



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجبلاي بونعاما خميس مليانة-

Université Djilali Bounaama Khemis Miliana

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département de : Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Microbiologie appliquée

## Thème :

**Isolement de staphylocoques pathogènes à partir du  
lait de mammite et sa sensibilité vis-à-vis d'une huile  
essentielle**

Présenté par :

- ❖ M<sup>lle</sup> Sahki Soumia
- ❖ M<sup>lle</sup> Medani Naima

Soutenu le 27/12/2020

Devant le jury :

- |                                |     |       |
|--------------------------------|-----|-------|
| ❖ Présidente : Mme Halfaoui Z. | MAB | UDBKM |
| ❖ Promoteur : Mr Ghallal M.    | MA  | UDBKM |
| ❖ Examinatrice : Mme Didouh A. | MCB | UDBKM |

*Année universitaire : 2019/2020*

## Remerciements

Nous tenons, en premier lieu, à remercier Allah le Tout Puissant et Miséricordieux qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail ;

Nous remercions notre promoteur **Dr Ghallal M.**, vous recevrez notre grande reconnaissance pour votre disponibilité, votre aide et tous les conseils et vos encouragements qui ont fait progresser ce mémoire ;

Nos remerciements chaleureux à l'ensemble du personnel du laboratoire de la laiterie « Arib », en particulier à Mlle **Amina**, Mlle **Latifa** et Mlle **Ibtissame**, pour leur accueil et leur soutien durant toute la période de notre stage pratique ; et pour le responsable de la bibliothèque de l'Universitaire Djilali Bounaama de Khemis Miliana ;

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant les années d'étude ;

Pour terminer, nous souhaitons exprimer nos remerciements ainsi que notre respect à tout le personnel de l'Institut Universitaire et merci à tous ce qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

## Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Mes très chers parents : **Aouicha** et **Abdallah** pour tous leurs sacrifices, leur tendresse, leur amour et leurs conseils tout au long de mes études, donc aucune dédicace n'exprime ma reconnaissance ;

Mes grands-parents : **Mohamed** et **Fatiha**, et mes chers frères et chers sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de courage et de générosité ;

Toute ma famille : tantes, oncles, cousines et cousins, pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire ;

Mes très chères amies : **Ahlame**, **Nadjat**, **Soumia**, **Rim**, **Souad** et **Yasmine** ; et à tous mes collègues de la promotion Master II « microbiologie appliquée » 2019/2020 ;

Mon promoteur **Dr Ghalall M.**, je vous dis merci ;

Tous qui me sont chers ;

Mon binôme **Soumia**.

**Naima Medani**

## Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents **Mohamed** et **Kaltoum**, symboles de sacrifice, de tendresse et d'amour, je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours ;

Mon cher mari **Abdelkader** pour sa patience et son encouragement ;

Ma fille **Rania** ;

Mes chers frères : **Omar** et **Yassine** ;

Mes chères sœurs : **Fayza**, **Amina**, **Karima** et **Bouchra**, je vous exprime mes vifs remerciements ;

Mes très chères amies : **Ahlam**, **Chahra**, **Najat**, **Nawal** et **Fatima Zohra** ;

Toute notre promotion ;

Toute ma famille maternelle et paternelle ;

Mon promoteur **Dr Ghallal M.** ;

Tous qui me sont chers ;

Mon binôme **Naima**.

**Sahki Soumia**

## ملخص

الحليب هو غذاء ذو قيمة غذائية عالية ، فهو غني جداً بالبروتينات والدهون والكاربوهيدرات وخاصة في إمداد العناصر النزرة مثل الكالسيوم. ونتيجة لذلك ، فإنها تحتل مكانة لا جدال فيها في الحصة الغذائية البشرية في معظم البلدان ذات المستوى المعيشي المنخفض أو المتوسط أو العالي. إنها بيئة مثالية لمعظم الجراثيم بسبب الرطوبة التي تعد عاملاً مفيداً لتطور الميكروبات.

المكورات العنقودية هي كائنات دقيقة يمكن العثور عليها في الحليب ، عندما يأتي الحليب من حيوان مريض ، يمكن أن تكون عوامل التهاب الضرع.

وبالتالي تستخدم المضادات الحيوية بشكل تقليدي لعلاج الحيوانات ضد أمراض الثدي. في الوقت الحالي ، يعد الحد من استخدام المضادات الحيوية قضية رئيسية بسبب مقاومة مضادات الميكروبات والبحث عن مواد طبيعية جديدة مضادة للميكروبات هو الشغل الشاغل لمعظم الباحثين ، حيث تمثل الزيوت الأساسية مجموعة مثيرة للاهتمام للغاية ، لأنها بخصائص مضادة للميكروبات تجعلها جذابة كبديل للمضادات الحيوية. في الواقع ، أثبتت الزيوت الأساسية مراراً فعاليتها في المختبر على البكتيريا المعزولة من التهاب الضرع.

خلال فترة التدريب التي استمرت أقل من أسبوع ، عملنا على 8 عينات من حليب البقر الخام. تم عزل المستعمرات السلبية لتجلط الدم الأبيض. بسبب مرض الكوفيد 19 ، لم نتمكن من القيام بوظائفنا.

**الكلمات المفتاحية:** حليب ، مضاد حيوي ، مقاومة للمضادات الحيوية ، مكورات عنقودية.

## Résumé

Le lait est un aliment de haute valeur nutritionnelle, il est très riche en protéines, lipides, glucides et surtout en apport en oligo-éléments tel que le calcium. De ce fait, il occupe une place incontestable dans la ration alimentaire humaine dans la plupart des pays ayant un niveau de vie bas, moyen ou élevé. Il constitue un milieu idéal pour la majeure partie des germes en raison de l'humidité qui est un facteur favorable au développement microbien.

Les staphylocoques sont des micro-organismes qui peuvent se trouver dans le lait, lorsque ce dernier est issu d'un animal malade, il peut s'agir d'agents de mammites.

Les antibiotiques sont ainsi classiquement utilisés pour traiter les animaux contre les affections mammaires. Actuellement la réduction de l'utilisation des antibiotiques est un enjeu majeur à cause de l'antibiorésistance et la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes naturelles est la préoccupation capitale de la plupart des chercheurs, dont les huiles essentielles représentent un groupe très intéressant, car elles sont dotées de propriétés antimicrobiennes les rendant intéressantes comme produits de remplacement des antibiotiques. En effet, les huiles essentielles ont prouvé à maintes reprises leur efficacité *in vitro* sur des bactéries isolées de mammites.

Durant notre stage qui a duré moins d'une semaine, on a travaillé sur 8 échantillons de lait cru de vache. On a isolé des colonies blanches à coagulase négative. En raison de la maladie de COVID-19, on n'était pas en mesure d'accomplir notre travail.

**Mots clés :** lait, antibiotique, antibiorésistance, staphylocoque.

## Abstract

Milk is a food of high nutritional value, it is very rich in proteins, lipids, carbohydrates and especially in supply of trace elements such as calcium. As a result, it occupies an indisputable place in the human food ration in most countries with a low, medium or high standard of living. It is an ideal environment for most germs because of the humidity which is a favorable factor for microbial development.

Staphylococci are microorganisms that can be found in milk, when the milk comes from a sick animal, it can be agents of mastitis.

Antibiotics are thus conventionally used to treat animals against mammary diseases. Currently, reducing the use of antibiotics is a major issue because of antimicrobial resistance and the search for new natural antimicrobial substances is the main concern of most researchers, of which essential oils represent a very interesting group, because they are with antimicrobial properties making them attractive as antibiotic substitutes. Indeed, essential oils have repeatedly proven their effectiveness in vitro on bacteria isolated from mastitis.

During our internship, which lasted less than a week, we worked on 8 samples of raw cow's milk. White coagulase negative colonies were isolated. Due to COVID-19 disease, we were unable to do our jobs.

**Keywords:** milk, antibiotic, antibiotic resistance, staphylococcus.

# Sommaire

Remerciements

ملخص

Résumé

Abstract

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Généralités sur staphylocoques pathogènes.....</b>	<b>3</b>
1.1. Introduction .....	3
1.2. Historique.....	3
1.3. Habitat.....	4
1.4. Taxonomie et classification.....	4
1.5. Pouvoir pathogène des staphylocoques .....	5
1.5.1. Caractères généraux.....	5
1.5.2. Infections à staphylocoques .....	6
1.5.2.1. Formes cutanées .....	6
1.5.2.2. Formes muqueuses .....	6
1.5.2.3. Formes généralisées .....	6

1.5.2.3.1. Septicémie succédant à un foyer initial cutanéomuqueux .....	6
1.5.2.3.2. Formes intestinales .....	7
1.5.2.3.3. Syndrome de choc toxique .....	7
1.6. Facteurs de virulence des staphylocoques .....	7
1.6.1. Composants de la paroi .....	7
1.6.2. Facteurs d'invasion et d'adhésion .....	8
1.6.3. Substances élaborées par <i>S. aureus</i> .....	8
1.6.3.1. Toxines .....	8
1.6.3.1.1. Hémolysines .....	9
1.6.3.1.2. Leucocidine .....	9
1.6.3.1.3. Exfoliatine .....	9
1.6.3.1.4. Entérotoxine .....	9
1.6.3.1.5. Toxine responsable du choc toxique staphylococcique (TSST-1) .....	10
1.6.3.2. Enzymes non toxiques .....	10
1.6.3.2.1. Coagulase libre .....	10
1.6.3.2.2. Fibrinolysine .....	10
1.6.3.2.3. Désoxyribonucléases ou ADNases .....	10
1.6.3.2.4. Hyaluronidase .....	11
1.6.3.2.5. Lipase .....	11
1.7. Diagnostic bactériologique .....	11
<b>Chapitre II : Résistance de staphylocoques aux antibiotiques .....</b>	<b>12</b>
2.1. Introduction .....	12
2.2. Mécanisme de la résistance bactérienne.....	12
2.2.1. Définition de la résistance bactérienne.....	12
2.2.2. Phénotypes de résistance .....	12

2.2.3. Niveaux de résistance .....	13
2.3. Résistance des bactéries aux antibiotiques.....	13
2.3.1. Résistance naturelle ou intrinsèque .....	13
2.3.2. Résistance acquise .....	13
2.3.2.1. Mutation chromosomique ou évolution verticale.....	14
2.3.2.2. Acquisition des gènes de résistance ou évolution horizontale .....	14
2.3.2.2.1. Transformation.....	15
2.3.2.2.2. Transduction.....	16
2.3.2.2.2.1. Transduction généralisée .....	16
2.3.2.2.2.1. Transduction spécialisée .....	16
2.3.2.2.3. Conjugaison .....	16
2.4. Principaux modes de résistance des bactéries .....	17
2.4.1. Phénomène d'imperméabilité .....	17
2.4.2. Phénomène d'efflux .....	18
2.4.3. Défaut d'affinité .....	18
2.4.4. Résistance par modification enzymatique de la cible .....	18
2.5. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques .....	19
2.5.1. Résistance aux $\beta$ -lactamine .....	19
2.5.1.1. Structure des $\beta$ -lactamines .....	19
2.5.1.2. Classification des $\beta$ -lactamines .....	19
2.5.1.3. Mécanisme de résistance .....	19

2.5.1.3.1. Résistance par production de bêta-lactamases .....	19
2.5.1.3.2. Résistance par une protéine de liaison à la pénicilline additionnelle (PLP2a) .....	20
2.5.2. Résistance aux glycopeptides .....	20
2.5.3. Résistance aux aminosides .....	21
2.6. Facteurs induisant la résistance aux antibiotiques .....	21
<b>Chapitre III : Huiles essentielles .....</b>	<b>23</b>
3.1. Historique.....	23
3.2. Définition.....	23
3.3. Répartition et localisation des huiles essentielles .....	24
3.3.1. Répartition .....	24
3.3.2. Localisation des huiles essentielles.....	24
3.4. Classification des huiles essentielles.....	24
3.5. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles .....	25
3.6. Composition chimique des huiles essentielles .....	25
3.6.1. Terpènes et Terpénoïdes .....	26
3.6.1.1. Monoterpènes .....	26
3.6.1.2. Sesquiterpènes .....	27
3.6.2. Composés aromatiques .....	27
3.6.3. Composés d'origine diverse.....	27
3.7. Activités biologiques des huiles essentielles .....	27
3.7.1. Activité antioxydante .....	27
3.7.2. Activité antifongique .....	28

<b>3.7.3. Activité antimicrobienne.....</b>	<b>28</b>
<b>3.7.4. Activité antivirale .....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.5. Activité neurale.....</b>	<b>29</b>
<b>3.7.6. Autres activités .....</b>	<b>29</b>
<b>3.8. Principaux domaines d'application .....</b>	<b>29</b>
<b>3.8.1. Aromathérapie.....</b>	<b>29</b>
<b>3.8.2. Agro-alimentaire .....</b>	<b>30</b>
<b>3.8.3. Cosmétologie et parfumerie .....</b>	<b>30</b>
<b>3.8.4. Pharmacie .....</b>	<b>30</b>
<b>3.9. Facteurs de variabilités des huiles essentielles.....</b>	<b>31</b>
<b>3.9.1. Origine botanique.....</b>	<b>31</b>
<b>3.9.2. Organe producteur.....</b>	<b>31</b>
<b>3.9.3. Origine géographique .....</b>	<b>31</b>
<b>3.9.4. Conservation des plantes .....</b>	<b>32</b>
<b>3.9.5. Mode d'extraction .....</b>	<b>32</b>
<b>Chapitre IV : Etude expérimentale .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Objectif .....</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Lieu et période du travail .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Matériel .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.1. Matériels biologiques .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.2. Verreries et petits matériels.....</b>	<b>33</b>

<b>4.3.3. Réactifs et produits chimiques .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.4. Milieux des cultures .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.5. Appareillages .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4. Méthodes .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4.1. Prélèvement du lait cru .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4.2. Isolement de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4.3. Purification des colonies suspectes.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.4. Identification de <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.4.1. Coloration de Gram .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.4.2. Test de catalase .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.4.3. Test de coagulase .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.4.4. Test de mannitol-mobilité.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.5. Antibiogramme.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.6. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.6.1. Détermination de la CMI.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.6.2. Aromatogramme .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5. Résultats .....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>40</b>

## Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Disposition des antibiotiques sur les boîtes d'antibiogramme.	37
2	Illustration de la méthode d'aromatogramme.	39

## Liste des abréviations

**ATB** : Antibiotique

**MH** : Mueller Hinton

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**SARM** : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline

**SCN** : staphylocoque à coagulase négative

**SCP** : staphylocoque à coagulase positive

**FAO** : Food and Agriculture Organisation

**PLP** : Protéine Liant les Pénicillines

**HE** : Huile Essentielle

**GN** : Gélose Nutritive

**BN** : Bouillon Nutritif

# Introduction

---

## Introduction

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de trois milliards de litres par an (Kirat, 2007).

Le lait est un aliment presque complet et hautement nutritif pour l'homme et pour les jeunes mammifères, c'un substrat très riche et composé de : protéines, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines, et qui sont présents à des concentrations tout fait satisfaisantes pour la croissance et la multiplication cellulaire, par conséquent, les micro-organismes trouvent dans le lait un milieu idéal pour leur développement (Debreil, 2008).

En fait la situation de la production du lait en Algérie suggère à une recommandation des contrôles de la qualité du lait et des bovins laitiers, car les produits laitiers sont généralement contaminés par *Staphylococcus aureus*, dont l'origine de ces contaminations varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation. La contamination du lait cru et des produits laitiers par *S. aureus* peut être donc d'origine endogène, telle qu'une mammite ou inflammation des glandes mammaires du ruminant qui peut conduire au transfert de *Staphylococcus aureus* dans le lait cru ; ou d'origine exogène qu'il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés d'un apport de l'environnement (Brisabois *et al.*, 1997).

L'utilisation des antibiotiques pour le traitement n'est parfois pas efficace, parce que les bactéries sont devenues résistantes à un grand nombre d'antibiotiques (Chavéron, 1999). En effet l'application des antibiotiques dans différents secteurs industriels (agroalimentaire, insecticides, parfumerie, cosmétique) et même en thérapie peut causer des antibiorésistances, mais aussi des effets mutagènes, cancérigènes, des maladies auto-immunes, des allergies ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer et peut augmenter le taux de pollution dans la nature. De ce fait, la réflexion s'est développée auprès des industriels et vise à diminuer leur utilisation (Mnayer, 2016).

Pour éviter les problèmes causés par les traitements basés sur les antibiotiques, on utilise des produits naturels comme les huiles essentielles et le miel.

Les huiles essentielles constituent la majeure partie des composés aromatiques naturels qui sont aujourd'hui de plus en plus utilisés dans différents domaines et possèdent un large

## Introduction

---

éventail d'activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne, anti-cancer, anti-inflammatoire, ... etc.).

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail vise à isoler des staphylocoques pathogènes à partir du lait cru de vache et à étudier la sensibilité des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques et d'une huile essentielle.

# Synthèse bibliographique

## Chapitre I : Généralités sur les staphylocoques

### 1.1. Introduction :

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin surtout pour *Staphylococcus aureus*, immobiles, non sporulés, à catalase positive et à oxydase négative (Curie et Curie, 2002-2003). Ils ne sont pas capsulés et possèdent, comme les autres bactéries à Gram positif, une paroi composée de peptidoglycane, d'acides teichoïques et de protéines (FAO, 1994).

Elles poussent sur les milieux de culture usuels et forment des colonies rondes et lisses jusqu'à 4 mm de diamètre (FAO, 1994).

Elles sont de couleur dorée, c'est l'exemple de *Staphylococcus aureus* (FAO, 1994) ou de couleur blanche, à savoir *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* et *Staphylococcus lugdunensis* (Anonyme 1).

Les staphylocoques sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et de degrés de gravité divers (FAO, 1994).

Elles sont considérées comme un des premiers agents responsables d'infections nosocomiales, mais elles peuvent aussi être contractées en dehors de l'hôpital (infections dites communautaires) (FAO, 1994).

Ils sont présents dans la nature, les staphylocoques sont des bactéries qui colonisent la peau, les membranes muqueuses, les voies respiratoires, digestives supérieures et urogénitales. Ils peuvent se propager entre les animaux et les êtres humains par contact ou à travers les vecteurs (Rosenbach, 1884).

Les différents hôtes des espèces de staphylocoque incluent les mammifères, les oiseaux, les primates, les humains, les aliments et aussi les animaux domestiques (Rosenbach, 1884).

### 1.2. Historique :

Les staphylocoques ont été découverts par Louis Pasteur et Robert Koch à l'académie des sciences en 1876 et 1880 (Eyquem *et al.*, 1998).

## Synthèse bibliographique

Louis Pasteur a révélé et a insisté sur l'existence de cette bactérie qu'il avait isolée à la fois du pus de l'anthrax et de l'ostéomyélite et des eaux de la Seine (Eyquem *et al.*, 1998).

Ces germes ont été observés à l'examen microscopique sous forme de grappe de raisins et ils ont été décrits par Robert Koch en 1878 (Eyquem *et al.*, 1998).

Ces isolats observés et identifiés en 1879 dans des pus de furoncle et d'ostéomyélite par Louis Pasteur comme étant un organisme unique qui forme de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais plutôt associés en petits amas (Eyquem *et al.*, 1998).

Robert Koch en 1880 en France décrivant des grappes de coques dans du pus d'origine humaine (Fasquelle, 1974 ; Spicer, 2003) ; en 1881, Alexander Ogston isola la bactérie à partir d'abcès postopératoires et reproduisit l'infection chez l'animal, ce chirurgien étudia la différence entre *Staphylococcus* et *Streptococcus* (Spicer, 2003 ; Berche *et al.*, 1988).

En 1884, le savant Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries, il a divisé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches *S. albus* ou dorées *S. aureus* (Eyquem *et al.*, 1998).

### 1.3. Habitat :

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont ubiquitaires, peu exigeantes et capables de vivre dans de nombreux sites. Elles sont soit saprophytes de l'environnement extérieur, soit commensales des épithéliums cutané et muqueux des hommes et des animaux (Wertheim, 2005).

### 1.4. Taxonomie et classification :

Le genre *Staphylococcus* appartenait à la famille des *Micrococcaceae* qui distinguait trois autres genres : *Micrococcus*, *Planococcus* et *Stromatococcus* (Fede Righi, 2005).

Les caractères généraux de cette bactérie : une étude a démontré que la composition chimique de la paroi et le pourcentage en guanine et cytosine (G + C %) du génome entre ces quatre genres sont très éloignés, et leur regroupement dans la même famille n'est donc plus justifié. Ainsi que la composition des séquences d'ARN r 16s a confirmé la nécessité d'un profond remaniement de cette famille (Fede Righi, 2005).

Selon la classification de Garrity et ses collaborateurs (2007), le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes* constitué de quatre classes : *Clostridia*, *Mollicutes*,

## Synthèse bibliographique

*Togobacteria* et *Bacilli*. La classe des *Bacilli* compte 2 ordres : *Lactobacillales* et *Bacillales*, ce dernier est divisé en quatre familles, y compris *Staphylococcaceae* qui comprend un seul genre *Staphylococcus* dont G + C % est de 30 + 39 %. Le genre *Staphylococcus* est proche des genres *Listeria* et *Bacillus* (Garrity *et al.*, 2007).

La classification du genre *Staphylococcus* a permis plusieurs remaniements successifs qui reposent sur l'analyse des séquences des gènes codant pour l'ARN ribosomique (ARN r) 16S (Garrity *et al.*, 2002).

On reconnaît actuellement 45 espèces et sous-espèces de staphylocoques, que l'on peut identifier grâce à leurs différents caractères phénotypiques (réactions biochimiques, structure de la paroi, ...) et génotypiques (polymorphisme de restriction, ribotypage et autres). Ces espèces sont retrouvées chez l'homme, d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (Garrity *et al.*, 2002).

Les espèces et les souches du même genre sont pour la grande majorité aéro-anaérobies facultatives, à catalase positive et à oxydase négative (Hennekinne, 2009).

La présence d'une enzyme de catalase permet de les distinguer des autres bactéries à Gram positif et elle est mise en évidence au laboratoire par coagulation du sang (Hennekinne, 2009).

Les espèces sont généralement classées en deux groupes basés sur la capacité à produire une coagulase libre : les staphylocoques à coagulase positive (SCP), qui est les plus pathogènes, et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Hennekinne, 2009).

### **1.5. Pouvoir pathogène des staphylocoques :**

#### **1.5.1. Caractères généraux :**

Germe pyogène par excellence, *S. aureus* est le microbe de la suppuration et certaines souches agissent aussi par libération d'une ou de plusieurs toxines (intoxication alimentaire, syndrome de choc toxique, impétigo) (Curie et Curie, 2002-2003).

La fréquence et la gravité des infections à staphylocoques sont liées à trois principaux facteurs :

1- Le caractère ubiquitaire du germe ;

## Synthèse bibliographique

2- L'abaissement des défenses locales et générales des malades soumis à des soins intensifs, des interventions chirurgicales graves ... etc. ;

3- La fréquente résistance aux antibiotiques du staphylocoque, notamment du staphylocoque hospitalier (Curie et Curie, 2002-2003).

### **1.5.2. Infections à staphylocoques :**

#### **1.5.2.1. Formes cutanées :**

C'est l'atteinte plus ou moins sévère des follicules pilo-sébacés (folliculite, furoncle, anthrax), l'atteinte péri-unguéale (onyxis, péri-onyxis) et l'atteinte du tissu sous-cutané (panaris, phlegmons). Certaines formes superficielles (impétigo) peuvent se compliquer de lésions bulleuses graves lorsque la souche de staphylocoque est productrice d'exfoliatine (Curie et Curie, 2002-2003).

#### **1.5.2.2. Formes muqueuses :**

Otites, sinusites, mastoïdites et conjonctivites.

#### **1.5.2.3. Formes généralisées :**

##### **1.5.2.3.1. Septicémie succédant à un foyer initial cutané-muqueux :**

Diffusion par atteinte des veines (phlébite, caillot et embolie septique en rapport respectivement avec action de la coagulase, de la fibrinolyse et de l'hyaluronidase) (Curie et Curie, 2002-2003).

On l'observe principalement chez les sujets ayant des défenses immunitaires affaiblies, traumatisés, sujets soumis à une intervention chirurgicale grave, sujets en unités de soins intensifs, diabétiques, sujets âgés et nourrissons (Curie et Curie, 2002-2003).

Les septicémies à staphylocoques, qui sont de pronostic redoutable (20 et 30 % de mortalité), se compliquent souvent de localisations ostéo-articulaires (ostéomyélites) et viscérales (même lorsqu'elles sont peu symptomatiques) : pleuro-pulmonaires (abcès-bulleux), uro-génitales (phlegmon péri-néphrétique), cérébrales (abcès du cerveau) et cardiaques (endocardite aiguë) (Curie et Curie, 2002-2003).

# Synthèse bibliographique

## 1.5.2.3.2. Formes intestinales :

Il s'agit soit d'intoxication alimentaire par absorption de toxine préformée dans les aliments contaminés par staphylocoques producteurs d'entérotoxines, soit d'une entérocolite aiguë pseudomembraneuse à staphylocoque, consécutive à une antibiothérapie polyvalente massive et prolongée ayant sélectionné une souche entérotoxique (Curie et Curie, 2002-2003).

## 1.5.2.3.3. Syndrome de choc toxique :

Il a été décrit pour la première fois en 1978 par Todd et ses collaborateurs. Il associe une hypotension artérielle importante avec état de choc, une fièvre (supérieure à 39 °C), une érythrodermie diffuse, une desquamation des paumes et des plantes une à deux semaines après le début de la maladie et une atteinte pluri-viscérale (digestive, musculaire, muqueuse, rénale, hépatique, neurologique et hématologique). Les hémocultures sont négatives, tandis que les prélèvements locaux permettent de cultiver *S. aureus* (Curie et Curie, 2002-2003).

La majorité des cas publiés sont associés à l'usage de tampons vaginaux périodiques particuliers retirés maintenant du marché, les signes cliniques sont liés à la production d'une exotoxine protéique (toxic shock syndrome Toxin 1 ou TSST-1), d'autres toxines (entérotoxine B ou C) seraient impliquées dans le syndrome de choc toxique (Curie et Curie, 2002-2003).

Des syndromes similaires peuvent s'observer au cours d'infections par d'autres bactéries, comme *Streptococcus A* (Curie et Curie, 2002-2003).

## 1.6. Facteurs de virulence des staphylocoques :

### 1.6.1. Composants de la paroi :

Les composants de la paroi comme le peptidoglycane, les acides téichoïques et lipotéichoïques possèdent des effets biologiques démontrés *in vitro*, notamment la sécrétion de cytokines par les cellules lymphomonocytaires, alors que le peptidoglycane est peu immunogène. Les acides teichoïques (polymères linéaires du ribitol-phosphate) donnent naissance à des anticorps que l'on trouve dans le sérum des malades atteints d'infections récentes, ces acides téichoïques sont les récepteurs des bactériophages (lysotypie des staphylocoques) (Curie et Curie, 2002-2003).

Des polysaccharides capsulaires sont trouvés chez 90 % des souches, onze types capsulaires ont été décrits et les types 5 et 8 sont les plus fréquents. Cette capsule permet une

## Synthèse bibliographique

meilleure résistance des souches à l'opsonisation et à la phagocytose. Certaines souches produisent un exopolysaccharide (glycocalix) qui entraîne la formation d'un biofilm engluant les bactéries et leur permettant d'adhérer aux surfaces extérieures. Certaines protéines ou glycoprotéines sont responsables de la spécificité de type, il existe 14 sérotypes mis en évidence par réaction d'agglutination au moyen de sérums immuns (Curie et Curie, 2002-2003).

### 1.6.2. Facteurs d'invasion et d'adhésion :

*Staphylococcus aureus* colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaires, *S. aureus* se fixe aux cellules par l'intermédiaire de protéines de surface, les adhésines, qui sont ancrées dans le peptidoglycane, cinq protéines ont été caractérisées :

- La protéine A, élaborée uniquement par les souches d'origine humaine, se lie au fragment des immunoglobulines, elle intervient dans l'opsonisation et la phagocytose ;
- La protéine de liaison au collagène permet l'adhésion de *S. aureus* au cartilage ;
- La protéine de liaison à la fibronectine permet l'adhésion de *S. aureus* aux caillots plasmatiques, mais aussi aux biomatériaux (cathéters, prothèses) ;
- La protéine de liaison au fibrinogène (clumping factor) provoque l'agrégation de bactéries en présence de plasma permettant de transformer directement le fibrinogène en fibrine ;
- La protéine de liaison à l'élastine (Curie et Curie, 2002-2003).

Il existe des récepteurs pour d'autres protéines plasmatiques (plasminogènes) ou tissulaires (vitronectine, laminine, sialoprotéines de l'os) (Curie et Curie, 2002-2003).

### 1.6.3. Substances élaborées par *S. aureus* :

*S. aureus* élabore des protéines diffusibles douées soit d'activité toxique, soit d'activité seulement enzymatique (Curie et Curie, 2002-2003).

#### 1.6.3.1. Toxines :

Cinq principales toxines sont décrites chez *S. aureus* (Curie et Curie, 2002-2003) :

## Synthèse bibliographique

### 1.6.3.1.1. Hémolysines :

Elles ont une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les globules rouges et les plaquettes. L'hémolysine alpha sécrétée par la quasi-totalité des souches de *S. aureus* est mise en évidence avec les hématies de mouton, de bœuf ou de lapin, la perméabilisation membranaire entraîne une fuite osmotique du contenu cellulaire aboutissant à la mort des cellules (Curie et Curie, 2002-2003).

La cytolysse de plaquettes et de monocytes libère des cytokines et d'autres médiateurs de la réaction inflammatoire expliquant le choc septique des infections sévères à *S. aureus*. La destruction des cellules endothéliales favorise la dissémination des bactéries et les métastases infectieuses (Curie et Curie, 2002-2003).

### 1.6.3.1.2. Leucocidine :

Elle est formée de deux composés codés par des gènes distincts agissant en synergie. Elle agit sur les polynucléaires et les macrophages chez lesquels elle provoque la perte de mobilité, la dégranulation, la destruction nucléaire et la lyse cellulaire. Cette protéine a un rôle important dans la formation du pus (Curie et Curie, 2002-2003).

### 1.6.3.1.3. Exfoliatine :

C'est une protéine thermostable responsable des lésions d'érythrodermie bulleuse que l'on observe parfois au cours des septicémies à staphylocoques et au cours de l'impétigo (Curie et Curie, 2002-2003).

En se fixant à certaines protéines intracellulaires cutanées (profilagrine et filagrine), elle provoque une épidermolyse : décollement intra-épidermique entre le *stratum granulosum* et le *stratum spinosum*. Il y a rupture entre les cellules adjacentes, suivie de celle des ponts intercytoplasmiques (desmosomes), ce qui entraîne des lésions bulleuses. 80 % des sujets adultes ont des anticorps protecteurs contre cette protéine (Curie et Curie, 2002-2003).

### 1.6.3.1.4. Entérotoxine :

Des pourcentages de 30 à 60 % des souches de *S. aureus* produisent une entérotoxine. Il existe 7 sérotypes différents (A, B, C1, C2, C3, D, E). Ce sont des protéines thermostables, insensibles aux enzymes protéolytiques du suc digestif et responsables d'intoxications alimentaires (diarrhée, vomissements, douleurs abdominales et rarement un collapsus cardiaque)

## Synthèse bibliographique

qui apparaissent 1 à 6 heures après l'ingestion. L'entérotoxine A est de loin la plus fréquente (Curie et Curie, 2002-2003).

### 1.6.3.1.5. Toxine responsable du choc toxique staphylococcique (TSST-1) :

C'est une protéine antigénique qui entraîne la formation d'anticorps protecteurs présents chez 85 % des sujets adultes. Cette toxine, comme les entérotoxines, a un effet pyrogène et est un superantigène qui entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires ce qui conduit à la libération de plusieurs médiateurs : interleukine, interféron gamma, TNF (*tumor necrosis factor*) alpha et bêta. Ces médiateurs sont responsables de la symptomatologie du choc toxique staphylococcique, appelé aussi TSST-1 (*Toxic shock syndrome toxin-1*) (Curie et Curie, 2002-2003).

### 1.6.3.2. Enzymes non toxiques :

#### 1.6.3.2.1. Coagulase libre :

C'est une exoenzyme coagulant le plasma d'homme et de lapin (Curie et Curie, 2002-2003).

C'est une protéine thermostable, toujours produite par les souches de *S. aureus*, mais pas par *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus*). Elle provoque la transformation de la prothrombine en thrombine, cette dernière, ainsi activée, agit sur le fibrinogène qu'elle transforme en fibrine. C'est un facteur primordial dans le pouvoir pathogène en coagulant le plasma autour des coques et en les protégeant de la phagocytose ; elle est à l'origine des thrombophlébites suppurées (Curie et Curie, 2002-2003).

#### 1.6.3.2.2. Fibrinolysine :

Elle est caractéristique des souches pathogènes humaines en convertissant le plasminogène en plasmine, elle provoque la dislocation des caillots endoveineux qui libère des micro-embolies septiques, facteurs de septicémie et de localisations septiques secondaires (Curie et Curie, 2002-2003).

#### 1.6.3.2.3. Désoxyribonucléases ou ADNases :

Ce sont des facteurs de destruction des noyaux cellulaires. L'ADNase thermostable est spécifique de *Staphylococcus aureus* (Curie et Curie, 2002-2003).

## Synthèse bibliographique

### 1.6.3.2.4. Hyaluronidase :

C'est une enzyme thermolabile hydrolysant l'acide hyaluronique, substance fondamentale du tissu conjonctif, elle favorise ainsi la diffusion des staphylocoques dans le tissu conjonctif (Curie et Curie, 2002-2003).

### 1.6.3.2.5. Lipase :

Environ 80 % des souches produisent cette enzyme qui semble constituer un facteur de virulence dans les abcès, ou en modifiant les lipides bactériens, elle favorise la survie des staphylocoques (Curie et Curie, 2002-2003).

## 1.7. Diagnostic bactériologique :

Le diagnostic bactériologique de l'infection staphylococcique est uniquement direct (mis en évidence de la bactérie), il n'y a pas de diagnostic indirect par recherche des anticorps circulants, le diagnostic repose sur les principales étapes suivantes :

- Le prélèvement : il doit être aseptique (pour être certain que le staphylocoque que l'on va isoler n'est pas un simple commensal de la peau ou des muqueuses) et avant le début du traitement antibiotique ;
- L'examen microscopique : c'est un examen d'orientation qui vise à rechercher de cocci réguliers à Gram positif et groupés en amas ;
- La culture sur gélose ordinaire dans la majorité des cas ou sur milieu de culture sélectif, comme le milieu de Chapman (qui contient 7 % de NaCl, du mannitol et un indicateur de pH), si le prélèvement est fortement contaminé par d'autres bactéries ;
- L'identification de la bactérie repose sur la mise en évidence des caractères suivants : catalase (différence avec le streptocoque), fermentation du glucose en anaérobiose (différence avec le microcoque), coagulase (différence avec *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*), ADNase thermostable (qui signe l'espèce *S. aureus*) (Curie et Curie, 2002-2003).

Le diagnostic sera toujours complété par la mesure de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme), étant donné la fréquence de la résistance de *S. aureus* aux bêta-lactamines (exemple : pénicilline), aux aminosides (exemple : gentamicine) et à certaines macrolides (exemple : érythromycine), notamment chez les souches hospitalières (Curie et Curie, 2002-2003).

# Synthèse bibliographique

## Chapitre II : Résistance de staphylocoques aux antibiotiques

### 2.1. Introduction :

Pour un traitement, quel qu'il soit, son efficacité à soigner une pathologie est fortement menacée par l'apparition potentielle d'une résistance ; pour un antibiotique, c'est son efficacité à lutter contre un germe concerné. En effet ce dernier peut développer une résistance vis-à-vis de l'antibiotique (Anonyme 2).

La résistance bactérienne est définie comme la capacité des bactéries à résister aux effets des antibiotiques ou des biocides censés les contrôler ou les tuer (Anonyme 2).

Le phénomène d'antibiorésistance n'est pas nouveau, mais le nombre de micro-organismes résistants et multirésistants, ainsi que les localisations géographiques affectées ne cessent de croître dans des proportions inquiétantes (Anonyme 2).

### 2.2. Mécanisme de la résistance bactérienne :

#### 2.2.1. Définition de la résistance bactérienne :

Un micro-organisme est considéré « résistant » vis-à-vis d'un antibiotique lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Carles, 2012).

Les bactéries sont dites multirésistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances naturelle et acquise, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques (Carles, 2012).

Elles sont alors résistantes à plusieurs antibiotiques ou classes pharmacologiques d'antibiotiques (Carles, 2012).

#### 2.2.2. Phénotypes de résistance :

Quand on étudie la sensibilité d'une souche à plusieurs antibiotiques, on détermine son phénotype de résistance aux antibiotiques (Carles, 2012).

Si la souche n'exprime que des résistances naturelles, on dit qu'elle appartient au phénotype sauvage ou sensible (Carles, 2012).

## Synthèse bibliographique

Si des résistances acquises ont modifié sa sensibilité, elle exprime un phénotype de résistance qu'on peut identifier et dont on doit tenter de déterminer le mécanisme (Carles, 2012).

### 2.2.3. Niveaux de résistance :

D'un point de vue bactériologique, on dit qu'une souche est résistante lors qu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que la concentration qui inhibe la majorité des souches de la même espèce (Carles, 2012).

On parle de bas niveau de résistance, si la croissance est stoppée par de faibles concentrations d'antibiotique et de haut niveau de résistance si de fortes concentrations sont nécessaires (Carles, 2012).

## 2.3. Résistance des bactéries aux antibiotiques :

### 2.3.1. Résistance naturelle ou intrinsèque :

La résistance naturelle d'une bactérie est une caractéristique propre à une espèce bactérienne, elle est partagée par toutes les souches normales de cette espèce (Rebiahi, 2012).

La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (Fauchère et Avrile, 2002).

La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques (Fauchère et Avrile, 2002).

### 2.3.2. Résistance acquise :

Elle existe grâce à l'acquisition d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance qui déterminent un phénotype de résistance bien précis, différent du phénotype sauvage, caractérisant les souches n'ayant pas acquis ce mécanisme. Elle ne concerne qu'une population plus ou moins importante de souches d'une espèce (Ros, 1999 ; Meyer *et al.*, 2004).

Dès le début de l'antibiothérapie la résistance acquise a été observée mais sa fréquence était faible. Ultérieurement, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes et on constate, quotidiennement, que de très nombreuses souches ne se comportent pas à l'égard des antibiotiques conformément à ce que les spectres d'activité permettraient de le supposer. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule

## Synthèse bibliographique

identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques (Ros, 1999 ; Meyer *et al.*, 2004).

### 2.3.2.1. Mutation chromosomique ou évolution verticale :

Cette résistance dépend d'une mutation spontanée au niveau du chromosome bactérien et aura pour conséquence la modification ou la perte d'un gène pouvant entraîner soit une modification de la perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques, soit une modification de la cible pariétale ou intracellulaire de l'antibiotique (Calcagno *et al.*, 2011).

C'est un phénomène rare, dû au hasard, il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique, mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes (ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique) (Lozniewski et Rabaud, 2010).

C'est un phénomène indépendant : l'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques (Lozniewski et Rabaud, 2010). La probabilité de deux mutations simultanées est donc très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques.

Elle est transmissible et permanente et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie mère à bactéries filles), toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'antibiotique (Lozniewski et Rabaud, 2010).

### 2.3.2.2. Acquisition des gènes de résistance ou évolution horizontale :

Aussi appelé transfert latéral de gènes, ce processus permet à un organisme d'intégrer du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant. Ce mécanisme joue un rôle dans l'expansion de la résistance extra-chromosomique, il s'oppose au transfert vertical (Calcagno *et al.*, 2011 ; Anonyme 3).

Les plasmides sont des molécules d'ADN indépendant du chromosome et capables d'autoréplication. Ils peuvent être présents « multicopie » (présents en de nombreuses copies) chez une bactérie et des plasmides différents peuvent cohabiter au sein de la même bactérie. Un plasmide peut porter plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques conférant ainsi une multirésistance, certains plasmides possèdent un très large spectre d'hôte (Poly *et al.*, 2000).

## Synthèse bibliographique

Les transposons sont des séquences d'ADN capables de promouvoir leur propre transfert d'un élément génétique (chromosome ou plasmide) à un autre, on parle de « gènes sauteurs ». Ils peuvent s'intégrer au chromosome de la bactérie. Ces éléments mobiles peuvent servir de véhicule aux gènes de résistance et permettre leur dissémination (Poly *et al.*, 2000).

Il a été découvert plus récemment que les gènes de résistances extra-chromosomiques pouvaient aussi être transmis par les intégrons (par transduction). Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison spécifique du site médié par une intégrase (Poly *et al.*, 2000).

### 2.3.2.2.1. Transformation :

La transformation est le transfert passif d'ADN ou exogène d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice, dite en « état de compétence ». Le transfert, qui est partiel et limité à quelques espèces bactériennes, entraîne l'acquisition par la bactérie réceptrice de nouveaux caractères génétiques stables transmissibles. Un fragment d'ADN étranger libéré d'une bactérie (par lyse ou libération active) est absorbé par une autre cellule bactérienne, cette absorption d'ADN est suivie d'une recombinaison génétique (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

Ce modèle a permis de démontrer que l'ADN était le support chimique de l'hérédité en 1944 (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

La transformation naturelle ou physiologique (opposée à la transformation artificielle qui est précédée du traitement chimique ou enzymatique de la paroi bactérienne avant sa mise en contact avec l'ADN) exige l'état de compétence de la bactérie réceptrice, qui n'apparaît qu'à certains stades de la division cellulaire et seulement chez une fraction de la population bactérienne. Il y a d'abord apparition de l'état de compétence chez une bactérie réceptrice qui va ensuite pouvoir fixer l'ADN donneur dans son génome (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

Cette absorption d'ADN polymérisé est suivie d'une recombinaison génétique avec acquisition de nouveaux caractères génétiques stables, donc transmissibles à la descendance. Ce caractère génétique est dénommé « recombinant » ou « transformant » (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

## Synthèse bibliographique

### 2.3.2.2.2. Transduction :

Dans le phénomène de la transduction, l'ADN est transféré d'une cellule à une autre par un bactériophage (Davison *et al.*, 1999).

Ce mécanisme se produit généralement lorsqu'un virus porte accidentellement de l'ADN d'une cellule bactérienne et l'injecte dans une autre, essentiellement à la même espèce (Davison *et al.*, 1999).

Le transfert de gènes de l'hôte par les phages peut se faire de deux façons :

#### 2.3.2.2.2.1. Transduction généralisée :

Elle résulte d'une erreur rare lors de l'assemblage d'un phage, lorsqu'un segment de génome de l'hôte est emporté avec l'ADN du phage (Michael et John, 2007).

Cet ADN sera injecté à l'intérieur de la bactérie réceptrice et pourra apporter des gènes de résistance aux antibiotiques transmis verticalement à la descendance. S'il n'est pas intégré au chromosome de la bactérie réceptrice, il serait perdu par dilution au cours des divisions bactériennes (Michael et John, 2007).

#### 2.3.2.2.2.2. Transduction spécialisée :

C'est une caractéristique de certains phages lysogènes qui sont restés intégrés dans le chromosome de l'hôte un certain temps (Michael et John, 2007).

A l'activation, l'excision du génome viral emporte des gènes adjacents de leur site d'intégration, l'infection d'une autre bactérie par ces virions apportera à celle-ci des nouveaux gènes qui pourront être des gènes de résistances aux antibiotiques (Michael et John, 2007).

#### 2.3.2.2.3. Conjugaison :

La conjugaison est un processus sexuel strict qui nécessite un contact préalable et l'appariement entre deux bactériens de sexe différent avec la formation d'un pont cytoplasmique permettant les échanges bactériens, dont celui du chromosome (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

Le facteur F, facteur de sexualité ou fertilité, est nécessaire à ce mécanisme (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

## Synthèse bibliographique

Ce facteur permet la synthèse de pili sexuels et donne la polarité au chromosome (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

Le transfert d'ADN chromosomique est à sens unique, orienté, progressif et quelque fois total (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

Le transfert de gènes par conjugaison est un facteur majeur d'évolution du patrimoine génétique bactérien et joue un rôle essentiel en bactériologie médicale, notamment dans la résistance aux antibiotiques (Anonyme 4 ; Anonyme 5).

La conjugaison est responsable en grande partie de l'émergence d'une résistance chez les bactéries pathogènes. En pareil cas, la résistance se transmet aux bactéries filles, les bactéries ayant reçu cet élément mobile peuvent se rétablir et redevenir sensibles aux antibiotiques si elles ne sont pas exposées à ces derniers (Yamashita *et al.*, 2000).

### **2.4. Principaux modes de résistance des bactéries :**

Selon Le Loir et Gautier, quatre mécanismes de résistance concernent *S. aureus* ainsi que la plupart des espèces bactériennes d'intérêt médical (Le Loir et Gautier, 2010) :

#### **2.4.1. Phénomène d'imperméabilité :**

Pour qu'un antibiotique soit actif, il faut qu'il pénètre jusqu'à sa cible (Singleton, 2005).

Cela suppose qu'il soit capable de traverser les divers obstacles mis sur sa route par la bactérie (Singleton, 2005).

Ces obstacles potentiels varient selon la localisation de la cible et selon le type bactérien (Gram positif ou négatif), on peut retenir : la capsule, la membrane externe, l'espace périplasmique, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique (Singleton, 2005).

La présence d'une capsule n'est pas un obstacle à la pénétration des antibiotiques. Le peptidoglycane est un réseau lâche qui ne joue pas de rôle dans la rétention des substances, y compris les antibiotiques, l'espace périplasmique qui sépare le peptidoglycane de la membrane cytoplasmique est un bain liquidien où peuvent se trouver des enzymes qui détruiront les antibiotiques (Singleton, 2005).

## Synthèse bibliographique

### 2.4.2. Phénomène d'efflux :

Trois gènes codant pour des systèmes d'efflux ont été décrits chez les cocci à Gram positif. Leur produit forme un transporteur protéique qui diminue l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule (Lina *et al.*, 1999).

Les gènes *msrA* et *msrB* sont responsables d'un phénotype de résistance de type MS, c'est-à-dire d'une résistance inductible vis-à-vis des macrolides dont le noyau comporte 14 et 15 carbones (C<sub>14</sub> et C<sub>15</sub>) et au composé B des streptogramines, après induction par l'érythromycine (Lina *et al.*, 1999).

Le gène *mef* entraîne un phénotype de résistance nommé M, caractérisé par une résistance limitée aux macrolides en C<sub>14</sub> et en C<sub>15</sub> (Lina *et al.*, 1999).

Il est localisé sur des éléments chromosomiques transférables par conjugaison et n'a jamais été retrouvé sur un plasmide (Roberts *et al.*, 1999).

Les gènes *uga* et *ugaB* codent pour des protéines d'efflux du seul composé A des synergistines (Roberts *et al.*, 1999 ; Lina *et al.*, 1999).

Tous ces gènes sont retrouvés chez différentes espèces de staphylocoques à coagulase négative et chez *S. aureus* (Roberts *et al.*, 1999 ; Lina *et al.*, 1999).

### 2.4.3. Défaut d'affinité :

Après la pénétration cellulaire de l'antibiotique, il existe une étape de reconnaissance de la cible, c'est à ce niveau qu'intervient ce type de résistance, il s'agit soit d'une résistance naturelle avec la mauvaise affinité de certains antibiotiques pour les cibles, soit d'une résistance acquise avec modification des cibles et perte d'affinité des antibiotiques pour ces cibles, par exemple les quinolones de première génération n'ont que peu d'affinité à l'ADN gyrase des *Staphylococcus aureus* (Singleton, 2005).

### 2.4.4. Résistance par modification enzymatique de la cible :

Ce mécanisme est impliqué dans la résistance aux macrolides, il est lié à la production des méthylases dont les gènes sont plasmidiques ou chromosomiques (Anonyme 6).

Cette enzyme va méthyler la sous-unité 50S des ribosomes et empêcher les macrolides de s'y fixer (Anonyme 6).

## Synthèse bibliographique

Ce phénomène s'observe chez des bactéries à Gram positif comme les staphylocoques (Anonyme 6).

### 2.5. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques :

#### 2.5.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines :

##### 2.5.1.1. Structure des $\beta$ -lactamines :

Les  $\beta$ -lactamines ont en commun une structure appelée l'anneau  $\beta$ -lactame, qui est formée de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote, cette structure constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules (Fisher *et al.*, 2005).

La structure de base des pénicillines, l'acide 6-aminopénicillanique, est constituée d'un cycle thiazolidine lié au cycle  $\beta$ -lactame, par contre, les céphalosporines se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (ou noyau céphème) avec un atome de soufre en position 1 (Dbaibo, 2000).

Le noyau céphème est beaucoup plus stable que le noyau pénicillanique des pénicillines, ce qui permet aux céphalosporines de mieux résister globalement à l'action diverse des bêta-lactamases bactériennes (Bryskier, 1999).

##### 2.5.1.2. Classification des $\beta$ -lactamines :

Les  $\beta$ -lactamines constituent une grande famille d'antibiotiques dont le représentant le plus ancien est la pénicilline G. Cette famille est répartie en quatre principaux groupes : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (Bryskier, 1999).

##### 2.5.1.3. Mécanisme de résistance :

Il existe deux mécanismes de résistance à ces antibiotiques chez *S. aureus* :

###### 2.5.1.3.1. Résistance par production de bêta-lactamases :

Les bêta-lactamases sont des enzymes plasmidiques inductibles qui catalysent l'inactivation des pénicillines par fixation covalente au niveau du cycle  $\beta$ -lactame (Courvalin et Leclercq, 2012).

Les pénicillinases hydrolysent les pénicillines mais épargnent la plupart des céphalosporines (sauf les céphalosporines de première génération), les monobactames et les

## Synthèse bibliographique

carbapénèmes ; par contre elles sont sensibles aux inhibiteurs (acide clavulanique et tazobactam) (Anonyme 7).

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* est inductible, c'est-à-dire que sa production est accrue en présence de certaines  $\beta$ -lactamines, elle est extracellulaire, c'est-à-dire excrétée par la bactérie (Calcagno *et al.*, 2011 ; Anonyme 3).

Les céphalosporinases sont des  $\beta$ -lactamases chromosomiques produites naturellement à bas niveau par un certain nombre d'espèces (Calcagno *et al.*, 2011 ; Anonyme 3).

### **2.5.1.3.2. Résistance par une protéine de liaison à la pénicilline additionnelle (PLP2a) :**

La protéine liant la pénicilline additionnelle est codée par le gène chromosomique *mecA*. Elle possède une activité enzymatique (transpeptidase, carboxypeptidase ou glycosyltransférase) et a une affinité faible vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines. Les souches de *S. aureus* possédant le gène *mecA* sont donc résistantes à toute la famille des  $\beta$ -lactamines, notamment à la méticilline ou à l'oxacilline. La résistance à la méticilline, qui entraîne une résistance à toutes les bêta-lactamines, est déterminée par la présence du gène *mecA*. Le mécanisme impliqué peut résulter de mutations au sein de ce dernier, conduisant à une hyperproduction d'une de la PLP2a (Chambers, 1997 ; Mainardi *et al.*, 1996 ; Dumitrescu *et al.*, 2010).

### **2.5.2. Résistance aux glycopeptides :**

Le mécanisme de résistance aux glycoprotéines reste à ce jour imparfaitement connu et semble être multifactoriel. Chez les staphylocoques à coagulase négative, le problème existe chez deux espèces : *S. haemolyticus* et *S. épidermidis*. Les CMI 50 de la téicoplanine vis-à-vis de ces espèces sont supérieures à celles de la vancomycine (Mainardi, 1997).

Concernant les staphylocoques dorés intermédiaire aux glycopeptides (GISA), les données récentes traduisent l'existence de nombreuses modifications de la paroi bactérienne avec notamment une production accrue de précurseurs du peptidoglycane (Mainardi, 1997 ; Sieradzki *et al.*, 1999).

Il apparaît cependant que cette résistance repose sur des mécanismes distincts de ceux impliqués chez les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE), puis qu'aucun gène analogue à ceux impliqués chez les entérocoques n'a pu être mis en évidence chez les staphylocoques (Mainardi, 1999).

## Synthèse bibliographique

### 2.5.3. Résistance aux aminosides :

Dans ce cas, l'inactivation enzymatique repose sur l'action de trois groupes d'enzymes, les aminosides-phosphotransférases (APH), les aminosides-nucléotidyltransférases (ANT) et les aminosides-acétyltransférases (AAC), qui catalysent respectivement la phosphorylation des groupements « hydroxyle » (-OH), la nucléotidylation des groupements « hydroxyle » (-OH) et l'acétylation des groupements aminés (-NH<sub>2</sub>). Ces enzymes sont constitutives, intracellulaires, non diffusibles et codées le plus souvent par un plasmide associé ou non à un transposon, donc transférables, elles ne modifient l'antibiotique qu'après sa pénétration dans la cellule bactérienne (Calcagno *et al.*, 2011 ; Anonyme 3 ; Anonyme 7).

Les staphylocoques sont normalement sensibles à tous les aminosides qui sont surtout utilisés en association avec les  $\beta$ -lactamines ou les glycopeptides avec lesquels, ils synergisent en bactéricidie (Bismuth et Leclercq, 2000).

L'aminoside le plus communément touché chez les SARM (*S. aureus* résistants à la méticilline) est l'amikacine, et plus de 90 % d'entre eux expriment une résistance à la kanamycine, cet antibiotique devrait être *a priori* évité dans les infections à staphylocoque. D'autre part, la gentamycine est moins touchée (chez environ 5 à 30 % des SARM) (Leclercq, 2002).

### 2.6. Facteurs induisant la résistance aux antibiotiques :

Les facteurs induisant la résistance aux antibiotiques sont (Carles, 2012) :

- Emergence de la résistance, exemples : usage abusif d'antibiotiques (durée trop courte ou dose sous-thérapeutique) ; diagnostic non confirmé d'infections bactériennes ; utilisation inadéquate d'antibiotiques dans les pays en voie de développement, ... (Carles, 2012).
- Propagation des souches résistantes, exemple : mesures d'hygiène inadéquate dans les hôpitaux ; non-respect des directives de lutte contre les infections ; promiscuité des patients (transfert des patients colonisés ou infectés entre les hôpitaux et milieux communautaires) ; voyages internationaux, ... (Carles, 2012).
- Utilisation d'antibiotiques dans l'agro-alimentaire, exemples : animaux destinés à la consommation, agriculture, aquaculture, ... (Carles, 2012).

## **Synthèse bibliographique**

- Utilisation d'antibiotiques et désinfectants, exemples : agents antibactériens dans les produits d'entretien et les produits ménagers, le dentifrice, les pastilles contre le mal de gorge, les savons, ... (Carles, 2012).

# Synthèse bibliographique

## Chapitre III : Huiles essentielles

### 3.1. Historique :

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme dont il se servait pour se parfumer, aromatiser sa nourriture ou même se soigner (Robert, 2000).

La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes, il plongeait, dans un récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et pierres brûlantes, la vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle (Robert, 2000).

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par la civilisation arabe et égyptienne, qui leur attribuaient avant tout un usage religieux (Selle, 2006).

Puis progressivement, ces huiles essentielles se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants de médecine traditionnelle (Buchbauer *et al.*, 1993).

De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants (Pauli, 2001).

En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques (Pauli, 2001).

A l'apogée de leurs conquêtes en Afrique du Nord et en Espagne, les Arabes le firent connaître aux Espagnols, lesquels à leur tour le propagèrent en Europe, à travers les possessions du Royaume d'Aragon, échelonnées tout le long des côtes du Nord de la Méditerranée (Berthier, 1980 ; Moller, 2008).

### 3.2. Définition :

Les huiles essentielles, encore appelées essences ou huiles volatiles, sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur généralement fortes, extraites à partir des différentes

## Synthèse bibliographique

parties de certaines plantes aromatiques par des méthodes de distillation, par enfleurage et par expression par solvant ou par d'autres méthodes (Belaiche, 1979 ; Valnet, 1984 ; Wichtel et Anthon, 1999).

D'après Bruneton, les huiles essentielles ou les essences sont « des produits de composition généralement assez complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation » (Bruneton, 1999).

### 3.3. Répartition et localisation des huiles essentielles :

#### 3.3.1. Répartition :

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal principalement chez les végétaux supérieurs, il existe environ 17500 espèces aromatiques dans le monde, les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité de familles, exemple : *Myrtaceae* (girofle), *Lauraceae* (laurier), *Lamiaceae* (menthe), ... (Bellakhdar, 1997).

#### 3.3.2. Localisation des huiles essentielles :

Tous les organes végétaux peuvent renfermer des huiles essentielles en particulier les sommités fleuries (lavande, menthe) (Belaiche, 1979 ; Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999 ; Ghestem *et al.*, 2001).

On les trouve aussi dans les écorces (cannelier), les racines (vétiver), les rhizomes (gingembre), les fruits (anis, fenouil, badiane), le bois (camphrier), les feuilles (citronnelle, *Eucalyptus*), les graines (muscade) et les boutons floraux (clou de girofle) (Belaiche, 1979 ; Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999 ; Ghestem *et al.*, 2001).

### 3.4. Classification des huiles essentielles :

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens et grâce à l'indice aromatique obtenu par des aromatogrammes, les huiles essentielles sont classées en groupes, on peut citer :

- Les huiles majeures : ce sont des huiles dont l'action bactéricide est constante ;
- Les huiles médiums : elles ont moyennement antiseptiques, le pouvoir bactéricide est variable suivant les sujets, ces huiles essentielles peuvent donc être majeures pour certains individus ;

## Synthèse bibliographique

- Les huiles terrains : leur pouvoir bactéricide ou bactériostatique est différent d'un individu à un autre (Chacou et Bassou, 2007).

### 3.5. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles :

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bernard *et al.*, 1988 ; Bruneton, 1993).

Les principales caractéristiques sont :

- Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante ;
- Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Elles sont volatiles et très rarement colorées (Institut national des espèces *Salvia*, *Lavandula* et *Mentha* du Maroc, 1948).
- Elles sont solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques, mais peu solubles dans l'eau ;
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux ;
- La densité est faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés, dont une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse (Chaker, 2010).

### 3.6. Composition chimique des huiles essentielles :

Ce sont des mélanges complexes et variables de différents composés chimiques dissous l'un dans l'autre formant des solutions homogènes (Dorosso, 2002).

Ces constituants appartiennent quasi exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'une autre part (Dorosso, 2002).

## Synthèse bibliographique

### 3.6.1. Terpènes et Terpénoïdes :

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires, leur classification est basée sur leur nombre d'unités de base (isoprène ou unité isoprénique) et leur nombre d'atomes de carbone : hémiterpénoïdes (1 unité isoprénique, en C<sub>5</sub>), monoterpénoïdes (2 unités isopréniques, en C<sub>10</sub>), sesquiterpénoïdes (3 unités isopréniques, en C<sub>15</sub>), diterpénoïdes (4 unités isopréniques, en C<sub>20</sub>), ... Ils représentent le groupe le plus important (Bruneton, 1999).

#### 3.6.1.1. Monoterpènes :

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes acycliques, monocycliques ou bicycliques, ils constituent parfois plus de 90 % des huiles essentielles (Bruneton, 1999).

Dans cette catégorie de composés, il existe de nombreuses molécules fonctionnalisées, on cite par exemple :

- Alcools : acycliques (géraniol/nérol, citronellol), monocycliques (menthol) et bicycliques (bornéol) ;
- Aldéhydes : le plus souvent acycliques (géranial/néral, citronellal) ;
- Cétones : acycliques (tagétone), monocycliques (menthone, isomenthone, carvone, pulégone) et bicycliques (camphre, fenchone) ;
- Esters : acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle) et bicycliques (acétate d'isobomyle) ;
- Ethers : comme 1,8-cinéole (eucalyptol), mais aussi les éthers cycliques tétrahydrofuraniques ou dihydropyranique et tétrahydropyraniques qui, pour certains, jouent un rôle majeur dans l'arôme des fruits (oxyde de linalol ou de rose) ;
- Peroxydes : ascaridole ;
- Phénols : thymol, carvacrol (Bruneton, 1999).

## Synthèse bibliographique

### 3.6.1.2. Sesquiterpènes :

C'est la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules, les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précédent, dont les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents (Bruneton, 1999).

### 3.6.2. Composés aromatiques :

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol (Chouiteh, 2012).

Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles, on peut citer par exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (Chouiteh, 2012).

### 3.6.3. Composés d'origine diverse :

En général, ils sont de faible poids moléculaire, entraînés lors de l'hydro- distillation. Ils sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée, porteurs de différentes fonctions, on cite par exemple l'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille (Dorosso, 2002).

## 3.7. Activités biologiques des huiles essentielles :

### 3.7.1. Activité antioxydante :

De nombreuses huiles essentielles, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir antioxydant (Mantle *et al.*, 1998 ; Karioti *et al.*, 2006).

Cette activité est attribuée à certains groupes fonctionnels, en l'occurrence, les alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques, tels que : le linalol, le 1,8-cinéol, le géraniol/néral, le citronellal et quelques monoterpènes dont le  $\gamma$ -terpinène et l' $\alpha$ -terpinolène (Edris, 2007).

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est utilisé comme substitut dans la conservation alimentaire (Edris, 2007).

## Synthèse bibliographique

### 3.7.2. Activité antifongique :

De nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles essentielles du thym, de la citronnelle, de la cannelle et de l'arbre à thé présentent des activités antifongiques (Burt, 2004).

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les micro-organismes envahissant la denrée alimentaire (Lis Balchin, 2002).

### 3.7.3. Activité antimicrobienne :

L'une des premières mises en évidence *in vitro* de l'activité antibactérienne des huiles essentielles date de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle (Cox *et al.*, 2000).

Lorsqu'en 1875, Buchholtz a étudié la croissance des propriétés inhibitrices de l'huile des graines de carvi et thym. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XX<sup>ème</sup> siècle pour que les scientifiques commencent à s'en intéresser (Cox *et al.*, 2000).

Plusieurs recherches ont démontré le pouvoir antimicrobien de certaines essences sur une large palette de micro-organismes, y compris sur des bactéries résistantes aux antibiotiques, la croissance des bactéries résistantes et multirésistantes aux antibiotiques peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se sont révélées efficaces, particulièrement contre les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (May *et al.*, 2000 ; Tohidpour *et al.*, 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (Fisher et Philips, 2009)

Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* et *Staphylococcus aureus* (Shin et Kin, 2005).

De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques : sirops, gouttes, gélules, ... etc., elles rentrent aussi dans la préparation d'infusions telles que la verveine, le thym, la menthe et autres (Shin et Kin, 2005).

## Synthèse bibliographique

### 3.7.4. Activité antivirale :

Les huiles essentielles riches en phénols ont montré une activité antivirale contre certains virus notamment *Herpes simplex* (Girard, 2010).

### 3.7.5. Activité neurale :

Les huiles essentielles possèdent une action sédatrice et agissent sur le système nerveux central en stimulant ou en inhibant le système sympathique ou parasympathique. Elles permettent ainsi la régulation du système nerveux périphérique (Girard, 2010).

### 3.7.6. Autres activités :

Les huiles essentielles possèdent également d'autres activités telles que l'activité désodorisante dans la mesure où certaines huiles essentielles peuvent être utilisées pour lutter contre les mauvaises odeurs (Bruneton, 1993).

De très nombreuses drogues à huiles essentielles, à savoir *Mentha citrata* et *Lippia citriodora*, sont réputées et efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux (Bruneton, 1993).

## 3.8. Principaux domaines d'application :

En raison de leurs diverses propriétés, les plantes et leurs essences présentent un grand intérêt en pharmacie (par leur pouvoir antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif, antidiabétique, ...), en alimentation (par leurs activités anti-oxydante et aromatisante), en parfumerie et en cosmétique (par leur propriété odoriférante) (Seddik, 2010).

Les huiles essentielles sont commercialisées et utilisées dans divers domaines industriels entre autres la pharmacie, la cosmétologie, l'aromathérapie, ... (Seddik, 2010).

### 3.8.1. Aromathérapie :

L'aromathérapie est une forme de médecine alternative dans laquelle les huiles essentielles ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs, ainsi elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que l'acupuncture, la masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, la podologie, la rhumatologie ainsi que dans l'esthétique (Sallé, 2006).

## Synthèse bibliographique

### 3.8.2. Agro-alimentaire :

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisantes, les huiles essentielles sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym, ...), elles sont également très prisées en liquoristerie (boissons anisées, kummel) et en confiserie (bonbons, chocolat, ...) (Teisseire, 1977).

Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures (Bustaf et Foegeding, 1983), comme en cas de conservation du « smen » par exemple par le thym et le romarin (Ismaili et Ben Djilali, 1990 ; Laltoui *et al.*, 1994).

### 3.8.3. Cosmétologie et parfumerie :

Les huiles essentielles sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes, l'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60 %), en particulier celles de rose, de jasmin, de violette et de verveine (Seu-saberno et Blakeway, 1987).

Les huiles essentielles sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques, comme les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les dentifrices, les shampoings, les savons ... etc. (Seu-saberno et Blakeway, 1987).

Enfin le secteur des produits d'hygiène, détergents et lessives par exemple, consomme beaucoup d'huiles essentielles pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs (Seu-saberno et Blakeway, 1987).

### 3.8.4. Pharmacie :

Plus de 40 % de médicament sont à base de composants actifs de plantes (Bruneton, 1999).

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (verveine, thym, menthe,...) et sous la forme de préparations galéniques (Sallé, 1991).

De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisantes de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale (Sallé, 1991).

Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base d'huiles essentielles comme les crèmes, les élixirs, les collyres...etc. (Sallé, 1991).

# Synthèse bibliographique

## 3.9. Facteurs de variabilités des huiles essentielles :

La composition chimique des huiles essentielles de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce, ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes. Le mot « chémotype » est dérivé de chimiotype ou chimiovariété. Cette variation peut être due à de nombreux facteurs, dont nous citons les plus importants (Fekih, 2014) :

### 3.9.1. Origine botanique :

La composition d'une huile essentielle varie en fonction de l'espèce productrice. En effet, l'extraction de l'huile essentielle d'un même organe de deux plantes différentes ne donne pas la même composition chimique (Martinetti, 2013 ; Padrini et Leucheroni, 1997).

Par exemple, la sauge officinale (*Salvia officinalis*) et la sauge sclarée (*Salvia sclarea*) sont deux espèces qui peuvent être vendues sous l'appellation d'essence de sauge, la première, riche en cétones neurotoxiques, peut provoquer des crises d'épilepsie, alors que la seconde possède des esters aromatiques anti-épileptisants (Franchom *et al.*, 2001).

### 3.9.2. Organe producteur :

La composition et le rendement d'une huile essentielle varient selon la partie de la plante à partir de laquelle est extraite (Roulier, 2000).

### 3.9.3. Origine géographique :

Cela permet de connaître l'environnement dans lequel grandit la plante et de caractériser ainsi l'huile essentielle obtenue, il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine (Joy Bowes, 2003).

Une même plante grandissant dans des lieux différents, avec changement de situation géographique (altitude et latitude) et variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes (Joy Bowes, 2003).

Par exemple, le thym vulgaire à géranol ne produit cette molécule de géranol qu'en hiver alors que l'acétate de géranol la remplacera en été (Viaud, 1993).

## **Synthèse bibliographique**

### **3.9.4. Conservation des plantes :**

Les plantes doivent être séchées à l'air et l'ombre. En effet, des modifications chimiques, physiques et biochimiques, dues à l'action de la lumière et de la température, peuvent influencer sur la qualité des huiles essentielles (Roulier, 2000).

### **3.9.5. Mode d'extraction :**

Il existe plusieurs modes d'extraction des huiles essentielles qui peuvent faire évoluer la composition de celles-ci (Roulier, 2000).

# Partie expérimentale

---

## Chapitre IV : Partie expérimentale

### 4.1. Objectif :

L'objectif de ce présent travail est d'étudier la sensibilité des souches de *S. aureus* isolées de lait cru vis-à-vis des antibiotiques et de l'huile essentielle d'*Eucalyptus*.

### 4.2. Lieu et période du travail :

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de la laiterie « Arib », située à Aïn Defla, durant une période très écourtée à cause de la pandémie du COVID-19 et qui s'est étendue de 01/03/2020 à 05/03/2020.

### 4.3. Matériel :

#### 4.3.1. Matériels biologiques :

- Echantillon étudié : lait cru.

#### 4.3.2. Verreries et petits matériels :

- Boîtes de Petri ;

- Pipette Pasteur ;

- Lames et lamelles ;

- Disques d'antibiotiques : Pénicilline (10 UI), Oxacilline (1 µg), Céfoxitine (30 µg), Gentamicine (10 µg), Kanamycine (30 µg), Erythromycine (15 µg), Vancomycine (CMI seulement), Clindamycine (2 µg), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (1.25/23.75 µg), Tétracycline (30 µg), Chloromphénicol (30 µg), Fosfomycine (50 µg), acide fusidique (10 µg), Amikacine (30 µg), Ofloxacine (5 µg), Pristinamycine (15 µg), Teicoplanine (30 µg) et Rifampicine (5 µg) ;

- Ecouvillons ;

- Anse de platine ;

## Partie expérimentale

---

- Tubes à essai.

### 4.3.3. Réactifs et produits chimiques :

- Eau distillée stérile ;

- Eau oxygénée ;

- Réactifs pour coloration de Gram : alcool, fuchsine, solution de Lugol, violet de gentiane.

### 4.3.4. Milieux des cultures :

- Milieu Chapman ;

- Gélose nutritive (GN) ;

- Gélose Mueller Hinton (MH) ;

- Bouillon nutritif (BN).

### 4.3.5. Appareillages :

- Bain-marie ;

- Microscope optique.

## 4.4. Méthodes :

### 4.4.1. Prélèvement du lait cru :

Le lait cru de citerne constitue notre prélèvement. Les échantillons sont prélevés aseptiquement en respectant les règles d'asepsie : désinfection avec l'alcool à 70 ° et flamage à l'aide d'une flamme à alcool du robinet de citerne, puis couler une certaine quantité de lait dans les flacons stériles identifiés (60 ml).

### 4.4.2. Isolement de *S. aureus* :

#### Etape 1 : Enrichissement

Chaque prélèvement de lait cru est incubé à 37 °C pendant 24 heures.

## Partie expérimentale

---

### Etape 2 : Isolement sur un milieu sélectif :

Après avoir coulé le milieu Chapman dans des boîtes de Petri dans une zone aseptique, le milieu Chapman est ensemencé par le prélèvement de lait cru à l'aide d'une anse de platine par la méthode des stries et est incubé à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

#### 4.4.3. Purification des colonies suspectes :

Dans la zone d'asepsie, une colonie bactérienne suspecte sur le milieu Chapman est transférée, à l'aide d'une anse de platine, dans une boîte de Petri contenant de la GN, l'ensemencement se fait par stries et l'incubation est réalisée à 37 °C pendant 24 heures.

#### 4.4.4. Identification de *S. aureus* :

En travaillant toujours dans une zone stérile, et à partir d'une culture pure et fraîche sur la GN, on procède à réaliser la coloration de Gram et mettre en œuvre des tests d'identification.

##### 4.4.4.1. Coloration de Gram :

- Réaliser une suspension bactérienne en mettant une colonie bactérienne prélevée, à l'aide d'une anse de platine, à partir d'une culture fraîche sur GN sur une lame avec une goutte d'eau physiologique stérile ;
- Sécher la lame sur la flamme du bec Bunsen pour fixer le frottis ;
- Verser le violet de gentiane sur la lame et laisser agir pendant 1 minute, puis rincer avec de l'eau distillée ;
- Ajouter la solution de Lugol et laisser agir 45 secondes et rincer avec de l'eau distillé ;
- Ajouter de l'alcool et laisser agir 30 secondes et rincer avec de l'eau distillé ;
- Ajouter la fuchsine et laisser agir 1 minute et rincer avec de l'eau distillé ;
- Laisser la lame sécher à l'air ;
- Ajouter 2 gouttes d'une huile d'immersion et déposer une lamelle sur la lame, puis observer en microscope optique par un grossissement  $\times 1000$ .

## Partie expérimentale

### 4.4.4.2. Test de catalase :

On met une colonie bactérienne à l'aide d'une anse de platine sur une lame, puis on ajoute une goutte d'eau oxygénée. Une réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz.

### 4.4.4.3. Test de coagulase :

On ensemence une colonie bactérienne dans un BN et on l'incube à 37 °C pendant 18 heures.

Après l'incubation, on prend 0.5 ml de la culture sur BN et on ajoute 0.5 ml de plasma humain, le mélange est à incuber à 37 °C pendant 24 heures. Une réaction positive se traduit par la coagulation du plasma humain dans un délai allant de 2 à 24 heures.

Pour valider la positivité de la réaction, il faut impérativement réaliser un témoin (-) : 0.5 ml de BN stérile + 0.5 ml de plasma humain.

### 4.4.4.4. Test de mannitol-mobilité :

Principe	Aspect du milieu après l'ensemencement	Mode d'ensemencement	Lecture
C'est une gélose molle conditionnée en tube et qui permet d'étudier simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité.		Ensemencement par piqûre centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une pipette Pasteur, incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures.	Fermentation du mannitol positive : virage au jaune du tube ; Présence d'une mobilité : diffusion de part et d'autre de la piqûre centrale.

### 4.4.5. Antibiogramme :

#### Principe :

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques.

## Partie expérimentale

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celles-ci.

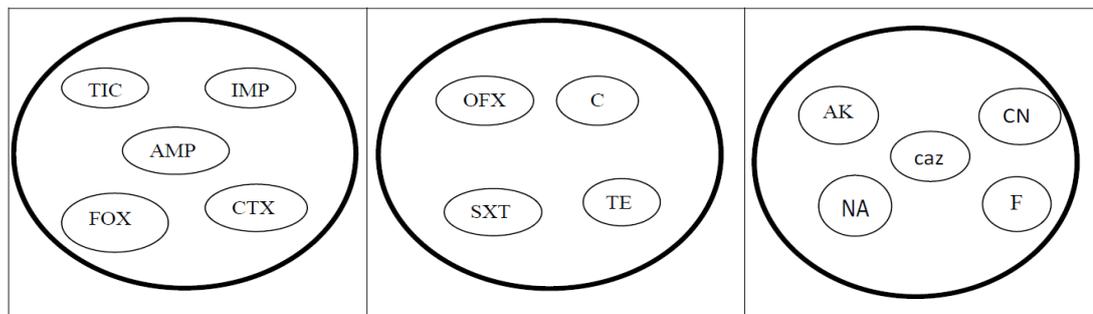
Le milieu utilisé est le milieu MH coulé dans une boîte de Pétri de façon uniforme et jusqu'à avoir une épaisseur de 4 mm.

### Technique :

- A proximité du bec Bunsen et à l'aide d'une anse de platine stérilisée au préalable, prélever un ou deux colonies purifiées ;
- Les déposer dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique, bien mélanger la préparation ;
- Inonder la boîte du milieu de MH par la préparation ;
- Aspirer soigneusement à la pipette Pasteur l'excès de suspension ou rejeter dans un bécher d'eau de Javel.
- Sécher le milieu ensemencé pendant 15 minutes à 37 °C ;
- Appliquer des disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince flambée ou d'un distributeur ;
- Incuber les boîtes dans l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

### Application des disques :

Les disques d'antibiotiques sont déposés, à l'aide d'une pince stérile, sur la gélose MH, selon la méthode illustrée dans la figure 1, on laisse les boîtes environ 20 minutes à la température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis on incube pendant 18 à 24 heures à 37 °C (Leroy *et al.*, 2007).



**Figure 1 :** Disposition des antibiotiques sur les boîtes d'antibiogramme (Leroy *et al.*, 2007).

## Partie expérimentale

---

### Lecture :

A l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition circulaires autour des disques d'antibiotiques sont mesurés en millimètre.

La lecture doit se faire dans les délais recommandés : 18 à 24 heures.

### Interprétation :

L'interprétation est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM, on a des souches sensibles (S), à sensibilité intermédiaire (I) ou résistantes (R).

#### 4.4.6. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle :

##### 4.4.6.1. Détermination de la CMI :

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de la CMI d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure (Rios *et al.*, 1988), car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans un milieu solide gélosé ou dans un bouillon (microdilution ou macrodilution). Ces méthodes peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne *in vitro* des produits testés vis-à-vis des bactéries (Balouiri *et al.*, 2016).

La technique standardisée de dilution en milieu liquide, développée par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) ou plus récemment nommé CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), reste la méthode de référence la plus utilisée (Abbes *et al.*, 2011).

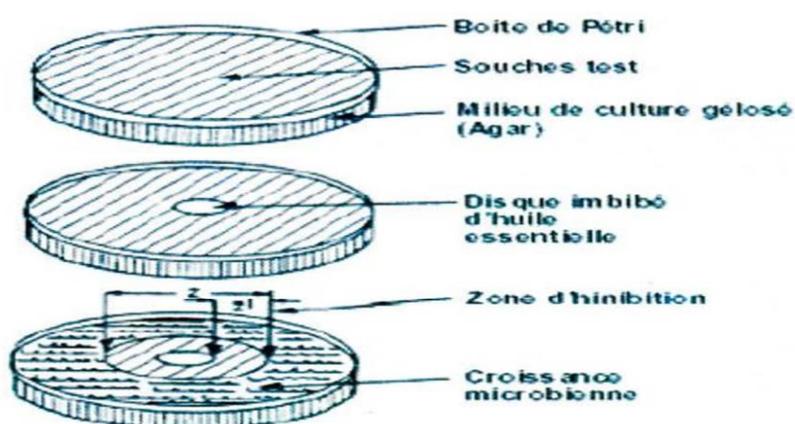
La méthode de macrodilution était parmi les premières à être développées et sert toujours de méthode de référence (Schwalbe *et al.*, 2007 ; Das *et al.*, 2010). Elle est effectuée dans 10 tubes à essai contenant un volume supérieur à 1 ml (habituellement 2 ml) (Jorgensen et Turnidge, 2015). En effet, ces tubes doivent contenir des concentrations différentes de l'agent antimicrobien avec le même volume, et sont ensuite inoculés avec des micro-organismes d'essai à des concentrations standard. Tous les tubes de dosage doivent être incubés pendant 18 à 24 heures dans un incubateur d'air ambiant à 35-37 °C. Après l'incubation, les tubes sont examinés pour détecter les changements de turbidité comme indicateur de croissance. La CMI de l'huile essentielle peut être déterminée par la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui

## Partie expérimentale

inhibera la croissance visible des micro-organismes testés (Schwalbe *et al.*, 2007 ; Das *et al.*, 2010).

### 4.4.6.2. Aromatogramme :

C'est une méthode qui se réalise *in vitro* et est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme. Elle consiste à utiliser des disques en papier imprégnés d'huiles essentielles à la CMI trouvée, puis disposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension bactérienne. Après incubation de 24 heures, les bactéries se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition (Figure 2). On peut exprimer l'activité antimicrobienne en indiquant directement la zone d'inhibition en millimètre. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible, et plus le diamètre est petit, plus la souche est résistante (Belaiche-Danons, 1979).



**Figure 2 :** Illustration de la méthode d'aromatogramme (Zaika, 1988).

### 4.5. Résultats :

Durant la période limitée de notre travail, 8 échantillons ont été soumis à la recherche et l'identification de *S. aureus*.

Les colonies obtenues sur milieu Chapman étaient blanches (mannitol négatif). La coloration de Gram a révélé des coques à Gram positif, isolées, en chaînes et en amas. Toutes les souches isolées étaient à catalase positive et à coagulase négative.

## Conclusion

---

### Conclusion

Le lait occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des Algériens, il apporte la plus grande part de protéines d'origine animale (Anonyme 8).

Cependant, la production du lait de vache se heurte souvent au problème de gestion de la qualité qui pénalise tant les producteurs que les transformations. Les conditions d'hygiène au niveau des fermes et le maintien de la chaîne du froid tout le long du circuit de la production jusqu'à l'arrivée du lait à la laiterie comportent autant des sources de contaminations par *S. aureus* à maîtriser afin de préserver la qualité d'hygiène du lait (Faye et Loiseau, 2002).

L'utilisation des antibiotiques pour le traitement n'est parfois pas efficace parce que les bactéries sont devenues résistantes à cause de l'utilisation accrue des antibiotiques, qui peut engendrer aussi des maladies à savoir l'allergie et le cancer ... etc.

La solution qu'on pourrait apporter pour remédier à cette situation pourrait être l'utilisation des traitements naturels alternatifs.

L'objectif de notre travail est l'isolement de staphylocoques pathogènes à partir du lait cru de vache et d'étudier leur sensibilité aux antibiotiques et à une huile essentielle.

Durant notre pratique qui était très écourtée à cause du COVID-19, on a pu seulement isoler quelques souches de staphylocoques blancs à coagulase négative. L'étude n'a pas pu être achevée et les objectifs n'ont donc pas pu être atteints.

## Références bibliographiques

Abbes S., Trabelsi H., Amouri I., Sallemi H., Nej S., Fatma C., Makni F. et Ayadi A., 2011. Methods for studying the *in vitro* susceptibility of *Candida spp.* to antifungals. Annales de Biologie Clinique. p635-642.

Anonyme 1 : [www.Micobes-edn.Org/étudiant.Staph.Html](http://www.Micobes-edn.Org/étudiant.Staph.Html). Consulté le 04/03/2020.

Anonyme 2 : <http://on.dre.or>. Consulté le 24/03/2020.

Anonyme 3 : <http://anne.decoستر.free.fr/atb/resab.h.tm>. Consulté le 30/04/2014.

Anonyme 4 : <https://www.med.univ-montpl.fr/enseignement/cycle1/PCEM2/mod-base/MB7BioMed/Ressources locales/BCTERIO/B3.Genetique.pdf>. Consulté le 10/04/2014.

Anonyme 5 : <http://www.chups.jussien.Fr/polysbactério//index.html>. Consulté le 10 /04/2014.

Anonyme 6 : <http://www.medecine.ups.tlse.Fr/pcem2/bacteriologie/atb%20>. Consulté le 18/04/2020.

Anonyme 7 : <http://wwwOU-picardie.Fr/servlet/com>. Consulté le 14 /05/2014.

Anonyme 8 : <http://www.agroligne.com/contenu/silait-2008-1<sup>er</sup>-salon-international-lait>. Consulté le 27/04/2020.

Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. Journal of Pharmaceutical Analysis, n° 6, p71-79.

Belaiche P., 1979. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie (tome 1 : l'aromatogramme). Maloine. Paris. France.

Belaiche-Dannons O., 1979. L'aromatogramme. Maloine. Paris. France.

Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis pressed. Paris. France. p764.

Berche P., Gaillard J. L. et Simonet M., 1988. Bactériologie : les bactéries des infections humaines. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. France. p660.

Bernerd T., Periaux F., Brav O., Delmas M. et Gaset A., 1988. Le concept de raffinage végétal : application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat. INPT. Toulouse. France.

Berthier A., 1980. Epices-aromates leurs huiles essentielles et oléorésine. Parfums, Cosmétique, Arômes. n° 34. p39-44.

Bismuth R. et Leclercq R., 2000. *Staphylococcus aureus* et antibiotiques, In Précis de bactériologie clinique. Ed ESKA. Paris. France. p611-616.

Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., De Buyser M. L., Collect C., Groin-Bastuji B. et Thorel M. F., 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. Revue scientifique et technique. 16(1).

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition. Tec. et Doc. Lavoisier. Paris. France. p915.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie : photochimie, plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Tec. et Doc. Lavoisier. Paris. France.

Bryskier A., 1999. Evolution de la chimiothérapie antibactérienne. Ellipse. France. p1216.

Buchbauer G., Jager W., Jirovetz L., Ilmberger J. et Dietrich H., 1993. Therapeutic properties of essential oils and fragrances, inbioactine volatile compound from plants. Chapter 12. Acs symposium séries 525. Washington DC : American Chemical Society.

Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods, a review. Int. J. Food Microbiol. n° 94.

Bustef F. et Foegeding P. M., 1983. Chemical food preservatives. Philadelphia. U.S.A. p656.

Calcagno F., Edouard S. et Haddad V., 2011. Pharma-mémo infectiologie. Ed. Vernazobres-Gregg. Paris. France.

Carles S., 2012. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Pharmactuel. Vol. 42. Supplément 2 décembre 2009. Le parrainage des antimicrobiens : vision 2010.

Chacou M. et Bassou K., 2007. Efficacité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha spicata* L. de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes : *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albican*. Mémoire de DES Microbiologie. Université de Kasdi Merbah. Ouargla. Alger.

Chaker E., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique. Toulouse. France.

Chambers H. F., 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microb. Rev. n° 10.

Chavéron H., 1999. Molécules toxiques. *In* Introduction à la toxicologie nutritionnelle. Tec. et Doc. Lavoisier. Paris. France. p98.

Chouiteh O., 2012. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de doctorat. Université d'Oran. Alger.

Courvalin P. et Leclercq R., 2012. Antibiogramme. 2<sup>ème</sup> édition. ESKA-Médecine. Paris. France. p800.

Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R. et Wullie S. G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology. n° 88.

Curie P. et Curie M., 2002-2003. Bactériologie. Faculté de médecine, Université Pierre et Marie Curie. Niveaux DCEM 1 (Document de Circulation pour Etranger Mineur). France. p29.

Das K., Tiwari R., Shrivastava D., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research. n° 4, 104-111.

Davison J., 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmide. 42(2).

Dbaibo G. S., 2000. Old and new target of antibacterial therapy. Peb. Med. J. n° 48.

Derdreil E., 2008. Les analyses bactériologiques du lait de l'infection mammaire bovine applicables au cabinet vétérinaire en pratique courante et leurs intérêts dans le traitement des mammites. Thèse de doctorat. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. France.

Dorosso S. A., 2002. Composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone Soudanienne du Burkina Faso : valorisation. Thèse de doctorat. Université d'Ouagadougou. Burkina Faso.

Dumitrescu O., Dauwalder O., Boisset S., Reverdy M. E., Tristan A. et Vandenesch F., 2010. Résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*. Med. Sci. Vol. 26(11). Paris. p943-949.

Edris A. E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituent : a review. *Phytother. Res.* n° 21.

Eyquem A., Alouf J. et Montagnier L., 1998. *Traité de microbiologie clinique*. Piccin. Italie. p567-591.

FAO (Food and agriculture organisation), 1994. *Microbiologie et hygiène alimentaire*. Actes du séminaire FAO/AAMHA/FMS sur le thème "recherche des germes pathogènes dans les aliments". Rome. Italie.

Fasquelle R., 1974. *Eléments de bactériologie médicale*. 9<sup>ème</sup> édition. Flammarion. Paris. France.

Fauchère J. L. et Avril L., 2002. *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses Edition Marketing. Paris. France. p250-260.

Faye B. et Loiseau G., 2002. Source de contamination dans les filières laitières et exemples de démarche qualité, gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l'atelier international. Montpellier. France. p11-13.

Fede Righi M., 2005. *Bactériologie alimentaire, compendium d'hygiène des aliments*. 2<sup>ème</sup> édition. Economica. Paris. France. p25-50.

Fekih N., 2014. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. Algérie.

Fisher J. F., Meroueh S. O. et Mobashery S., 2005. Bacterial to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*. 105(2).

Fisher K. et Philips C., 2009. *In vitro* inhibition of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J. Biomed. Sci.* n° 66.

Franchom P., Jallois R. et Daniel P., 2001. L'aromathérapie exactement. *Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. France. p490.

Garrity K. L., Johnson J. et Belland D. B. S., 2002. *Bergy's manual of systematic bacteriology*. 2<sup>nd</sup> edition. Springer, Verlag Revised. New York. p722.

Garrity T. G., George M., Timothy G., Lilburn J. R., Cole S. H., Harrison J. E. et Brian J., 2007. The Bacteria: phylum *Firmicutes*, class *Bacilli*. Taxonomie out line of bacteria and Archaea. 7(7).

Ghustem A., Seguin E., Paris M. et Orecchioni A. M., 2001. Le préparateur en pharmacie, botanique, pharmacognosie, phytothérapie, homéopathie. Tec. et Doc. Paris. France.

Girard G., 2010. Les propriétés des huiles essentielles dans les soins buccodentaires d'hier aujourd'hui. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré Nancy. France. p6-8.

Henne Kinne J. A., 2009. Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive. Thèse de doctorat. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement. Paris. France.

Institut national des espèces *Salvia*, *Lavandula* et *Mentha* du Maroc, 1948. Conception et application à la l'extraction des huiles essentielles. Tome III. Faculté des sciences de Rabat. Maroc.

Ismaili Alaoui M. et Ben Djilali B., 1990. 1<sup>er</sup> séminaire Magrébin sur les plantes aromatiques, Tlemcen. Mémoire de magistère. Université d'Oran. Algérie.

Jorgensen J. H. et Turnidge J. D., 2015. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. Manual of Clinical Microbiology. 11<sup>th</sup> edition. American Society of Microbiology. p1253-1273

Joy Bowes E., 2003. The chemistry of aromatherapeutic oils. 3<sup>rd</sup> édition. Routledge. Bretagne. p56.

Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Drouhiotis D., Ranic A., Hadjipavlou-Litina D. et Skaltsasa H., 2006. Analysis of essential oil of *Organum dubuim* growing wild in cyprus, investigation of its antioxydant capicity and antimicrobial activity. Planta Med. 62.

Kirat S., 2007. Les conditions d'émergence d'un système d'élevage spécialisé en engraissement et ses conséquences sur la redynamisation de l'exploitation agricole et la filière des viandes rouges bovines, cas de Wilaya de Jijel en Algérie. Thèse de master en sciences. Institut agronomique méditerranéen de Montpellier. France.

Laltoui N., Tantaoui E. et Essent J. A., 1994. Oil. Res. 165.

Le Loir Y. et Gautier M., 2010. *Staphylococcus aureus*. Tec. et Doc. Lavoisier. France. p283.

- Leclercq R., 2002. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. Ann. Fr. Anesth. Réanim. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. France. p375-383.
- Leroy F. et De Vuyst L., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food application. Mol. Microbiol. Biotechnol. n ° 13.
- Lina G., Quaglia A., Reverdy M. E., Leclercq R., Vandensch F. et Etienne J., 1999. Distribution of gènes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob. Agent Chemother. n° 43.
- Lis-balchin M., 2002. Lavender, the genus *Lavandula*. 1<sup>st</sup> edition. Taylor and Francis. London et New York . p268.
- Lozniewski A. et Rabaud C., 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques, infections associées aux soins. CCLIN sud-est. Nancy. 1.
- Mainardi J. L., Goldstein F. W. et Gutmann L., 1996. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. Encycl. Méd. Chir. Maladies infectieuses. Elsevier. Paris. 10.
- Mainardi J. L., 1997. Résistance de staphylocoques aux glycopeptides. Méd. Mal. Inf. 27.
- Mainardi J. L., 1999. La résistance des bactéries à Gram positif aux glycopeptides. Actu. Reanim. Urg. 150.
- Mantle D., Anderton J. G., Falkous G., Barnes M., Jone P. et Perry E. K., 1998. Comparaison of methods for determinations of total antioxydant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. Comp. Biochem. Physiol. Molecul. Biol. 121(4).
- Martinetti P., 2013. Mon guide des huiles essentielles. L'Anor. France. p5-6.
- May J., Chan C. H., King A., William L. et French G. L., 2000. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother. 45.
- Meyer A., Deiania J. et Bernard A., 2004. Résistance aux agents antimicrobiens. Doin. Biosciences et techniques. Collection dirigée par Fagarella J. et Calos A. 2<sup>ème</sup> édition. France.
- Michael M. et John M., 2007. Brock : biologie de microbiologie. 11<sup>ème</sup> édition. Pearson. Paris. France. p1047.

- Mnayer D., 2016. Eco-extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. France.
- Moller K., 2008. La distillation à l'alambic : un art à la portée de tous. Unicobres, Editorial UNICO. France. p152.
- Padrini F. et Leucheronie M., 1997. La nature des huiles essentielles. Desxechi. p124.
- Paris M. et Hurabielle M., 1981. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome 1. Masson. Paris. France. p339.
- Pauli A., 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. Int. J. Aromather. 11.
- Poly M. C., Lambert T., Gassama A. et Denis F., 2000. Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Analyses de Biologie Clinique. 58(4).
- Rebaihi G., 2012. Caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibioresistance au niveau du centre hospitalier. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen. Algérie.
- Rios J., Recio M. et Villar A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. Journal of Ethnopharmacology. n° 23. p127-149.
- Robert G., 2000. Les sens du parfum. Osman Eroylls Multimedia. Paris. France. p224.
- Roberts M., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L. B. et Seppala H., 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-tincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother. n° 43.
- Ros A., 1999. La résistance bactérienne ou le naufrage des antibiotiques. VIII<sup>ème</sup> assemblée annuelle des CLIN du sud-est. Lyon. France.
- Rosenbach F. J., 1884. Microorganisme en biederwund, infection, krankheiten des menschen 2. Wiesbaden. Allemagne. p12.
- Roulier G., 2000. Les huiles essentielles pour votre santé. Guide pratique d'aromathérapie et d'aromachologie : propriétés et indication des essences de plantes. Dangles. France. p336.
- Sallé J. L., 1991. Le totum en phytothérapie : approche de phytobiothérapie. Edition Fraison-Roche. Paris. France. p240.

Sallé J. L., 2006. Les huiles essentielles : synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Edition Fraison-Roche. Paris. France. p21.

Schwalbe R., Steele-Moore L. et Goodwin, A. C., 2007. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Crc Press.

Seddik M., 2010. Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région d'Adrar : étude de son activité biologique et antioxydante. Mémoire de magistère. Université d'Oran Es-Senia. Algérie.

Selle C., 2006. The chemistry of fragrance from perfumer to consumer. 2<sup>nd</sup> edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. Angleterre. p329.

Seu-Saberno M. et Blakeway J., 1987. La mousse de chêne, une base de la parfumerie, pour la science. Thèse de magistère. Université d'Oran. Algérie.

Shin S. et Kin J. H., 2005. *In vitro* inhibitory activities of essential oils from two korean *Thymus* species against antibiotic resistant pathogenes, Arch. Pharm. Res. n° 28.

Sieradzki K., Pinho M. G. et Tomasz A., 1999. Inactivated pbp4 in highly glycopeptide-resistant laboratory mutans of *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 274(27).

Singleton P., 2005. Bactériologie pour la médecine, biologie et biotechnologie. Dunod. 6<sup>ème</sup> édition. Paris. France.

Spicer W., 2003. Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie. Flammarion. Paris. France. p28-29.

Teisseire P., 1977. L'actualité chimique, la chimie des parfums. 1<sup>ère</sup> partie. 7.

Tohidpour A., Sattari M., Omibaigi R., Yadegar A. et Nazemi J., 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Phytochimie. 17.

Valnet J., 1984. Aromathérapie, traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S. A. Paris. France. p544.

Viaud H., 1993. Les huiles essentielles et leur distillation, thérapeutique naturelle. GNOMA. 924.

Werthiem H. F. L., Melles D. C., Vos M. C., Van Leeuwen W., Van Belkum A. et Verbrugghe H. A., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infection. *Lancet Infect. Dis.* 5(12).

Wichtel M. et Anthon R., 1999. *Plantes thérapeutiques : tradition, pratiques officinales, science et thérapeutique*, Edition Tec. et Doc. Paris. France.

Yamashita S. K., Louie M., Simor A. E. et Rochlis A., 2000. Microbiological surveillance and parental antibiotic use in a critical care unit. *Canadian Journal of Infection Diseases.* n° 11.

Zaika L. L., 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety.* n° 9.