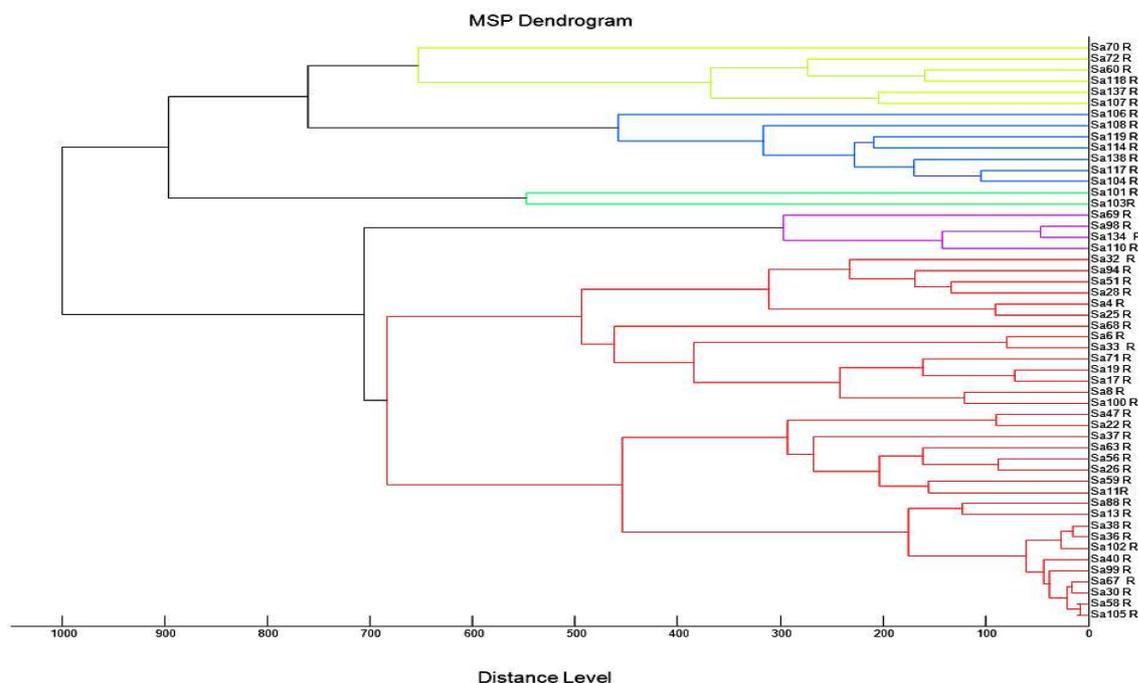
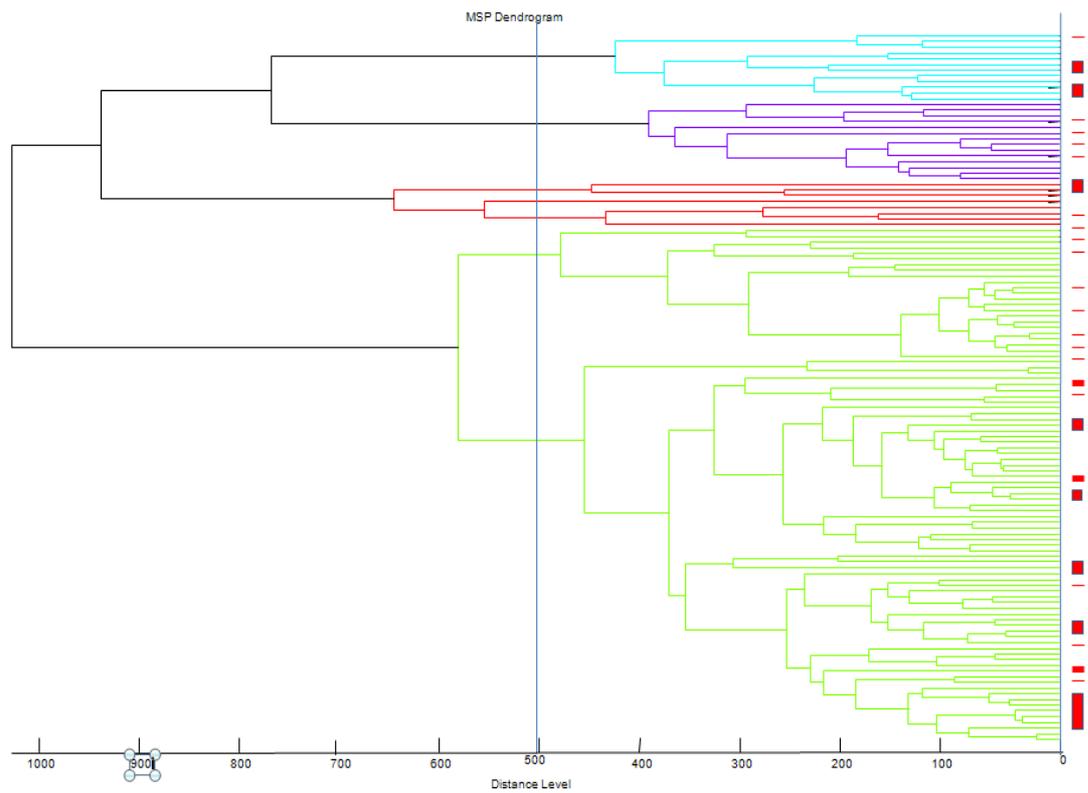


Figure 19 : Dendrogramme de 52 souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline de type BORSA. Les spectres ont été traités en utilisant le logiciel MALDI Biotyper version 2.0 (Bruker Daltonik Allemagne).



■ Souches BORSA

Figure 20 : Dendrogramme de 126 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du CHU de Tlemcen (Algérie).

2. Les tests de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme des souches de *Staphylococcus aureus*, de la CMI à l'oxacilline et de la PCR sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Résultats des antibiogrammes, de la CMI à l'oxacilline et de la PCR

Souches	Source	échantillons pathologiques	OX	MICs OX μ g/ml	AMX	AMC	GN	FOX	C	<i>mecA</i>	LPV	TSST-1
Sa69	Pédiatrie	N	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa70		N	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa71		N	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa88		N	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa94		N	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa99		N	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	-
Sa101		N	R	1.5	R	S	S	S	S	-	-	-
Sa102		N	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa103		N	R	0.5	S	S	S	S	R	-	-	-
Sa105		N	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa107		N	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa108		N	R	1.0	R	S	S	S	S	-	-	-
Sa110		P	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa113		P	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa120		P	R	1	S	S	S	S	S	-	-	-
Sa135		P	R	1.5	S	S	S	S	S	-	-	-
Sa137		P	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa138	P	R	0.5	R	S	R	S	S	-	-	-	
Sa4	Néonatalogie	N	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	-
Sa8		N	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	+
Sa11		N	R	1	R	S	R	S	S	-	-	+
Sa17		N	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa67		N	R	1.5	R	S	R	S	R	-	+	-
Sa100		N	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa119		N	R	0.5	R	S	S	S	S	-	-	+
Sa134		Vc	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa60		Vc	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa63		Vc	R	0.5	R	S	R	S	S	-	-	-

Résultats et discussion

Sa68		Vc	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa 13	Pneumologie	Vc	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa19		Vc	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	+
Sa22		Vc	R	0.5	R	S	R	S	S	-	-	-
Sa25		Vc	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	+
Sa40		Vc	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa98		Vc	R	0.5	S	S	S	S	S	-	-	-
Sa106		Vc	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	+
Sa37		Vc	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	-
Sa38		Vc	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa26	Maternité	P	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	-
Sa 28		P	R	1	R	S	S	S	R	-	-	-
Sa30		P	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa32		P	R	0.5	R	S	S	S	S	-	-	-
Sa6		P	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	+
Sa72		P	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	+
Sa118	Dermatologie	P	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	+
Sa33		P	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	-
Sa36		P	R	1.0	R	S	R	S	R	-	-	+
Sa58		P	R	1.5	R	S	S	S	S	-	-	-
Sa59		P	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	-
Sa47	Médecine interne	P	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	-
Sa51		P	R	0.5	R	S	S	S	R	-	-	-
Sa56		P	R	0.5	R	S	R	S	R	-	-	+

P : plaie, n : nasal, vc : cathéter, OX : oxacilline, AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, GN : gentamicine, FOX : cefoxitine, C : chloramphenicol, + : Présence, - : Absence

Les souches étaient résistantes à l'oxacilline avec des CMI variant de 0,5 à 1.5 µg/ml et résistantes à l'amoxicilline. Cependant, ces souches sont devenues sensibles en présence d'inhibiteur de β-lactamase (amoxicilline-acide clavulanique). Une seule souche a été repérée

positive avec le test au Cefinase. Ces résultats nous permettent de conclure que nos souches correspondent au phénotype BORSA productrices de β -lactamases (Leahy et al., 2011).

Ces souches BORSA ont montré des antibiogrammes différents et étaient résistantes à l'amoxicilline avec un pourcentage de 92,3 %, à la gentamicine (61,53 %) et au chloramphénicol (76,92 %). Toutes les souches étaient sensibles au Céfoxitine et à l'association amoxicilline-acide clavulanique (Figure 21).

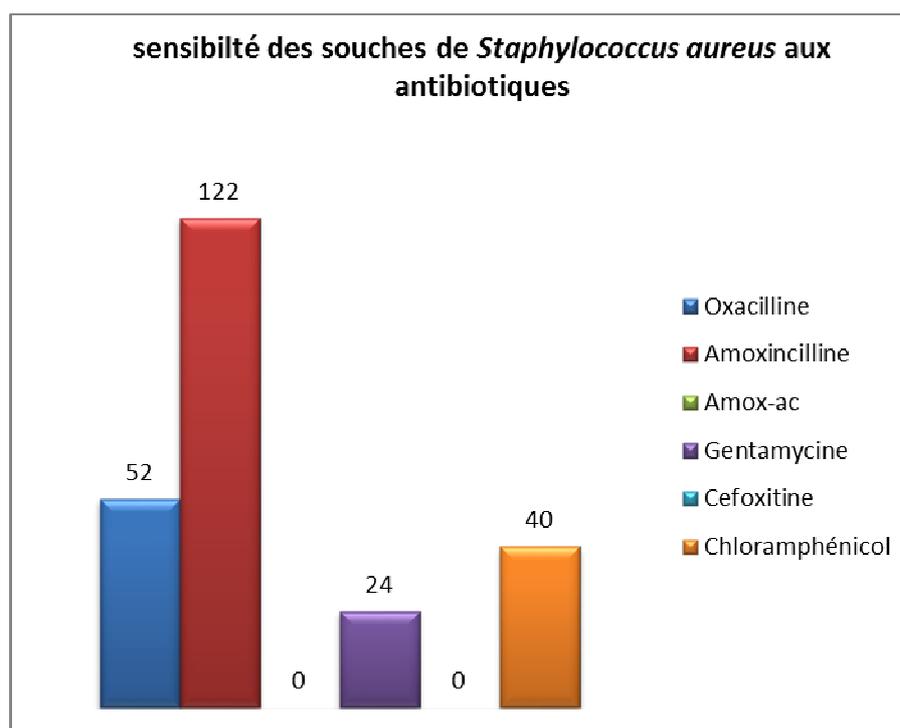


Figure 21 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* prélevées au CHU de Tlemcen

3. Recherche des gènes *mecA*, LPV et TSST-1 par PCR

Toutes les souches qui sont résistantes à l'oxacilline étaient *mecA*-négatif. Parmi les souches, une seule souche est LPV positive et onze souches portent le gène TSST-1 (Voir figures 22, 23, 24 et 25).



Figure 22 : Résultats de la PCR standard sur la recherche du gène *mec A*.

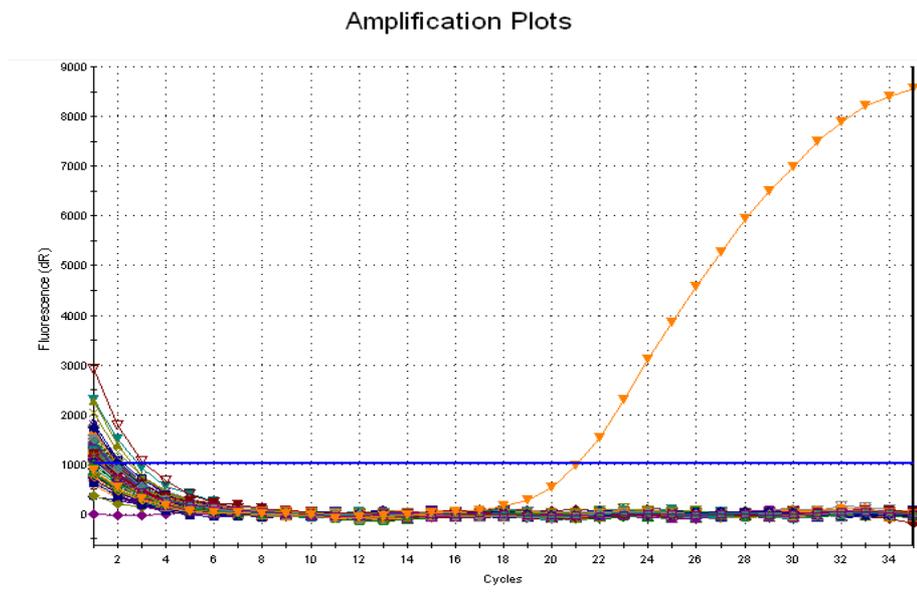


Figure 23 : Résultats de la PCR en temps réel sur la recherche du gène *mec A*.

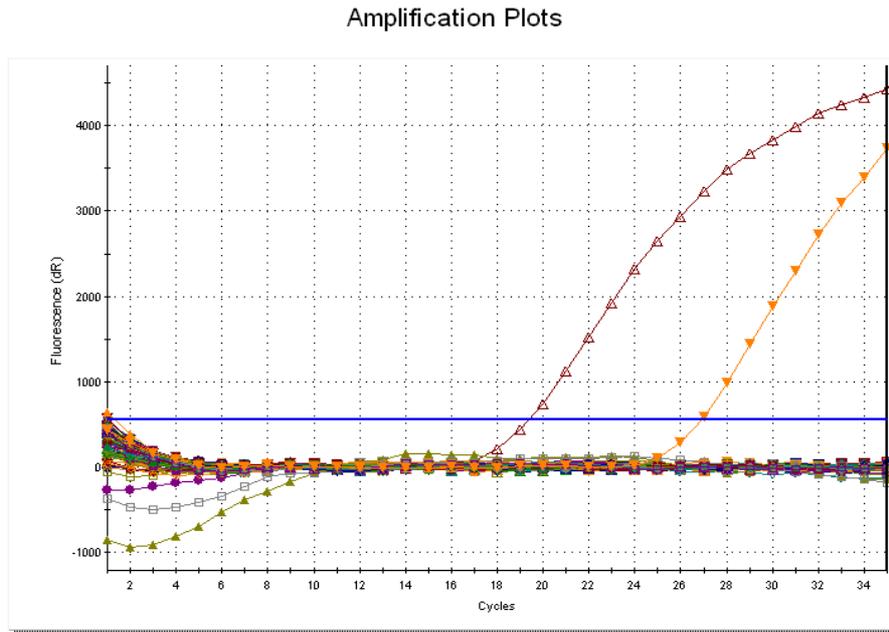


Figure 24 : Résultats de la PCR en temps réel sur la recherche du gène LPV.

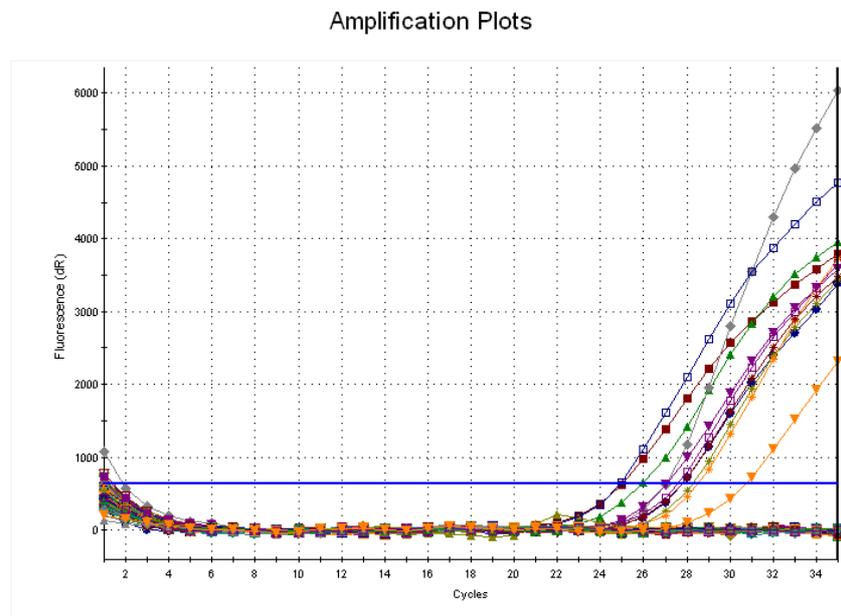


Figure 25 : Résultats de la PCR en temps réel sur la recherche du gène TSST1.

Nous avons utilisé la technique de MALDI-TOF-MS pour l'identification et le typage de nos souches qui ont un phénotype BORSA. Cette technique semble être efficace puisque des études antérieures ont montré que le typage des souches par MALDI-TOF-MS est intéressant par rapport à d'autres méthodes telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour plusieurs raisons: le dendrogramme généré par MALDI-TOF-MS est un résultat de l'analyse des protéines ribosomiques et du peptidoglycane des bactéries tandis que le dendrogramme obtenu par méthode de typage par PFGE est le résultat de l'analyse de l'ADN chromosomique de la bactérie (Fujinami et al., 2011). Les souches hétérogènes isolées à partir de différents environnements ne peuvent pas être différenciées par PFGE (Wong et al., 2004) alors que, MALDI-TOF-MS nous permet de différencier les souches hétérogènes et les souches étroitement liées (Eddabra et al., 2012; Shah et al., 2011).

Décrites pour la première fois en 1986, les souches BORSA présentent une CMI d'oxacilline $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ sur une gélose Mueller-Hinton additionnée de 2 % de NaCl, néanmoins la CMI peut être moins en absence de NaCl et pourra être de plus en ajoutant 5 % de NaCl (Montanari et al., 1990; Petersson et al., 1999). Les auteurs fixent les CMI des souches BORSA qui sont productrices β -lactamases dans l'intervalle $0,5 \mu\text{g/ml}$ jusqu'à $8 \mu\text{g/ml}$ en l'absence du gène *mecA* (Gal et al., 2001; Nadarajah et al., 2006). Puisqu'il existe des souches qui ont des CMI basses comme celle des souches BORSA qui sont *mecA* positive, leurs phénotypes est due en fait quelles sont hyper hétérogène (Al Nakib et al., 2012; Tomasz et al., 1991).

Nos résultats ont montré qu'il y a une diffusion des souches *mecA*-négatives productrices de β -lactamases au CHU de Tlemcen et plus précisément dans les départements de pédiatrie, de néonatalogie et de pneumologie dans lesquels nous avons fait beaucoup de prélèvements. La sensibilité des souches à la céfoxitine a confirmé que nos souches étaient *mecA* négative parce que les souches résistantes à la céfoxitine sont généralement *mecA* positive (Felten et al., 2002). La résistance à l'amoxicilline et la sensibilité à l'amoxicilline-acide clavulanique nous a permis de savoir que les souches ont un phénotype BORSA (Hirano et Bayer, 1991; Leahy et al., 2011; Pefanis et al., 1993).

Les résultats du test de la Cefinase (test qui utilise un disque nitrocéfine) ont montré qu'une seule souche parmi les 52 résistantes est Cefinase positif, ces résultats sont en bon accord avec ceux de Massidda et al. (1992). Ces auteurs ont décrit pour la première fois des

souches productrices de β -lactamases BORSA qui ne sont pas détectables par la nitrocéfine comme cette production de β -lactamases est inductible par la méthicilline ou la pénicilline G.

Dans d'autres études sur les souches qui ont un phénotype BORSA, Massidda et al. (1996) décrivent une méthode pour la détection de la production β -lactamases en utilisant la nitrocéfine, mais par l'addition d'un inducteur comme la méthicilline avec la nitrocéfine dans une microplaque, la méthicilline induit la production de β -lactamases et la nitrocéfine révèle cette production par le changement de couleur.

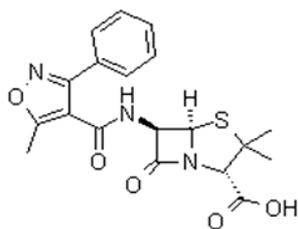
Aussi, d'autres travaux ont rapporté une épidémie de surproduction de β -lactamases dans laquelle 22% des isolats de *S. aureus* étaient résistants à l'oxacilline et étaient *mecA* négative (Petinaki et al., 2002). Cependant, dans notre étude, tous les isolats étaient résistants à l'oxacilline et étaient *mecA* négative. L'analyse de *S. aureus* résistant à l'oxacilline de type BORSA de la Tunisie par Maalej et al. (2012) a bien confirmé nos résultats de l'antibiogramme puisqu'ils ont trouvé toutes les souches résistantes à l'oxacilline et qui étaient sensibles à la céfoxitine et ne porte pas le gène *mecA*.

4. Recherche de la dégradation de l'oxacilline par spectrométrie de masse

L'Analyse chimique par spectrométrie de masse de type UltraFlex a révélé une dégradation enzymatique de l'oxacilline par les souches testées. La lecture de cette dégradation a été faite par la lecture des pics apparus et qui indiquent l'oxacilline non dégradé ou dégradé selon les formes chimiques présentées dans la figure 26.

La dégradation enzymatique de l'oxacilline par les souches productrices de β -lactamases a été bien mise en évidence par la spectrométrie de masse de type Ultarflex. Dans cette méthode nous avons étudié la comparaison entre les pics de l'oxacilline, le NaCl et l'oxacilline. Ce teste nous a confirmé la dégradation avec l'apparition des pics qui se traduisaient comme des produits de dégradation de l'oxacilline.

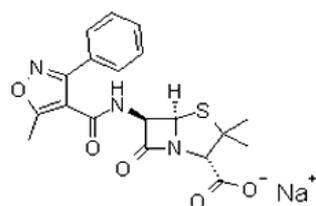
Oxacilline



Poids moléculaire = 401.44

Formule moléculaire= C₁₉H₁₉N₃O₅S

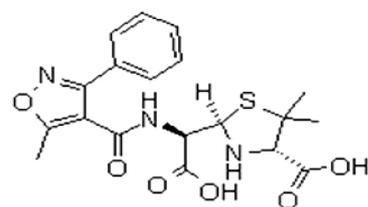
Adduit de sodium à l'oxacilline



Poids moléculaire = 423.42

Formule moléculaire= C₁₉H₁₈N₃NaO₅S

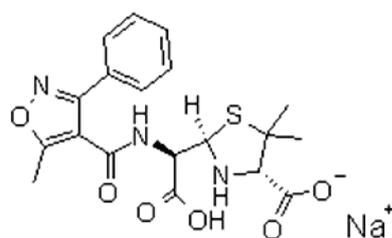
Métabolite



Poids moléculaire = 419.46

Formule moléculaire= C₁₉H₂₁N₃O₆S

Adduit de sodium au métabolite

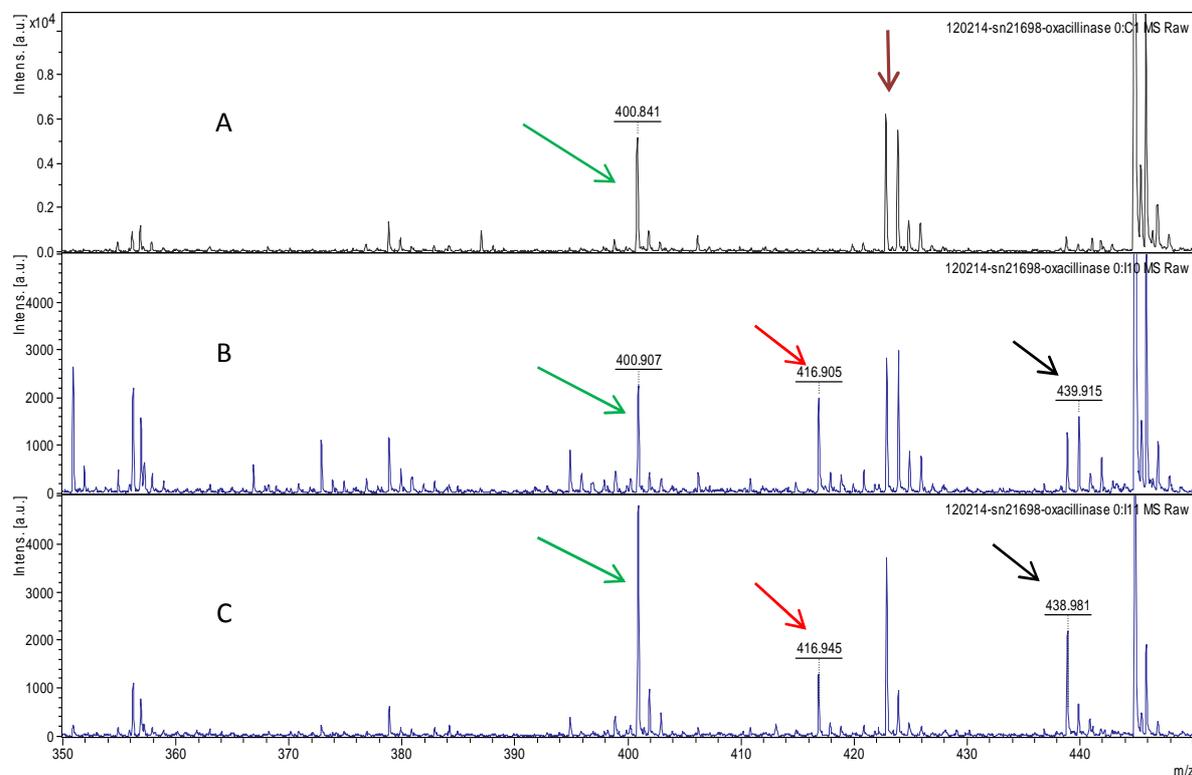


Poids moléculaire = 441.46

Formule moléculaire= C₁₉H₂₀N₃NaO₆S

Figure 26 : Structures chimiques de l'oxacilline et ses produits de dégradations

Si on compare les résultats des souches résistantes avec d'autres souches sensibles (figure 27 et 28), on s'aperçoit que ces pics significatifs ne sont produits qu'avec les souches résistantes ce qui confirme le mécanisme de résistance d'origine enzymatique.



■ Adduit de sodium aux métabolites de dégradation ■ Oxacilline

■ Métabolites de dégradation d'oxacilline ■ Adduit oxacilline sodique

A : témoin négatif

B : Oxacilline et la souche Sa101 a la concentration 0.125 mg/ml

C : Oxacilline et la souche 101 à la concentration 0.0625 mg/ml

Figure 27 : Les spectres établis par MALDI-TOF-MS Ultraflex de la souche 101 (SARM) à 0,125 et 0,0625 mg/ml dans le temps T4

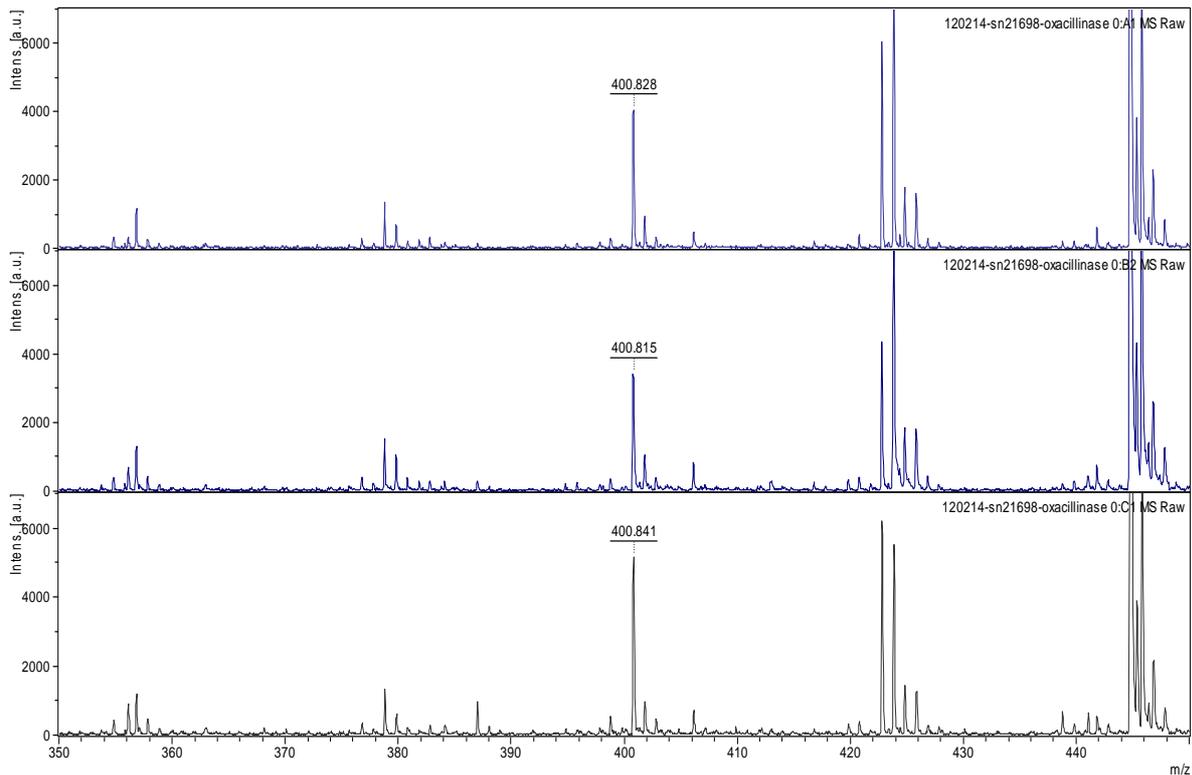


Figure 28 : Les spectres établis par MALDI-TOF-MS Ultraflex de la souche Sa34 (SASM) à 0,125 et 0,0625 mg/ml dans le temps T4

5. Conclusion

La première partie de notre travail nous a permis d'identifier et de typer par MALDI-TOF-MS des souches de *S. aureus* isolées au CHU de Tlemcen. 42,27 % des souches se sont révélées résistantes à la méticilline, 92,3 % à l'amoxicilline, 61,53 % à la gentamicine et 76,92 % au chloramphénicol. La recherche du mécanisme de résistance à la méticilline par MALDI-TOF-MS de type Ultraflex a montré que ces souches produisent des enzymes de β -lactamases qui hydrolysent l'oxacilline. La PCR en temps réel a révélé une seule souche productrice de LPV et onze souches productrices de TSST-1. Bien que ce travail ne présume pas à une étude épidémiologique des SARMs au niveau du CHU de Tlemcen, on peut dire qu'il y a présence d'une résistance à la méticilline du *S. aureus* au CHU de Tlemcen par production de β -lactamases. Donc, la recherche d'autres substances anti-SARM est nécessaire afin de réduire ce taux de résistance et pour traiter les infections difficiles. C'est l'objet de la deuxième partie de notre travail à savoir l'évaluation de l'effet inhibiteur des huiles essentielles et des extraits à l'éthanol des plantes retenues sur les souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques et productrices de toxines dangereuses.

6. Effet des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de certaines plantes aromatiques sur les souches SARM

6.1. Résultats des extractions

Les rendements en huiles essentielles des plantes retenues sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Rendements en huiles essentielles des plantes étudiées.

Composés	Teneurs % (V/P)	Couleurs
<i>O. v. subsp. glandulosum</i>	4.5	Jaune foncée
<i>T. m. subsp. ciliatus</i>	3.92	Jaune foncée
<i>A. verticillata</i>	2.7	Jaune clair
<i>E. globulus</i>	1.96	Jaune foncée
<i>C. schoenanthus</i>	1.7	Jaune pâle
<i>L. multifida</i>	0.16	Jaune foncée

D'après le tableau ci-dessus on remarque que les rendements en huiles essentielles obtenus par hydrodistillation sont variables. Les espèces *O. glandulosum*, *A. verticillata* et *T. m. subsp. ciliatus* sont les plantes aromatiques qui présentent les rendements les plus importants. Alors que *C. schoenanthus*, *E. globulus* et *L. multifida* ont donné des rendements moyens et faible respectivement. La comparaison de nos rendements obtenus avec ceux de la littérature est du même ordre de grandeur pour certaines huiles mais différents pour d'autres huiles. Bekhechi et al, (2008) ont obtenu des rendements en HE d'*O. glandulosum* qui varient de 3.53 à 3.95 %. Pour *T. m. subsp. Ciliatus*, Bousmaha-Marroki et al, (2007) ont enregistré des rendements qui varient de 3.0 % à 5.1 %. Par contre pour l'espèce *A. verticilatta*, Kambouche et El-Abed, (2003) ont trouvé un rendement important qui est de 4.97 %. La même chose pour *E. globulus*, Elaissi et al, (2011) ont enregistré un rendement d'HE de 3.8 % ; Khadri et al, (2008) ont obtenu des teneurs en HE de *C. schoenanthus* qui varient entre 1.1 et 2.6 % et Zini et al, (2011) ont enregistré un rendement en HE de 2.4 % pour *L. multifida*.

Ces variations de rendements en HE dépendent de nombreux facteurs tels que, l'espèce, l'âge de la plante, la partie de la plante traitée, l'état du matériel végétal avant utilisation, la période de récolte, l'origine géographique (effet du milieu), le mode d'extraction et la durée de distillation.

6.2. Analyse chimique des huiles essentielles

Les résultats des analyses chimiques par CG/SM des huiles essentielles utilisées sont présentés dans le tableau 9 et illustrés par les chromatogrammes (voir annexe 2).

Tableau 9 : Composition chimique des huiles essentielles des plantes retenues.

Composés	Ir _a	Ir _p	<i>O. v. subsp. glandulosum</i>	<i>T. m. subsp. ciliatus</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>L. multifida.</i>	<i>C. schoenanthus</i>	<i>E. globulus</i>
α -Thujene	928	1023	1.0	1.7	0.3	-	0.1	-
α -Pinene	931	1022	0.7	0.6	0.1	0.6	0.4	9.3
Camphene	943	1066	0.1	0.1	-	-	0.2	-
1-Octen-3-ol	959	1446	0.2	-	-	0.2	-	-
3-Octanone	963	1253	0.1	-	-	-	-	-
Sabinene	966	1120	-	-	Tr	-	-	-
β -Pinene	970	1110	0.2	0.1	0.1	0.2	-	-
Myrcene	979	1159	2.0	2	0.6	0.7	0.5	-
2-carene	996	1131	-	-	-	-	2.2	-
α -Phellandrene	997	1164	0.3	0.3	-	-	0.1	0.4
Δ -3-Carene	1005	1147	0.1	0.1	Tr	TR	-	-
α -Terpinene	1008	1178	2.8	1.7	0.1	-	0.3	0.9
<i>p</i> -Cymene	1011	1268	17.1	4.7	15.6	2.2	5.9	0.4
Limonene	1020	1199	0.6	0.2	15.0	-	7.0	0.9
β -Phellandrene	1020	1208	-	-	-	-	1.0	-
Eucalyptol	1020	1209	-	-	-	0.9	-	68.0
α -phellandrene+1,8-cineole	1021	1212	-	0.2	-	-	-	-
(Z)- β -Ocimene	1024	1230	0.1	-	-	Tr	0.4	-
(E)- β -Ocimene	1034	1247	0.1	-	-	Tr	0.2	-
γ -Terpinene	1047	1243	27.0	7.8	6.6	-	5.1	0.1
Cis-hydrate sabinene	1050	1451	-	-	Tr	-	-	-
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1051	1451	0.2	0.3	-	-	-	-
Fenchone	1071	1401	-	-	-	Tr	-	-
<i>p</i> -cymenene	1073	1469	-	0.1	-	-	Tr	-
Terpinolene	1078	1280	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6
Linalool	1081	1544	0.7	0.6	0.1	Tr	-	4.9
Cis- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	1114	1546	-	-	-	-	18.6	-
Trs- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	1130	1610	-	-	-	-	9.5	-

Borneol	1148	1698	0.1	0.1	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	1161	1600	0.1	0.8	0.2	-	-	0.6
α -Terpineol	1172	1697	0.2	0.2	0.1	-	1.4	1.0
Cis-Pipériol	1184	1681	-	-	-	-	7.2	-
Trans- Pipériol	1196	1751	-	-	-	-	4.9	0.2
Cis-carveol	1208	1863	-	-	Tr	-	-	-
Thymoquinone	1216	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol methyl ether	1231	1603	-	-	-	0.3	-	-
Pipéritone	1232	1730	-	-	-	-	0.2	-
Géraniol	1232	1844	-	-	-	-	0.2	-
Carvone	1235	1739	-	-	-	Tr	-	-
Thymol	1266	2189	41.6	0.3	50.1	-	0.1	0.3
Carvacrol	1278	2219	2.2	72.8	8.8	57.1	1.1	0.1
α -Terpenylacetate	1334	1695	-	-	-	0.1	-	3.1
Δ -Elémène	1337	1467	-	-	-	-	0.2	-
carvacryl acetate	1345	1876	-	0.4	-	-	-	-
β -Elémène	1388	1589	-	-	-	-	1.4	-
Methyleugenol	1367	2009	-	-	-	0.2	-	-
β -Caryophyllene	1424	1591	1.0	2.2	-	2.1	-	0.2
β -Farnesene	1448	1661	-	-	-	0.1	-	-
α -Humulene	1456	1665	0.1	0.1	-	-	-	-
β -Bisabolene	1500	1720	0.1	Tr	-	25.2	-	-
β -Sesquiphellandrene	1516	1765	0.6	-	-	-	-	-
Thymohydroquinone	1522	>2850	-	-	-	-	-	-
(E)- α -bisabolene	1534	1772	-	Tr	-	-	-	-
Elémol	1535	2076	-	-	-	-	7.4	-
Spathulenol	1560	2119	-	-	-	3.4	-	-
Caryophyllene oxide	1576	1980	0.2	0.2	-	3.7	0.1	0.8
A-Cadinol	1640	2231	-	-	-	-	2.8	-
B-Eudesmol	1653	2220	-	-	-	-	3.7	-
Intermédeol	1658	2262	-	-	-	-	0.3	-
dehydroabietane	2037	2501	-	Tr	-	-	-	-
Total			99.6	97.7	98,6	98.4	88.9	91.8
Monoterpènes hydrocarbonés			52,2	52,2	39,3	3.8	23.5	12.6
Monoterpènes oxygénés			45,1	45,1	59,3	60.1	43.2	78.4
Sesquiterpene hydrocarboné			1.8	-	-	27.4	0.17	-
Sesquiterpene oxygéné			0.2	0.2	-	7.1	20.5	0.8

I_{ra} : Indice de rétention sur colonne apolaire ; I_{rp} : Indice de rétention sur colonne polaire

Tr : traces ; - : Absence

Les résultats de l'analyse chimique montrent que les huiles essentielles étudiées sont divisées en deux groupes, les HE phénoliques riches en thymol et/ou en carvacrol tel que les

HE de *A. verticillata*, *O. v. subsp. glandulosum*, *T. m. subsp. ciliatus* et *L. multifida* et les HE non phénoliques représentées par *C. schoenanthus* et *E. globulus*.

En effet, les HE d'*A. verticillata* et d'*O. v. subsp. glandulosum* sont riches en thymol (50,1 % ; 41,6 %) et en p. cymène (15,6 % ; 17,1 %) respectivement. Cependant le limonène est abondant (15,0 %) dans l'HE de *A. verticillata* alors que l'HE d'*O. v. subsp. glandulosum* est riche en γ terpinène (27,0 %). En plus, l'HE d'*A. verticillata* contient plus de monoterpènes oxygénés que l'huile d'origan alors que c'est l'inverse pour les monoterpènes hydrocarbonés.

Alors que l'analyse des HE de *T. m. subsp. ciliatus* et de *L. multifida* a révélé que les deux huiles sont à chymiotype carvcrol (72,8 % et 57,1 %) respectivement et riches en monoterpènes. En plus du carvacrol, l'huile essentielle de *L. multifida* est riche en β -bisabolène (25.2 %) et en oxyde de caryophyllène (3.7 %).

Cependant, la composition chimique des HE de *C. schoenanthus* et de *E. globulus* sont totalement différentes. La première est très légèrement majoritaire en Cis-p-Menth-2-en-1-ol (18,6 %) accompagnée d'autres composés tels que le trans- Pipériol (4,9 %) et le 2-carene (2,2 %). Par contre, l'huile essentielle de *E. globulus* est riche en eucalyptol (1,8-cineole) avec un pourcentage de 68 % suivi de α -Pinène (9.3 %) et de Linalool (4.9 %).

En comparant nos résultats avec ceux de la littérature on s'aperçoit que les mêmes composés majoritaires des HE de l'origan, d' *A. verticillata*, de *T. ciliatus*, de *L. multifida* et de *E. globulus* sont retrouvés mais qui varient quantitativement. En effet Bekhechi et al, (2008) ont trouvé les mêmes composés majoritaires lors de l'analyse chimique d'*O. v. subsp. glandulosum* à savoir le thymol (44.4 %-49.5 %), le γ terpinène (16.4 %-23.8 %). De même Kambouche et El-Abed, (2003) ont enregistré les mêmes composés majoritaires de l'huile d'*A. verticillata* récolté en Algérie dans la région d'Oran qui sont le thymol (12.96 %) et le p-cymène (14.8 %). L'or de l'analyse de l'HE de *T. m. subsp. ciliatus* du Nord-ouest Algérien, Bousmaha-Marroki et al., (2007) ont enregistré un pourcentage de carvacrol allant de 72.4 % jusqu'à 80.3 %. L'étude de la composition chimique de l'huile de *E. globulus* par Djenane et al., (2011) a montré les mêmes composés majoritaires que les nôtres qui sont l'eucalyptol (81.7 %) suivi par le α -Pinène (2.3 %).

Concernant l'HE de *L. multifida* d'origine espagnole, Garcia-Vallejo et al, (1989) ont présenté les mêmes composés majoritaires autrement-dit le même chimiotype qui est le carvacrol/ β -bisabolène.

Pour l'HE de *C. schoenanthus*, nos résultats sont concordants avec ceux de Bittencourt Dutra de Sousa et al, (2005) mais en contraste avec ceux de Khadri et al, (2008) qui ont obtenu comme composés majoritaires le limonene (24.2 %) et le β -Phellandrene (13.4 %) sur un échantillon d'origine Tunisien.

7. Effets des huiles essentielles des six plantes sur les souches SARM

7.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose

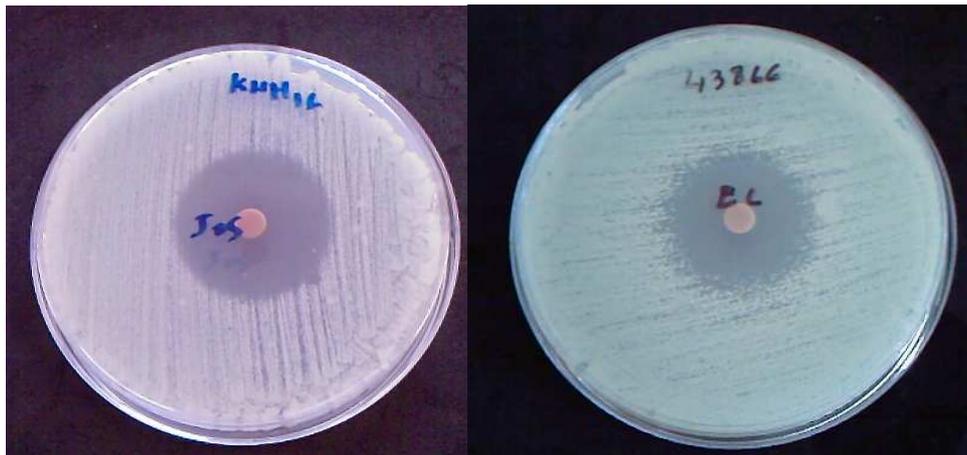
Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des six plantes sur *S. aureus* résistant à la méticilline SARM sont consignés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Diamètres d'inhibitions des huiles essentielles des six plantes

Souche code	Diamètre (mm)					
	<i>T. m. subsp.ciliatus</i>	<i>C. schoenanthus</i>	<i>O. v. subsp. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>E. globulus</i>	<i>L. multifida</i>
SARM1	30	9	31	25	6	27
SARM2	32	10	34	15	6	14
SARM3	34.7	9	28	28	6	15
SARM4	28	9	28	28	6	17
SARM5	16.5	7	26	24	6	14
SARM6	16.5	9	24	18	6	23
SARM7	17.5	8.5	23	19	6	22
SARM8	16.5	8	24	15	6	22
SARM9	20	9	25	20	6	18
SARM10	20	9	25	21	6	20
SARM11	15	8	29	22	6	24
SARM12	19	9	28	30	6	19

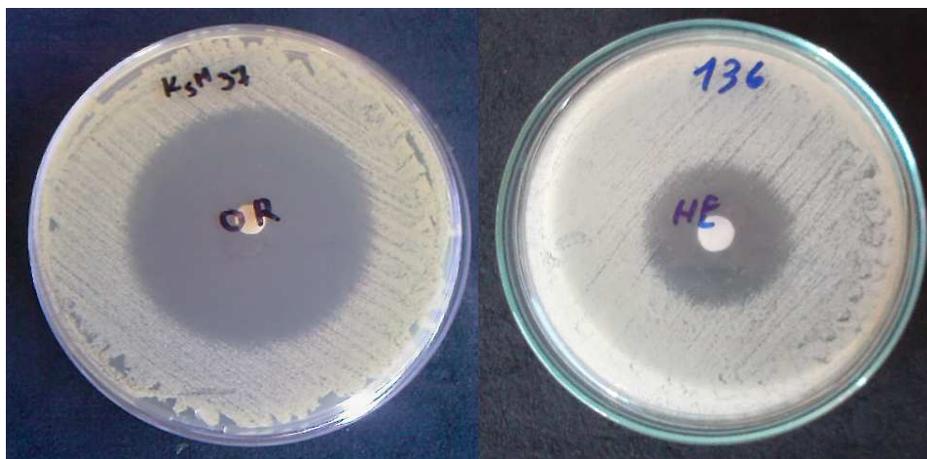
SARM13	36.7	8	32	27	6	21
SARM14	29	9	25	34	10	18
SARM15	36	9	26	27	6	21
SARM16	19	9	26	25	6	18
SARM17	18.5	8.5	30	25	6	21
SARM18	34	9	25	16	6	20
SARM19	21	8	25	22	6	22
SASM1	43	9	57	28	10	24
SARM 43300	27	9	32	30	15	18
SASM 25923	40	10	36	30	6	19
SASM 33862	35.5	9	34	25	15	22
SASM 29213	30	12	36	28	6	19
SARM 43866	27	8	55	30	20	20
Moyenne	26.5	8.9	31.1	24.5	7.6	19.9

D'après les résultats ci-dessus on remarque que les huiles les plus actives contre les souches de SARM sont celles de *T. m. subsp. ciliatus*, *O. v. subsp. glandulosum*, *L. multifida* et *A. verticillata* ; tandis que les huiles de *C. schoenanthus* et d'*E. globulus* ont montré une moyenne ou faible activité. L'huile essentielle d'*O. v. subsp. glandulosum* a montré les zones d'inhibitions les plus grandes (> 57 mm) pour certaines souches malgré le faible volume utilisé des huiles essentielles (2µl) par disque (figure 29). Selon les moyennes des zones d'inhibitions on peut classer les HE par ordre décroissant comme suit : *O. v. subsp. glandulosum* (31.1 mm), *T. m. subsp. ciliatus* (26.5 mm), *A. verticillata* (24.5 mm) *L. multifida* (19.9 mm), *C. schoenanthus* (8.9mm) et *E. globulus* (7.6 mm).



A. verticillata

E. globulus



O. v. subsp. glandulosum

L. multifida



O. v. subsp. glandulosum

Figure 29: Effet des huiles essentielles étudiées sur des souches SARM.

7.2. Résultats des concentrations minimales inhibitrices

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches SARM par les huiles essentielles sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles des six plantes

Souche code	Concentration minimale inhibitrice CMI % (V/V)					
	<i>T. m. subsp. Ciliatus</i>	<i>C. schoenanthus</i>	<i>O. v. subsp. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>E. globulus</i>	<i>L. multifida</i>
SARM1	0,25	-	0,125	0,25	-	0,125
SARM2	0,25	-	0,125	0,125	-	0,5
SARM3	0,125	-	0,25	0,25	-	0,25
SARM4	0,125	-	0,25	0,25	-	0,125
SARM5	0,125	-	0,25	0,5	-	0,5
SARM6	0,5	-	0,25	0,25	-	0,125
SARM7	0,5	-	0,25	0,125	-	0,125
SARM8	0,125	-	0,25	0,25	-	0,125
SARM9	0,125	-	0,25	0,125	-	0,0625
SARM10	0,25	-	0,125	0,5	-	0,25
SARM11	0,5	-	0,25	0,5	-	0,5
SARM12	0,125	-	0,125	0,25	-	0,25
SARM13	0,25	-	0,25	0,25	-	0,125
SARM14	0,125	-	0,25	0,5	-	0,5
SARM15	0,06	-	0,06	0,5	-	0,25
SARM16	0,25	-	0,25	0,25	-	0,125
SARM17	0,5	-	0,25	0,25	-	0,25
SARM18	0,25	-	0,06	0,125	-	0,5
SARM19	0,5	-	0,06	0,5	-	0,5

SASM1	0,03	-	0,006	0,06	-	0,06
SARM 43300	0,25	-	0,5	0,125	-	0,25
SASM 25923	0,25	-	0,25	0,25	-	0,125
SASM 33862	0,25	-	0,25	0,25	-	0,0625
SASM 29213	0,25	-	0,25	0,25	-	0,125
SARM 43866	0,5	-	0,25	0,25	-	0,25
Moyenne	0,25	-	0,2	0,27	-	0,24

D'après les résultats ci-dessus on constate que les CMI étaient très faibles pour les huiles essentielles des plantes *O. glandulosum*, *L. multifida*, *T. m. subsp. ciliatus* et *A. verticillata* comparées aux CMI des HEs de *C. schoenanthus* et de *E. globulus*. L'HE d'*O. glandulosum* a montré l'activité la plus forte avec des CMI $\leq 0,06$ % pour certaines souches SARM et jusqu'à 0,006 % pour des souches SASM comme c'est le cas pour la souche SASM PVL positive « SASM1 ».

En comparant nos résultats de la technique de diffusion en gélose et des CMI avec des travaux antérieurs, Chao et al, (2008) ont trouvé des diamètres très grands (>83 mm) sur un SARM de référence ATCC 700699 en utilisant l'huile essentielle de *Cymbopogon flexuosus* riche en Géraniol (46%), alors que l'huile essentielle de *C. schoenanthus* (18,6% en Cis-p-Menth-2-en-1-ol) à donné un effet très faible. Les mêmes auteurs ont montré que l'HE d'*Origanum majorana* à un effet remarquable sur le SARM avec des diamètres de 28 mm et l'HE de *Thymus vulgaris* avec un diamètre de 57 mm.

L'effet du carvacrol et du thymol purifiés de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* L. sur la souche SARM de référence ATCC 43300 a montré une forte inhibition de ces composés contre cette souche SARM *mec A* positif (Nostro et al., 2004). Nous avons obtenu le même résultat avec notre huile d'*O. v. subsp. glandulosum* riche en Thymol. L'espèce *A. verticillata* a montré une activité anti-SARM moyenne, cette activité est due principalement à la

composition de son huile essentielle riche en Thymol (Seo et al., 2009). Dans notre travail nous avons constaté que malgré que l'huile essentielle d'*A. verticillata* est plus riche en Thymol (50.1%) et en carvacrol (8.8%) que l'huile essentielle d'*O. v. subsp. glandulosum* (41.6% et 2.2% respectivement), cette dernière est plus actif avec un effet anti-SARM plus fort. Cette forte activité est due soit à la présence du γ -Terpinene (27%) alors qu'il représente 6.6% chez *A. verticillata* et/ou soit à la synergie entre la totalité des constituants car la totalité de ces constituants peut expliquer la forte activité d'une huile par rapport à une autre huile (Pattnaik et al., 1997 ; Cristani et al., 2007).

L'espèce *L. multifida* a présenté une activité intéressante étant donné que les diamètres d'inhibitions sont de 14 à 27 mm avec seulement 2 μ l d'huile appliquée sur le disque. Des études antérieures sur l'utilisation de certaines huiles essentielles de lavandes contre des souches SARM ont montré que les diamètres d'inhibition ne dépassent pas 16 mm avec 5 μ l d'huile appliquée (Roller et al., 2009) et une CMI d'environ 0,5% (Nelson, 1997). Alors que l'huile essentielle de *L. multifida* a montré des résultats plus efficaces (tableau 9 et 10). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que *L. multifida* est l'espèce unique qui produit de grandes quantités de carvacrol (Lis-Balchin, 2002). Ce dernier semble agir sur la membrane de la bactérie par une réduction de la synthèse de l'ATP et du potentiel de membrane électrique, et donc, une augmentation de la perméabilité de la membrane, qui aboutit à la destruction de la cellule bactérienne (Husnu Can Baser, 2008). Aussi, des études ont montré que le composé β -bisabolène possède une activité antimicrobienne intéressante sur les microorganismes (Simic et al., 2005). Nascimento et al, (2007) ont évalué l'activité antimicrobienne du β -bisabolène sur huit souches SARM productrices de β -lactamases et ils ont comparé cet effet avec d'autres espèces bactériennes. Les auteurs confirment que les CMI les plus faibles ont été observées contre les souches productrices de β -lactamases « BORSA » de *Staphylococcus aureus*. Cela confirme nos résultats obtenus avec *L. multifida* et qui a comme composé majoritaire le β -bisabolène sur nos souches de *Staphylococcus aureus* de phénotype BORSA.

On peut expliquer le faible effet de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* malgré sa richesse en eucalyptol (63 %) par le faible effet antistaphylococcique de ce produit. Van Vuuren et al, (2007) ont étudié l'effet antimicrobien de l'eucalyptol pur et ont confirmé son faible effet sur *Staphylococcus aureus* avec des CMI de 8 mg/ml. Toutefois le faible effet anti-SARM de

C. schoenanthus est dû l'absence des composés de nature phénoliques dans cette huile (Koba et al., 2004).

D'après les résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles et de leur activité anti-SARM, on peut dire que les huiles essentielles les plus efficaces contre ce pathogène sont généralement les huiles riches en monoterpènes oxygénés de nature phénoliques comme le thymol, le carvacrol et a des sesquiterpènes monocycliques tel que le β -bisabolène qui sont connus par leur pouvoir inhibiteur des microorganismes. Cette activité anti-SARM peut être aussi plus importante lorsqu'il y a une synergie entre les constituants d'une même HE (Pattnaik et al., 1997).

Les résultats enregistrés pour les diamètres d'inhibitions ont montré que les plus grands diamètres d'inhibitions des huiles essentielles ont été observés avec *O. v. subsp. glandulosum* avec une moyenne de 30,1 mm, *T. m. subsp. ciliatus* 26,49 mm, *A. verticillata* 24.48 mm et *L. multifida* 19.92 mm. Pour *E. globulus* et *C. schoenanthus* on a de faibles zones d'inhibitions avec des moyennes de 7.5 mm et 8.75 mm respectivement. Les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour l'huile d'origan ont confirmé les diamètres d'inhibition importants. Par contre, l'HE de l'espèce *L. multifida* a donné des CMI intéressantes mais des diamètres d'inhibitions moins importants. Cette huile est classée la troisième lors des CMI alors qu'elle est classée la cinquième lors des diamètres d'inhibitions. Ces résultats obtenus peuvent être expliqués par le fait que certaines huiles essentielles ont des viscosités importantes qui influent sur leurs diffusions dans les géloses donnant des CMI basses que les diamètres d'inhibition, d'où l'intérêt, de calculer la CMI pour évaluer les effets de ces substances (Hood et al., 2003). Pour les HE d'*A. verticillata*, *E. globulus* et *C. schoenanthus* on remarque qu'elles ont suivi le même ordre de classement que celui obtenu avec les diamètres d'inhibitions.

On peut dire que l'effet d'une même huile essentielle sur plusieurs souches SARM était variable. Cette variabilité de sensibilité est due à plusieurs facteurs notamment les conditions de culture, l'âge, la concentration de l'inoculum, la température et le temps d'incubation sont parmi les facteurs les plus importants (Kalemba et Kunicka, 2003). Des résultats similaires ont été obtenus par Tohidpour et al, (2010) en étudiant l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur une collection de dix souches SARM. Les auteurs ont trouvé une différence des diamètres entre 12 jusqu'à 27 mm.

8. Effets des extraits de l'éthanol des six plantes sur les souches SARM

8.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose et des concentrations minimales inhibitrices

Les résultats des diamètres d'inhibitions et des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches SARM aux extraits à l'éthanol de *T. m. subsp.ciliatus*, *O. v. subsp. glandulosum*, *A. verticillata* et *L. multifida* sont présentés dans le tableau 12 et 13.

Tableau 12 : Diamètres d'inhibitions des extraits à l'éthanol de *T. m. subsp.ciliatus*, *O. v. subsp. glandulosum*, *A. verticillata* *L. multifida* contre les souches SARM

Souche code	Diamètres d'inhibitions (mm)			
	<i>T. m. subsp.ciliatus</i>	<i>O. v. subsp. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>L. multifida</i>
SARM1	20	19	14	10
SARM2	20	18	16	9
SARM3	18	16	14	7
SARM4	19	16	12	8
SARM5	18	16	14	8
SARM6	22	22	15	9
SARM7	19	20	17	9
SARM8	19	18	16	10
SARM9	18	16	15	8
SARM10	17	16	15	8
SARM11	20	19	16	11
SARM12	21	19	16	13
SARM13	20	19	16	12
SARM14	18	19	17	9
SARM15	19	17	17	11

SARM16	18	18	17	12
SARM17	19	19	15	11
SARM18	18	20	16	9
SARM19	20	16	14	10
SASM1	22	16	14	11
SARM 43300	16	15	13	4
SASM 25923	15	15	14	2
SASM 33862	17	15	14	4
SASM 29213	20	19	16	10
SARM 43866	18	16	14	8
Moyenne	18,8	17,5	15,0	8,9

Tableau 13 : Concentrations minimales inhibitrices des extraits à l'éthanol de *T.ciliatus*, *O. glandulosum*, *A. verticillata* *L. multifida* contre les souches SARM

Souche code	Concentrations minimales inhibitrices mg/ml			
	<i>T. m.</i> <i>subsp.ciliatus</i>	<i>O. v. subsp.</i> <i>glandulosum</i>	<i>A.</i> <i>verticillata</i>	<i>L.</i> <i>multifida</i>
SARM1	0.03	0.25	1	2
SARM2	0.01	0.25	1	4
SARM3	0.06	0.25	1	nd
SARM4	0.03	0.25	1	8
SARM5	0.03	0.25	1	4
SARM6	0.01	0.12	1	4

SARM7	0.03	0.12	0.5	4
SARM8	0.03	0.25	0.5	2
SARM9	0.03	0.25	1	4
SARM10	0.06	0.25	1	2
SARM11	0.01	0.25	0.5	8
SARM12	0.01	0.25	0.5	4
SARM13	0.03	0.25	0.5	4
SARM14	0.03	0.25	0.5	2
SARM15	0.03	0.25	0.5	2
SARM16	0.03	0.25	0.5	4
SARM17	0.03	0.25	1	nd
SARM18	0.03	0.12	1	8
SARM19	0.03	0.25	1	4
SASM1	0.03	0.25	0.5	2
SARM 43300	0.06	0.25	1	4
SASM 25923	0.06	0.25	1	4
SASM 33862	0.03	0.25	1	2
SASM 29213	0.01	0.12	0.5	4
SARM 43866	0.03	0.25	1	2
Moyenne	0.03	0.22	0.81	3.75

nd : non déterminé

Les résultats de la sensibilité des souches de SARM aux extraits à l'éthanol des espèces *O. v. subsp. glandulosum*, *T. m. subsp. Ciliatus*, *A. verticillata*, *L. multifida.*, ont montré que

l'extrait de *T. m. subsp. ciliatus* est le plus actif avec une moyenne de diamètre d'inhibition de 18,8 mm et une moyenne de CMI de 0.03 mg/ml. Ensuite l'extrait d'*O. v. subsp. glandulosum* qui a montré aussi un effet fort avec une moyenne des diamètres d'inhibition de 17,5 mm et une moyenne de CMI de 0.22 mg/ml suivi par l'extrait d'*A. verticillata* qui a également montré un effet remarquable avec une moyenne des diamètres d'inhibition de 15.0 mm et une moyenne de CMI de 0.81 mg/ml. Tandis que l'extrait de *L. multifida* a enregistré la plus faible moyenne des diamètres d'inhibition de 8.9 mm et une moyenne de CMI de 3.75 mg/ml.

En effet AQIL et al., (2005) ont testé sept extraits à l'éthanol des plantes *Camellia sinensis*, *Delonix regia*, *Holarrhena antidysenterica*, *Lawsonia inermis*, *Punica granatum*, *Terminalia chebula* et *Terminalia belerica*, sur des souches résistantes à la pénicilline par production de β -lactamases (BORSA). Les diamètres d'inhibitions étaient entre 11 et 26 mm. Nos résultats entrent bien dans cette fourchette exceptée pour la lavande.

On comparant les résultats de l'effet des extraits de l'éthanol à ceux des huiles essentielles nous remarquons qu'ils présentent des différences. L'HE d'*O. v. subsp. glandulosum* était la plus active sur le SARM alors que l'extrait à l'éthanol de l'espèce *T. m. subsp. ciliatus* était le plus inhibiteur.

9. Résultats des tests d'activités en phase vapeur (calcul de la dose minimale inhibitrice « DMI »)

L'activité en phase vapeur a été étudiée uniquement pour les huiles essentielles les plus actives à savoir *T. m. subsp. ciliatus*, *L. multifida*, *A. verticillata* et *O. v. subsp. glandulosum*. Les résultats du calcul de la dose minimale inhibitrice sont présentés dans le tableau 14. Un exemple sur l'activité en phase vapeur d'HE d'*O. v. subsp. glandulosum* sur une souche SARM est présenté dans la figure 30.

Tableau 14 : Doses minimales inhibitrices des huiles essentielles de *T. m. subsp. ciliatus*, *L. multifida*, *O. v. subsp. glandulosum* et *A. verticillata*

Souche code	DMI $\mu\text{l}/\text{cm}^3$			
	<i>T. ciliatus</i>	<i>L. multifida</i>	<i>O. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>
SARM1	0,2644	0,1322	0,0661	0,0661
SARM2	0,1322	0,0661	0,033	0,0661
SARM3	0,0661	0,0661	0,0165	0,033
SARM4	0,0661	0,0661	0,0165	0,033
SARM5	0,0661	0,0661	0,0165	0,0661
SARM6	0,1322	0,0661	0,033	0,0661
SARM7	0,2644	0,0661	0,033	0,033
SARM8	0,0661	0,0661	0,033	0,0661
SARM9	0,132	0,0661	0,0661	0,0661
SARM10	0,132	0,1322	0,0661	0,1322
SARM11	0,2644	0,0661	0,033	0,033
SARM12	0,1322	0,0661	0,0661	0,0661
SARM13	0,0661	0,0661	0,0165	0,0661
SARM14	0,1322	0,1322	0,0661	0,1322
SARM15	0,1322	0,0661	0,0661	0,0661
SARM16	0,132	0,0661	0,0661	0,0661
SARM17	0,2644	0,2644	0,033	0,2644
SARM18	0,1322	0,0661	0,0661	0,0661
SARM19	0,0661	0,0661	0,0165	0,0661
SASM1	0,0661	0,0661	0,0165	0,0661
SARM 43300	0,0661	0,0661	0,0165	0,0661
SASM 25923	0,0661	0,033	0,0165	0,033
SASM 33862	0,1322	0,033	0,0661	0,033
SASM 29213	0,1322	0,033	0,033	0,1322
SARM 43866	0,2644	0,2644	0,033	0,2644
Moyenne	0,1348	0,0859	0,0396	0,0819

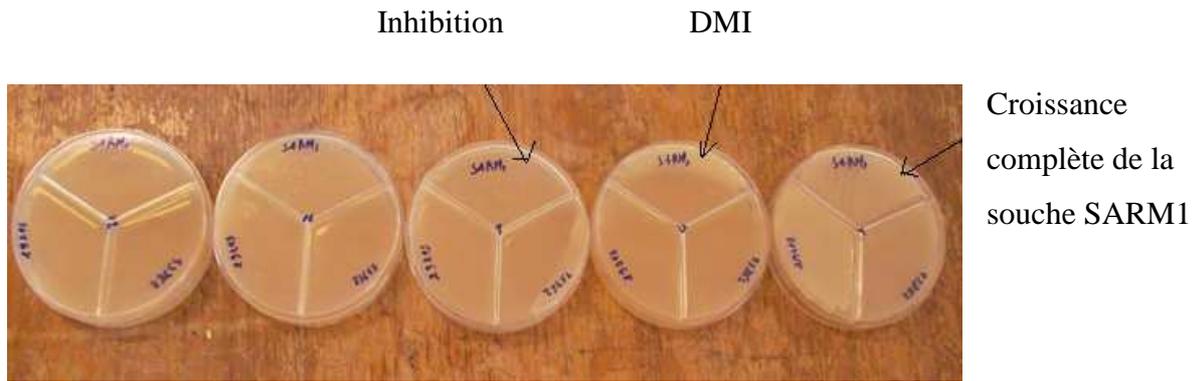


Figure 30 : Dose minimale inhibitrice de la souche SARM1 exposé à l'huile d'*O. v. subsp. glandulosum*

On remarque que l'HE d'*O. v. subsp. glandulosum* est la plus active en phase vapeur avec une moyenne de DMI de $0,0406 \mu\text{l}/\text{cm}^3$ suivi par *A. verticillata* avec une moyenne de $0,0826 \mu\text{l}/\text{cm}^3$ tandis que *L. multifida* et *T. m. subsp. ciliatus* ont montré moins d'effets respectivement. Certains auteurs pensent que les huiles essentielles ont une très forte activité en phase gazeuse comparée à leurs activités en phase liquide (Inouye et al., 2001). Néanmoins l'effet de cette vapeur de l'huile essentielle dépend de la volatilité relative de ses constituants (Laird et Phillips, 2012).

Cela donne une information sur la possibilité de l'utilisation de ces huiles essentielles pour la désinfection atmosphérique de l'air confiné des établissements de santé par mesure de la lutte contre la propagation de la résistance aux antibiotiques et puisque les huiles essentielles sont parmi les substances les moins toxiques pour cette utilisation (Inouye, 2003)

10. Cinétique de destruction du SARM avec les huiles essentielles

L'étude de la cinétique de destruction du SARM 43300 avec les quatre huiles essentielles est représentée par les figures 31a et 31b. Les résultats montrent qu'après 240 min à la concentration 1%, les quatre courbes atteignent l'axe des abscisses. L'HE d'*O. v. subsp. glandulosum* a détruit toutes les cellules bactérienne au bout de 60 min, *L. multifida* en 120 min alors qu'il a fallu 240 min pour détruire toutes les cellules par *T. m. subsp. ciliatus* et *A. verticillata*.

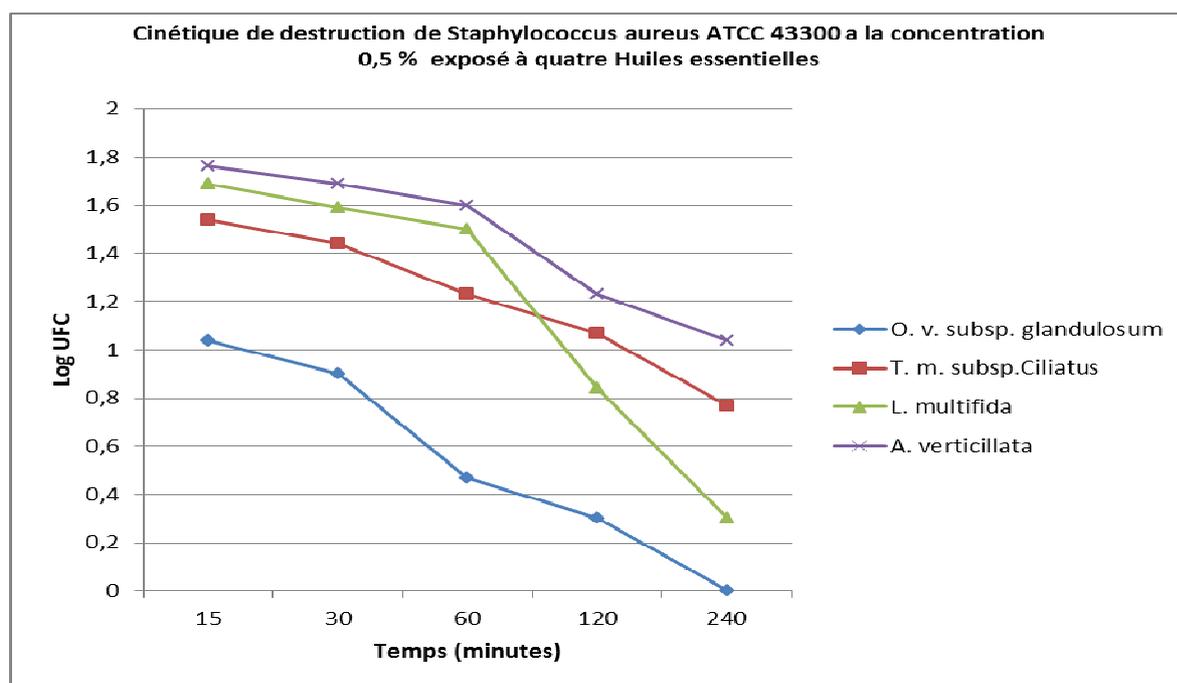
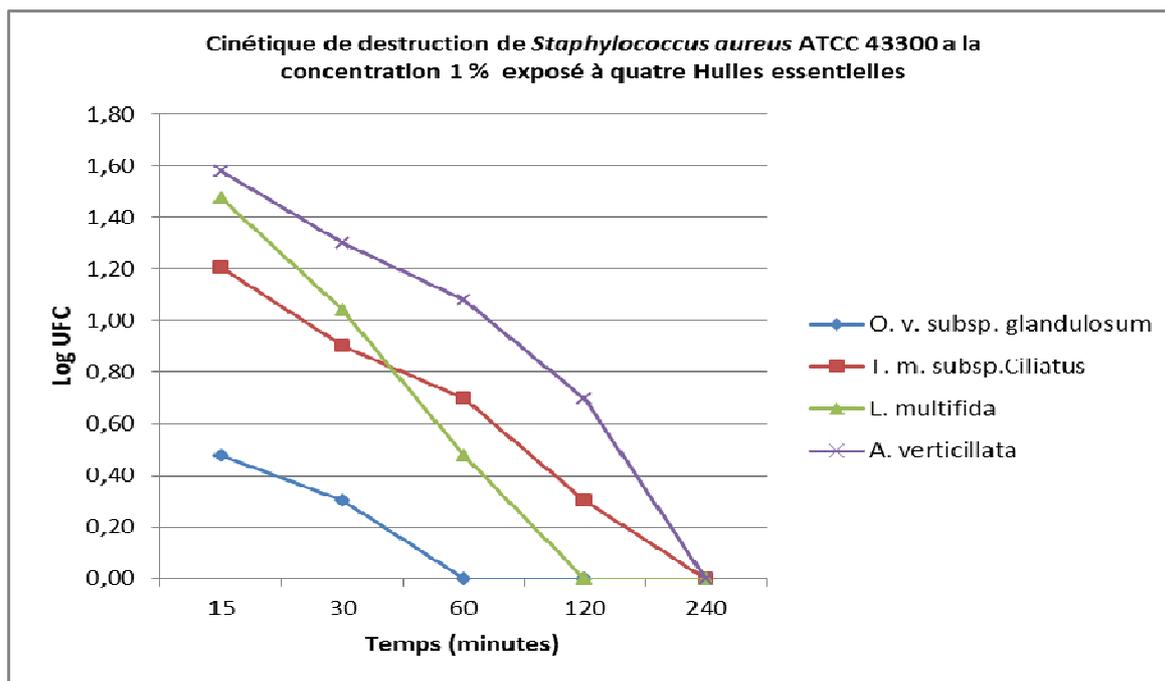


Figure 31a : Cinétique de destruction de la souche SARM ATCC 43300 exposée à quatre huiles essentielles (*O. v. subsp. glandulosum*, *T. m. subsp. Ciliatus*, *L. multifida* et *A. verticillata*) dans les temps 15', 30', 60', 120' et 240' aux concentrations 1 et 0.5%.

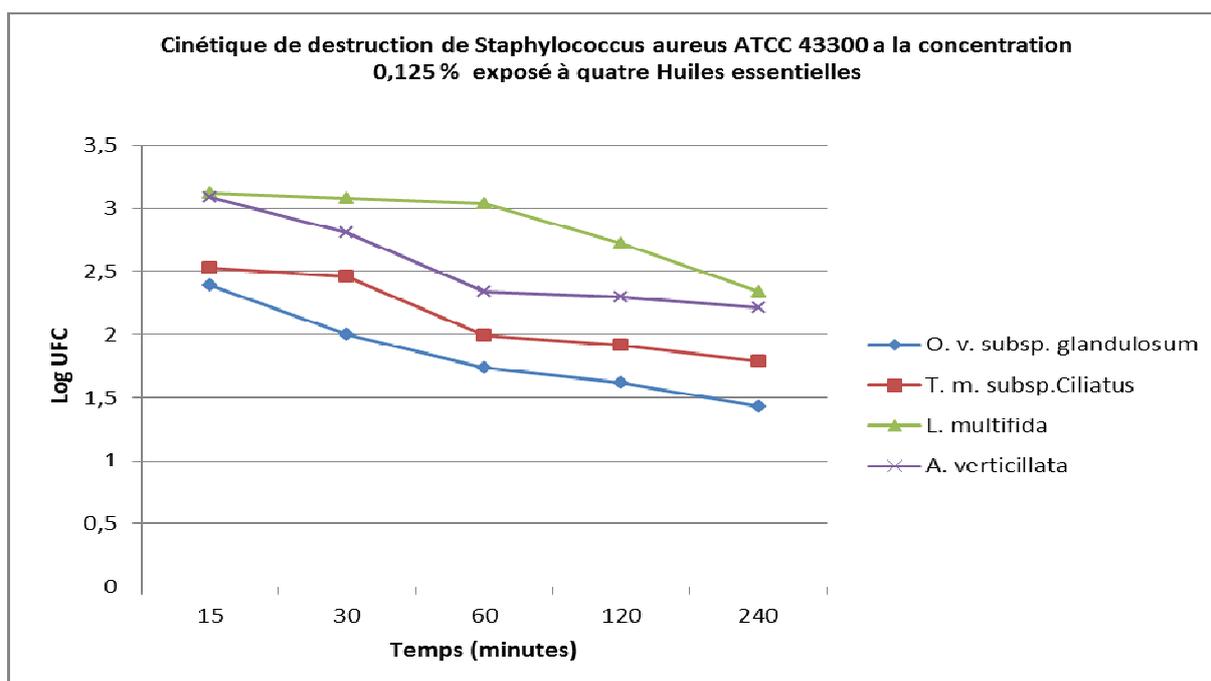
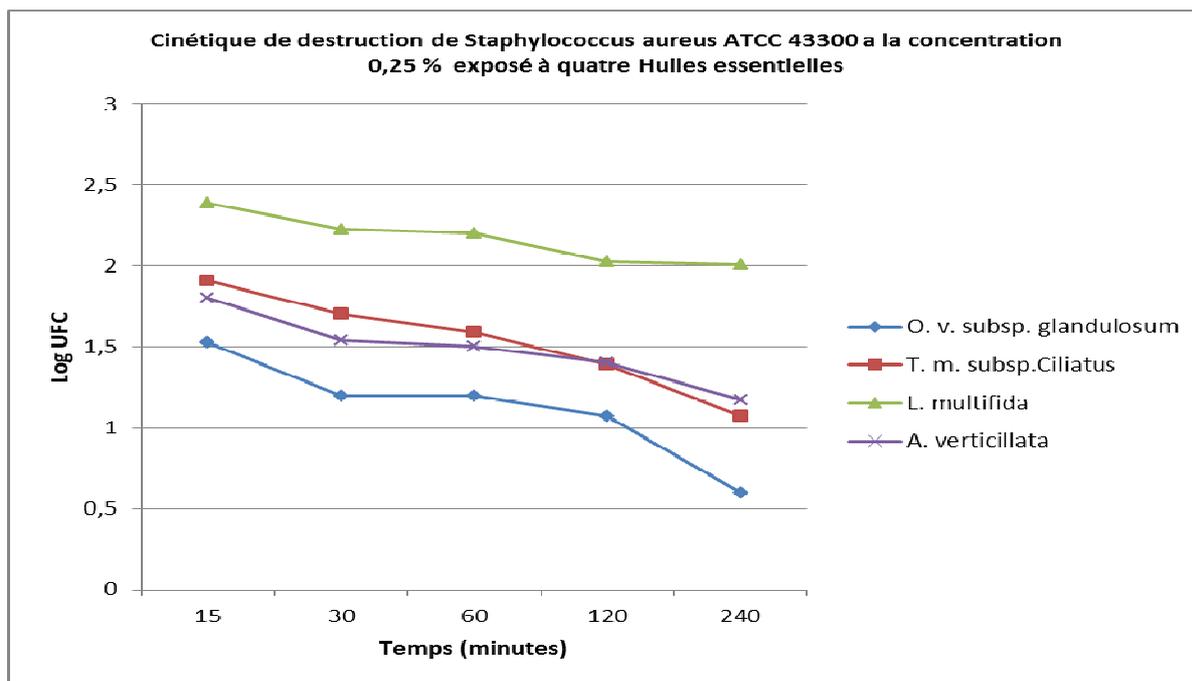


Figure 31b : Cinétique de destruction de la souche SARM ATCC 43300 exposée à quatre huiles essentielles (*O. v. subsp. glandulosum*, *T. m. subsp. Ciliatus*, *L. multifida* et *A. verticillata*) dans les temps 15', 30', 60', 120' et 240' aux concentrations 0.25 et 0.125%.

La réduction exercée par les quatre huiles essentielle après quatre heures à la concentration 1% est de $6.8 \log_{10}$ « l'inoculum initial ». Cette destruction totale signifie qu'à cette concentration les quatre huiles ont exercé un effet bactéricide. Pour la concentration 0.5% *O. v. subsp. glandulosum* a exercé un effet bactéricide avec une destruction complète des cellules bactérienne après 240 min, cependant l'huile de *L. multifida* a effectué une destruction allant de $6.8 \log_{10}$ jusqu'à $0.25 \log_{10}$ tandis que *T. m. subsp. ciliatus* et *A. verticillata* ont montré un effet moins fort avec une destruction de $6.8 \log_{10}$ jusqu'à $0.8 \log_{10}$ et $1.05 \log_{10}$ respectivement. Néanmoins, l'huile essentielle à 0.25% d'*O. v. subsp. glandulosum* a montré une destruction presque complète de la souche alors que les huiles de *L. multifida*, *A. verticillata* et *T. m. subsp. ciliatus* ont montré une destruction moyenne. Toutefois la concentration 0.125% à montré une faible activité des quatre huiles essentielles de $6.8 \log_{10}$ jusqu'à $2.34 \log_{10}$ pour *A. verticillata* et *L. multifida* et de $6.8 \log_{10}$ jusqu'à 1.79 et $1.43 \log_{10}$ pour *T. m. subsp. ciliatus* et *O. v. subsp. glandulosum* respectivement pendant 240 min. Il en résulte que l'activité bactéricide des quatre huiles essentielles testées dans cette étude dépend de la concentration. En effet, ces huiles puisqu'elles sont concentrations dépendantes, elles sont bactéricides aux concentrations requises et détruisaient les cellules a la phase stationnaire, mais lorsque leurs concentrations et faibles elles sont bactériostatiques (Christoph et al., 2001). La plupart des études sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles portent sur l'inhibition de la croissance microbienne plutôt que sur les cinétiques des effets létaux (Lattaoui et Tantaoui-Elaraki, 1994).

Dadalioglu et Evrendilek (2004), ont étudié la cinétique de destruction de la souche SARM ATCC 43300 par les huiles essentielles d'Origan et de lavandes d'origine Turque. Les auteurs ont trouvé un effet très fort de l'huile d'Origan suivie par l'effet des lavandes. Ces résultats sont compatibles avec les nôtres comme nous avons enregistré une cinétique plus rapide et plus forte d'*O. v. subsp. glandulosum* que celle exercée par *L. multifida*.

11. Résultats des tests *in vivo*

Les résultats des tests *in vivo* sur le traitement des rats infectés au niveau dermique par une souche de *S. aureus* productrice de LPV en utilisant l'huile essentielle d'*O. v. subsp. glandulosum* sont présenté par la figure 32. On remarque que tous les rats ont développé une infection après 24 h d'incubation. L'infection se caractérise par la production de pus autour de l'incision. Aucune mortalité n'a été observée et aucun signe d'inflammation ou de la sensibilité à l'huile n'a été observé pour le contrôle négatif.

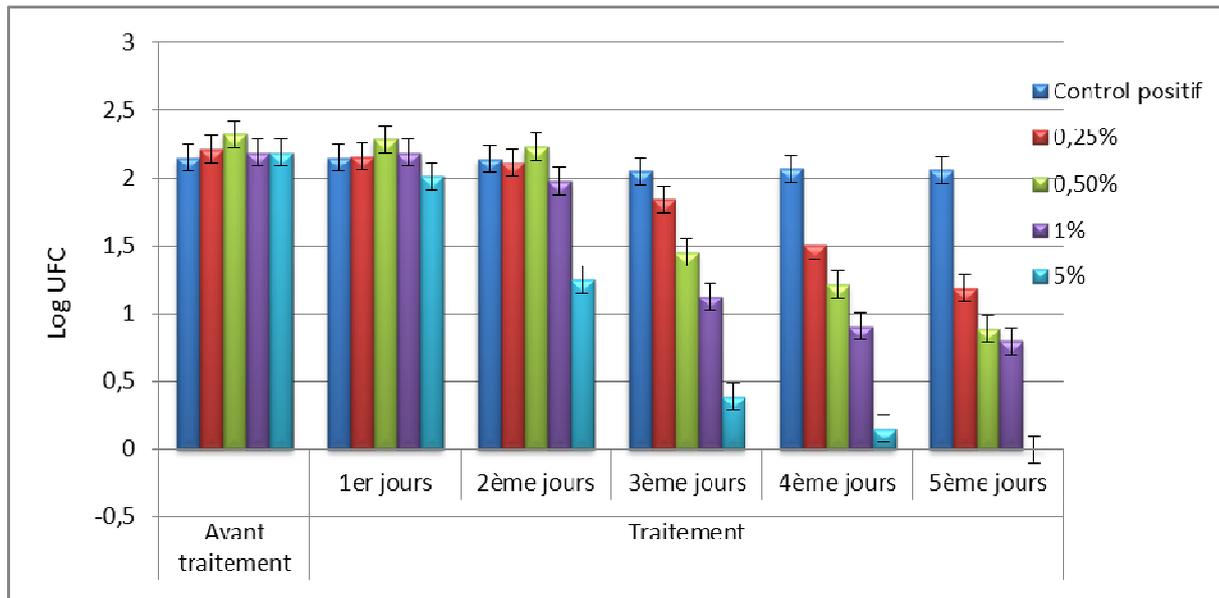


Figure 32 : L'effet de l'huile essentielle d'*O. v. subsp. glandulosum* sur la réduction du nombre d'UFC des plaies infectées du rat Wistar par *Staphylococcus aureus* LPV positif

Le traitement des infections cutanées à *Staphylococcus aureus* LPV positif chez les rats avec *O. v. subsp. glandulosum* a montré une diminution du nombre d'UFC pour toutes les concentrations utilisées. Après le premier traitement, il y avait une stabilité dans le nombre de colonies pour les concentrations de 0,25 %, 0,5 % et 1 %, tandis que pour la concentration de 5 %, une légère baisse a été observée, alors que le second traitement a montré une importante réduction du nombre d'UFC pour la concentration de 5 % par 0,93 log₁₀ et une légère diminution pour la concentration de 1 %. Le troisième traitement à montrer une forte réduction d'UFC pour la concentration 5 % par 1.8 log₁₀ et pour la concentration 1 % par 1,06 log₁₀. En outre, une diminution remarquable d'UFC pour les concentrations 0,5 % et 0,25 % qui ont montré une stabilité des UFC dans les deux premiers traitements.

Dans le quatrième traitement, nous voyons clairement une diminution significative du nombre d'UFC du germe à partir des sites d'infections pour la concentration 5 % et une réduction très importante pour la concentration 1 % de l'ordre de 1,28 log₁₀.

Le cinquième traitement révèle une éradication totale du nombre d'UFC pour la concentration de 5 %, alors qu'une diminution spectaculaire du nombre d'UFC de 1,69 log₁₀ et 1,3 log₁₀ pour les concentrations de 1 % et 0,5 % respectivement. Tandis que pour les deux contrôles positifs aucune diminution n'a été observée et le nombre d'UFC été stable pendant les jours de traitement.

À partir de ces résultats, nous constatons que le traitement avec la concentration de 5 % permet une élimination rapide du germe en cinq jours, mais la concentration de 1 % permet une réduction considérable de l'infection de 1,69 log₁₀ dans les cinq premiers jours de traitement. Cependant le contrôle positif à montrer un nombre stable d'UFC qui confirme la forte colonisation du site de l'infection par ce pathogène en absence du traitement (figure 38). On peut en déduire que ce traitement avec l'huile essentielle est dépendant de la concentration. On peut aussi dire que les concentrations dans l'intervalle comprises entre 1 % et 5 % peuvent être efficaces dans l'éradication de cet organisme produisant la toxine LPV. Cette efficacité est due à la faible CMI de cette souche vis-à-vis de notre huile essentielle qui est de l'ordre de 0,00625 %.

Si nous comparons nos résultats avec ceux obtenus avec des molécules de références telles que la mupirocine testée par Gisby et Bryant, (2000) sur des plaies de la peau de rat infectée par *Staphylococcus aureus*, ces auteurs ont montré que la crème de mupirocine à 2 % réduisait dans le cinquième jour du traitement le nombre d'UFC de 7,23 log₁₀ à 2,51 log₁₀ soit une réduction de 65,28 %. Par contre, notre huile d'*O. v. subsp. glandulosum* appliquée à la concentration de 1 % a exercé une réduction du nombre d'UFC de 2,19 log₁₀ à 0,5 log₁₀ soit une réduction de 77,16 % lors du cinquième traitement. Cela confirme l'efficacité de notre traitement de l'huile essentielle, sachant que la prévalence actuelle de la résistance à la mupirocine est en augmentation (Park et al., 2012), d'où l'importance de la recherche d'autres agents antimicrobiens.

Nous avons choisit la souche de *S. aureus* LPV positive pour sa capacité de causer des infections plus graves chez les souris que les souches LPV négatives (Varshney et al., 2010) et pour prouver l'efficacité du traitement par les huiles essentielles contre les infections compliquées et difficiles à traiter. Notre huile a permis une bonne éradication du nombre d'UFC à des concentrations supérieures à 1 %. Cette activité *in vivo* est due principalement à l'abondance en thymol qui caractérise cette huile essentielle (Bendahou et al., 2008) qui a une forte activité toxique contre la membrane de *S. aureus* en induisant la perméabilité (Cristani et al., 2007) et agit de la même manière sur les SARM et les SASM (Nostro et al., 2004). Cette activité est également due aux γ -terpinène et p-cymène qui sont en quantité significative dans la composition chimique de cette huile essentielle, et qui sont connus pour leur activité cytotoxique contre les bactéries Gram positifs et Gram négatifs (Cristani et al., 2007). Le mécanisme d'action de ces trois monoterpènes est dû à la pénétration dans la membrane

plasmique et la perturbation des fractions lipidiques et fonctions membranaires (Cristani et al., 2007).

S. aureus colonise les plaies sous la forme d'un biofilm qui est non traitable avec des antibiotiques (Katsuyama et al., 2005) et seule l'action des leucocytes polymorphonucléaires est capable de détruire ce biofilm (Akiyama et al., 2002). Le problème avec l'infection par *S. aureus* à LPV positif est que les leucocytes sont détruits par la LPV ce qui explique la complication de ces infections difficiles à traiter. Nos résultats montrent que l'huile essentielle d'*O. v. subsp. glandulosum*. Desf., à un effet remarquable sur l'éradication de ce germe producteur de LPV dans les plaies infectées. Ce résultat peut être expliqué du fait que beaucoup d'huiles essentielles issues de plantes aromatiques exercent une activité anti-biofilm (Adukwu et al., 2012; Al-Bakri et al., 2010; Oral et al., 2010) et des activités stimulantes du système immunitaire (Standen et Myers, 2004) ce qui a permis d'éradiquer ce germe pathogène des plaies.

Ces résultats laissent à penser que cette huile essentielle peut être une bonne solution pour lutter contre les infections de la peau due à *Staphylococcus aureus* producteur de la toxine LPV.

12. Étude de la combinaison des huiles essentielles avec la vancomycine

Les travaux sur les combinaisons des agents antimicrobiens en clinique ont montré leurs efficacités en augmentant l'effet antimicrobien et en diminuant la concentration des antibiotiques. Ces derniers gardent toujours leurs effets inhibiteurs surtout lorsqu'ils possèdent une forte synergie entre eux (Denes et Hidri, 2009). Plusieurs travaux ont montré la possibilité de l'association des antibiotiques avec les huiles essentielles dans le but d'augmenter leurs effets à de faibles doses et ainsi pour diminuer la toxicité de plusieurs antibiotiques (Shin et Kang, 2003 ; Rosato et al., 2008).

Bien que possédant des effets secondaires tel que la néphrotoxicité (Daurel et Leclercq, 2010 ; Wong-Beringer et al., 2011), nous avons choisi d'utiliser la vancomycine en combinaison avec les huiles essentielles, car c'est le dernier antibiotique utilisé actuellement pour le traitement des infections à SARM. L'objectif de cette étude est de voir si les huiles essentielles possèdent des interactions positives (synergie) ou négatives (antagonisme) ou n'ayant aucun effet avec la vancomycine !.

L'étude de la combinaison de l'antibiotique Vancomycine a été réalisée avec quatre huiles essentielles qui sont : *T. m. subsp. ciliatus*, *A. verticillata*, *O. v. subsp. glandulosum* et *L. multifida*. Les résultats de la combinaison ont montré que trois huiles essentielles testées ont une synergie avec la vancomycine contre le SARM de référence ATCC 43300, ces huiles sont *T. m. subsp. Ciliatus*, *A. verticillata* et *L. multifida* tandis que l'huile essentielle d' *O. v. subsp. glandulosum* à présenter un effet d'addition (figure 33a et 33b).

L'huile essentielle d'*A. verticillata* à présenter le plus grand effet de synergie comme cette dernière à une CFI de 0.37 suivi par *Thymus ciliatus* et *L. multifida* avec une CFI de 0.5 puis par *O. v. subsp. glandulosum* qui a présenté un effet d'addition (CFI $\geq 0,5$) avec une CFI de 0,65 (figure 33a et 33b).

Des résultats similaires ont été observés par Mahboubi et Ghazian Bidgoli (2010) ou ils ont démontré l'effet synergétique de l'huile essentielle de *Zataria multiflora* avec la vancomycine contre les souches SARM avec une CFI de 0,32 sachant que cette huile contient le même composé majoritaire que *A. verticillata* et *O. v. subsp. glandulosum* qui est le thymol.

De même Fadli et al, 2012 ont présenté l'effet synergétique de l'huile essentielle de *Thymus maroccanus* chemotype carvacrol avec trois antibiotiques sont la gentamycine le ciprofloxacine et le céfixime (Fadli et al., 2012). Le même résultat a été enregistré lors de notre test de synergie avec l'huile essentielle de *T. m. subsp. ciliatus* qui est du même genre et ayant le même chemotype le carvacrol avec la vancomycine et aussi nous avons enregistré ce même taux de synergie avec l'huile essentielle de *L. multifida* qui présente également comme composé majoritaire le carvacrol et le β -bisabolène.

Cela confirme nos résultats puisque ces huiles essentielles riches en composés phénoliques (Thymol et Carvacrol) sont connus par leurs interactions synergiques avec les antibiotiques y compris la vancomycine.

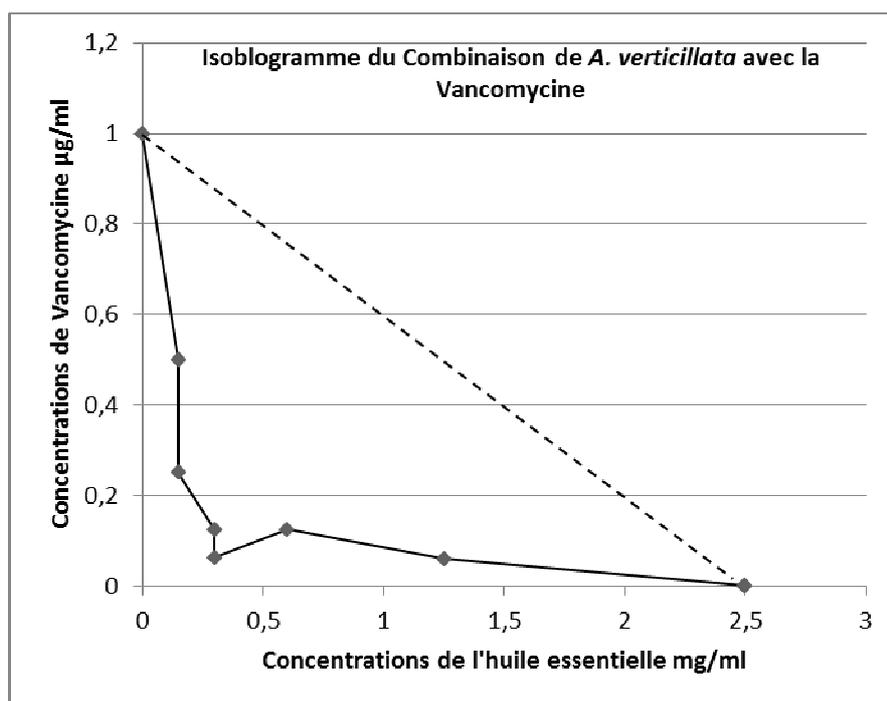
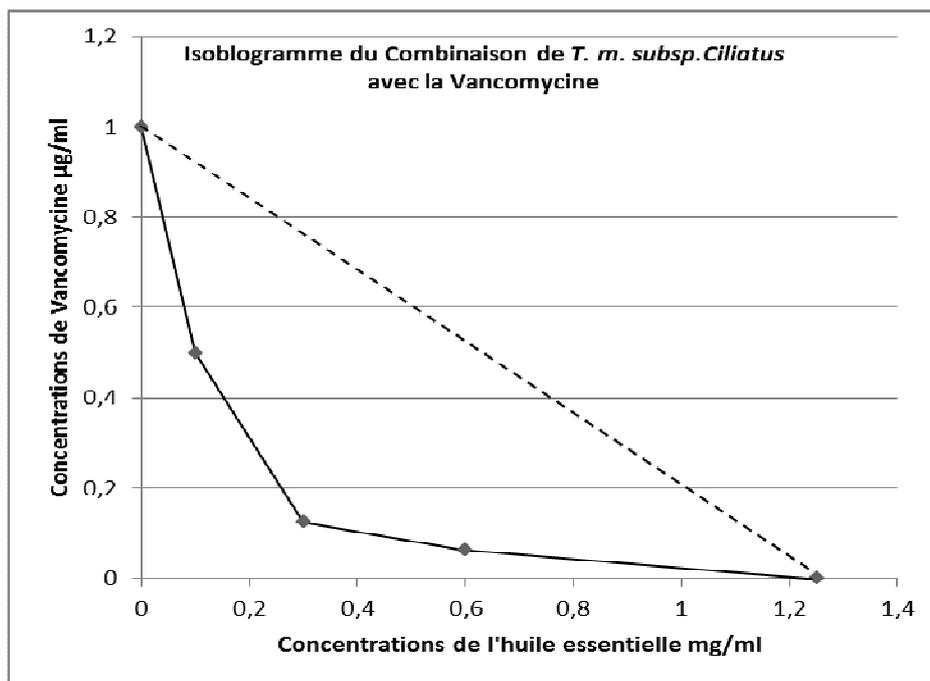


Figure 33a : isobogrammes démontrant la synergie des huiles essentielles de *T. m. subsp. ciliatus* et d' *A. verticillata* avec la vancomycine contre une souche de SARM ATCC 43300.

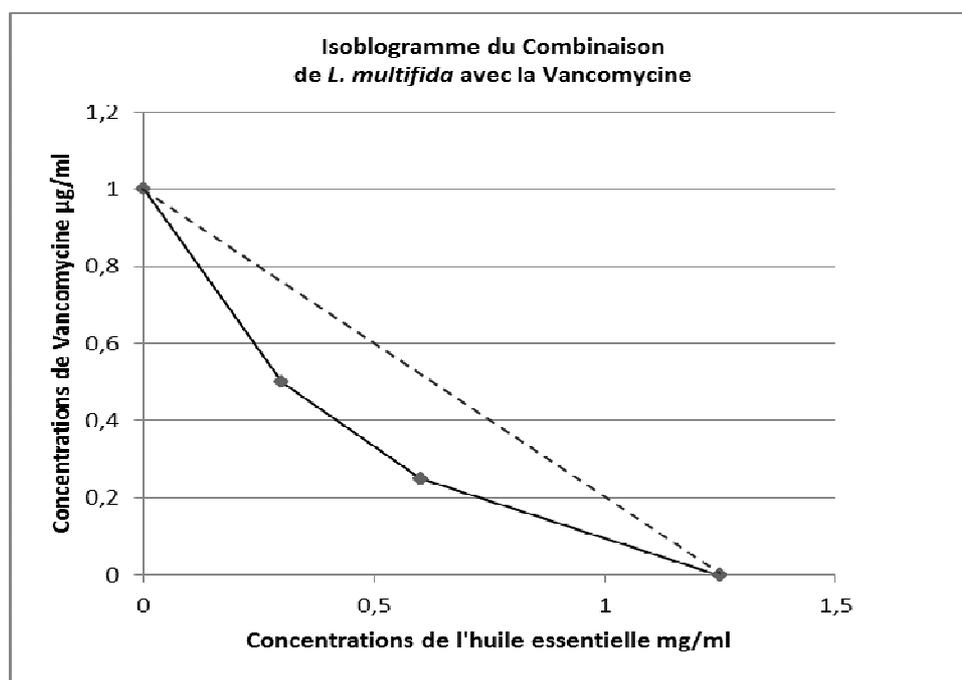
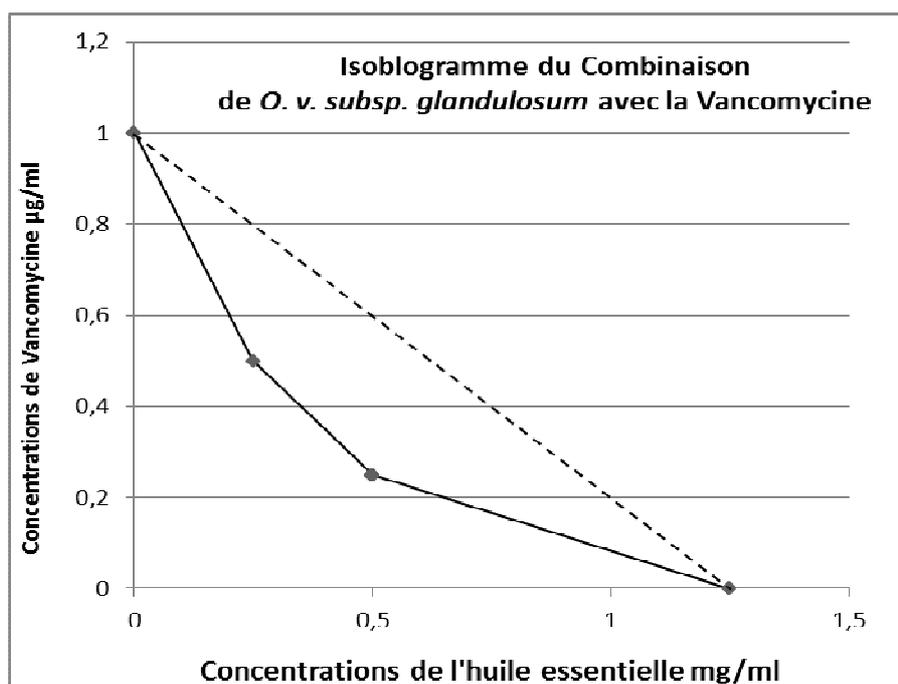


Figure 33b : isobogrammes démontrant la synergie des huiles essentielles d'*O. v. subsp. glandulosum* et de *L. multifida* avec la vancomycine contre une souche de SARM ATCC 43300.

13. Conclusion

Dans cette deuxième partie de notre travail, on déduit que les huiles essentielles et les extraits à l'éthanol des quatre plantes aromatiques *L. multifida*, *O. glandulosum*, *T. ciliatus* et *A. verticillata* possèdent des activités *in vitro* intéressantes sur les souches SARM. Toutefois les extraits à l'éthanol ont montré des effets moins forts que les huiles essentielles sur les souches SARM. L'HE d'*O. glandulosum* s'est montrée plus active par rapport aux autres HEs tandis que l'extrait à l'éthanol de *T. ciliatus* est le plus actif parmi les autres extraits des plantes. La destruction totale des souches exposées aux huiles essentielles a montré que ces huiles ont une activité bactéricide aux concentrations requises et en fonction du temps. La combinaison des quatre HEs avec l'antibiotique vancomycine a montré que l'HE de *A. verticillata* présente l'effet de synergie le plus important. L'essai *in vivo* de l'huile d'*O. glandulosum* (> 1%) a permis de traiter les infections superficielles produites par des souches qui sécrètent la toxine de la LPV.

Conclusion générale

L'objectif assigné à cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches SARM isolées du CHU de Tlemcen.

L'utilisation de MALDI-TOF-MS nous a permis d'identifier 123 souches alors que la PCR et la PCR en temps réel nous ont permis de caractériser les gènes de résistances et de toxines. L'antibiogramme a révélé qu'il y a 42,27 % de SARM isolés des patients hospitalisés dans différents services du CHU de Tlemcen (Algérie). Aussi, ces résultats ont montré qu'il y a une propagation de souches SARM productrices de β -lactamases et qui possèdent des toxines dangereuses. Sur les 123 souches typées, on a trouvé une souche productrice de la LPV et onze souches productrices de la TSST1.

Les résultats des tests *in vitro* de l'activité des huiles essentielles et des extraits éthanoliques par la méthode de diffusion ont montré des activités très intéressantes de certaines huiles essentielles comme celles d'*O. glandulosum*, *A. verticillata* et *T. ciliatus* avec des diamètres d'inhibitions dépassant 55, 36 et 30 mm respectivement. Alors que les résultats des tests par la méthode en phase vapeur étaient aussi satisfaisants avec des DMI très faibles de l'ordre de $0,0165 \mu\text{l}/\text{cm}^3$ en utilisant toujours l'HE d'*O. glandulosum*.

La souche SARM ATCC 43300 exposée aux huiles essentielles : *O. v. subsp. glandulosum*, *T. m. subsp. ciliatus*, *L. multifida* et *A. verticillata* a montré une très grande sensibilité aux concentrations requises. L'huile d'origan a détruit toutes les cellules de *S. aureus* au bout de 60 min à la concentration 1%. La combinaison des huiles essentielles avec l'antibiotique vancomycine a montré que l'huile d'*A. verticillata* présente l'effet de synergie le plus important avec une CFI de 0.37 alors que l'huile d'*O. v. subsp. glandulosum* a présenté un effet d'addition avec une CFI de 0,65.

Les résultats des tests *in vivo* ont montré une capacité de l'huile essentielle d'origan de traiter des rats infectés avec une souche productrice de toxines qui domme la peau de l'homme et des animaux. L'huile d'origan a permis une bonne réduction du nombre d'UFC des plaies infectées du rat Wistar par *Staphylococcus aureus* LPV positif à la concentration de 0.25 % et une éradication totale en cinq jours à la concentration de 5 %.

Ces résultats montrent que les plantes aromatiques représentent une alternative de traitement aux antibiotiques et constituent une solution pour lutter contre les bactéries multirésistantes et productrices de toxines dangereuses telles que le SARM. Les plantes

aromatiques d'origine locale étudiées dans ce travail ont montré de fortes activités contre le SARM.

Vu les résultats obtenus, il serait intéressant de valoriser ces plantes aromatiques par l'élaboration des produits pharmaceutiques à base d'huiles essentielles telle que les pommades, les lotions, les gels pour le traitement des infections et des aéro-sols pour la désinfection atmosphérique des établissements de santé ; d'élargir l'étude sur d'autres souches résistantes à d'autres antibiotiques, d'étudier l'effet de ces huiles sur les types de β -lactamases, d'élucider le mécanisme de l'effet inhibiteur des HEs et pourquoi pas purifier et identifier de nouvelles molécules antimicrobiennes.

Références

Références:

- Abreu, A.C., McBain, A.J., Simoes, M., 2012. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports* 29, 1007-1021.
- Adams, R.P., 1995. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured: Carol Stream, IL.
- Adekambi, T., Drancourt, M., Raoult, D., 2009. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* 17, 37-45.
- Adukwu, E.C., Allen, S.C.H., Phillips, C.A., 2012. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 113, 1217-1227.
- Akiyama, H., Huh, W.-K., Yamasaki, O., Oono, T., AND, I.K., 2002. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in mouse skin: does *S. aureus* generally produce a biofilm on damaged skin? *British Journal of Dermatology* 147, 879–885.
- Al-Bakri, A., Afifi, F., Othman, G., 2010. Determination of the antibiofilm, antiadhesive, and anti-MRSA activities of seven *Salvia* species.
- Al Nakib, M., Reglier-Poupet, H., Longo, M., Adam, J.M., Raymond, J., Zambardi, G., Tazi, A., Poyart, C., 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing low-level methicillin resistance may not be detected by the VITEK2(R) system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 72, 193-195.
- Amabile-Cuevas, C.F., 2003. New antibiotics and new resistance - In many ways, the fight against antibiotic resistance is already lost; preventing bacterial disease requires thoughtful new approaches. *Am. Scientist* 91, 138-149.
- Aqil, F., Khan, M.S.A., Owais, M., Ahmad, I., 2005. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of β -lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Basic Microbiology* 45, 106-114.
- Baby, S., George, V., 2009. *Essential Oils and New Antimicrobial Strategies*. *New Strategies Combating Bacterial Infection* wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 165-203.
- Badiou, C., Dumitrescu, O., Croze, M., Gillet, Y., Dohin, B., Slayman, D.H., Allaouchiche, B., Etienne, J., Vandenesch, F., Lina, G., 2008. Pantón–Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 1173–1186.
- Badiou C, O.D., Croze M, Gillet Y, Dohin B, Slayman D H, Allaouchiche B, J. Etienne, F. Vandenesch and Lina G, 2008. Pantón–Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 1173–1186.
- Baker, D.D., Chu, M., Oza, U., Rajgarhia, V., 2007. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural product reports* 24, 1225-1244.
- Balslev, U., Bremmelgaard, A., Svejgaard, E., Havstrem, J., Westh, H., 2005. An Outbreak of Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) in a Dermatological Unit. *microbial drug resistance* 11,, 78-81.

- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences* 78, 431-441.
- Banks, M.C., Kamel, N.S., Zabriskie, J.B., Larone, D.H., Ursea, D., Posnett, D.N., 2003. Staphylococcus aureus Express Unique Superantigens Depending on the Tissue Source. *The Journal of Infectious Diseases* 187, 77–86.
- Barber, M., 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *J. clin. Path.* 14, 385-393.
- Barrett, F.F., McGehee, R.F., Finland, M., 1968. methicillin-resistant staphylococcus aureus at boston city hospital - bacteriologic and epidemiologic observations. *N. Engl. J. Med.* 279, 441-&.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., 1966. Antibiotic susceptibility Testing by a standardized single disk method *The American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., 2007. Subject Index, Common Fragrance and Flavor Materials. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 269-278.
- Bayliss, B.G., Hall, E.R., 1965. Plasma Coagulation by Organisms Other Than Staphylococcus aureus. *journal of bacteriology* 89, 101-105.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Abdelouahid, D.E., 2008. Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'Origanum glandulosum d'Algérie. *Phytothérapie* 6, 153-159.
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.-M., Bernardini, A.-F., Costa, J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of Origanum glandulosum Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry* 106, 132-139.
- Berenbaum, M.C., 1989. what is synergy. *Pharmacol. Rev.* 41, 93-141.
- Bergogne-Bérézin, E., 2004. Après l'ère des antibiotiques, l'ère de la résistance. *La Presse Médicale* 33, 772-774.
- Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A., Walev, I., Walker, B., Kehoe, M., Palmer, M., 1996. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 165, 73-79.
- Bittar, F., Ouchenane, Z., Smati, F., Raoult, D., Rolain, J.M., 2009. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents* 34, 467-470.
- Bittencourt Dutra de Sosa, E. M., Costa Câmara, A.P., Costa, W.A., Costa, A.J., Oliveira, H.M., Galvão, E.L., Marques, M.O., 2005. Evaluation of the Extraction Process of the Essential Oil from Cymbopogon schoenanthus with Pressurized Carbon Dioxide, *brazilian archives of biology and technology*, Vol.48, Special n.: pp. 231-236
- Boerlin, P., Reid-Smith, R. 2008. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal Health Research Reviews* 9(2); 115–126
- Bosseray, A., Micoud, M., 2000. Infections nosocomiales. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 8-001-F-10, 1-8.
- Bousmaha-Marroki, L., Atik-Bekkara, F., Félix, T., Casanova, J. 2007. *J. Essent. Oil Res.* 19, 490-493
- Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., Bessiere, J.M., 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal* 18, 481-484.

- Bradley, S.F., 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinics in geriatric medicine* 8, 853-868.
- 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.
- Bulger, R.J., 1967. a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.* 67 , 81-89.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International journal of food microbiology* 94, 223-253.
- Butler, M.S., Buss, A.D., 2006. Natural products--the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical pharmacology* 71, 919-929.
- Carbonnelle, E., Beretti, J.L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A., 2007. Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 45, 2156-2161.
- Carson, C.F., Cookson, B.D., Farrelly, H.D., Riley, T.V., 1995. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35, 421-424.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 1914-1920.
- CASFM, 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. 15.
- Castle, S.S., 2007. Oxacillin. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier, New York*, pp. 1-5.
- Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., Garrabé, E., 2004. Bêtalactamines. *EMC - Maladies Infectieuses* 1, 129-202.
- Chambers, H.F., Deleo, F.R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629-641.
- Chao, S., Young, G., Oberg, C., Nakaoka, K., 2008a. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23, 444-449.
- Chao, S., Young, G., Oberg, C., Nakaoka, K., 2008b. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23, 444-449.
- Chapman, G.H., 1945. the significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of bacteriology* 50, 201-203.
- Chapman, G.H., Berens, C., Peters, A., Curcio, L., 1934. coagulase and hemolysin tests as measures of the pathogenicity of staphylococci. *journal of bacteriology*, 28, 343-363.
- Chapman, G.H., Berens, C., Stiles, M.H., 1941. the coagulation of plasma by staphylococci. *journal of bacteriology* 41, 431-440.

- Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai, H.B., Kinghorn, D., 2006. Drug Discovery From Natural Sources. *The AAPS Journal* 8, E239-E253.
- Christoph, F., Stahl-Biskup, E., Kaulfers, P.M., 2001. Death kinetics of *Staphylococcus aureus* exposed to commercial tea tree oils s.l. *Journal of Essential Oil Research* 13, 98-102.
- Chung, M., Dickinson, G., de Lencastre, H., Tomasz, A., 2004. International Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Two Hospitals in Miami, Florida. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 542-547.
- Clarridge, J.E., 3rd, 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17, 840-862.
- Claydon, M.A., Davey, S.N., Edwards-Jones, V., Gorden, B., 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology* 14, 1584-1586.
- CLSI, 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 31.
- Coelho, J.A., Grosso, C., Pereira, A.P., Burillo, J., Urieta, J.S., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Mendes, R.L., Palavra, A.M.F., 2007. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from *Satureja fruticosa* Béguinot. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 438-442.
- Council of Europe (2005). *European Pharmacopoeia* 5th, 2567-2568.
- Cookson, B.D., Robinson, D.A., Monk, A.B., Murchan, S., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M.J., Scheel, C., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N.J., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjö, U., Müller-Premru, M., Hryniewicz, W., Rossney, A., O'Connell, B., Short, B.D., Thomas, J., O'Hanlon, S., Enright, M.C., 2007. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: The harmony collection. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1830-1837.
- Courvalin, P., 1996. Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). *Clinical Microbiology and Infection* 2, S26-S34.
- Cowan, M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews* 12, 564-582.
- Cristani, M., d'arrigo, m., mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, m.g., miceli, d., v, v., bisignano, g., Saija, A., Trombetta, D., 2007. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *J. Agric. Food Chem* 55, 6300-6308.
- Dadalioglu, I., Evrendilek, G.A., 2004. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* 52, 8255-8260.
- Dasenbrook, E.C., 2011. Update on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine* 17, 437-441.
- Daurel, C., Leclercq, R., 2010. Faut-il abandonner la vancomycine ? *Archives de Pédiatrie* 17, Supplement 4, S121-S128.

- Del Giudice, P., Bes, M., Hubiche, T., Blanc, V., Roudiere, L., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J., 2011. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains are associated with follicular skin infections. *Dermatology* 222, 167-170.
- del Giudice, P., Blanc, V., de Rougemont, A., Bes, M., Lina, G., Hubiche, T., Roudiere, L., Vandenesch, F., Etienne, J., 2009. Primary skin abscesses are mainly caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains. *Dermatology* 219, 299-302.
- Denes, É., Hidri, N. 2009. Synergie et antagonisme en antibiothérapie. *Antibiotiques*. 11, 106-115
- Deresinski, S., 2005. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey. *Clinical Infectious Diseases* 40, 562–573.
- Deurenberg, R.H., Nieuwenhuis, R.F., Driessen, C., London, N., Stassen, F.R., van Tiel, F.H., Stobberingh, E.E., Vink, C., 2005. The prevalence of the *Staphylococcus aureus* *tst* gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. *FEMS Microbiol Lett* 245, 185-189.
- Dixon, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.
- Djenane, D., Lefsih, K., Yangüela, J., Roncalés, P., 2011. Composition chimique et activité anti-*Salmonella enteritidis* CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, de *Lavandula angustifolia* et de *Satureja hortensis*. Tests in vitro et efficacité sur les oeufs entiers liquides conservés à 7 ± 1 °C. *Phytothérapie*. 9, 343–353
- Doern, G.V., Earls, J.E., Jeznach, P.A., Parker, D.S., 1983. Species identification and biotyping of staphylococci by the API staph-ident system. *J Clin Microbiol* 17, 260-263.
- Dryden, M.S., Dailly, S., Crouch, M., 2004. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *Journal of Hospital Infection* 56, 283-286.
- Eddabra, R., Prevost, G., Scheftel, J.M., 2012. Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res* 167, 226-230.
- Edmondson, M., Newall, N., Carville, K., Smith, J., Riley, T.V., Carson, C.F., 2011. Uncontrolled, open-label, pilot study of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil solution in the decolonisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive wounds and its influence on wound healing. *International Wound Journal* 8, 375-384.
- Elaissi, A., Medini, H., Khouja, M.L., Simmonds, M., Lynen, F., Farhat, F., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F., 2011. Variation in Volatile Leaf Oils of Five *Eucalyptus* Species Harvested from Jbel Abderrahman Arboreta (Tunisia). *chemistry & biodiversity*. 8, 352-361.
- Ellenberg, E., 2004. Étymologie du terme « Nosocomial ». *Antibiotiques* 6, 149-150.
- Eltz, T., Zimmermann, Y., Haftmann, J., Twele, R., Francke, W., Quezada-Euan, J.J.G., Lunau, K., 2007. Enflourage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 274, 2843-2848.
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.-E., Pagès, J.-M., Hassani, L., 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19, 464-471.

- Fairbrother, R.W., 1940. coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 50, 83-88.
- Falagas, M.E., Bliziotis, I.A., Kasiakou, S.K., Samonis, G., Athanassopoulou, P., Michalopoulos, A., 2005. Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria. *BMC Infectious Diseases* 5, 1-7.
- Felten, A., Grandry, B., Lagrange, P.H., Casin, I., 2002. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2766-2771.
- Fischbach, M.A., Walsh, C.T., 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325, 1089-1093.
- Forestier, E., Remy, V., Mohseni-Zadeh, M., Lesens, O., Jauhlac, B., Christmann, D., Hansmann, Y., 2007. [MRSA bacteremia: recent epidemiological and therapeutical trends]. *La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne* 28, 746-755.
- Francois, P., Renzi, G., Pittet, D., Bento, M., Lew, D., Harbarth, S., Vaudaux, P., Schrenzel, J., 2004. A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome mec elements. *J Clin Microbiol* 42, 3309-3312.
- Fujinami, Y., Kikkawa, H.S., Kurosaki, Y., Sakurada, K., Yoshino, M., Yasuda, J., 2011. Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiological Research* 166, 77-86.
- Gal, Z., Kovacs, P., Hernadi, F., Barabas, G., Kiss, L., Igloi, A., Szabo, I., 2001. Investigation of Oxacillin-Hydrolyzing Beta-Lactamase in Borderline Methicillin-Resistant Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 47, 233-238.
- Garcia-Vallejo, M., Garcia-Vallejo, I., Velasco-Negueruela, A., 1989. Essential oils of the genus *Lavandula* L. in Spain. *Proc. ICEOFF, New Delhi* 4, 15-26.
- Gaudy, C., Buxeraud, J., 2005. Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. ELSEVIER / MASSON, 1-269.
- Gibbons, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural product reports* 21, 263-277.
- Gisby, J., Bryant, J., 2000. Efficacy of a New Cream Formulation of Mupirocin: Comparison with Oral and Topical Agents in Experimental Skin Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 255-260.
- Graffunder, E.M., 2002. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 999-1005.
- Gravet, A., Colin, D.A., Keller, D., Giradot, R., Monteil, H., Preèvost, G., 1998. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Letters* 436, 202-208.
- Gravet, A., Couppie, P., Meunier, O., Clyti, E., Moreau, B., Pradinaud, R., Monteil, H., Prevost, G., 2001. *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and LukE-LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. *J Clin Microbiol* 39, 4349-4356.

- Gravet, A., Rondeau, M., Harf-monteil, C., Grunenberger, F., Monteil, H., Scheftel, J., Prevost, G., 1999. Predominant *Staphylococcus aureus* Isolated from Antibiotic-Associated Diarrhea Is Clinically Relevant and Produces Enterotoxin A and the Bicomponent Toxin LukE-LukD. *Journal of clinical microbiology*, 37, 4012–4019.
- Grohs, P., 2009. Évolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques : la méticilline est-elle encore un marqueur de multirésistance ? *Pathologie Biologie* 57, 1-8.
- Guenther, E., 1950. The essential oils. Vol. IV. Robert. E. Kriger Publishing, Van Nostrand company, Huntington, New York, USA.
- Hackbarth, C.J., Kocagoz, T., Kocagoz, S., Chambers, H.F., 1995. Point Mutations in *Staphylococcus aureus* PBP 2 Gene Affect Penicillin-Binding Kinetics and Are Associated with Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39, 103–106.
- Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S., 1999. Disorganization of cell division of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a component of tea (*Camellia sinensis*): a study by electron microscopy. *FEMS Microbiology Letters* 176, 463-469.
- Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S., 2000. Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 852-853.
- Hammond, R.K., White, D.C., 1970. Inhibition of Carotenoid Hydroxylation in *Staphylococcus aureus* by Mixed- Function Oxidase Inhibitors. *Journal of bacteriology*, 103, 607-610.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Turnwald, D., Vogel, U., 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5442-5448.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y., Kobayashi, I., 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350, 1670-1673.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T., 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology* 9, 486-493.
- Hirano, L., Bayer, A.S., 1991. β -Lactam- β -Lactamase-Inhibitor Combinations Are Active in Experimental Endocarditis Caused by β -Lactamase-Producing Oxacillin-Resistant *Staphylococci*. *antimicrobial agents and chemotherapy* 35, 685-690.
- Hoefnagels-schuerman, A., Peetermans, W.E., Jorissen, M., Van Ierde, S., Oord, V., Vos, R.D., Eldere, J.V., 1999. *Staphylococcus aureus* adherence to nasal epithelial cells in a physiological in vitro model. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 35, 472-448.
- Holland, D.B., Bojar, R.A., Farrar, M.D., Holland, K.T., 2009. Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* 290, 149-155.
- Holtfreter, S., Broker, B.M., 2005. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? *Arch Immunol Ther Exp* 53, 13–27.
- Hood, J.R., Wilkinson, J.M., Cavanagh, H.M.A., 2003. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. *Journal of Essential Oil Research* 15, 428-433.

- Hudaib, M., Aburjai, T., 2007. Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 322-327.
- Humble, M.W., King, A., Phillips, I., 1977. API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *Journal of clinical pathology* 30, 275-277.
- Husnu Can Baser, K., 2008. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design* 14, 3106-3120.
- Inouye, S., 2003. Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *International Journal of Aromatherapy* 13, 33-41.
- Inouye, S., Abe, S., 2007. Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie* 5, 2-4.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, Y., 2001. Antibacterial activity of essential oil and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 565-573.
- Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H., Hiramatsu, K., 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2637-2651.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2002. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1887-1891.
- Jorgensen, J.H., 1991. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococcus aureus and methods for laboratory detection. *Infection control and hospital epidemiology* 12, 14-19.
- Joubert, O., Viero, G., Keller, D., Martinez, E., Colin, D.A., Monteil, H., Mourey, L., Dalla Serra, M., Prevost, G., 2006. Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *The Biochemical journal* 396, 381-389.
- Katsuyama, M., Ichikawa, H., Ogawa, S., Ikezawa, Z., 2005. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *Journal of dermatological science* 38, 197-205.
- Kalemba, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry* 10, 813-829.
- Kambouche, N., El-Abed, D., 2003. Composition of the Volatile Oil from the Aerial Parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). *J. Essent. Oil Res.*, 15,39-40
- Kempf, M., Bakour, S., Flaudrops, C., Berrazeg, M., Brunel, J.M., Drissi, M., Mesli, E., Touati, A., Rolain, J.M., 2012. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS one* 7, e31676.
- Kernodle, D.S., Classen, D.C., Stratton, C.W., Kaiser, A.B., 1998. Association of Borderline Oxacillin-Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* with Surgical Wound Infections. *journal of clinical microbiology* 36, 219-222.
- Kesah, C., Ben Redjeb, S., Odugbemi, T., Boye, C., Dosso, M., Ndinya Achola, O., Koulla-Shiro, S., Benbachir, M., Rahal, K., Borg, M., 2003. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clinical Microbiology and Infection* 9.2. 153-156.

- Khadri, A., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Neffati, M., Smiti, S., Araújo, M.E.M., 2008. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and ¹³C NMR. *Food Chemistry* 109, 630-637.
- Koba, K., Sanda, K., Raynaud, C., Nenonene, Y. A., 2004. Millet, J., Chaumont, J.P. 2004. Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Ann. Méd. Vét.* 148, 202-206
- Kloos, W.E., Wolfshohl, J.F., 1982. Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system. *J Clin Microbiol* 16, 509-516.
- Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I., Pavela, R., 2012. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International* 47, 161-165.
- Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10, 505-520.
- Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 206-220.
- Kon, K.V., Rai, M.K., 2012. Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Rev. Anti infect. Ther* 10, 775-790.
- Köning, W.A., Hochmuth, D.H., Joulain, D., 2001. Terpenoids and related constituents of essential oils. University of Hambourg, Institute of Organic Chemistry, Hambourg, Germany.
- Kwok, A.Y.C., 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 87-92.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E.L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E.M., Vazquez, V., Hook, M., Etienne, J., Vandenesch, F., Bowden, M.G., 2007. *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315, 1130-1133.
- Ladhani, S., 2003. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 39, 181-189.
- Ladhani, S., Joannou, C.L., Lochrie, D.P., Evans, R.W., Poston, S.M., 1999. Clinical, Microbial, and Biochemical Aspects of the Exfoliative Toxins Causing Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. *clinical microbiology reviews* 12, 224–242.
- Laird, K., Phillips, C., 2012. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in applied microbiology* 54, 169-174.
- Larif, M., Ouhssine, M., Soulaymani, A., Elmidaoui, A., 2013. Potential effluent oil mills and antibacterial activity polyphenols against some pathogenic strains. *Research on Chemical Intermediates*, 1-13.
- Larkin, E., Carman, R., Krakauer, T., Stiles, B.G., 2009. *Staphylococcus aureus*: The Toxic Presence of a Pathogen Extraordinaire. *Current Medicinal Chemistry* 16, 4003-4019.

- Lattaoui, N., Tantaoui-Elaraki, A., 1994. Comparative Kinetics of Microbial Destruction by the Essential Oils of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. *Journal of Essential Oil Research* 6, 165-171.
- Leahy, T.R., Yau, Y.C., Atenafu, E., Corey, M., Ratjen, F., Waters, V., 2011. Epidemiology of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pediatric Cystic Fibrosis. *Pediatric pulmonology*.
- Lesieur, C., Vecsey-Semjen, B., Abrami, L., Fivaz, M., van der Goot, F., 1997. Membrane insertion: the strategies of toxins. *Mol Membr Biol* 14, 45-64.
- Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10, S122-129.
- Lewis, K., Ausubel, F., 2006. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology* 24, 1504-1507.
- Lis-Balchin, M., 2002. *Lavender The Genus Lavandula*. Medicinal and aromatic plants – industrial profiles Taylor & Francis.
- Liu, G.Y., 2005. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine* 202, 209-215.
- Lo, W.T., Tang, C.S., Chen, S.J., Huang, C.F., Tseng, M.H., Wang, C.C., 2009. Panton-Valentine leukocidin is associated with exacerbated skin manifestations and inflammatory response in children with community-associated staphylococcal scarlet fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49, e69-75.
- Low, D.E., 2006. Microbes fight back. *Nature Medicine* 12, 11.
- Lucchesi, M.E., Chemat, F., Smadja, J., 2004. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A* 1043, 323-327.
- Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., Hiramatsu, K., 2002. Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 1147-1152.
- Maalej, S.M., Rhimi, F.M., Fines, M., Mnif, B., Leclercq, R., Hammami, A., 2012. Analysis of Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) Strains Isolated in Tunisia. *J Clin Microbiol* 50, 3345-3348.
- Mahboubi, M., Ghazian Bidgoli, F., 2010. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine* 17, 548-550.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J.J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3140-3145.
- Marcel, J.P., 2005. L'antibiogramme et son impact médical. *antibiotiques* 7, 53-58.

- Massidda, O., Montanari, M.P., Mingoia, M., Varaldo, P.E., 1996. Borderline Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains Have More in Common than Reduced Susceptibility to Penicillinase-Resistant Penicillins. *antimicrobial agents and chemotherapy* 40, 2769–2774.
- Massidda, O., Montanari, M.P., Varaldo, P.E., 1992. Evidence for a methicillin-hydrolysing/3-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. *FEMS microbiology letters* 92, 223-228.
- May, J., Chan, C.H., King, A., Williams, L., French, G.L., 2000. Time–kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45, 639-643.
- Mc Lafferty, F.W., Stauffer, D.B., 1994. Wiley Registry of Mass Spectra Data, 6th Ed. Mass spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, Version 3.10d. Palisade:Newfield.
- McDougal, L.K., Thornsberry, C., 1986. The Role of β -Lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. *journal of clinical microbiology*, 23, 832-839.
- Miaskowski, C., Levine, J.D., 1992. Comments on the evaluation of drug interactions using isobolographic analysis and analysis of variance. *Pain* 51, 383-387.
- Montanari, M.P., Tonin, E., Biavasco, F., Varaldo, P.E., 1990. Further Characterization of Borderline Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Analysis of Penicillin-Binding Proteins. *antimicrobial agents and chemotherapy*, 34, 911-913.
- Moyler, D.A., 1993. Extraction of essential oils with carbon dioxide. *Flavour and Fragrance Journal* 8, 235-247.
- Mulyaningsiha, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M., 2010. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine* 17, 1061–1066
- Nadarajah, J., Lee, M.J., Louie, L., Jacob, L., Simor, A.E., Louie, M., McGavin, M.J., 2006. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol* 55, 1675-1683.
- Nagy, E., Maier, T., Urban, E., Terhes, G., 2009. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 15, 796–802.
- Nascimento, A.M., Brandao, M.G., Oliveira, G.B., Fortes, I.C., Chartone-Souza, E., 2007. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 92, 95-100.
- Nathan, C., 2004. Antibiotics at the crossroads. *Nature*. 431, 899-902.
- Nelson, R.S., 1997. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 40, 305-306.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod* 66, 1022-1037.

- Nicolson, K., Evans, G., O'Toole, P.W., 1999. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiology Letters* 179, 233-239.
- Nishifuji, K., Sugai, M., Amagai, M., 2008. Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *Journal of dermatological science* 49, 21-31.
- NIST, 1999. National Institute of Standards and Technology, PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Perkin Elmer Corp: Norwalk, CT.
- Normark, B.H., Normark, S., 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 252, 91-106.
- Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Sudano Roccaro, A., Alonzo, V., 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters* 230, 191-195.
- Nour, M., Mastouri, M., Ben Nejma, M., 2005. [Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: emergence and molecular basis]. *Pathologie-biologie* 53, 334-340.
- Oliveira, D.C., Lencastre, H., Tomasz, A., 2012. Evolution of Molecular Techniques for the Characterization of MRSA Clones. 571-592.
- Orafidiya, L.O., Agbani, E.O., Abereje, O.A., Awe, T., Abudu, A., Fakoya, F.A., 2003. An investigation into the wound-healing properties of essential oil of *Ocimum gratissimum* linn. *Journal of wound care* 12, 331-334.
- Orafidiya, L.O., Oyedele, A.O., Shittu, A.O., Elujoba, A.A., 2001. The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. *International Journal of Pharmaceutics* 224, 177-183.
- Oral, N.B., Vatansever, L., Aydin, B., Sezer, C., Güven, A., Gülmez, M., Başer, K., Kürkçüoğlu, M., 2010. Effect of Oregano Essential Oil on Biofilms Formed By *Staphylococci* and *Escherichia coli*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 16, S23-S29.
- Palavecino, E., 2007. Clinical, Epidemiological, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections. *Methods in Molecular Biology* 391, 1-19.
- Panton, P.N., Valentine, F.C.O., 1932. Staphylococcal Toxin. *The Lancet* 506-508.
- Pantosti, A., Sanchini, A., Monaco, M., 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* *Future Microbiol* 2, 323-334.
- Park, S.Y., Kim, S.M., Park, S.D., 2012. The Prevalence, Genotype and Antimicrobial Susceptibility of High- and Low-Level Mupirocin Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of dermatology* 24, 32-38.
- Parker, M.W., Feil, S.C., 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in biophysics and molecular biology* 88, 91-142.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R., 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.* 89, 39-46.

- Pefanis, A., Thauvin-eliopoulos, C., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., 1993. Activity of Ampicillin-Sulbactam and Oxacillin in Experimental Endocarditis Caused by 3-Lactamase- Hyperproducing *Staphylococcus aureus*. *antimicrobial agents and chemotherapy*. 37, 507-511.
- Petersson, A.C., Kamme, C., Miorner, H., 1999. Disk with High Oxacillin Content Discriminates between Methicillin-Resistant and Borderline Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains in Disk Diffusion Assays Using a Low Salt Concentration. *journal of clinical microbiology*. 37, 2047–2050.
- Petinaki, E., Arvaniti, A., Bartzavali, C., Dimitracopoulos, G., Spiliopoulou, I., 2002. Presence of *mec* Genes and Overproduction of Beta-Lactamase in the Expression of Low-Level Methicillin Resistance among *Staphylococci*. *Chemotherapy*. 48, 174–181.
- Plano, L., 2004. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. *Progress in Dermatology*. 122, 1070–1077.
- Prescott, L., Harley, J.P., Klein, D.A., 2002. *Microbiologie*. De Boeck ed, 1014.
- Prevost, G., Couppie, P., Prevost, P., Gayet, S., Petiau, P., Cribier, B., Monteil, H., Piemont, Y., 1995a. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J. Med. Microbiol.* 42, 237-245.
- Prevost, G., Cribier, B., Couppie, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-barbancon, V., Monteil, H., Piemont, Y., 1995b. Panton-Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 Are Encoded by Distinct Genetic Loci and Have Different Biological Activities. *infection and immunity*. 63, 4121–4129.
- Rajakaruna, L., Hallas, G., Molenaar, L., Dare, D., Sutton, H., Encheva, V., Culak, R., Innes, I., Ball, G., Sefton, A.M., Eydmann, M., Kearns, A.M., Shah, H.N., 2009. High throughput identification of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF-MS of intact cells. *Infection, genetics and evolution. journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 9, 507-513.
- Ramdani-Bouguessa, N., Bes, M., Meugnier, H., Forey, F., Reverdy, M.E., Lina, G., Vandenesch, F., Tazir, M., Etienne, J., 2006. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 1083-1085.
- Rammelkamp, C.H., Maxon, T., 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 51, 386-389.
- Rebiahi, S.A., Abdelouahid, D.E., Rahmoun, M., Abdelali, S., Azzaoui, H., 2011. Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). *Medecine et maladies infectieuses* 41, 646-651.
- Roller, S., Ernest, N., Buckle, J., 2009. The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *J Altern Complement Med.* 15, 275-279.
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R., 2008. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15. 635–638
- Ruimy, R., Armand-Lefevre, L., Barbier, F., Ruppe, E., Coccojaru, R., Mesli, Y., Maiga, A., Benkalfat, M., Benchouk, S., Hassaine, H., Dufourcq, J.B., Nareth, C., Sarthou, J.L., Andremont, A., Feil, E.J.,

2009. Comparisons between Geographically Diverse Samples of Carried *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 191, 5577-5583.
- Sabulal, B., Dan, M., J, A.J., Kurup, R., Chandrika, S.P., George, V., 2007. Phenylbutanoid-rich rhizome oil of *Zingiber neesatum* from Western Ghats, southern India. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 521-524.
- Sachiko Naritaa, J.K., Jun-ichi Chibaa, Yves PieÂmontb, Sophie Jarraudc,, Jerome Etienneec, Y.K., 2001. Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, Φ SLT. *Gene*. 268, 195-206.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 239, 488-491.
- Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M., Geider, K., 2008. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *Plos one* 3, e2843.
- Sauer, S., Kliem, M., 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 8, 74-82.
- Schlievert, P.M., Case, L.C., 2007. Molecular Analysis of Staphylococcal Superantigens. *Methods in Molecular Biology* 391, 113-126.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C., 2007. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Taylor & Francis Group.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R., 1984. separation of yeast chromosome-sized dnas by pulsed field gradient gel-electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Seng, P., Abat, C., Rolain, J.M., Colson, P., Lagier, J.-C., Gouriet, F., Fournier, P.E., Drancourt, M., La Scola, B., Raoult, D., 2013. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, Jean M., Raoult, D., 2009. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 49, 543-551.
- Seng, P., Rolain, J.M., Fournier, P.E., La Scola, B., Drancourt, M., Raoult, D., 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 5, 1733-1754.
- Seo, S.-M., Kim, J., Lee, S.-G., Shin, C.-H., Shin, S.-C., Park, I.-K., 2009. Fumigant Antitermitic Activity of Plant Essential Oils and Components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*), Caraway (*Carum carvi*), Dill (*Anethum graveolens*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), and Litsea (*Litsea cubeba*) Oils against Japanese Termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 6596-6602.
- Sevin, E., 1999. approche moléculaire de la résistance à la méticilline de *staphylococcus aureus*. *revue francophone des laboratoires* 315, 25-31.
- Shah, H.N., Rajakaruna, L., Ball, G., Misra, R., Al-Shahib, A., Fang, M., Gharbia, S.E., 2011. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF Mass Spectrometry and Artificial Neural Network Analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 34, 81-86.

Sherry, E., Boeck, H., Warnke, P., 2001. Percutaneous treatment of chronic MRSA osteomyelitis with a novel plant-derived antiseptic. *BMC Surgery* 1, 1.

Shiota, S., Shimizu, M., Mizusima, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Tsuchiya, T., 2000. Restoration of effectiveness of β -lactams on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by tellimagrandin I from rose red. *FEMS Microbiology Letters* 185, 135-138.

Shin, S., Kang, C. 2003. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*. 36, 111–115

Simic, N., Palic, R., Randjelovic, V., 2005. Composition and antibacterial activity of *Achillea clypeolata* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 20, 127–130.

Singh, S.B., Barrett, J.F., 2006. Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochemical pharmacology* 71, 1006-1015.

Skinner, S., Murray, M., Walus, T., Karlowsky, J.A., 2009. Failure of cloxacillin in treatment of a patient with borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J Clin Microbiol* 47, 859-861.

Speller, D.C.E., Johnson, A.P., James, D., Marples, R.R., Charlett, A., George, R.C., 1997. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989–95. *The Lancet* 350, 323-325.

Spratt, B.G., 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Current Opinion in Microbiology* 2, 312-316.

Standen, M., Myers, S., 2004. The roles of essential oils in the modulation of immune function and inflammation: survey of aromatherapy educators. *International Journal of Aromatherapy* 14, 150-161.

Steflitsch, W., Steflitsch, M., 2008. Clinical aromatherapy. *Journal of Men's Health* 5, 74-85.

Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L.A., Lewis, K., 2000. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1433-1437.

Stratton, C.W., Ratner, H.B., 1985. Thermonuclease test for same-day identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures. *J. Clin. Microbiol* 21, 995.

Suntar, I., Akkol, E.K., Keles, H., Oktem, A., Baser, K.H., Yesilada, E., 2011. A novel wound healing ointment: a formulation of *Hypericum perforatum* oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge. *J Ethnopharmacol.* 134, 89-96.

Süntar, I., Akkol, E.K., Keleş, H., Oktem, A., Başer, K.H.C., Yeşilada, E., 2011. A novel wound healing ointment: A formulation of *Hypericum perforatum* oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge. *Journal of Ethnopharmacology.* 134, 89-96.

Talbot, G.H., Bradley, J., Edwards, J.E., Gilbert, D., Scheld, M., Bartlett, J.G., 2006. Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 42, 657-668.

Tallarida, R.J., 1993. Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain.* 53, 365.

Tallarida, R.J., Porreca, F., Cowan, A., 1989. Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms. *Life sciences*. 45, 947-961.

Tang, Y., Stratton, C., 2010a. *Staphylococcus aureus*: An Old Pathogen with New Weapons. *Clin Lab Med* 30, 179-2008.

Tang, Y.W., Stratton, C.W., 2010b. *Staphylococcus aureus*: An old pathogen with new weapons. *Clin Lab Med*. 30, 179-208.

Thomsen, M.K., Rasmussen, M., Fuursted, K., Westh, H., Pedersen, L.N., Deleuran, M., Moller, J.K., 2006. Clonal spread of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to oxacillin in a dermatological hospital unit. *Acta dermato-venereologica*. 86, 230-234.

Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., Nazemi, J., 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*. 17, 142-145.

Tomasz, A., Drugeon, H.B., Lencastre, H.M., Jabes, D., McDougall, L., Bille, J., 1989. New Mechanism for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical Isolates That Lack the PBP 2a Gene and Contain Normal Penicillin-Binding Proteins with Modified Penicillin-Binding Capacity. *antimicrobial agents and chemotherapy* 33, 1869-1874.

Tomasz, A., Nachman, S., Leaf, H., 1991. Stable Classes of Phenotypic Expression in Methicillin-Resistant Clinical Isolates of *Staphylococci*. *antimicrobial agents and chemotherapy* 35, 124-129.

Van Vuuren, S., Viljoen, A., 2011. Plant-Based Antimicrobial Studies - Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. *Planta medica*. 77, 1168-1182.

Van Vuuren, S., Viljoen, A., 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr. J.* 22, 540-544.

Varshney, A.K., Martinez, L.R., Hamilton, S.M., Bryant, A.E., Levi, M.H., Gialanella, P., Stevens, D.L., Fries, B.C., 2010. Augmented production of Panton-Valentine leukocidin toxin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is associated with worse outcome in a murine skin infection model. *The Journal of infectious diseases*. 201, 92-96.

Verpoorte, R., Choi, Y.H., Kim, H.K., 2005. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. *Journal of ethnopharmacology*. 100, 53-56.

Vitale, R., Afeltra, J., Dannaoui, E., 2005. Antifungal Combinations, in: Ernst, E., Rogers, P.D. (Eds.), *Antifungal Agents*. Humana Press, pp. 143-152.

von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., Habich, D., 2006. Antibacterial natural products in medicinal chemistry - Exodus or revival? *Angew. Chem.-Int. Edit.* 45, 5072-5129.

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16, 97-110.

Walker, J., Fox, A.J., Edwards-Jones, V., Gordon, D.B., 2002. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *Journal of Microbiological Methods*. 48, 117-126.

Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.H., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., DeLeo, F.R., Otto, M., 2007. Identification of novel

cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 13, 1510-1514.

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

Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E., Tenover, F.C., 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 302, 1569-1571.

Weigelt, J.A., 2007. MRSA. Informa Healthcare. New York, 10016 .14.

Weller, T., 1999. The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43, 15–22.

Wertheim, H., Melles, D., Vos, M., Vanleeuwen, W., Vanbelkum, A., Verbrugh, H., Nouwen, J., 2005. The role of nasal carriage in infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 5, 751-762.

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

Wise, R.I., Ossman, E.A., Littlefield, D.R., 1989. personal reflections on nosocomial staphylococcal infections and the development of hospital surveillance. *Reviews of Infectious Diseases* 11, 1005-1019.

Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., Aepfelbacher, M., Christner, M., 2011. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International journal of medical microbiology*. 301, 64-68.

Wong-Beringer, A., Joo, J., Tse, E., Beringer, P., 2011. Vancomycin-associated nephrotoxicity: a critical appraisal of risk with high-dose therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37, 95-101.

Wong, H.C., Chen, S.Y., Chen, M.Y., Oliver, J.D., Hor, L.I., Tsai, W.C., 2004. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Vibrio vulnificus* strains isolated from Taiwan and the United States. *Applied and environmental microbiology*. 70, 5153-5158.

Yam, T.S., Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S., 1998. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2 ' synthesis, and beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 211-216.

Znini, M., Paolini, J., Majidi, L., Desjobert, J.M., Costa, J., Lahhit, N., Bouyanzer, A., 2012. Evaluation of the inhibitive effect of essential oil of *Lavandula multifida* L., on the corrosion behavior of C38 steel in 0.5 M H₂SO₄ medium. *Research on Chemical Intermediates* 38, 669-683

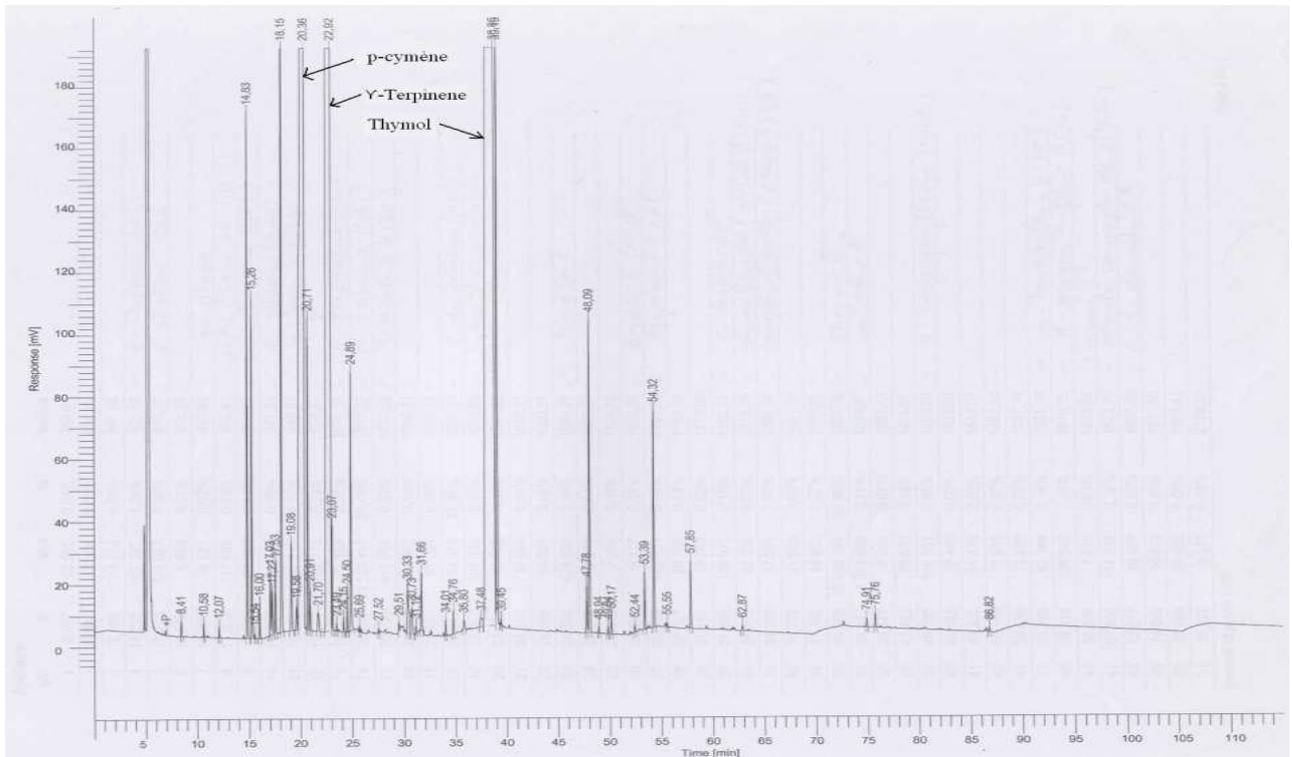
Annexes

Annexe 1 : Résultats d'identifications API

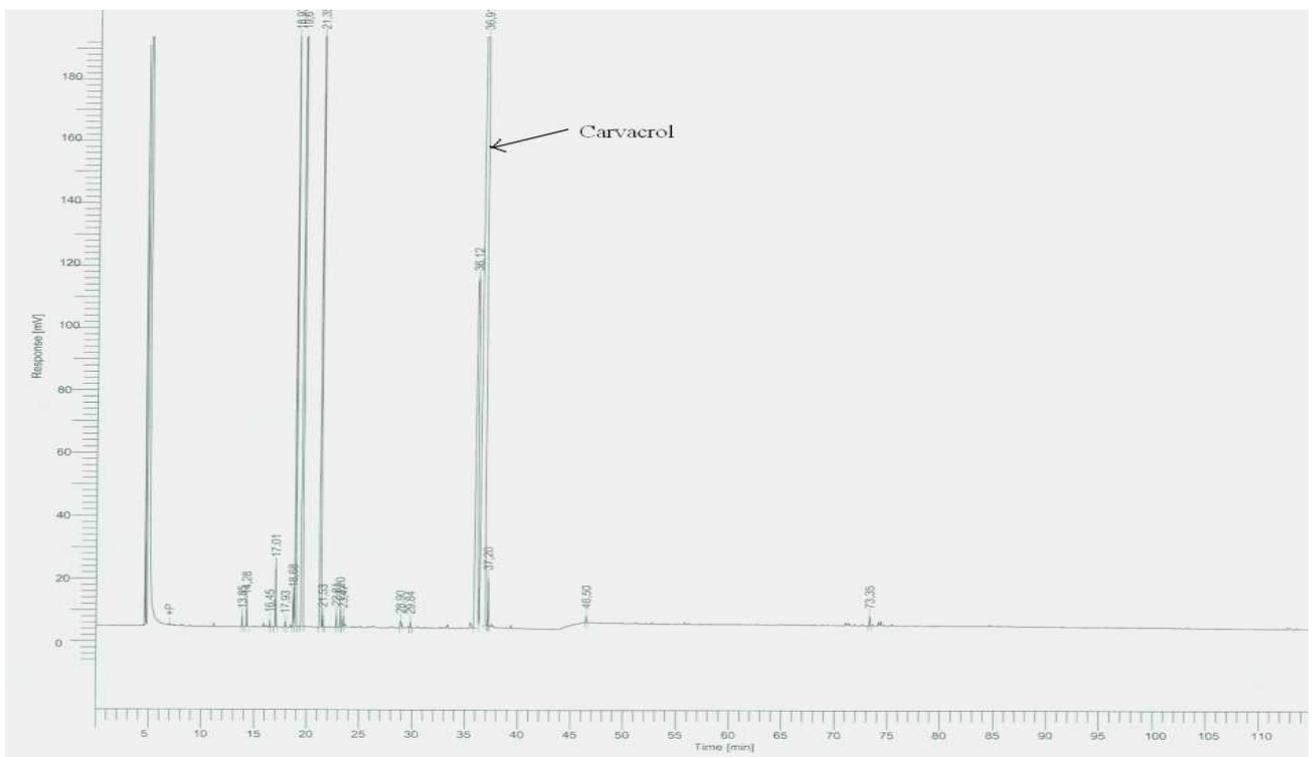
Nom de la souche	Espèce correspondant	Pourcentage	Biotype
Sa 350	<i>S.aureus</i>	66,3%	6736053
Sa P24	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 298	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa P14	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa P2B	<i>S.aureus</i>	95,2%	6736153
Sa 32	<i>S.aureus</i>	66,3%	6736053
Sa 301	<i>S.aureus</i>	66,3%	6736053
Sa P30	<i>S.aureus</i>	88,2%	6335053
Sa P7	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 310	<i>S.aureus</i>	64,2%	6737053
Sa D8	<i>S.aureus</i>	83,4%	6337053
Sa P16	<i>S.aureus</i>	83,4%	6337053
Sa 203	<i>S.aureus</i>	88,2%	6336053
Sa P17	<i>S.aureus</i>	90,7%	6337153
Sa 214	<i>S.aureus</i>	64,2%	6737053
Sa 102	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 132	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 414	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 16	<i>S.aureus</i>	96,5%	6726151
Sa Pc17	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 41	<i>S.aureus</i>	96,6%	6726153
Sa P15	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 235	<i>S.aureus</i>	86,1%	6736113
Sa 430	<i>S.aureus</i>	83,4%	6337053
Sa 10	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 357	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736253
Sa 137	<i>S.aureus</i>	70,8%	6737353
Sa 35	<i>S.aureus</i>	54,3%	6336111
Sa 232	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 26	<i>S.aureus</i>	89,1%	6736111
Sa 1	<i>S.aureus</i>	91,4%	6337151
Sa 302	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa M6	<i>S.aureus</i>	92,8%	6336151
Sa 300	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa Mi1	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 210	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa M9	<i>S.aureus</i>	92,8%	6336151
Sa 76	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
400	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa Pé15	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 314	<i>S.aureus</i>	66,3%	6736053
Sa 34	<i>S.aureus</i>	97,1%	6736151
Sa P41	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 209	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 304	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 204	<i>S.aureus</i>	86,1%	6736113
Sa Pé27	<i>S.aureus</i>	54,3%	6376111

Sa 305	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 378	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 371	<i>S.aureus</i>	77%	6736152
Sa 411	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 369	<i>S.aureus</i>	83,3%	6376153
Sa 354	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 368	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa Pé9	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 364	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 405	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 376	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 372	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 371	<i>S.aureus</i>	77%	6736152
Sa Pé8	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 404	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 366	<i>S.aureus</i>	61,8%	6736152
Sa 356	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 292	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa Pc304	<i>S.aureus</i>	77%	6736152
Sa 298	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa Pé23	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa Pé9	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 370	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 362	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 361	<i>S.aureus</i>	73,2%	6336051
Sa M20	<i>S.aureus</i>	65,5	6736152
Sa 238''	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 206	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa 298	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153
Sa P3B	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 363	<i>S.aureus</i>	77%	6736152
Sa Pé2A	<i>S.aureus</i>	93,9	6336153
Sa M11	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa 238''	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa M27	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa N7	<i>S.aureus</i>	92,9%	6336153
Sa 20	<i>S.aureus</i>	96,5%	6736152
Sa 14	<i>S.aureus</i>	77%	6336153
Sa 234	<i>S.aureus</i>	86,1%	6336153
Sa Pé1	<i>S.aureus</i>	97,8%	6736153
Sa P5A	<i>S.aureus</i>	93,9	6736153
Sa 296	<i>S.aureus</i>	93,9%	6336153

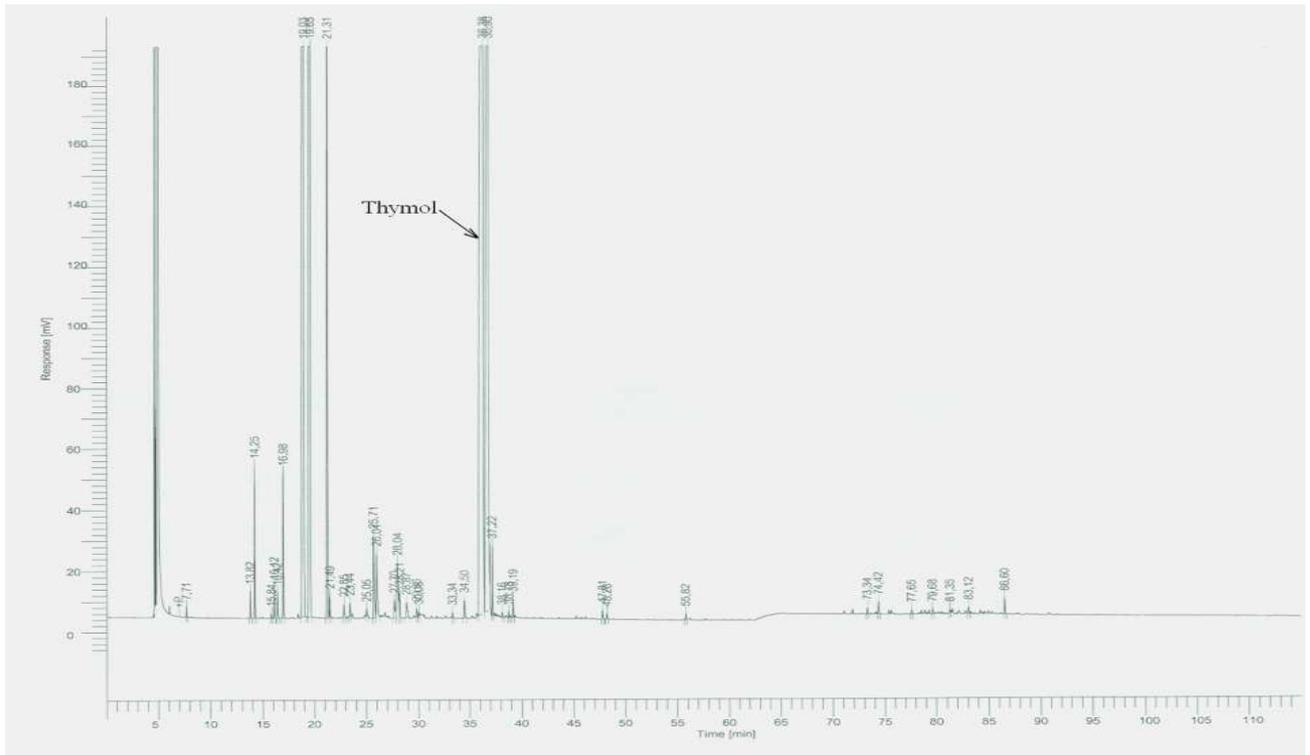
Annexe 2 : Chromatogrammes CG/SM des huiles essentielles étudiées



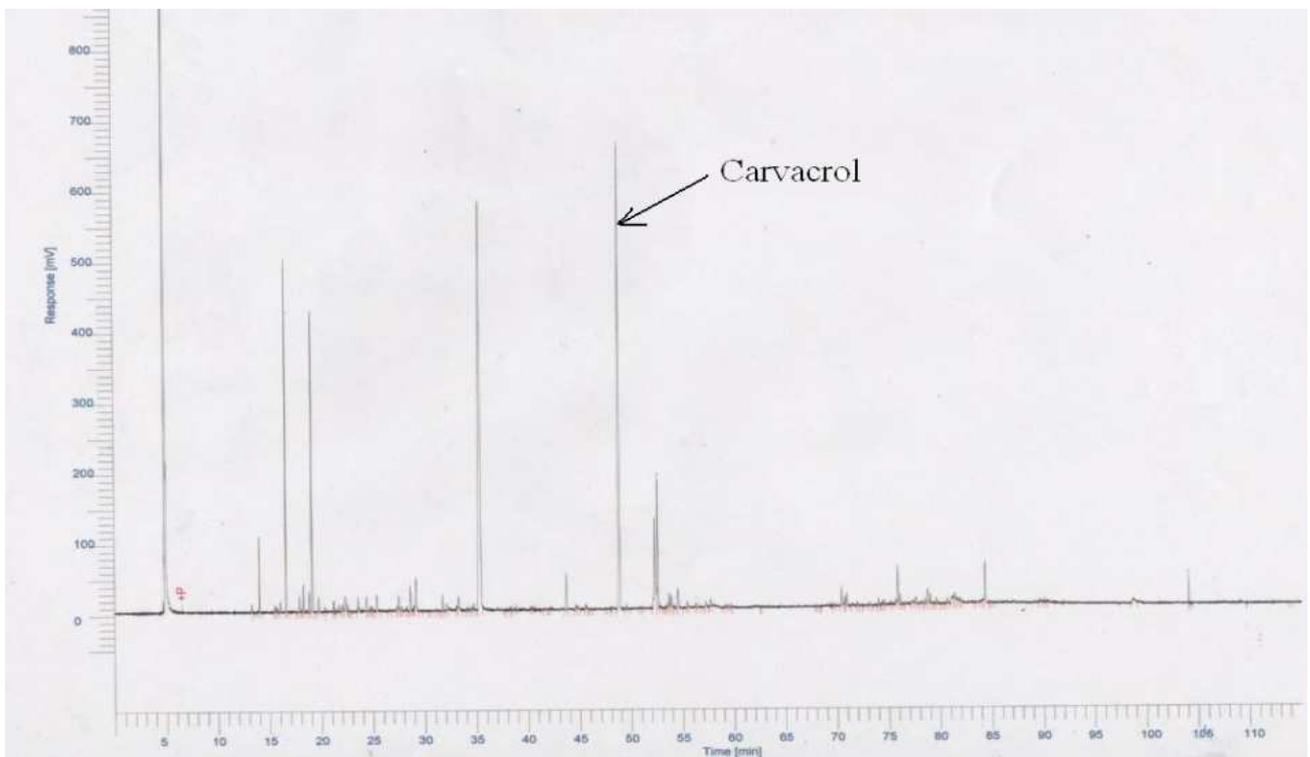
Chromatogramme CPG/SM de l'HE brute de *O. glandulosum*



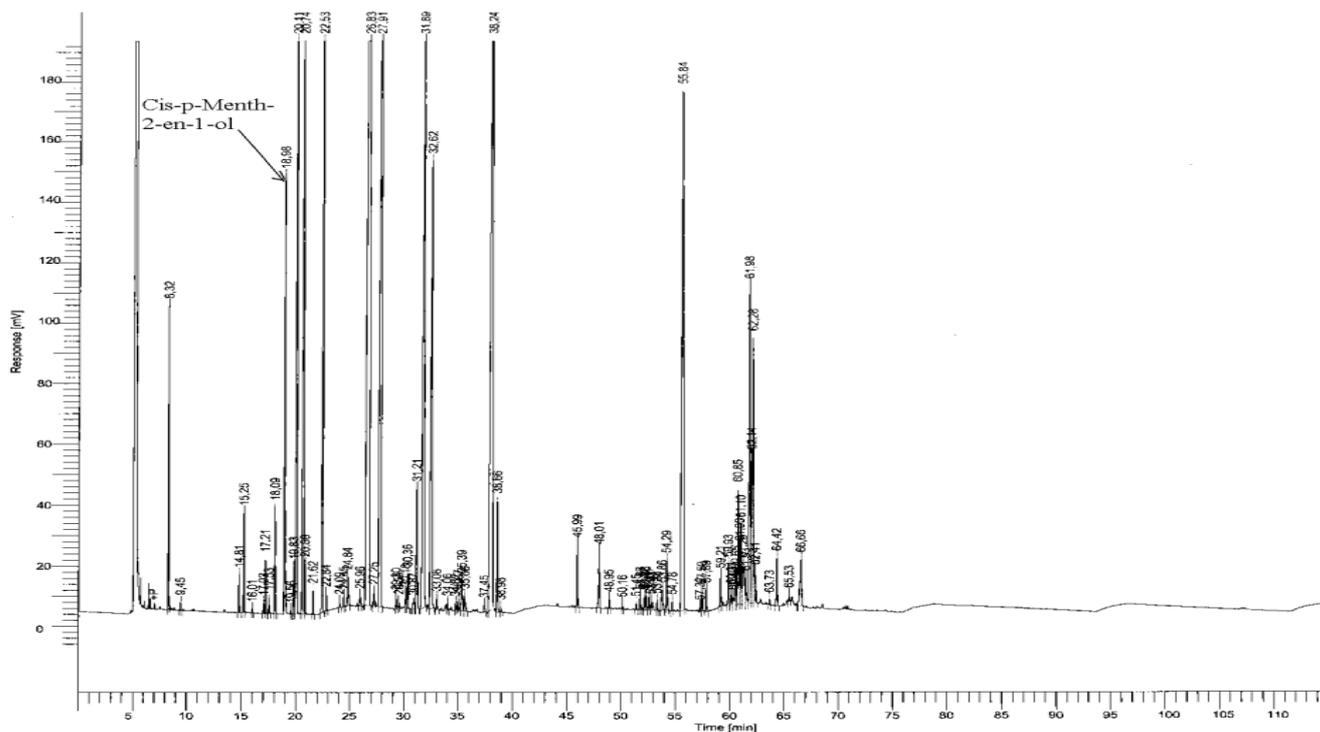
Chromatogramme CPG/SM de l'HE brute de *T. m. subsp. ciliatus* Desf.



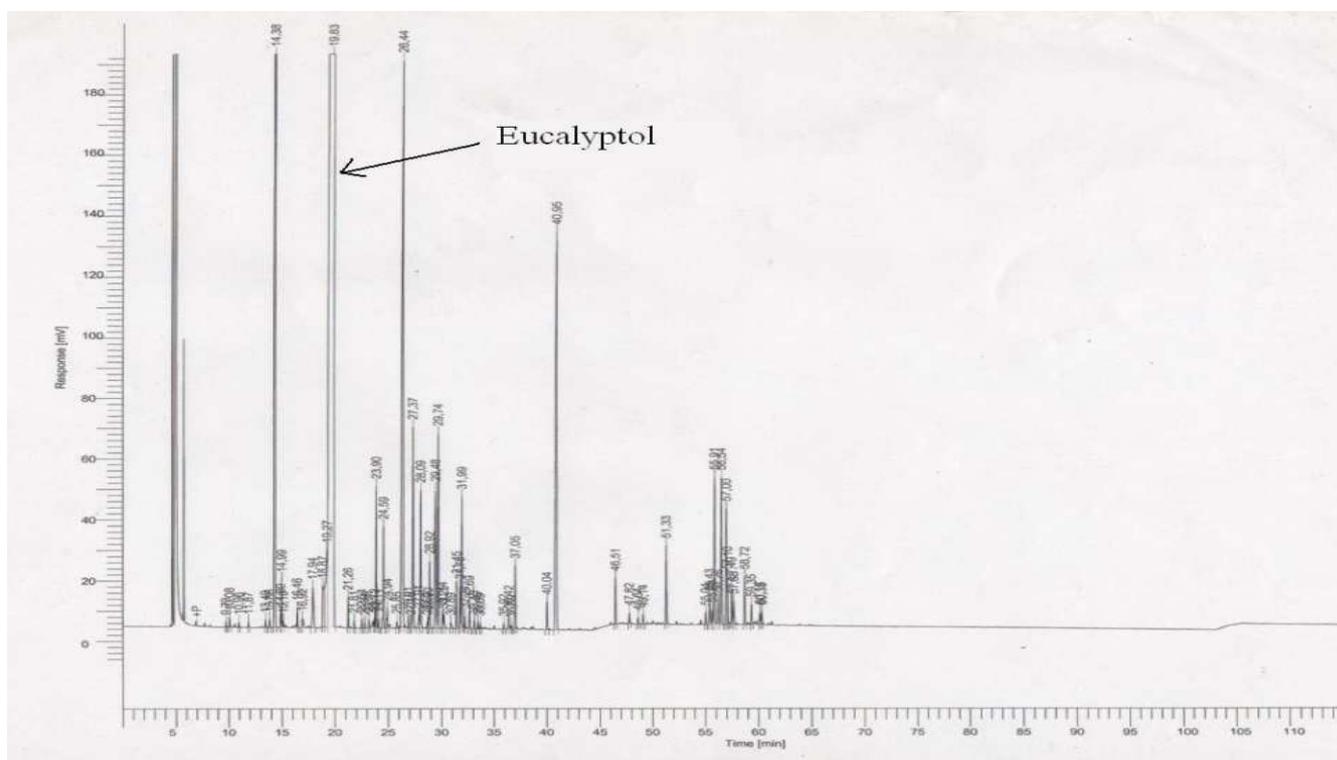
Chromatogramme CPG/SM de l'HE brute de *A. verticillata*



Chromatogramme CPG/SM de l'HE brute de *L. multifida*



Chromatogramme CPG/SM de l'HE brute de *C. schoenanthus*



Chromatogramme CPG/SM de l'HE brute de *Eucalyptus globulus*

Publications

Ce travail a fait l'objet de trois publications :

KHADIR Abdelmounaïm¹, BENDAHOU Mourad, BENBELAÏD Fethi, GHELLAÏ Lotfi, ABDOUNE Mohamed Amine, BELLAHSENE Chafika, ZENATI Fatima, ABDELOUAHID Djamel Eddine, MUSELLI Alain, PAOLLINI Julien, DESJOBERT Jean-Marie, COSTA Jean, 2013. Efficacy of the essential oil of *Origanum glandulosum* Desf against skin infections With PVL-producing *Staphylococcus aureus* strains in mice. African Journal of Microbiology Research. Vol. 7(20), pp. 2372-2377.

KHADIR Abdelmounaïm, BENDAHOU Mourad, BENBELAID Fethi, BELLAHCENE Chafika, ABDELOUAHID Djamel-Eddine, MUSEILI Alin, PAOLLINI Julien, DESJOBERT Jymy, COSTA Jean. 2013. Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants. Journal of Applied Pharmaceutical Science. Vol. 3 (07), pp. 018-024.

KHADIR Abdelmounaim, BENDAHOU Mourad, BENBELAID Fethi, ABDOUNE Mohamed Amine, BELLAHCENE Chafika, ZENATI Fatima, Abdelouahid Djamel-Eddine MUSEILI Alin, PAOLLINI Julien, COSTA Jean. 2013. Chemical composition and anti-MRSA activity of essential oil of *Lavandula multifida* L. from Algeria. Journal of Essential Oil Bearing Plants. (Publication acceptée)

Full Length Research Paper

Efficacy of the essential oil of *Origanum glandulosum* Desf against skin infections With PVL-producing *Staphylococcus aureus* strains in mice

KHADIR Abdelmounaïm¹, BENDAHOU Mourad*¹, BENBELAÏD Fethi¹, GHELLAÏ Lotfi¹,
ABDOUNE Mohamed Amine¹, BELLAHSENE Chafika¹, ZENATI Fatima¹, ABDELOUAHID
Djamel Eddine¹, MUSELLI Alain², PAOLLINI Julien², DESJOBERT Jean-Marie²
and COSTA Jean²

¹Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Nature and Life, Earth and Universe Sciences, AboubekrBelkaïd University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

²Université de Corse, Equipe Chimie des Produits Naturels, UMR-CNRS 6134, Quartier Grossetti, BP 52, 20250 Corti, France.

Accepted 3 May, 2013

Skin and soft tissue infections (SSTI) caused by staphylococcal toxins including Panton-Valentine leukocidin (PVL) have increased these last years. Treatment of these complicated infections is often difficult. The search for new methods and new antimicrobial substances is necessary. Natural products such as essential oils appear among the possible solutions. The objective of our work was to prove the effectiveness of treatment of these infections with essential oils *in vivo* on Wistar rats; we have chosen the oil of *Origanum glandulosum* from Algeria to perform this treatment because of its antiseptic properties. The treatment was done on infections induced in Wistar rats using PVL producing *Staphylococcus aureus* strain isolated from Tlemcen University Hospital. The results of our experiment have shown a significant decrease in the number of colonies collected from rats treated by the concentrations of 1 and 5% of *O. glandulosum* essential oil. The treatment of skin infections especially wounds caused by PVL positive *S. aureus* is possible with the essential oil of *O. glandulosum* which seems to be effective in eradicating the germ from infected wounds.

Key words: PVL-producing, *Staphylococcus aureus*, essential oil, skin infection, *Origanum glandulosum*.

INTRODUCTION

Skin and soft tissue infections (SSTI) are among the human diseases that have shown an alarming increase in the prevalence in recent years (Kaltsas et al., 2011). These infections are due to a variety of species of microorganisms among which *Staphylococcus aureus* is classified primarily (May et al., 2009). This species colo-

nizes the skin and wounds of patient by forming a biofilm that allows this organism to persist in this condition and produce toxins (Percival et al., 2011) of several types such as exfoliatins, toxic shock syndrome toxin TSST-1, enterotoxins and Panton-Valentine leukocidin (PVL), that is why this bacterium is among the spe-

* Corresponding author. E-mail: m_bendahou@mail.univ-tlemcen.dz.bendahou63@yahoo.fr.

cies that contain the largest number of virulence factors (Archer 1998).

PVL is associated with several skin diseases such as furunculosis (Del Giudice et al., 2011), cellulitis and skin abscess (del Giudice et al., 2009). It kills human polymorphonuclear leukocytes and is expressed at high toxic levels in human skin abscess (Badiou et al., 2008) and in necrotizing pneumonia (Labandeira-Rey et al., 2007). It is encoded by two genes, *lukF-PV* and *lukS-PV* which are transported horizontally by phages such as Φ SLT (Sachiko et al., 2001) and secreted by methicillin-susceptible *S. aureus* strains (MSSA) and methicillin-resistant strains (MRSA) circulating in community and hospital (Lo et al., 2009; Varshney et al., 2010). This toxin is sometimes produced at high level by methicillin-susceptible MSSA strains (Varshney et al., 2010). *In vivo* studies in mice have shown a positive correlation between the production of PVL and the damage of the infected wounds (Varshney et al., 2010). Treatment of such infections continues to report therapeutic failures (Nichols 1999) because of its complications that may develop kidney failure (Pereira et al., 2012). PVL may be responsible for serious infections, especially in children in neonatology (Dunlop and Eadie, 2011), but also in cases of infections with multidrug-resistant germs (Nichols 1999). Efficient and prompt treatment does not exist until now (Gillet et al., 2011). There is a need of a more convenient and less expensive treatment mainly during cutaneous infections with PVL-producing MSSA (Halcon and Milkus, 2004).

The search for new substances to better treat these infections is necessary (Nathwani, 2009). Natural products of plant origin such as essential oils seem to be a good way to replace the treatments with antibiotics (Warnke et al., 2009) since they constitute a reservoir of antimicrobial molecules (Edris, 2007), but also for their ability to inhibit virulence factors of *S. aureus* (Qiu et al., 2011) and quorum sensing (Szabo et al., 2010) in addition to their anti-biofilm effect (Quave et al., 2008), wound healing activity (Ipek et al., 2012) and stimulating the immune system response (Standen and Myers, 2004).

Origanum glandulosum, is a spontaneous (Basli et al., 2012) and endemic (Quezel and Santa 1963) plant of Northern Algeria, belonging to the *Lamiaceae* family. *O. glandulosum* is an interesting medicinal plant known by various therapeutic properties (Basli et al., 2012) namely the treatment of whooping cough, cough, fever and bronchitis (Sari et al., 2006), and its antiseptic use traditionally on skin used in baths (Belhattab et al., 2005). The antimicrobial activity of *O. glandulosum* essential oil was studied in previous studies; Bekhechi et al. (2008) have demonstrated the antimicrobial activity of *O. glandulosum* essential oil against various species of fungi and bacteria including three *S. aureus* strains, two

reference strains ATCC 601 and ATCC 43866 and one clinical strain. The results show a strong anti-staphylococcal activity with inhibition diameters ranging from 22 to 25 mm with the vincent method (Bekhechi et al., 2008). In the other hand, Bendahou et al. (2008) tested *O. glandulosum* essential oil obtained by hydro-distillation and microwave extraction on microbial species; among them, one strain was *S. aureus*. The two types of essential oil showed strong activity against *S. aureus* strain with an inhibition diameter of 23 mm (Bendahou et al., 2008).

In the absence of *in vivo* treatment with essential oils of infections due to *S. aureus* toxin-producing strains, specifically the Pantone-Valentine leukocidin, we had the idea to make this work which involves inducing skin infection in mice with PVL-producing *S. aureus* strains, then making a treatment with essential oil obtained from an Algerian medicinal plant, *O. glandulosum*.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Bacterial strains

One *S. aureus* strain was selected from a number of clinical strains to be used in this work based on its PVL toxin production. This strain was isolated from skin infections at University Hospital of Tlemcen. The identification was realized with API Staph gallery, BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France. This identification was confirmed using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDITOF-MS) (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) (Seng et al., 2010).

Animals

Twelve (12) Wistar rats of weight between 20 and 22 g adult males were used for this experiment. The strains were provided by Pasteur Institute of Algeria. The rats were left for 48 h before the experiment as an acclimatization phase; water and feed were provided to rats. Experiments on these animals were done according to the European decree on ethical rules Directive 86/609/EEC. The rats were divided into two groups: the first group consisted of six rats. Five rats suffered an infection and one uninfected rat represents the negative control. Among the infected in this group, one rat was used as a positive control. The second group suffered the same conditions except for the positive control, which in addition to the infection; this rat was exposed to a treatment with paraffin oil (BIOCHEM Chemopharma) alone.

The negative control of the first group has neither been infected nor undergone incisions and it was treated with essential oil diluted to 5% in paraffin; while, the negative control of the second group underwent incisions but was not infected.

Plant materials

The plant material was harvested in full flowering stage during June 2011 in Sebdou located in south of Tlemcen (Algeria, 34°69'41.32"

to 1°31'70.72"). The species identification was confirmed by the Laboratory of Botany, University of Tlemcen. A specimen was deposited at the herbarium of this laboratory under code Lb.06.

Obtaining essential oil was made by hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The oil obtained was dehydrated by anhydrous sodium sulfate and then kept at a temperature of 4°C and protected from the effect of light until analysis.

Methods

PCR amplification

The search for the *PVL* gene was made by real time polymerase chain reaction (PCR) using a StratageneMx 3000 apparatus and TaqMan probe primers as previously described (Francois et al., 2004).

F> (5'-AAAATGCCAGTGTATCCAGAGGTA-3')

R> (5'-TTTGCAGCGTTTTGTTTTTCG-3')

Prob (5'-CTTCAATCCAGAATTTATTGGTGT-3').

Induction of infection

The rats used for the experiment had a local anesthesia (Suntar et al., 2011). Then, they were been shaved at the back dorsal part with an electric razor and cleaned with 70% ethanol; three superficial incisions were made using sterile surgical blade (Varshney et al., 2010). Then 20 µl of the bacterial suspension of PVL positive *S. aureus* at 10⁷ CFU/ml was introduced directly into the incisions in the wounds for a development of infection with PVL-positive *S. aureus*. Then, each rat was isolated in a separate cage to avoid contamination between rats. Cages were subjected to regular cleanings with detergents.

GC/MS analysis

The analysis of the essential oil of *O. glandulosum* was performed on an Auto system Perkin Elmer GC-type apparatus with standard non polar/polar capillary columns coupled with a mass spectrometer Perkin Elmer Turbo Mass detector.

Susceptibility tests

The susceptibility of the strain used in this experiment to the essential oil was evaluated by the disk method of Bauer and Kirby. In short, a culture of 18 h on BHIB (brain heart broth, CondaPronadisa™, Spain) was standardized to 10⁸ CFU/ml, then inoculated by swabbing the surface of Mueller-Hinton agar (FlukaBioChemika, Spain) according to the recommendation of CLSI 2010. Sterile filter paper disks (Whatman No. 2) with 6 mm diameter were impregnated with 2 µl of essential oil, and then the disks were placed on the surface of Mueller-Hinton medium. The minimum inhibitory concentration has been also calculated by the method of microdilution (Mann and Markham, 1998). Susceptibility tests were made in triplicate.

Treatment

Treatment with essential oil of *O. glandulosum* Desf., has been

made in preparing four oil concentrations in the pure paraffin (BIOCHEM Chemopharma) (5, 1, 0.5 and 0.25%).

The treatment was applied to the infected rats by spreading 500 µl of the solution directly on the infected wounds. Before each treatment, a swabbing is performed then the swab is inserted into a tube of 5 ml of sterile physiological saline while the solution was vortexed. For each sample, four successive dilutions were made, 100 µl of each dilution was then deposited on to mannitol salt agar (Merck). The inoculation was then performed by a sterile swab and incubation was for 24 h at 37°C for enumeration. The colony forming unit (CFU) values determination was determined according to Petrou et al. (2012). After incubation, the colony count was done directly on agar plate for dilutions which have colonies numbers between 30 and 300 colonies, and then the number of colony was expressed in decimal logarithm. Standard deviation was calculated with the difference between the two replication values of CFU of each dilution.

RESULTS

Identification of *S. aureus* strain used in this experiment by API Staph bioMerieux gave a biotype 6726153. This identification was confirmed by using MALDI-TOF MS with a score greater than 2. The results of PCR amplification have shown that the strain used in this work was a PVL-positive strain as shown in Figure 1 among a number of clinical strains. This strain was selected for the experiment.

The extraction of our oil by hydrodistillation gave a yield of 5%. *O. glandulosum* essential oil is rich in thymol (42.3%), *p*-cymene (17.6%) and γ -terpinene (25.9%) (Table 1). The antibacterial activity of our oil to PVL-positive strain tested in this experiment gave high inhibition diameter of 42 mm using only 2 µl of oil, resulting to extreme antimicrobial activity (Ponce et al., 2003) and an MIC of 0.0625 µl/ml.

All rats have developed an infection after 24 h of incubation. The infection was characterized by production of pus around the incision. No mortality was observed, and no sign of inflammation or susceptibility to oil was observed for the negative control.

The treatment of skin infections by PVL-positive *S. aureus* in rats with *Origanum glandulosum* has shown a decrease in the number of CFU for all the concentrations used (Figure 2). After the first treatment, there was a stability in the number of colonies for concentrations 0.25, 0.5 and 1%, while for the concentration of 5%, a slight decrease was observed after the first treatment, whereas the second treatment has shown a significant reduction in number of CFU for the concentration of 5% by 0.93 log₁₀ and a slight decrease for 1% concentration. For the third treatment, a severe reduction of CFU for the concentration of 5% by 1.8 log₁₀ and for 1% by 1.06 log₁₀ was observed; also, a remarkable decrease in the concentrations 0.5 and 0.25% which have shown a stability of CFU in the first

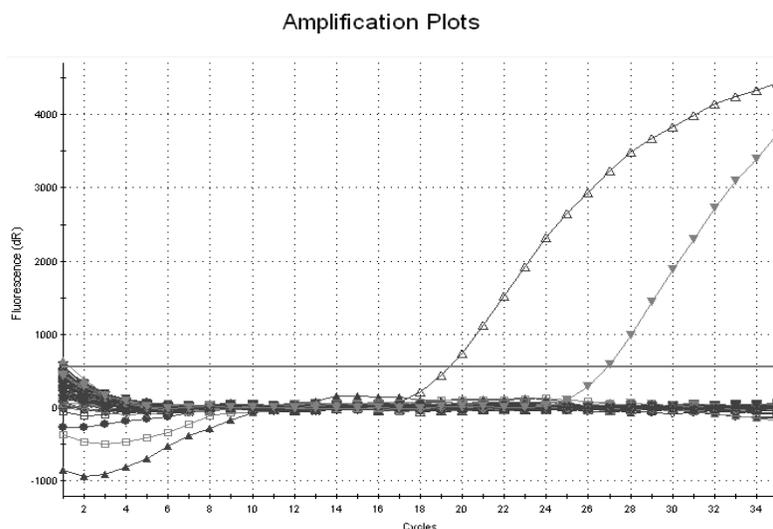


Figure 1. Real-time PCR amplification of PVL-positive *Staphylococcus aureus*: ▲, Positive control; ▽ PVL-positive strain.

Table 1. The major compounds of *Origanum glandulosum* Desf.

Compound	R1a	R1p	%
p-Cymene	1011	1268	17.6
Limonene	1020	1199	0.9
γ-Terpinene	1047	1243	25.9
Thymol	1266	2189	42.3
Carvacrol	1278	2219	02.3
Monoterpene hydrocarbons			52.2
Oxygenated monoterpenes			45.7

R1a and R1p are retention index on RTX-1 apolar column and RT-Wax polar column, respectively

two treatments.

In the fourth treatment, we clearly saw an eradication of the germ from the infection sites for 5% concentration and a very substantial reduction in the concentration of 1% by 1.28 log₁₀.

The fifth treatment reveals a total eradication of CFU for the concentration of 5% while a dramatic decrease in the number of CFU by 1.69 log₁₀ and 1.3 log₁₀ for the concentrations 1 and 0.5% respectively, while for the two positive controls no decrease was observed and the number of CFU was stable during the treatment days.

DISCUSSION

From these results, we can say that treatment with a 5%

concentration allows a rapid eradication of the organism in five days but the concentration 1% allows a considerable reduction of infection with 1.69 log₁₀ in five days of treatment, while the positive control have shown a stable number of CFU which confirms the strong colonization of the site of infection by this pathogen in the absence of treatment (Figure 2). We can deduce that this treatment with the essential oil is concentration dependent. We can also say that the concentrations in the range between 1 and 5% may be effective in eradicating this organism producing PVL toxin, this efficiency is due to the low MIC of this strain to our essential oil which has a value of 0.0625 μl/ml.

If we compare our results with those obtained with reference molecules such as mupirocin tested by Gisby and Bryant (2000), we will notice that *O. glandulosum* oil has a stronger effect. In the study performed by Gisby and Bryant (2000); the authors demonstrated that mupirocin cream at 2% reduces CFU from 7.23 log₁₀ to 2.51 log₁₀ as a reduction of 65.28% on the fifth day of treatment. While *O. glandulosum* oil only in concentration of 1% gave a reduced number of CFU from 2.19 log₁₀ to 0.5 log₁₀ as a reduction of 77.16% in the fifth day of treatment. This confirms the effectiveness of *O. glandulosum* oil treatment. In addition, there is an urgent need to look for other substances to replace mupirocin because of the spread of *S. aureus* resistant strains to this molecule (Park et al., 2012).

In our work, we demonstrated treatment of skin infection produced by PVL-positive *S. aureus* with essential oil from *O. glandulosum* Desf. Our choice of the PVL-positive strain of *S. aureus* was based on ability to cause more serious infections in mice than PVL-

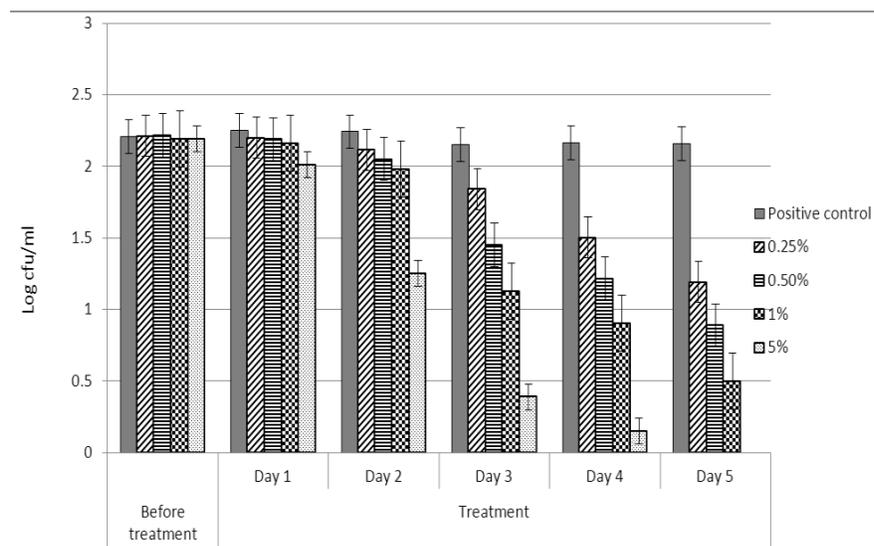


Figure 2. The effect of essential oil on reducing the number of CFU from the infected wounds by PVL-producing *Staphylococcus aureus*.

negative strains (Varshney et al., 2010) to prove the efficacy of this treatment against infections complicated and difficult to treat. Our oil has allowed a good eradication of the number of CFU at concentrations higher than 1%. This *in vivo* activity is mainly due to content in thymol (42.3%) which has the highest toxic activity against the membrane of *S. aureus* by inducing permeability (Cristani et al., 2007) and acts in the same manner in MRSA and MSSA (Nostro et al., 2004). This activity is also due to γ -terpinene and *p*-cymene which have significant amount of 25.9 and 17.6%, respectively and are known for their cytotoxic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Cristani et al., 2007). The mechanism of action of these three monoterpenes is due to penetration into the plasma membrane and the disruption of lipid fractions and other membrane functions (Cristani et al., 2007).

S. aureus colonizes the wounds in the form of a biofilm that is not treatable with antibiotics (Katsuyama et al., 2005) and only the action of polymorphonuclear leukocytes which is capable of destroying this biofilm (Akiyama et al., 2002). The problem with infection by PVL-positive *S. aureus* is that leukocytes are destroyed by the PVL which explains the complication of these infections being difficult to treat. Our results show that the essential oil of *O. glandulosum* Desf., has a remarkable effect on the eradication of this PVL-producing germ in infected wounds. These results leave us to think that this essential oil that has been used medicinally for several therapeutic purposes in Algeria can be a good solution to fight against skin infection due to PVL-producing *S.*

aureus. For this purpose, we assume that the herbal treatment with essential oils is possible in the form of an ointment or lotion and can be an alternative treatment to antibiotics in infections difficult to treat such as SSTI caused by PVL-producing *S. aureus*.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank ROLAIN Jean-Marc from « Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes (URMITE) Marseille » for Real time PCR amplification and MALDI-TOF MS identification.

REFERENCES

- Akiyama H, Huh W-K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K (2002). Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in mouse skin: does *S. aureus* generally produce a biofilm on damaged skin? Br. J. Dermatol.147: 879-885.
- Archer GL (1998). *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. Clin. Infect. Dis. 26: 1179-1181.
- Badiou COD, Croze M, Gillet Y, Dohin B, Slayman D H, Allaouchiche B, Etienne J, Vandenesch F, Lina G (2008). Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. Clin. Microbiol. Infect. 14: 1173-1186.
- Basli A, Chibane M, Madani K, Oukil N (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. Phytothérapie 10: 2-9.
- Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Abdelouahid DE (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. Phytothérapie 6: 153-159.
- Belhattab R, Larous L, Figueiredo AC, Santos PAG, Barroso JG, Pedro LG (2005). *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria:

- essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Fragr. J.* 20:209-212.
- Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert J-M, Bernardini A-F, Costa J (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106:132-139.
- Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli DVV, Bisignano G, Saija A, Trombetta D (2007). Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *J. Agric. Food Chem.* 55:6300-6308.
- Del Giudice P, Bes M, Hubiche T, Blanc V, Roudiere L, Lina G, Vandenesch F, Etienne J (2011). Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains are associated with follicular skin infections. *Dermatology* 222:167-170.
- del Giudice P, Blanc V, de Rougemont A, Bes M, Lina G, Hubiche T, Roudiere L, Vandenesch F, Etienne J (2009). Primary skin abscesses are mainly caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains. *Dermatology* 219:299-302.
- Dunlop RL, Eadie P (2011). Idiopathic neonatal necrotizing fasciitis caused by community-acquired MSSA encoding Panton Valentine Leukocidin genes. *J. Plast Reconstr. Aesthet. Surg.* 64: 1522-1524.
- Edris AE (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytother. Res.* 21:308-323.
- Francois P, Renzi G, Pittet D, Bento M, Lew D, Harbarth S, Vaudaux P, Schrenzel J (2004). A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome mec elements. *J. Clin. Microbiol.* 42:3309-3312.
- Gillet Y, Dumitrescu O, Tristan A, Dauwalder O, Javouhey E, Floret D, Vandenesch F, Etienne J, Lina G (2011). Pragmatic management of Panton-Valentine leukocidin-associated staphylococcal diseases. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38:457-464.
- Gisby J, Bryant J (2000). Efficacy of a New Cream Formulation of Mupirocin: Comparison with Oral and Topical Agents in Experimental Skin Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:255-260.
- Halcon L, Milkus K (2004). *Staphylococcus aureus* and wounds: A review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *Am. J. Infect. Control* 32:402-408.
- Ipek SIT, Osman U, Hikmet K, Esra KA (2012). Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by in vivo and in vitro experimental models. *J. Ethnopharmacol.* 139:533- 540.
- Kaltsas A, Guh A, Mediavilla JR, Varshney AK, Robiou N, Gialanella P, Henry M, Levi MH, Fries BC (2011). Frequency of panton-valentine leukocidin-producing methicillin-sensitive *Staphylococcus* strains in patients with complicated skin and soft tissue infection in bronx, new york. *J. Clin. Microbiol.* 49:2992-2995.
- Katsuyama M, Ichikawa H, Ogawa S, Ikezawa Z (2005). A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *J. Dermatol. Sci.* 38:197-205.
- Labandeira-Rey M (2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315:1130-1133.
- Lo WT, Tang CS, Chen SJ, Huang CF, Tseng MH, Wang CC (2009). Panton-Valentine leukocidin is associated with exacerbated skin manifestations and inflammatory response in children with community-associated staphylococcal scarlet fever. *Clin. Infect. Dis.* 49:e69-75.
- Mann CM, Markham JL (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol.* 84:538-544.
- May A, Stafford R, Bulger E, Heffernan D (2009). Treatment of Complicated Skin and Soft Tissue Infections. *Surg. Infect.* 10(5):467-499.
- Nathwani D (2009). New antibiotics for the management of complicated skin and soft tissue infections: are they any better? *Int. J. Antimicrob. Agents* 34(S1):S24-S29.
- Nichols R (1999). Optimal treatment of complicated skin and skin structure infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:19-23.
- Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Sudano Roccaro A, Alonzo V (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230:191-195.
- Park SY, Kim SM, Park SD (2012). The prevalence, genotype and antimicrobial susceptibility of high- and low-level mupirocin resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Dermatol.* 24: 32-38.
- Percival S, Emanuel C, Cutting K, Williams DW (2011). Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int. Wound J.* 9:14-32.
- Pereira G, Guevara M, Fagundes C, Sola E, Rodriguez E, Fernandez J, Pavesi M, Arroyo V, Gines P (2012). Renal failure and hyponatremia in patients with cirrhosis and skin and soft tissue infection. A retrospective study. *J. Hepatol.* 56:1040-1046.
- Petrou S, Tsiraki M, Giatrakou V, Savvaidis IN (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *Int. J. Food Microbiol.* 156:264-271.
- Ponce AG, Fritz R, del Valle C, Roura SI (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Sci. Technol.* 36:679-684.
- Qiu J, Wang J, Luo H, Du X, Li H, Luo M, Dong J, Chen Z, Deng X (2011). The effects of subinhibitory concentrations of costus oil on virulence factor production in *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 110:333-340.
- Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 118:418-428.
- Quezel P, Santa S (1963). *Nouvelles flores de l'Algerie et des regions desertiques meridionales*. T. II, CNRS, Paris, France.
- Sachiko NJK, Jun-ichi C, Yves P, Sophie J, Jerome EYK (2001). Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, Φ SLT. *Genes* 268:195-206.
- Sari M, Biondi DM, Kaâbeche M, Mandalari G, D'Arrigo M, Bisignano G, Saija A, Daquino C, Ruberto G (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour Fragr. J.* 21: 890-898.
- Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 5:1733-1754.
- Standen M, Myers S (2004). The roles of essential oils in the modulation of immune function and inflammation: survey of aromatherapy educators. *Int. J. Aromather.* 14:150-161.
- Suntar I, Akkol EK, Keles H, Oktem A, Baser KH, Yesilada E (2011). A novel wound healing ointment: a formulation of Hypericum perforatum oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 134:89-96.
- Szabo MA, Varga GZ, Hohmann J, Schelz Z, Szegedi E, Amaral L, Molnar J (2010). Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytother. Res.* 24:782-786.
- Varshney AK, Martinez LR, Hamilton SM, Bryant AE, Levi MH, Gialanella P, Stevens DL, Fries BC (2010). Augmented production of Panton-Valentine leukocidin toxin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is associated with worse outcome in a murine skin infection model. *J. Infect Dis.* 201:92-96.
- Warnke PH, Becker ST, Podschun R, Sivananthan S, Springer IN, Russo PA, Willfang J, Fickenscher H, Sherry E (2009). The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *J. Craniomaxillofac Surg.* 37:392-397.

Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants

KHADIR Abdelmounaim¹, BENDAHOU Mourad^{1,*}, BENBELAID Fethi¹, BELLAHCENE Chafika¹, ABDELOUAHID Djamel-Eddine¹, MUSEILI Alin², PAOLLINI Julien², DESJOBBER Jymy², COSTA Jean²

¹Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Nature and Life, Earth and Universe Sciences, Aboubekr Belkaïd University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

²UMR De Produits naturels, Université Pascal Paoli, Corte, France.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: 29/03/2013

Revised on: 07/04/2013

Accepted on: 06/05/2013

Available online: 30/07/2013

Key words:

MRSA, essential oils, kinetics of destruction, bactericidal.

ABSTRACT

In this work, we evaluated the anti-MRSA activity of essential oils obtained from four Algerian medicinal plants which are: *Ammoides verticillata*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*, *Lavandula multifida*, and *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus*. The anti-MRSA activity was evaluated by the technique of agar diffusion and determination of MICs. We also studied the kinetics of destruction of these oils against MRSA strain ATCC 43300. The four essential oils showed a good anti-MRSA activity. Oils with the highest activity are; *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*, *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus*, *Lavandula multifida* and *Ammoides verticillata* respectively. The kinetics of destruction of all essential oils against MRSA ATCC 43300 strain is dependent on concentration. The Concentration 1% allows a total destruction; while the concentration 0.5% was bactericidal only with *Origanum vulgare*, whereas the concentration 0.25% and 0.125% have had a low destruction respectively. We concluded that the essential oils can be used as an anti-MRSA.

INTRODUCTION

The rapid emergence of antibiotic resistance over the past six decades has been accompanied by a decrease in production of new antimicrobial agents (Talbot et al., 2006). This slowdown is mainly due to the lack of discovery of new molecules of antibiotics (Fischbach and Walsh 2009), but also to the lack of research programs on these molecules, since the pharmaceutical industry has reduced its research in this field because of its low profitability (Nathan 2004, von Nussbaum et al., 2006).

MRSA is now ranked among the top pathogen causing fatal nosocomial infections in hospital and community (Chambers and DeLeo 2009) with several types of skin infections, mucous membranes and endocarditis. It is also responsible for severe lung infections such as fatal necrotizing pneumonia (Tang and Stratton 2010). Initially sensitive to penicillin, *Staphylococcus aureus* was able to adapt quickly to the action of antimicrobial agents by creating of many mechanisms of resistance against most

antibiotics (Descloux et al., 2007). The acquisition of the *mecA* gene that codes for the protein (PBP2') (or PBP 2a) gives *Staphylococcus aureus* resistance to methicillin and most β -lactams (Deurenberg and Stobberingh 2008).

Another mechanism involved in multidrug resistance of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* MRSA to many classes of antibiotics other than the β -lactam antibiotics, is the efflux pumps that allow for the pathogen to remove the molecules of antibiotics which penetrate inside the cell to the extracellular medium (Piddock 2006). Glycopeptides are the last lines of defense effective in treating MRSA infection, however strains with reduced susceptibility or resistance to these molecules have been described (Tenover 1998, Tenover 2001).

In addition, there is another problem with these drugs which is their nephrotoxicity (Daurel and Leclercq 2010, Wong-Beringer et al., 2011). That is why the discovery and development of new antimicrobial agents and new classes of antibiotics is a need for emergency (Fischbach and Walsh 2009, Mohtar et al., 2009). In recent years, a growing interest focused on valorization of natural plant extracts which showed anti-bacterial properties, in particular against MRSA (Palaniappan and Holley 2010).

* Corresponding Author

BENDAHOU Mourad,
email: bendahou63@yahoo.fr,
BP1080, 13000 Tlemcen-Algeria

Tel: +213 43204279 Fax: +213 43203719

The natural plant extracts may contain interesting antibacterial compounds that can be considered as a new strategy to fight against nosocomial infections (Palaniappan and Holley 2010, Ramalmete *et al.*, 2011). Many recent studies have evaluated the antimicrobial activity of essential oils on bacteria, including those involved in nosocomial infections (Billerbeck 2008), Nevertheless, a few studies have been conducted on eradication of nosocomial pathogen such as MRSA.

In this work we evaluated the effect of four essential oils obtained from Algerian medicinal plants which are *Amoides verticillata*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*, *Lavandula multifida*, and *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* on 19 clinical MRSA, two references MRSA and three references methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* MSSA strains. We also studied the kinetics of destruction of these oils on reference MRSA strain ATCC 43300.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Aerial parts of the medicinal plant species (stems, leaves and flowers) used in this work were collected in full inflorescence. *Lavandula multifida* L. and *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet. were harvested from Bouhanak, located in West of Tlemcen (West of Algeria) at 34 ° 53 North and -1 ° 22 West, 700 m of altitude. While *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietsw. and *Amoides verticillata* (Desf.) Briq. were harvested from Mefrouche station which is located in the South of Tlemcen at an altitude of 1190 m, between latitudes 34 ° 49 North and longitude 1 ° 19 West. Harvests were made during June 2011. Specimens of all spices in this study were identified by laboratory of ecological management of natural ecosystems, university of Tlemcen. The plants materials were Left to dry for a week by spreading it in open air and away from sunlight.

Obtaining essential oils

Essential oils extraction was performed by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for three hours. The obtained essential oils was dried with magnesium sulfate (MgSO₄) and stored in smoked vials at +4 °C.

GC and GC / MS analysis

GC analyses were performed by a device type Perkins Elmer GC Autosystem equipped with a single injector and two flame ionization detectors (FID).

The device has two columns of fused silica capillary (60 mx 0.22 mm, film thickness 0.25 µm) with different stationary phases: Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Temperature program: 60-230 °C at 2 °C / min and then held isothermal at 230 °C (30 min). Carrier gas: helium (1 ml / min). Temperatures of injector and detector were held at 280 °C. Injection was performed with a split ratio of 1:80. Injected volume: 0.1 µl. Analyses GC / MS were made using a detector

Perkin Elmer TurboMass, directly coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL columns equipped with fused silica capillary (60 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethyl siloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol).

Analysis GC / MS was performed with the following conditions: temperature of the ion source 150 °C, ionization energy: 70 eV electron spectra ionization mass were acquired over the mass range of 35 to 350 Da. Scan time: 1 sec. The injection was performed with a division ratio of 1:80.

Bacterial strains

19 Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from postoperative wound, nasal swabs and central venous catheters incubations of patients hospitalized in several services (surgery, pediatrics, internal medicine, maternity and pulmonology) at the University Hospital of Tlemcen during a period of 14 months ranged from April 2010 to June 2011. These strains were identified by API Staph system (BioMérieux®, France). Reference MRSA strains ATCC 43866 and ATCC 43300, and MSSA strains ATCC 25923 and MSSA ATCC 29213 were also tested.

Selection of strains resistant to methicillin MRSA

Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains was performed by two methods as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2011), strains of *Staphylococcus aureus* correctly identified have suffered an antibiogram using oxacillin disk and cefoxitin. All strains resistant to oxacillin or cefoxitin were considered MRSA strains (CLSI 2011). The second method is a screening in Muller-Hinton agar (CondaPronadisa™, Spain) supplemented with 6 µg / ml of oxacillin or 4 µg / ml of cefoxitin. The strains were inoculated by spot using a sterile swab, all strains grown on agar were considered MRSA strains (CLSI 2011).

Agar diffusion technique

The strains tested were grown for 18 h in Muller-Hinton broth (CondaPronadisa™, Spain), and then the inoculum was prepared at a concentration of 10⁷ CFU / ml. inoculation was done by swabbing on Mueller-Hinton agar according to the recommendations of CLSI (CLSI 2011). A sterile disk of 6 mm in diameter impregnated with 2 µl of oil was placed in the center of the box sown.

Determination of the minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration was determined by the method of microplate (96 wells) round bottom (Wiegand *et al.*, 2008). First, we performed successive dilution ½ in Müller-Hinton broth. We have prepared two solutions, the first is the concentrated solution; it contains 40% essential oil, 59% Müller-Hinton broth and 1% Tween 80. The second solution contains only the Müller-Hinton broth and Tween 80 at a concentration of 1%, this solution was used to make the dilutions so that concentration of Tween 80 will remain the same at decreasing. Inocula of

10^8 UFC/ml were diluted 1/1000 to the concentration of 10^5 UFC/ml. in Microplate, 180 μ l of bacterial suspension at 10^5 UFC/ml were deposited inside the wells. Then 20 μ l of the solution of the oil was added. The final concentration of Tween 80 is 0.1% (v/v) in each well and the final concentrations of the essential oil is ranged from 4% to 0.0078%. Susceptibility testing of essential oils (agar diffusion method and e MICs were repeated three times).

Destruction kinetics of MRSA strain 43300 with essential oils

The kinetics of destruction of MRSA exposed to essential oils tested in this work was evaluated according to the experimental protocol Christoph, et al., 2001 (Christoph et al., 2001); The inoculum preparation was done by cultivating the strain tested in 10 ml of trypticase soy TSB (Fluka BioChemika®, France) during 18 h of incubation. Then the culture was centrifuged for 10 min at 250 rpm at 25 ° C. After that, the pellet is recovered and suspended in 0.9 ml of sterile saline for a concentrated suspension of bacteria 3×10^9 CFU / ml. MRSA ATCC 43300 strain (100 μ l of the final inoculum) were inoculated into 50 ml containing the concentrations 1, 0.5, 0.25, and 0.125 % oil and Tween 80 (0.5%) in sterile distilled water and stirred continuously. After incubation for 5, 10, 15, 30, 60, 120, and 240 min at 37C °, aliquots of 1 ml were sampled and transferred to a broth inactivation (9 ml of nutrient broth) and vortexed. After 2 min, serial dilutions were prepared in saline, and 100 μ l of each dilution and broth inactivation were spread on Mannitol salt agar medium (Merck®, France) for enumerating colonies. For this work we used the reference strain ATCC 43300 MRSA.

RESULTS AND DISCUSSION

GC and GC / MS analysis

The chemical composition of the essential oils is presented in Table 1. Based on this composition, we find that the essential oil of *A. verticillata* is rich in thymol (51.1%), p. cymene (16.4%) and limonene (14.1%). As well as the essential oil of *O. v. subsp. glandulosum* is rich also in thymol (43.3%), p-cymene (15.3%), and γ terpinene (27.0%). In addition, the oil of *A. verticillata* contains more oxygenated monoterpenes than oregano oil while the reverse is true for hydrocarbon monoterpenes. Analysis of *T. m. subsp. Ciliatus* showed a chemotype carvacrol as major compound with a percentage of 80.1% and an abundance of Monoterpenes hydrocarbons, while the chemical composition of *L. multifida* showed that it is rich in carvacrol with a percentage of 57, 1%, but also with the β -bisabolene, with 25.2%.

The results of the antimicrobial activity of essential oils of the four medicinal plants on methicillin resistant *S. aureus* MRSA strains have shown that the four oils showed strong activity against MRSA strains, the level of this activity was variable. The essential oils showed the strongest activities are: *T. m. subsp. Ciliatus*, *O. v. subsp. glandulosum* *L. multifida* and *A. verticillata*, respectively. Results of inhibition diameters and minimum inhibitory concentrations are presented in Tables 2 and 3. The

results of the anti-MRSA activity of the four essential oils showed that MRSA strains tested were either sensitive or highly sensitive towards the four essential oils such as the lowest inhibition diameters were 14 mm (Ponce et al., 2003). *O. v. subsp. glandulosum*, showed the highest activity with diameters that reach 55 mm and MIC \leq 0.06%, which explains the use of this herb by the ancient population and confirms the broad spectrum action of its essential oil (Bendahou et al., 2008). Comparing this with the anti-MRSA effect of other species of the same genus, Chao et al., 2008 showed that the species *Origanum majorana* has a remarkable effect on MRSA with diameters of 28 mm, as these authors tested the essential oil of *Thymus vulgaris* species, the latter showed a very strong effect with a diameter of 57 mm (Chao et al., 2008). Indeed Nostro et al., 2004 showed the effect of purified carvacrol and thymol essential oil of *Origanum vulgare* on the strain of MRSA ATCC 43300, the results showed a strong inhibition of these compounds against this MRSA strain (Nostro et al., 2004). We obtained the same results with Algerian *O. v. subsp. glandulosum* which has as the major compound the Thymol, while the species *A. verticillata* showed an average anti-MRSA activity although the composition of its essential oil is rich in thymol. In addition, the species *T. m. subsp. Ciliatus* showed a significant anti-MRSA effect, the antibacterial activity of this essential oil is mainly due to its high content of carvacrol (Bousmaha-Marroki et al., 2007).

On the active species of lavender we tested, *L. multifida* which presented a remarkable activity. The anti-MRSA effect of this species can be explained by the fact that *L. multifida* is the only species that produces large amounts of carvacrol (Harborne and Williams 2002). Indeed, carvacrol act on the membrane of the bacterium by a reduction in ATP synthesis and membrane electrical potential, and therefore the result is an increase in the permeability of the membrane, which results in the destruction of the bacterial cell (Husnu Can Baser 2008). Moreover, studies have shown that another major component that this plant has; called " β -bisabolene" has an interesting antimicrobial activity on microorganisms and MRSA strains (Nascimento et al., 2007, Simic et al., 2005).

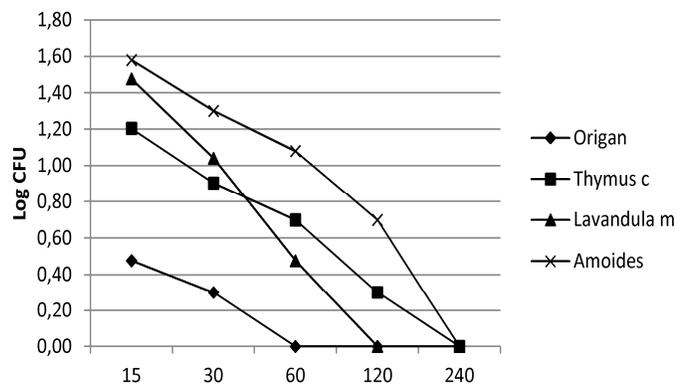
The results for the diameters of inhibition showed that the larger diameters of inhibition were observed with *O. v. subsp. glandulosum* with an average of 29.45 mm, and *T. m. subsp. Ciliatus* of 25.8 mm then less large diameter with *A. verticillata* of 24.33 mm and *L. multifida* with an average of 19.75 mm. Furthermore, we observed some differences in the effect between inhibition zones and MICs. The minimum inhibitory concentrations gave consistent results with the inhibition diameters as smaller MICs were recorded with *O. v. subsp. glandulosum*, however the species *L. multifida* gave more effect at CMI compared with diameters of inhibition, these results can be explained by the fact that certain essential oils have viscosities that affect their broadcasts in the plates and therefore they give MIC greater than the diameters of inhibition, including interest, to compute the CMI assess the effects of these substances (Hood et al., 2003).

Table 1: Chemical composition of plants studied

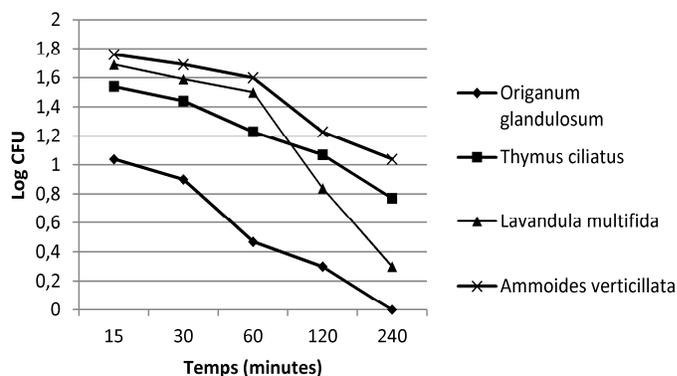
Plants			<i>T. m. subsp. Ciliatus</i>	<i>O. v. subsp. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>L. multifida</i>
Yield % (w/w)			6	4	4.5	0.6
Constituents	RIa	RIp				
α -Thujene	928	1023	0.4	1.3	0.2	-
α -Pinene	931	1022	0.5	0.6	0.1	0.6
Camphene	943	1066	0.1	0.1	-	-
1-Octen-3-ol	959	1446	tr	0.1	-	0.2
3-Octanone	963	1253	0.1	0.1	-	-
Sabinen	966	1120	-	-	0.1	-
β -Pinene	970	1110	0.1	0.1	0.1	0.2
Myrcene	979	1159	1.2	2.0	0.7	0.7
α -Phellandrene	997	1164	0.1	0.3	-	-
Δ -3-Carene	1005	1147	0.1	0.1	tr	tr
α -Terpinene	1008	1178	1.3	2.7	0.1	-
<i>p</i> -Cymene	1011	1268	7.1	15.3	16.4	2.2
Limonene	1020	1199	0.3	0.5	14.1	-
Eucalyptol	1020	1209	-	-	-	0.9
α -phellandrene	1021	1212	-	0.2	-	-
(Z)- β -Ocimene	1024	1230	0.1	tr	-	tr
(E)- β -Ocimene	1034	1247	0.1	tr	-	tr
γ -Terpinene	1047	1243	4.2	27.0	7.5	-
Cis-hydrate sabinene	1050	1451	-	-	tr	-
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1051	1451	0.2	0.3	-	-
Fenchone	1071	1401	-	-	-	tr
<i>p</i> -cymenene	1073	1469	-	-	-	-
Terpinolene	1078	1280	0.1	0.1	0.1	0.1
Linalool	1081	1544	0.7	0.6	0.2	tr
Borneol	1148	1698	0.1	0.1	-	-
Terpinen-4-ol	1161	1600	0.4	0.2	0.3	-
α -Terpineol	1172	1697	0.2	0.2	0.2	-
Cis-carveol	1208	1863	-	-	tr	-
Thymoquinone	1216	-	-	-	-	-
Carvacrol methyl ether	1231	1603	-	-	-	0.3
Carvone	1235	1739	-	-	-	tr
Thymol	1266	2189	0.2	43.3	51.1	-
Carvacrol	1278	2219	80.1	2.0	7.5	57.1
α -Terpenylacetate	1334	1695	-	-	-	0.1
carvacryl acetate	1345	1876	0.1	-	-	-
Methyleugenol	1367	2009	-	-	-	0.2
β -Caryophyllene	1424	1591	1.2	1.2	-	2.1
β -Farnesene	1448	1661	-	-	-	0.1
α -Humulene	1456	1665	0.1	0.1	-	-
β -Bisabolene	1500	1720	0.1	0.1	-	25.2
β -Sesquiphellandrene	1516	1765	0.1	0.4	-	-
(E)- α -bisabolene	1534	1772	-	tr	-	-
Spathulenol	1560	2119	-	-	-	3.4
Caryophyllene oxide	1576	1980	0.2	0.2	-	3.7
Total (%)			99,5	99,6	98,7	97,1

Percentages, elution order are given on apolar column; Retention index RIa and RIb are given respectively on apolar (Rtx-1) and polar column (Rtx-Waw); tr: trace (<0,05); All compounds are identified by RI, GC/MS from laboratory libraries.

Destruction kinetics of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 exposed to four essential oils at the concentration 1%



Destruction kinetics of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 exposed to four essential oils at the concentration 0.5%



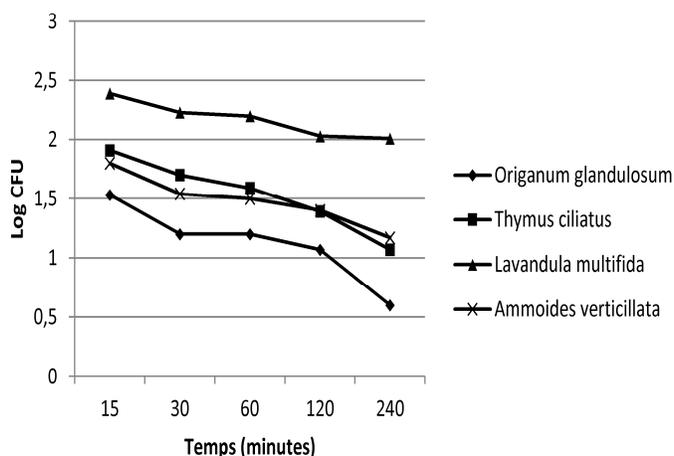
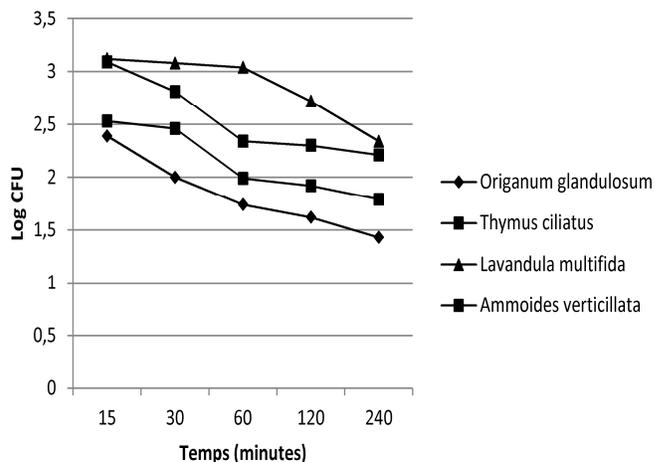
Destruction kinetics of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 exposed to four essential oils at the concentration 0.25%Destruction kinetics of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 exposed to four essential oils at the concentration 0.125%

Fig . 1: destruction kinetics of MRSA strain ATCC 43300 exposed to four essential oils (*O. v. subsp. Glandulosum*, *T. m. subsp. Ciliatus*, *L. multifida* and *A. verticillata*) in time 15; 30; 60; 120; and a four concentration 1%, 0.5%, 0.25% and 0.15%.

Table. 2: Inhibition diameter of essential oils of four medicinal plants collected in western Algeria.

Strains	diameter (mm)			
	<i>T. m. subsp. Ciliatus</i>	<i>O. v. subsp. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>L. multifida</i>
MRSA1	30	31	25	27
MRSA2	32	34	15	14
MRSA3	34.66	28	28	15
MRSA4	28	28	28	17
MRSA5	16.5	26	24	14
MRSA6	16.5	24	18	23
MRSA7	17.5	23	19	22
MRSA8	16.5	24	15	22
MRSA9	20	25	20	18
MRSA10	20	25	21	20
MRSA11	15	29	22	24
MRSA12	19	28	30	19
MRSA13	36.66	32	27	21
MRSA14	29	25	34	18
MRSA15	36	26	27	21
MRSA16	19	26	25	18
MRSA17	18.5	30	25	21
MRSA18	34	25	16	20
MRSA19	21	25	22	22
MRSA 43300	27	32	30	18
MSSA 25923	40	36	30	19
MSSA 33862	35.5	34	25	22
MSSA 29213	30	36	28	19
MRSA 43866	27	55	30	20

Table. 3: Minimum inhibitory concentration of four medicinal plants collected in western Algeria.

Strains	Minimum inhibitory concentration MIC% (v/v)			
	<i>T. m. subsp. Ciliatus</i>	<i>O. v. subsp. glandulosum</i>	<i>A. verticillata</i>	<i>L. multifida</i>
MRSA1	0.25	0.125	0.25	0.125
MRSA2	0.25	0.125	0.125	0.5
MRSA3	0.125	0.25	0.25	0.25
MRSA4	0.125	0.25	0.25	0.125
MRSA5	0.125	0.25	0.5	0.5
MRSA6	0.5	0.25	0.25	0.125
MRSA7	0.5	0.25	0.125	0.125
MRSA8	0.125	0.25	0.25	0.125
MRSA9	0.125	0.25	0.125	0.0625
MRSA10	0.25	0.125	0.5	0.25
MRSA11	0.5	0.25	0.5	0.5
MRSA12	0.125	0.125	0.25	0.25
MRSA13	0.25	0.25	0.25	0.125
MRSA14	0.125	0.25	0.5	0.5
MRSA15	0.06	0.06	0.5	0.25
MRSA16	0.25	0.25	0.25	0.125

MRSA17	0.5	0.25	0.25	0.25
MRSA18	0.25	0.06	0.125	0.5
MRSA19	0.5	0.06	0.5	0.5
MRSA 43300	0.25	0.5	0.125	0.25
MSSA 25923	0.25	0.25	0.25	0.125
MSSA 33862	0.25	0.25	0.25	0.0625
MSSA 29213	0.25	0.25	0.25	0.125
MRSA 43866	0.5	0.25	0.25	0.25
Average	0.26	0.21	0.28	0.25

The effect of essential oils on different MRSA strains was more or less similar; in general, essential oils with high activities have maintained this activity for the majority of MRSA strains tested. There is not a clear difference between the effect of essential oils on clinical MRSA strains and MSSA references strains, however, the inhibition diameters were the lowest recorded for MRSA strains as it is for MSSA strains case for MRSA11 (15 mm oil *T. m. subsp. Ciliatus*) and MRSA2 (14 mm oil *L. multifida*).

Destruction kinetics of MRSA strain 43300 with essential oils

The study of the kinetics of destruction of the MRSA strain 43300 with the four essential oils showed that after 240 min at the concentration 1%, all four death kinetic curves reached the x-axis with a reduction of 6.8 log₁₀ which means that the four oils exerted a bactericidal effect whereas at the concentration 0.5%, *O. v. subsp. glandulosum* oil exercise a high bactericidal effect with complete destruction of bacterial cells, while *L. multifida* destruction was observed from log 6.8 log₁₀ to 0.25 log₁₀. However *T. m. subsp. Ciliatus* and *A. verticillata* exerted lower reductions of bacterial cells which were from 6.8 log₁₀ to 0.8 log₁₀ and 1.05 log₁₀ respectively. Nevertheless, the concentration 0.25% showed almost complete destruction of *O. v. subsp. glandulosum* and average destruction of *L. multifida*, *A. verticillata* and *T. m. subsp. Ciliatus*. However, the curves of the concentration 0.125% showed a very low activity of the four oils with low decreases of bacterial cells which ranged from 6.8 log₁₀ to 2.34 log₁₀ and 1.43 log₁₀ within 240 min (see fig. 1), it follows that the bactericidal activity of all essential oils tested in this study is dependent on concentration. Indeed, these oils because they have dependent on concentrations, they are bactericidal at concentrations required and destroying cells at the stationary phase, but when concentrations are low they exert more bacteriostatic activity (Christoph et al., 2001).

In fact, the most studies of the antimicrobial activity of essential oils concern inhibition of microbial growth rather than lethal effects (Lattaoui and Tantaoui-Elaraki 1994). However there is some studies on time killing kinetics on MRSA strains; Dadalioglu and Evrendilek, 2004, presented the kinetics of destruction of the MRSA strain ATCC 43300 and found a very strong effect of oregano oil followed by the effect of lavender from Turkey (Dadalioglu and Evrendilek 2004). These results agree well with ours as we recorded a faster kinetics of *O. v. subsp. glandulosum* and stronger than that exerted by *L. multifida*. In another study, May et al.,, have studied the kinetics of destruction of MRSA and MSSA strains exerted by tea tree oils,

they have found that tea tree oil was more active against methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* than methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (May et al., 2000).

CONCLUSION

The evaluation of the anti-MRSA activity of four essential oils obtained from Algerian medicinal plants tested in this work showed that oils had a remarkable inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, especially, against MSSA than strains MRSA. In addition, the kinetics of destruction showed that all essential oils tested in this study is dependent on concentration to exercise its bactericides. We also concluded that the essential oils can be used as an anti-MRSA, since our results showed their effectiveness. Further studies are needed to develop formulations for pharmaceutical use based on these essential oils to fight this nosocomial pathogen.

REFERENCES

- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.-M., Bernardini A.-F., Costa J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. Food Chem 2008;106: 132-139.
- Billerbeck V. G. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Phytothérapie 2008;5: 249-253.
- Bousmaha-Marroki L., Atik-Bekkara F., Tomi F., Casanova J. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria. J Essent Oil Res 2007;19: 490-493.
- Chambers H. F., DeLeo F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nature Rev Microbiol 2009;7: 629-641.
- Chao S., Young G., Oberg C., Nakaoka K. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. Flavour Fragr J 2008; 23: 444-449.
- Christoph F., Stahl-Biskup E., Kaulfers P. M. Death kinetics of *Staphylococcus aureus* exposed to commercial tea tree oils. J Essent Oil Res 2001;13: 98-102.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 2011;31
- Dadalioglu I., Evrendilek G. A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. J Agric Food Chem 2004;52: 8255-8260.
- Daurel C., Leclercq R. Faut-il abandonner la vancomycine ? Arch Pediatr 2010;17, Supplement 4: 121-128.
- Descloux E., Mohammedi I., Gillet Y., Francois B., Etienne J. Pneumonie nécrasante à *Staphylococcus aureus* communautaire résistant à la méticilline et producteur de leucocidine de Pantone-Valentine chez un adulte. Réanimation 2007;16: 256-258.

- Deurenberg R. H., Stobberingh E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008;8: 747-763.
- Fischbach M. A., Walsh C. T. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 2009;325: 1089-1093.
- Harborne J., Williams C. (2002). Lavender The Genus *Lavandula*. In Lis-Balchin M. (ed.) Medicinal and aromatic plants – industrial profiles (pp. 86-99). New York: Taylor & Francis.
- Hood J. R., Wilkinson J. M., Cavanagh H. M. A. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. *J Essent Oil Res* 2003;15: 428-433.
- Husnu Can Baser K. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Curr Pharm Des* 2008;14: 3106-3120.
- Lattaoui N., Tantaoui-Elaraki A. Comparative Kinetics of Microbial Destruction by the Essential Oils of *Thymus broussonetii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. *J Essent Oil Res* 1994;6: 165-171.
- May J., Chan C. H., King A., Williams L., French G. L. Time kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000;45: 639-643.
- Mohtar M., Johari S. A., Li A. R., Isa M. M., Mustafa S., Ali A. M., Basri D. F. Inhibitory and Resistance-Modifying Potential of Plant-Based Alkaloids Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr Microbiol* 2009;59: 181-186.
- Nascimento A. M., Brandao M. G., Oliveira G. B., Fortes I. C., Chartone-Souza E. Synergistic bactericidal activity of Eremanthus erythropappus oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2007;92: 95-100.
- Nathan C. Antibiotics at the crossroads. *Nature* 2004;431: 899-902.
- Nostro A., Blanco A. R., Cannatelli M. A., Enea V., Flamini G., Morelli I., Sudano Roccaro A., Alonzo V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett* 2004;230: 191-195.
- Palaniappan K., Holley R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol* 2010;140: 164-168.
- Piddock L. Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. *Nature Rev Microbiol* 2006;4: 629-636.
- Ponce A. G., Fritz R., del Valle C., Roura S. I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Sci Technol* 2003;36: 679-684.
- Ramalhete C., Spengler G., Martins A., Martins M., Viveiros M., Mulhovo S., Ferreira M.-J. U., Amaral L. Inhibition of efflux pumps in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. *Int J Antimicrob Ag* 2011;37: 70-74.
- Simic N., Palic R., Randjelovic V. Composition and antibacterial activity of *Achillea clypeolata* essential oil. *Flavour Fragr J* 2005;20: 127-130.
- Talbot G. H., Bradley J., Edwards J. E., Gilbert D., Scheld M., Bartlett J. G. Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 2006;42: 657-668.
- Tang Y. W., Stratton C. W. *Staphylococcus aureus*: An old pathogen with new weapons. *Clin Lab Med* 2010;30: 179-208.
- Tenover. Characterization of Staphylococci with Reduced Susceptibilities to Vancomycin and Other Glycopeptides. *J Clin Microbiol* 1998;36: 1020-1027.
- Tenover. Increasing Resistance to Vancomycin and Other Glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001;7: 327-332.
- von Nussbaum F., Brands M., Hinzen B., Weigand S., Habich D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry - Exodus or revival? *Angew. Chem.-Int. Edit.* 2006;45: 5072-5129.
- Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008;3: 163-175.
- Wong-Beringer A., Joo J., Tse E., Beringer P. Vancomycin-associated nephrotoxicity: a critical appraisal of risk with high-dose therapy. *Int J Antimicrob Ag* 2011;37: 95-101.

How to cite this article:

KHADIR Abdelmounaïm, BENDAHOU Mourad, BENBELAID Fethi, BELLAHCENE Chafika, Abdelouahid Djamel-Eddine, MUSEILI Alin, PAOLLINI Julien, DESJOBBER JYMY, COSTA Jean., Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants. *J App Pharm Sci*, 2013; 3 (07): 018-024.

العنوان: آثار مستخلصات بعض النباتات العطرية على سلالات من المكورات الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) المعزولة من مستشفى جامعة تلمسان.

الكلمات المفتاحية: *Staphylococcus aureus*, مقاومة, ميثيسيلين, سارم, الزيوت العطرية, التأثير.

ملخص: مقاومة المكورات العنقودية الذهبية للميثيسيلين (سارم) هو السبب الرئيسي عن ارتفاع معدل الإصابة بالأمراض الخطيرة والوفيات في جميع أنحاء العالم. 126 سلالة من المكورات العنقودية الذهبية منها 52 مقاومة للميثيسيلين تم عزلها من مستشفى جامعة تلمسان. وأظهر تحليل PCR real time و PCR و MALDI-TOF-MS أن السلالات مقاومة للميثيسيلين بواسطة إنتاج β -lactamases وسلالة واحدة فقط لديه الجين السم PVL وأحد عشر سلالة تمتلك الجين TSST-1. التعرض لتأثير الزيوت العطرية ومستخلصات الايثانول من *O. glandulosum*, *L. multifida*, *A. verticillata*, *C. schoenanthus*, *T. ciliatus* et *E. globulus* أظهرت بطريقتين الانتشار على الأجار ($\text{MIC} = 0,006\%$; $\text{Ø} > 55\text{mm}$) وبطريقة التأثير البخاري مع الحصول على DMI منخفضة ($\text{CMI} = 0,01\%$) أظهرت تجريب مستخرجات الإيثانول أن مستخلص من *Ciliatus T. m.* أظهر أحسن تأثير ($\text{CMI} = 0,01\%$) و $\text{Ø} > 20\text{mm}$; كما أظهرت حركية قتل الميكروبات على أنها تعتمد على التركيز بما أنها تمنع نمو الجراثيم في خمسة أيام في تركيز 0.25% وتقوم بقتل سريع و شامل ب $6.8 \log_{10}$ في خمسة أيام عند تركيز 5%. أظهر مزج الزيوت مع المضاد الحيوي vancomycin أن زيت *A. verticillata* أبانت أكبر قدر من التعاون ($\text{FIC} = 0.37$). أظهرت الاختبارات في الجسم الحي التي أجريت على فئران الويستر تأثير زيت *O. glandulosum* ضد عدوى تسببها المكورات العنقودية الذهبية المنتجة لل PVL أن زيت *O. glandulosum* يمنع نمو الجراثيم في تركيز 0.25% و يقضي بشكل نهائي على العدوى عند التركيز 5% في خمسة أيام.

Titre: Effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline SARM isolées du CHU de Tlemcen

Mots clés: *Staphylococcus aureus*, résistance, méticilline, SARM, huiles essentielles, activité.

Résumé: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) est un agent pathogène nosocomial majeur responsable d'un taux élevé de morbidité grave et de mortalité dans le monde. 126 souches de *Staphylococcus aureus* dont 52 résistantes à la méticilline ont été isolées du CHU de Tlemcen. Les analyses par PCR, PCR en temps réel et par MALDI-TOF-MS ont montré que les souches résistent à la méticilline par production de β -lactamases et dont une seule souche possède le gène de la toxine LPV et onze souches possèdent le gène de TSST-1. Les souches résistantes à la méticilline soumises à l'effet des huiles essentielles et des extraits à l'éthanol d'*O. glandulosum*, *L. multifida*, *A. verticillata*, *C. schoenanthus*, *T. ciliatus* et *E. globulus* ont montré une grande sensibilité à l'huile essentielle d'*O. glandulosum* par la méthode de diffusion en gélose ($\text{Ø} > 55\text{mm}$; $\text{CMI} = 0,006\%$) et par la méthode en phase vapeur avec des DMI très faibles de l'ordre de $0,0165 \mu\text{l}/\text{cm}^3$. L'extrait à l'éthanol de *T. Ciliatus* s'est montré le plus actif ($\text{Ø} > 20\text{mm}$; $\text{CMI} = 0,01\%$). La cinétique de destruction a montré que l'effet des huiles essentielles est bactéricide avec une destruction totale des cellules de $6.8 \log_{10}$ à la concentration de 1%. La combinaison des huiles avec l'antibiotique vancomycine a montré que l'huile d'*A. verticillata* présente l'effet de synergie le plus important ($\text{CFI} = 0.37$). Le test *in vivo* sur rat Wistar de l'effet de l'huile d'origan contre une infection causée par *S. aureus* producteur de la LPV a montré que l'huile d'origan inhibe la croissance du germe à la concentration de 0.25% et exerce une éradication totale à la concentration de 5% en cinq jours.

Title: Inhibitory effect of some aromatic plant extracts on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) isolated from Tlemcen University Hospital.

Keys words: *Staphylococcus aureus*, resistance, Methicillin, MRSA, essential oils, activity.

Abstract: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major nosocomial pathogen responsible for a high rate of serious morbidity and mortality worldwide. 126 *Staphylococcus aureus* strains from which 52 were methicillin-resistant were isolated from Tlemcen University Hospital. Analysis by PCR, real time PCR and MALDI-TOF-MS showed that strains resistant to methicillin by production of β -lactamases and only one strain have the PVL toxin gene and eleven strains possess the gene TSST-1. Resistant strains subjected to the effect of essential oils and ethanol extracts of *O. glandulosum*, *L. multifida*, *A. verticillata*, *C. schoenanthus*, *T. ciliatus* and *E. globulus* showed a high sensitivity to *O. glandulosum* EO by the agar diffusion method ($\text{Ø} > 55\text{mm}$; $\text{MIC} = 0,006\%$) and the vapor phase method with very low DMI of about $0.0165 \mu\text{l}/\text{cm}^3$. The ethanol extract of *T. Ciliatus* proved to be the most active ($\text{Ø} > 20\text{mm}$; $\text{CMI} = 0,01\%$). The kinetics of destruction showed that the effect of essential oils is bactericidal because EOs has had total destruction cells of $6.8 \log_{10}$ at the concentration 1%. The combination of HEs with the antibiotic vancomycin showed that *A. verticillata* oil show the most important synergistic effect ($\text{FIC} = 0.37$). The *in vivo* test in Wistar rats on the effect of oregano oil against an infection caused by *S. aureus* producing PVL showed that oregano EO inhibits the growth of germs at concentration 0.25% and has a complete eradication at concentration 5% in five days.