

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

UNIVERSITÉ BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de
Master en Sciences Biologiques
Option : Microbiologie-Bactériologie

Thème

***Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline :
Profil de Résistance aux Antibiotiques et à l'Huile
Essentielle du Thym (*Thymus vulgaris*)**

Présenté par :
GHANEM Soumia

Soutenu le : 20/09/2017 (Salle 04 - Bloc 01)

Devant le jury:

M. GUETARNI D.	Professeur	Univ. Blida 1	Président
M^{me}BOUDJEMAA N.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Examinatrice
M. BOUKHATEM M.N.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Promoteur
M^{me}LALLAOUI F.	Maitre assistante en microbiologie	CHU Mustapha	Co-Promotrice

Remerciements

Au terme de ce travail, Je tiens à remercier d'abord Dieu le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la patience, la santé et surtout persévérance durant mes années d'études.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon promoteur **BOUKHATEM MN** d'avoir accepté de m'encadrer, et pour ses conseils précieux.

Je remercie ma Co-promotrice **LALLAOUI F** Maitre assistante de CHU de Mustapha-d'Alger qui m'a toujours montrée de l'intérêt pour mes travaux, j'espère que ce mémoire sera un remerciement suffisant au : soutien, sympathie, conseils, disponibilité et à la confiance sans cesse renouvelée dont elle a fait preuve à mon égard.

Je tiens également à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à Monsieur **GUETARNI D** pour avoir honoré ce travail en l'évaluant et en acceptant de présider le jury.

J'exprime toute ma gratitude à Madame **BOUDJEMAA N** pour avoir accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury en qualité d'examinatrice.

Je tiens à remercier également l'équipe du laboratoire central, unité bactériologie (CHU Mustapha-d'Alger).

Enfin, mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour réaliser un de mes rêves .c'est avec un très grand honneur que je dédie le fruit de ce travail comme un geste de reconnaissance à :

Mes très chers parents : Ali et Yamina, source de tendresse, qui ont sacrifié pour mon bonheur, qui m'ont constamment soutenu dans ma vie, pour leur amour et leurs prières.

<< Que dieu me les gardes >>

Mes chères sœurs Amel, Ihcene et ma belle-sœur Rayhana pour leurs complicité et encouragements, que Dieu me les garde pour toute ma vie.

Mes adorables frères : Mohamed et Yassine, à qui je souhaite beaucoup de bonheur et réussite dans leur vie.

Merci à tous mes amis et collègues et à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des Abréviations

AAC : Aminoglycoside Acetyl-transférase	MLS _B i: Phénotype de Résistance par méthylation de la cible de l'antibiotique, "i" pour "inductible"
ADN : Acide Désoxyribonucléique	MS _B : Phénotype de Résistance aux Macrolides – Streptogramines B par efflux
ANT : Aminoglycoside Nucléotidyl-transférase	NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
APH : Aminoglycoside Phospho-Transférase	PLP : Protéines Liaison les Pénicillines
ARN: Acide Ribonucléique	PLP2a : Protéines Liaison les Pénicillines muté
ATB : Antibiotique	R : Résistant
ATCC: American Type Culture Collection	S : Sensible
ATP: Adénosine Triphosphate,	SARM : <i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Mécilline
BGT: Bouillon Glucosé Tamponné	SASM : <i>Staphylococcus aureus</i> Sensible à la Mécilline
CHU: Centre Hospitalo-Universitaire	TSST-1: Toxic Shock Syndrome Toxin -1
CLSI: Clinical Laboratory Standard Institut	VISA :
Cm : Centimètre	Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice	VRSA : Vancomycin Résistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CO ₂ : Dioxyde de Carbone	PEN : Pénicilline
DNase : Désoxyribonucléase	FOX : Céfoxitine
DZI : Diamètre de la Zone d'Inhibition	KMN : Kanamycine
EF-G : Facteur d'Elongation GTPase	GMN : Gentamycine
GISA: Glycopeptide Intermediate <i>S. aureus</i>	ERY : Erythromycine
GN : Gélose Nutritive	CMN : Clindamycine
GSC : Gélose au Sang Cuit	PTN : Pristinamycine
GSF : Gélose au Sang Frais	CIP : Ciprofloxacine
HE : Huile Essentielle	LVX : Levofloxacine
IPA : Institut Pasteur d'Alger	OFX : Ofloxacine
IgG : Immunoglobuline G	VAN : Vancomycine
K : Phénotype de Résistance à la Kanamycine	SXT : Cotrimoxazole
KT : Phénotype de Résistance à la Kanamycine et à la Tobramycine	TET : Tétracycline
KTG : Phénotype de Résistance à la Kanamycine-Tobramycine-Gentamycine	FAD : Acide Fusidique
LCR: Liquide Céphalo-rachidien	RIF : Rifampicine
MH : Muller Hinton	16S: Svedberg (vitesse de sédimentation)
MLS: Macrolides-Lincosamides-Streptogramines	
MLS _B c: Phénotype de Résistance acquise par mutation et Méthylation de la cible de l'antibiotique, "c" pour "constitutif"	

Liste des Tableaux

Tableau 1.1. Enzymes inactivatrices des aminosides et phénotypes de résistance.	9
Tableau 1.2. Principaux phénotypes de résistance aux MLS chez les staphylocoques.	10
Tableau 2.1. Examen bactériologique des différents prélèvements cliniques.	15
Tableau 3.1. Répartition des staphylocoques isolés selon le sexe des patients.	24

Liste des Figures

Figure 1.1. Principales infections humaines causées par les staphylocoques.	4
Figure 1.2. Facteurs de virulence chez les <i>Staphylococcus aureus</i> .	6
Figure 2.1. Illustration de la méthode de l'aromatogramme.	21
Figure 2.2. Illustration de la méthode de microatmosphère.	21
Figure 3.1. Répartition des souches de <i>S. aureus</i> et SARM selon le type de prélèvement.	22
Figure 3.2. Répartition des souches en fonction des services d'hospitalisation.	23
Figure 3.3. Profil de résistance des <i>Staphylococcus aureus</i> .	24
Figure 3.4. Profil de résistance des <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méticilline.	25
Figure 3.5. Phénotypes de résistance des <i>S. aureus</i> aux aminosides.	26
Figure 3.6. Phénotypes de résistance des SARM aux aminosides.	26
Figure 3.7. Phénotypes de résistance des <i>S. aureus</i> aux Macrolides-Lincosamides-Streptogramines.	27
Figure 3.8. Phénotypes de résistance des SARM aux Macrolides-Lincosamides-Streptogramines.	27
Figure 3.9. Activité anti-SARM de l'essence du thym en aromatogramme (20 µL/disque).	28
Figure 3.10. Activité anti-SARM de l'essence du thym en aromatogramme (40 µL/disque).	29
Figure 3.11. Diamètre des zones d'inhibition en aromatogramme à 20 µL (A) et 40 µL (B) d'huile.	29
Figure 3.12. Activité anti-SARM de l'essence du thym en microatmosphère (20 µL/disque).	30
Figure 3.13. Activité anti-SARM de l'essence du thym en microatmosphère (40 µL/disque).	30
Figure 3.14. Diamètre des zones d'inhibition en microatmosphère à 20 µL (A) et 40 µL (B) d'huile.	31
Figure 3.15. Distribution des valeurs des concentrations minimales inhibitrices pour les souches SARM isolées différents prélèvements cliniques.	31

Table des Matières

Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des Abréviations	
Résumé	
Abstract	
Introduction	1
Chapitre 1. Généralités sur les Staphylocoques	
1.1. Caractéristiques des staphylocoques	3
1.1.1. Condensé historique	3
1.1.2. Classification taxonomique	3
1.1.2.1. Staphylocoque doré	4
1.1.3. Facteurs de virulence et de physiopathologie	5
1.1.3.1. Composants de la paroi	5
1.1.3.2. Facteurs d'invasion et d'adhésion	5
1.1.3.3. Substance élaborées par <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.2. Antibiotiques actifs sur <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.2.1. Bêta-lactamines	8
1.2.2. Aminosides	8
1.2.3. Macrolides, Lincosamides, Streptogramine	9
1.2.4. Quinolones	10
1.2.5. Glycopeptides	11
1.2.6. Autres résistances	11
Chapitre 2. Matériel et Méthodes	
2.1. Matériel	13
2.1.1. Souches bactériennes	13
2.1.2. Milieux de culture et solutions de coloration	13
2.1.3. Tests et réactifs d'identification	14
2.1.4. Matériel végétal et huile essentielle	14
2.2. Méthodes	14
2.2.1. Étude bactériologique des différents prélèvements	14
2.2.1.1. Examen macroscopique du prélèvement	14
2.2.1.2. Identification des souches de <i>S.aureus</i>	16
2.2.1.2.1. Etude macroscopique des colonies	16
2.2.1.2.2. Etude microscopiques : (<i>Coloration</i> de Gram)	16
2.2.1.2.3. Identification biochimique	17
2.2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>S.aureus</i>	18
2.2.2.1. Antibiogramme	18
2.2.2.1.1. Recherche de la résistance à la méticilline	18
2.2.2.1.1.1. Test de diffusion du disque de céfoxitine	18
2.2.2.1.1.2. Recherche de la PLP2a (SLIDEX™ - MRSA)	18

2.3.3. Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle	19
2.3.3.1. Technique de diffusion en milieu solide (aromatogramme)	19
2.3.3.2. Technique de diffusion en phase vapeur (Microatmosphère)	19
2.3.3.3. Technique de dilution en milieu gélosé	20

Chapitre 3. Résultats et Discussion

3.1. Analyses microbiologiques des prélèvements	22
3.1.1. Répartition des souches selon le type de prélèvement	22
3.1.2. Répartitions des souches selon les services hospitaliers	23
3.1.3. Répartition des staphylocoques selon le sexe	24
3.2. Antibiorésistance des souches staphylococciques isolées	24
3.2.1. Profil de résistance des <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.2.2. Profil de résistance des <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la Méricilline	25
3.2.3. Résistances associées aux antibiotiques	26
3.2.3.1. Résistance aux aminosides	26
3.2.3.2. Résistance aux Macrolides-Lincosamides-Streptogramines	26
3.3. Screening anti-SARM de l'huile essentielle du thym commun	27
3.3.1. Diffusion en milieu solide (Aromatogramme)	27
3.3.2. Diffusion en phase vapeur (Microatmosphère)	29
3.3.3. Dilution en milieu gélosé	31
3.4. Discussion	32
Conclusion	39
Références Bibliographiques	41
Annexe	

RÉSUMÉ

La recrudescence de la multirésistance aux antibiotiques des staphylocoques dorés constitue un problème majeur de santé publique, provoquant souvent des impasses thérapeutiques.

L'objectif assigné à notre étude est axé sur le diagnostic bactériologique des prélèvements cliniques provenant de différents services hospitaliers du CHU Mustapha d'Alger, en vue de déterminer la prévalence des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et d'évaluer ainsi leur profil de résistance aussi bien aux antibiotiques (ATB) qu'à l'huile essentielle (HE) du thym commun (*Thymus vulgaris* L.).

La sensibilité aux ATB a été déterminée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé, selon les normes du CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute).

Un total de 190 souches de *S. aureus*, dont 52 SARM, ont été isolées de différents prélèvements cliniques chez 172 patients. La majorité des *S. aureus* est issue de suppurations superficielles avec 69 isolats, suivis par les hémocultures où le nombre des souches était de 37. Les souches SARM étaient isolées des suppurations superficielles avec 26 isolats.

La totalité des souches SARM sont résistantes à la pénicilline, l'oxacilline et l'ofloxacine. Une importante résistance a été signalée pour les ATB de la famille des aminosides, en l'occurrence kanamycine et gentamycine avec un taux de 80.77% et 61.54%, respectivement.

En revanche, toutes les SARM étaient sensibles à l'action inhibitrice de l'HE du thym avec des diamètres de zones d'inhibition qui varient entre 30 et 50 mm pour la dose 20 µL, et entre 32 et 80 mm à 40 µL/disque. De meilleurs résultats ont été obtenus en microatmosphère avec une inhibition totale pour tous les isolats SARM provenant des prélèvements bronchiques.

Ces résultats, très encourageants, laissent entrevoir la possibilité d'utilisation de l'HE du thym comme alternative à l'antibiorésistance des SARM. Son intégration dans l'arsenal thérapeutique paraît pleinement justifiée. Seul l'avenir nous dira l'impact réel de ces nouvelles acquisitions.

Mots-clés : *Staphylococcus aureus* résistant méticilline ; Antibiogramme ; Huile essentielle ; *Thymus vulgaris* ; Carvacrol ; Aromatogramme.

ABSTRACT

Nowadays, the resurgence and reappearance of Multi-Drug Resistance bacteria (MDR) and pathogenic staphylococci is still a major public health concern which often leads to therapeutic failure.

The aims of our study were to isolate, identify and determine the occurrence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from different clinical samples of Mustapha Hospital (Algiers) and to evaluate their resistance to both antibiotics and *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO).

Sensitivity to antibiotics was determined by disc diffusion method, according to the standards of CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute).

A total of 190 *S. aureus* strains, including 52 MRSA, were isolated from different clinical specimens of 172 patients. The majority of *S. aureus* originated from superficial suppurations with a 69 strains, followed by blood cultures where the number of strains was 37. MRSA were isolated from surface suppurations with a 26 strains.

All MRSA strains are resistant to penicillin, oxacillin and ofloxacin. Significant resistance has been reported for aminoglycoside antibiotic family, namely kanamycin and gentamycin at 80.77% and 61.54%, respectively. In contrast, all MRSA strains were sensitive to the inhibitory action of TVEO with diameters of inhibition zones ranging between 30 and 50 mm for the 20 µL dose and between 32 and 80 mm at 40 µL of TVEO per disk. Better results have been obtained in the vapour phase with a total inhibition for all MRSA micro-organisms isolated from bronchial specimens.

Finally, our findings are very interesting and suggest the potential use of TVEO against MRSA species. Its integration into the therapeutic arsenal seems fully justified. Further studies will be required in the future to assess their toxicity and human health benefits.

Keywords: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; Disc diffusion method; Essential oil; *Thymus vulgaris*; Carvacrol; Aromatogramme.

INTRODUCTION

Les bactéries pathogènes sont responsables de plusieurs maladies épidémiques et pandémiques. Dès lors, la quête de nouvelles substances anti-infectieuses est devenue un intérêt de santé publique. A partir d'une succession d'observations et de travaux de nombreux chercheurs dont Pasteur, Joubert, Duchesne puis Fleming, cette quête a abouti à la découverte des antibiotiques (ATB) **(Trémolères, 2013)**.

L'avènement de ces nouvelles molécules, au lendemain de la seconde guerre mondiale, fut un avantage important pour l'homme dans cette lutte contre les maladies infectieuses. Ainsi, l'introduction des ATB en thérapeutique a fait progresser l'espérance de vie de l'homme, sans doute plus qu'aucun autre traitement médical. Après moins d'un demi-siècle d'existence, ce brillant tableau affiché par ces anti-infectieux s'assombri progressivement. Durant ces 30 dernières années, les infections microbiennes sont devenues récurrentes du fait de l'apparition progressive des bactéries pathogènes résistantes aux ATB. La surconsommation des ATB a aidé ces bactéries, dotées d'un incroyable pouvoir d'adaptation, à prendre progressivement le dessus **(Martinez, 2009 ; Kempf et Zeitouni, 2012 ; Batardet al., 2012)**.

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux ATB est un phénomène actuellement préoccupant dans les pays en voie de développement où les pathogènes résistants aux ATB peuvent avoir une plus forte prévalence dans certains pays africains. L'Algérie est un pays du nord de l'Afrique où les récentes données de résistance aux ATB indiquent une situation inquiétante. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance notamment dans le nord du pays **(Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014)**.

Les espèces du genre *Staphylococcus* figurent parmi ces germes qui ont un fort pouvoir adaptatif et ont développé différents mécanismes de résistance aux ATB. Plus de 90% des souches produisent une pénicillinase. L'oxacilline reste active contre ces souches, mais des staphylocoques hospitaliers, et plus récemment communautaires (présents hors de l'hôpital), ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M (mécicilline, oxacilline) et les autres β -lactamines par la production d'une Protéine Liant les Pénicillines (PLP) et ayant une faible affinité pour ces composés **(Fernandez-Gerlinger et Mainardi, 2014)**.

Staphylococcus aureus est à l'origine de pathologies extrêmement variées, qui peuvent être des infections suppuratives, localisées ou systémiques, mais aussi des syndromes liés à l'action de toxines. Ces infections relèvent d'un véritable problème de santé publique tant par la virulence de la bactérie que par l'émergence de souches multirésistantes aux ATB. Selon les services hospitaliers, ces dernières représentent entre 20 et 50% des souches (Nuemiet *al.*, 2013). Les premiers cas rapportés d'infection à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) datent de plus de trente ans et revêtaient un caractère nosocomial ; l'acquisition de SARM étant liée à l'hospitalisation récente ou à l'exposition prolongée et récurrente aux ATB. Néanmoins, depuis les années 1990, les infections liées aux staphylocoques se sont multipliées chez les adultes et les enfants n'ayant aucun des facteurs de risque d'acquisition de SARM habituellement décrits (Del Giudice *et al.*, 2012 ; Michel et Pharm, 2013).

Face à cette préoccupation mondiale – qu'est l'émergence des staphylocoques multi-résistants, il est primordial de conduire des études épidémiologiques afin de comprendre et de contrôler la diffusion et l'augmentation de la résistance des staphylocoques aux ATB.

C'est dans ce contexte que nous avons orienté notre étude qui a été réalisée au niveau du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Mustapha d'Alger. Notre travail s'est axé principalement sur le diagnostic bactériologique de différents prélèvements cliniques (hémoculture, liquide céphalo-rachidien (LCR), urines, prélèvements bronchiques, suppurations superficielles, ponctions et matériels (cathéters)), provenant de patients hospitalisés ou des consultations externes, en vue de déterminer la fréquence des *Staphylococcus* pathogènes isolés, en particulier les SARM, et d'évaluer ainsi leur profil de d'antibiorésistance afin de mieux définir les stratégies thérapeutiques et préventives. En outre et afin de contrecarrer cette résistance des SARM, nous avons testé l'efficacité anti-infectieuse de l'huile essentielle du thym commun (*Thymus vulgaris*) sur ces souches de SARM, en utilisant plusieurs méthodes microbiologiques.

Chapitre 1

Généralités sur les Staphylocoques

1.1. Caractéristiques des staphylocoques

1.1.1. Condensé historique

En 1878, Louis Pasteur (1822-1895), travaillant avec Emile Roux et Chamberland sur les germes des maladies, observa au microscope, dans le pus de furoncle et d'ostéomyélite, des formations en « amas de grains » qu'il appelle staphylocoque (**Karthik, 2007**). En 1880, Alexander Ogston (1844-1929), un écossais, isola le premier les staphylocoques à partir d'abcès et d'autres lésions cutanées et les cultiva *in vitro*, reconnaissant leur rôle dans l'inflammation et la suppuration. Il décrivit en 1881 la première espèce connue de staphylocoque : *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque doré en raison de la couleur des colonies bactériennes obtenues en culture.

Plus tard, une autre variété de staphylocoques, donnant des colonies bactériennes non pigmentées, sera nommée tout naturellement staphylocoque blanc (**Kock *et al.*, 2009**). En 1953, est isolée pour la première fois, au Canada, une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la pénicilline qui était à l'origine de lésions de la peau, de pneumonies chez les enfants ou de septicémies. L'arrivée d'un autre ATB, la méticilline, dans les années 60, a mis fin à cette épidémie. La résistance à la méticilline de souches de *S. aureus* isolées en pathologie humaine n'a pas mis longtemps à survenir et a été décrite dès 1961 au Royaume-Uni. Et à partir des années 1970, les souches de *Staphylococcus aureus* Résistantes à la Méticilline (SARM) sont devenues l'une des premières causes des infections acquises à l'hôpital (infections nosocomiales) avec une dissémination mondiale (**Cleefet *et al.*, 2010**).

1.1.2. Classification taxonomique

Selon l'ouvrage de référence pour la taxonomie bactérienne « Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, la 2ème édition » (**Garrity *et al.*, 2004**).

Domaine : Eubacteria ou Bacteria

Phylum XIII: Firmicutes

Classe I: Bacilli

Ordre I : Bacillales

Famille VIII : Staphylococcaceae

Genre I : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus*

1.1.2.1. Staphylocoque doré

Les souches de *S. aureus* sont connues pour provoquer des infections de la peau : furoncles, folliculites, panaris, impétigo, abcès mammaires chez les femmes qui allaitent.

La moindre lésion cutanée peut leur donner l'occasion de proliférer (Wulfetal., 2008). Les infections des muqueuses sont également fréquentes (Figure 1.1).

Au niveau génital, un déséquilibre de la flore naturelle peut laisser aux staphylocoques l'occasion de proliférer. Ils peuvent aussi atteindre les yeux (conjonctivites), les oreilles (otites) ou les voies respiratoires (pneumonies, pleurésies). Toutes ces infections sont susceptibles de se compliquer et d'aboutir à des bactériémies. L'évolution peut alors être fulminante, aiguë et associée à des localisations secondaires multiples et variées (valves cardiaques, os, articulations, rein et cerveau) (Todar, 2005).

Le choc toxique staphylococcique (très rare mais potentiellement mortel), avec sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique, sont dus à des souches productrices de toxines qu'on appelle entérotoxines. Le syndrome d'exfoliation généralisée, et sa forme mineure localisée, l'impétigo bulleux, sont dus à des souches productrices d'exfoliatines (Nehal et al., 2010).

S. aureus partage avec la bactérie *Escherichia coli* le premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales. L'élévation de l'incidence des infections staphylococciques est en rapport avec le nombre croissant de malades immunodéprimés mais aussi avec la multiplication des procédures invasives qui lèsent la barrière cutanéomuqueuse (interventions chirurgicales, pose de cathéters ou de sondes, implantation de prothèses). De telles procédures favorisent la pénétration dans l'organisme de souches véhiculées par les patients ou par les membres de l'équipe soignante (transmission manuportée) (Thomas et al., 2007).

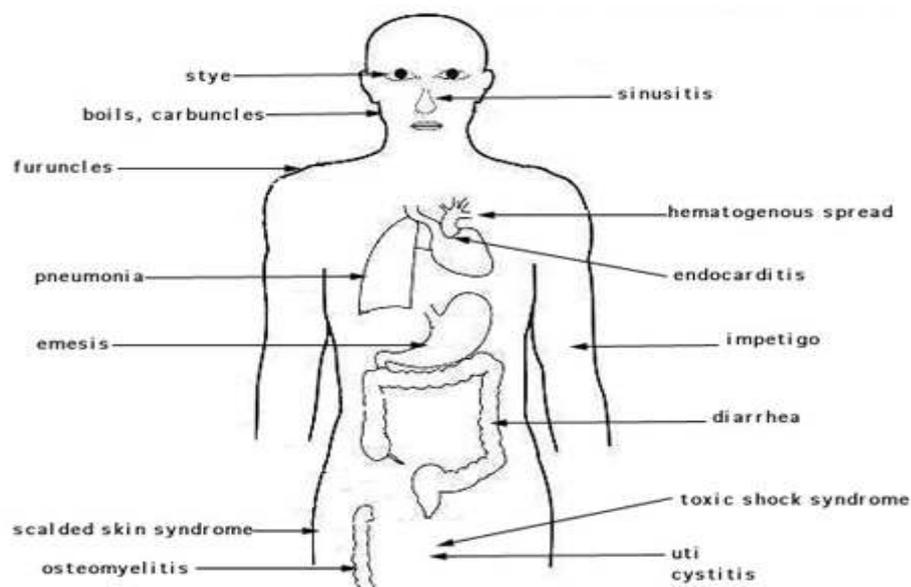


Figure 1.1 :Principales infections humaines causées par les staphylocoques (Thomas et al., 2007).

1.1.3. Facteurs de virulence et de physiopathologie

1.1.3.1. Composants de la paroi

Les composants de la paroi comme le peptidoglycane, les acides teichoïques et lipoteichoïques possèdent des effets biologiques démontrés *in vitro*, notamment la sécrétion de cytokines par les cellules lymphomonocytaires (Schijffelen *et al.*, 2010). 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 de malades atteints d'infection récente. Ces acides teichoïques sont les récepteurs de bactériophages (lysotypie des staphylocoques) (Jensen et Lyon, 2009).

Des polysaccharides capsulaires sont trouvés chez la majorité des souches (Loeza *et al.*, 2004). Cette capsule permet une meilleure résistance des souches à l'opsonisation et à la phagocytose. Certaines produisent un exopolysaccharide (glycocalix) qui entraîne la formation d'un biofilm engluant les bactéries et leur permettant d'adhérer aux surfaces extérieures (Lozano *et al.*, 2011). Certaines protéines ou glycoprotéines sont responsables de la spécificité de type. Il existe 14 sérotypes mis en évidence par réaction d'agglutination (Zmantar *et al.*, 2011).

1.1.3.2. Facteurs d'invasion et d'adhésion

D'après Gomez-Sanz *et al.* (2010), *S. aureus* colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire. Il se fixe aux cellules par l'intermédiaire de protéines de surface, les andésines, qui sont ancrées dans le peptidoglycane (Figure 1.2). 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 qui provoque l'agrégation de bactéries en présence de plasma permettant de transformer directement le fibrinogène en fibrine.
- ✓ La protéine de liaison à l'élastine.

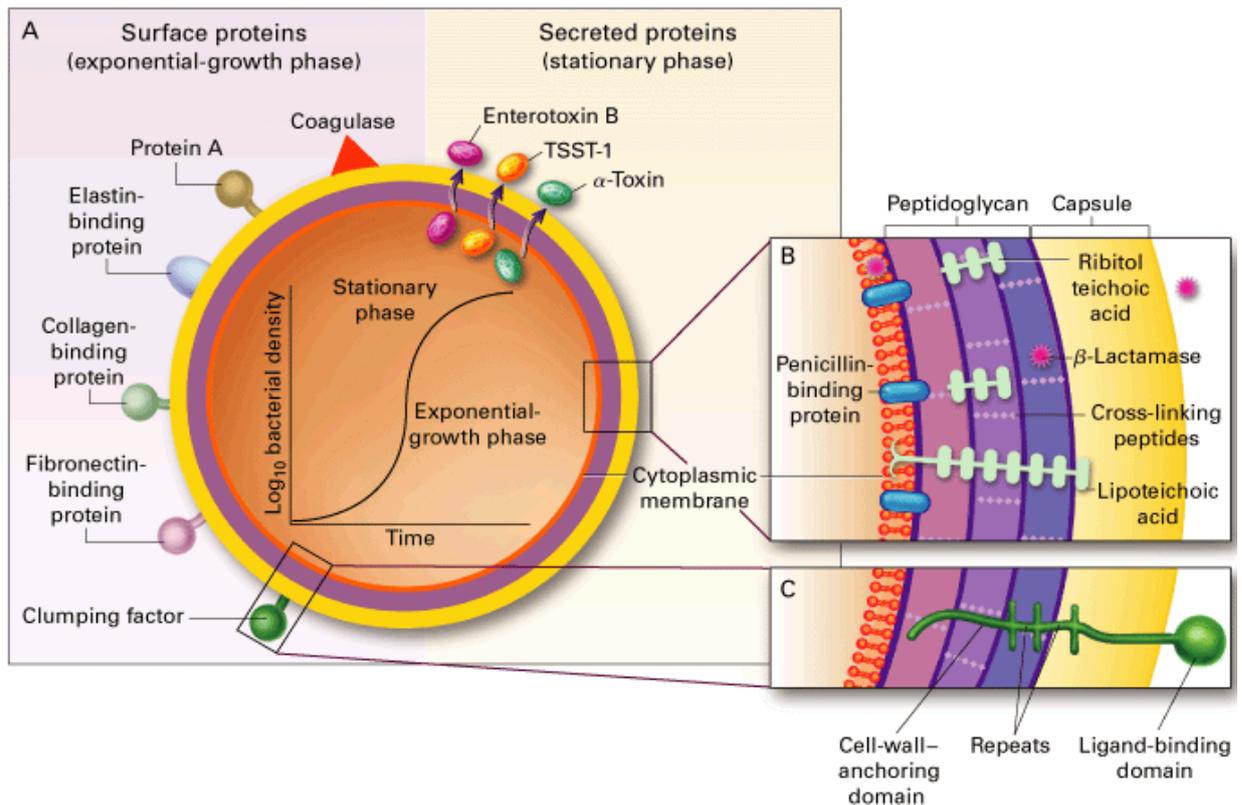


Figure 1.2 :Facteurs de virulence chez les *Staphylococcus aureus*(Gordon *et al.*, 2008).

1.1.3.3. Substance élaborées par *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus élabore des protéines diffusibles douées soit d'activité toxique, soit d'activité seulement enzymatique (Fessler *et al.*, 2010).

- **Toxines :** Selon Mc Dougal *et al.* (2010), cinq principales toxines sont décrites chez *Staphylococcus aureus* :
 - **Les hémolysines** ont une action cytotoxique sur de nombreuses cellules eucaryotes, notamment les globules rouges et les plaquettes. L'hémolysine α , sécrétée par la quasi-totalité des souches de *S. aureus*, est mise en évidence avec des hématies de mouton. La perméabilisation membranaire entraîne une fuite osmotique du contenu cellulaire aboutissant à la mort des cellules. 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 leucocidine** 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.
 - **L'exfoliatine** 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.

- **Les entérotoxines**, dont il existe 7 sérotypes différents, sont des protéines thermostables responsables d'intoxications alimentaires qui apparaissent 1 à 6 heures après l'ingestion. Des souches de *S. aureus* produisent une entérotoxine. Il s'agit d'une protéine thermostable, insensible aux enzymes protéolytiques du suc digestif.
 - **La toxine** responsable du choc toxique staphylococcique (TSST-1): cette protéine antigénique entraîne la formation d'anticorps protecteurs. Cette toxine a un effet pyrogène et entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires, ce qui entraîne la libération de plusieurs médiateurs responsables de la symptomatologie du choc staphylococcique.
- ✓ **Enzymes non toxiques :**
- **La coagulase-libre** est une exo-enzyme coagulant le plasma d'homme ou de lapin. C'est une protéine thermostable, toujours produite par les souches de *S. aureus* et non produite par *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*. Elle active la prothrombine en thrombine. La thrombine 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.
 - **La fibrinolysine** est caractéristique des souches pathogènes humaines. En activant le plasminogène en plasmine, elle provoque la dislocation des caillots endoveineux qui libère des micro-embols septiques, facteurs de septicémie et de localisations septiques secondaires.
 - **La désoxyribonucléase (ou DNases)** sont des facteurs de destruction des noyaux cellulaires. La DNase thermostable est spécifique de *S. aureus*.
 - **L'hyaluronidase** est une enzyme thermolabile hydrolysant l'acide hyaluronique, substance fondamentale du tissu conjonctif : elle favorise ainsi la diffusion des staphylocoques dans le tissu conjonctif.
 - **La lipase** : la majorité des souches produisent cette enzyme qui semble constituer un facteur de virulence dans les abcès où en modifiant les lipides bactériens, elles favorisent la survie des staphylocoques (**Monecke et al., 2007**).

1.2. Antibiotiques actifs sur *Staphylococcus aureus*

1.2.1. Bêta-lactamines

➤ Mécanisme d'action :

Les β -lactamines ont pour cibles différentes enzymes (protéines liant les pénicillines « PLP ») en bloquant la polymérisation du peptidoglycane et secondairement la synthèse par la bactérie d'autolysines conduisant à sa mort (Daurel et Leclercq, 2008).

Quatre types de PLP (PLP1, PLP2, PLP3 et PLP4) sont produits par les *S. aureus*, dont les trois premiers sont considérés comme les cibles les plus importantes des bêta-lactamines (Courvalin et Leclercq, 2012).

➤ Mécanismes de résistance :

La résistance aux β -lactamines repose sur deux grands types de mécanismes qui sont :

- La production de β -lactamases (pénicillinase).
- La modification de la cible des β -lactamines.

A/-Mécanisme de résistance par production de β -lactamases

Les β -lactamases sont des enzymes qui catalysent l'inactivation des pénicillines en hydrolysant le cycle β -lactame. Le gène *blaZ* codant pour les pénicillinases peut être porté par un plasmide ou par un transposon. L'existence d'une pénicillinase entraîne une résistance à la pénicilline G et aux pénicillines A (ampicilline, amoxicilline), aux carboxypénicillines (ticarcilline), et aux uréidopénicillines (pipéracilline). Ce mode de résistance est présent chez 90 % des isolats cliniques (Daurel et Leclercq, 2008 ; Courvalin et Leclercq, 2012).

B/-Mécanisme de résistance par modification de la cible des bêta-lactamines

Cette résistance est liée à la présence du gène *mecA* qui code pour une PLP autre que les PLP normales de *S. aureus* nommée « PLP2a » ou « PLP' » ayant une faible affinité pour les β -lactams, en entraînant par conséquence une résistance à l'ensemble des β -lactamines, y compris les pénicillines M « oxacilline » (Courvalin et Leclercq, 2012).

1.2.2. Aminocyclitolides

➤ Mécanisme d'action

Les aminocyclitolides inhibent la synthèse protéique, en exerçant une activité bactéricide rapide qui justifie leur association aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi (oxacilline et vancomycine) pour le traitement des infections graves (Daurel et Leclercq, 2008).

➤ **Mécanisme de résistance**

La résistance des staphylocoques aux aminosides est surtout due à la production d'enzymes inactivatrices. Trois classes d'enzymes existent dont chacune est responsable d'un phénotype de résistance spécifique (**Daurel et Leclercq, 2008**). Les enzymes inactivant les aminosides sont codées par des gènes plasmidiques ayant un fort potentiel de dissémination (**Quincampoix et Mainardi, 2001**).

Tableau 1.1 : Enzymes inactivatrices des aminosides et phénotypes de résistance (**Daurelet Leclercq, 2008**).

Phénotype/Acronyme	Enzyme	Kanamycine Amikacine	Tobramycine	Gentamicine Nétilmicine
Sauvage		S	S	S
Kanamycine K	Aminoside phospho-transférase APH	R	S	S
Kanamycine- Tobramycine KT	Aminoside nucléotidyl- transférase ANT	R	R	S
Kanamycine- Tobramycine Gentamicine KTG	Aminoside acétyl-transférase- phosphotransphérase APH-AAC	R	R	R

R : résistant, **S** : sensible

1.2.3. Macrolides, Lincosamides, Streptogramine (MLS)

➤ **Mécanisme d'action**

Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse protéique qui agissent lors de l'élongation des chaînes peptidiques. En stimulant la dissociation du ribosome et du complexe ARN de transfert peptidique. Cela entraîne une terminaison réversible de l'élongation protéique. Les macrolides et les lincosamides (lincomycine et clindamycine) n'ont qu'une activité bactériostatique sur les staphylocoques alors que les streptogramines (pristinamycine, quinupristine-dalfopristine), qui résultent de l'association de deux composés A et B agissant en synergie et possédant une activité bactéricide (**Tankovic et al., 1997**).

➤ **Mécanisme de résistance**

- La modification de cible est de loin le mécanisme le plus répandu et confère un spectre de résistance croisée entre macrolides, lincosamides et streptogramines B. En effet, les souches résistantes produisent une méthylase codée par le gène erm (chromosomique ou plasmidique) responsable de la méthylation d'une adénine de l'ARN^{23S} de la sous-unité ribosomale 50S.

Cette altération spécifique et unique du ribosome bactérien a pour conséquence de réduire l'affinité entre l'érythromycine et sa cible sans doute du fait de changement de conformation de l'ARN ribosomal 23S.

La résistance conférée est croisée entre l'ensemble des macrolides, les lincosamides et les streptogramines B dont les sites de fixation se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLSB.

Ce phénotype peut être inductible (MLSBi) quand la méthylase est produite seulement en présence de macrolide inducteur à 14 et 15 atomes, ou constitutif (MLSBC), lorsque la production est permanente, et indépendante de l'antibiotique (Leclercq, 2002).

Le phénotype inductible semble prédominant chez les staphylocoques dorés sensibles à la méticilline, tandis que le phénotype constitutif prédomine chez les SAMR (gène *ermA* prédominant) (Quincampoix et Mainardi, 2001).

- Efflux (phénotype MSB) : due à la présence d'une pompe ATP-dépendante codée par le gène plasmidique *msrA* va conférer une résistance par efflux aux macrolides à 14 et 15 atomes (Daurel et Leclercq., 2008).

Tableau 1.2 : Principaux phénotypes de résistance aux MLS chez les staphylocoques.

Mécanisme	Classe de gènes	Phénotype	Phénotype de résistance			
			14-, 15M	16-M	L	S
Méthylation ribosomale	<i>erm(A), erm(C)</i>	MLSb inductible	R	Sa	Sa	S
		MLSb constitutif	R	R	R	Sb
Efflux	<i>msr(A)</i>	MSB	R	S	S	S

a : Risque de sélection de mutant résistant. b : Activité bactéricide réduite.

1.2.4. Quinolones

➤ Mécanisme d'action

Les staphylocoques sont naturellement résistants aux quinolones de première génération comme l'acide nalidixique mais sont en revanche sensibles aux fluoroquinolones. Les quinolones agissent en inhibant spécifiquement la synthèse de l'ADN, ceci étant rapidement suivi par la mort de la bactérie. Cette action sur l'ADN est secondaire à l'inhibition de deux topo isomérases bactériennes : l'ADN gyrase, qui catalyse le surenroulement négatif de l'ADN, et l'ADN topo-isomérase IV qui est responsable de la décaténation des chromosomes au cours de la réplication (Tankovic et al., 1997).

➤ **Mécanisme de résistance**

Acquisition de la résistance chez les staphylocoques est largement liée la survenue de mutations chromosomiques, ces mutations conduisent à une diminution de la liaison des quinolones sur leurs cibles intracellulaires, ADN-topo-isomérase IV (**Tankovic et al.,1997**).

1.2.5. Glycopeptides

➤ **Mécanisme d'action**

Les glycopeptides agissent sur la synthèse de la paroi bactérienne au cours de l'élongation, à un stade plus précoce que les bêta-lactamines, en ciblant le résidu D-Ala-D-Ala terminaux des précurseurs à la surface de la bactérie avec une haute affinité, bloquant ainsi l'addition des précurseurs a la chaine du peptidoglycane naissant et prévenant les étapesultérieures de polymérisation(**Tankovicet al.,1997**).

➤ **Mécanisme de résistance**

Différents termes et acronymes, VISA (vancomycinintermediate*S. aureus*), GISA (glycopeptideintermediate*S. aureus*), hétéro-VISA (souches sensibles à la vancomycine avec une sous-population vancomycine intermédiaire et en général intermédiaire ou résistant à la teicoplanine), ont été utilisés pour définir les souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides et plus récemment VRSA pour les souches résistantes.

➤ **Souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides**

- ces souches ont une paroi épaissie résultant d'une réorganisation complexe du métabolisme du peptidoglycane liée probablement à des mutations dans de multiples gènes. Ces réorganisations pourraient empêcher l'accès de la vancomycine à sa cible.
- Une autre hypothèse non exclusive serait l'hyperproduction de précurseurs du peptidoglycane agissant comme autant de leurres pour les glycopeptides.

1.2.6. Autres résistances

➤ **Acide fusidique**

L'acide fusidique, représentant unique de sa famille, inhibe la synthèseprotéique en interférant avec une GTPase (facteur d'élongation G (EF-G)), empêchant la progression de la chaine polypeptidique au niveau du ribosome.

Il existe deux mécanismes de résistanceà cet antibiotique chez *S. aureus* : mutation dans le gène*fusA*codant le facteur d'élongation G ou diminution de la perméabilité(**Daurel et Leclercq, 2008**).

➤ **Tétracyclines**

La résistance aux tétracyclines est due soit à un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire codée par les gènes *tetK* ou *tetL* d'origine plasmidique soit une protection de la cible par une protéine codée par le gène transposable *tetM* (Tchougoune, 2007).

➤ **Rifampicine :**

La rifampicine inhibe l'ARN polymérase, bloquant ainsi la transcription. Elle est bactéricide. Des mutations au sein du gène *rpoB* codant la chaîne bêta de l'ARN polymérase sont responsables du phénotype de résistance à cet antibiotique (Daurel et Leclercq, 2008).

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

Notre stage de fin d'étude a été effectué au niveau du laboratoire de Bactériologie du CHU Mustapha d'Alger, durant une période de 5 mois (Février-Juin 2017). L'objectif de notre travail consiste à isoler et identifier les staphylocoques dorés, y compris les SARM, isolées de différents prélèvements cliniques et d'évaluer ainsi leur profil d'antibiorésistance. Ces prélèvements ont été diagnostiqués dans les différents services du CHU. Aussi, des prélèvements de patients auscultés à titre externe ont été obtenus.

L'identification de l'espèce a été faite en se basant sur les caractères morphologiques, culturels et biochimiques. Par la suite, un antibiogramme, par la méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller-Hinton (MH), a été réalisé sur chaque souche bactérienne. La lecture et l'interprétation des résultats ont été faites selon les règles et les recommandations du CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) (Bonnet *et al.*, 2012). L'objectif de cette étude était d'estimer la proportion des staphylocoques dorés et des SARM ainsi que leur profil d'antibiorésistance.

Par ailleurs, la sensibilité des SARM a été explorée avec l'HE du thym par 2 méthodes complémentaires (aromatogramme et microatmosphère) suivie par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Ceci a été fait dans un objectif de trouver une alternative à l'antibiorésistance des SARM.

2.1. Matériel

2.1.1. Souches bactériennes

Des souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) ont été utilisées pour vérifier la fiabilité des différents réactifs et valider les techniques d'identification et les tests de sensibilité aux antibiotiques. Au total, deux souches staphylococciques ont été utilisées en l'occurrence : *S. aureus* ATCC 25923 (sensible à l'oxacilline) et *S. aureus* ATCC 43300 (résistante à l'oxacilline).

2.1.2. Milieux de culture et solutions de coloration

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés lors de notre étude. Nous citerons la gélose nutritive (GN), gélose Muller-Hinton (MH) ou encore le milieu Chapman, gélose au sang frais et gélose au sang cuit, milieu d'enrichissement BGT. Tous ces milieux de culture proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA).

Concernant les solutions de colorations utilisées, nous citerons le violet de gentiane, lugol, fuchsine, bleu de méthylène et alcool (70°). Toutes ces solutions ont été utilisées pour la réalisation de la coloration de Gram et de bleu de méthylène des bactéries isolées.

2.1.3. Tests et réactifs d'identification

L'identification des souches de staphylocoques isolées a été faite à l'aide d'un test rapide d'agglutination (PastorexStaph Plus). Pour les SARM, c'est le kit de recherche de la PLP2a (Slidex-MRSA). Le plasma humain a été aussi utilisé pour la recherche des coagulases libres. La catalase a été employée pour différencier les (cocci à Gram +, catalase+) des (cocci à Gram +, catalase-). Aussi, plusieurs disques d'antibiotiques ont été utilisés afin de déterminer le profil d'antibiorésistance des staphylocoques pathogène. Les ATB utilisés en (Annexe 02).

2.1.4. Matériel végétal et huile essentielle

L'huile essentielle du thym commun (*Thymus vulgaris*) a été fournie par la société « Ziphee.Bio » spécialisée dans la production des HE et des engrais biologiques, sise à Lakhdaria (Bouira). L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de la plante (feuilles et tiges) durant la période de floraison (juin 2014). Le matériel végétal provient des montagnes de Bouira. Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle. L'HE contient le carvacrol (83.8%) comme composé majoritaire, suivi par le *p*-cymène (8.15%) et le terpinène (4.96%). Cette huile est riche aussi en composés oxygénés qui sont les prédominants (86%).

Aussi, l'HE est certifiée « 100% naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de distillation. Elle a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.

2.2. Méthodes

Tous les prélèvements réceptionnés au laboratoire de microbiologie ont été accompagnés d'une fiche de renseignement comportant le nom et prénom du malade, le sexe, l'âge, les signes cliniques ainsi que le traitement d'antibiotique éventuellement entamé.

2.2.1. Étude bactériologique des différents prélèvements

Durant notre période d'étude, les 190 souches de *S. aureus* été isolées de différents prélèvements cliniques à savoir 30 prélèvements d'hémocultures, 2 d'LCR, 14 des urines, 22 des prélèvements bronchiques, 63 des suppurations superficielles, 33 des ponctions ainsi 8 des cathéters.

2.2.1.1. Examen macroscopique du prélèvement :

Cet examen donne des informations importantes. Il consiste à observer à l'œil nu:

❖ Couleur :

- **Suppurations superficielles et profondes** : une évaluation macroscopique des prélèvements de pus ou d'écoulement recueillis, de couleur jaune vert au rouge brun avec une odeur fétide.

- **LCR et liquides de ponctions** : un LCR normal est clair, classiquement en «eau de roche», mais diverses étiologies entraînent des modifications de cet aspect normal si bien qu'il peut apparaître : hémorragique (sanguant), xanthochromique (jaunâtre), trouble (hypercytose).
- **Urine** : va du jaune foncé au rouge brun. Une couleur rouge est due à un mélange avec le sang ou de l'hémoglobine.
- **Prélèvements bronchiques** : rouille, verdâtre, hémoptoïque (sang)
- ❖ **Consistance** : elle peut aller d'un liquide trouble pour LCR, l'urine et l'hémoculture, à une matière très épaisse et collante pour le pus et sécrétions bronchiques.

Pour chaque prélèvement une analyse bactériologique comportant un examen direct et une mise en culture ont été réalisés. L'examen des différents prélèvements est résumé dans le **Tableau 2.1**.

Tableau 2.1 : Examen bactériologique des différents prélèvements cliniques.

Prélèvements	Mise en culture
Suppurations : ✓ Superficielles ✓ Profondes	Culture sur gélose au sang frais (GSF) et gélose au sang cuit (GSC) Incubation à 35°C S/CO ₂ , 24-48h. Enrichissement dans un bouillon glucosé tamponné (BGT)
Hémocultures	culture : GSC, GSF (35°C , S/ CO ₂ 24-48h)
Liquide Céphalo-rachidien	culture : GSC, GSF (35°C, S/ CO ₂ 24-48h) Enrichissement dans du BGT
Ponctions*	culture : GSC, GSF (35°C , S/ CO ₂ 24-48h) Enrichissement dans du BGT Incubation prolongée à 7 jours pour le liquide articulaire
Urines	Ensemencement selon la méthode de l'anse calibrée de 10 µl sur gélose nutritive (GN)
Prélèvements bronchiques **	culture : GSC, GSF (35°C , S/CO ₂ 24-48h)
Cathéter	1 ml d'eau physiologique ajouté au prélèvement puis 10µl ensemencés sur GSF et GSC (35°C S/CO ₂ 18-48 h).

*ponctions : Epanchement pleurale, liquide articulaire.

**prélèvements bronchiques : crachat, prélèvement distal protégé, aspiration endo-trachéale.

2.2.1.2. Identification des souches de *S.aureus*

- Après une mise en culture du prélèvement réceptionné, suivie par une incubation de 24h, toutes colonies individuelles et morphologiquement semblables, issues des cultures bactériennes positives, feront l'objet d'une identification par des tests de coloration et des tests biochimiques.
- Dans le cas de culture polymorphe une étape de purification qui consiste à isoler chaque type bactérien précède l'identification biochimique des bactéries.

2.2.1.2.1. Etude macroscopique des colonies

- ✓ **Sur Gélose Nutritive (GN) :** *S.aureus*, après 24h d'incubation, donne des colonies lisses produisant en général un pigment jaune.
- ✓ **Sur milieu Chapman :** les colonies apparaissent jaunes dorés entourés d'un halo jaune clair due à la fermentation du mannitol.
- ✓ **Sur Gélose au sang frais :** On observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (beta hémolyse) autour des colonies.

2.2.1.2.2. Etude microscopiques : (Coloration de Gram)

- **Principe :** C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer.
- **Technique :** la méthodologie utilisée était celle adoptée par (Ganter et Jolles.,1970).

Les étapes suivies dans cette technique se résument à :

- 1^{ère} étape : préparation de frottis : sur une lame, nous déposons une goutte d'eau stérile. Ensuite nous ajoutons une colonie bien isolée qui sera étalée et fixée à la chaleur.
- 2^{ème} étape : nous réalisons la coloration du frottis. D'abord, nous effectuons une coloration par le violet de gentiane et laissons agir pendant 2 min. ensuite nous rinçons à l'eau courante et recouvrons le frottis par la solution de lugol et laissons agir pendant 30 secondes. Une décoloration à l'alcool sera faite rapidement (15 secondes) suivie par un rinçage. Enfin, une recoloration à la fushine sera effectuée pour une durée d'une minute suivie par un rinçage à l'eau et séchage de la lame. L'observation se fait à l'aide d'une goutte d'huile à immersion l'objectif x100.
- **Lecture :** la présence de staphylocoques sous forme de cocci en amas à Gram +.

2.2.1.2.3. Identification biochimique

- Recherche de la catalase

▪ **Principe :** Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries. La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d' O_2 sous forme gazeuse (Denis et al.,2011).

▪ **Technique :** A partir d'un milieu solide et aérobie, nous avons prélevé une quantité suffisante de culture et la mettons en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame.

▪ **Lecture :** La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d' O_2 .

- Recherche de la coagulase liée (Test d'agglutination rapide)

▪ **Principe :** C'est un test d'agglutination sur lame permettant l'identification rapide des souches de *S. aureus*, prêt à l'emploi et fiable à interpréter avec des résultats en une minute. Des particules de latex rouge sont sensibilisées par des protéines : fibrogène et Ig G humaines (Dupouy-Camet, 2002).

▪ **Technique :** Sur le papier Staphaurex-Plus, nous rajoutons une goutte de latex rouge en prenant une colonie bactérienne et la déposons sur la solution du latex rouge et nous mélangeons.

▪ **Lecture :** Après une minute, si la solution s'agglutine, nous pouvons déduire qu'il s'agit de *S.aureus*.

- Recherche de la coagulase libre :

▪ **Principe :** La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme thermostable ; la staphylocoagulase ou coagulase. Cette dernière agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium (Fang et al., 2003).

▪ **Technique :** Nous prenons trois tubes secs en rajoutant du plasma humain. Dans un tube nous rajoutons une colonie bactérienne de la souche isolée, dans le second tube nous rajoutons une colonie bactérienne de la souche ATCC 25923 (témoin positif) alors que dans le dernier tube aucune souche ne sera rajoutée (témoin négatif). L'incubation se fait à 37°C pendant de 18 à 24h alors que l'observation sera toutes les heures jusqu'à 4 h.

▪ **Lecture :** Si le résultat est positif, il y aura alors une coagulation du plasma.

2.2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S.aureus*

2.2.2.1. Antibiogramme

- **Technique** : Une suspension bactérienne sera préparée en prélevant des colonies pures et les déposer dans l'eau distillée stérile. Après agitation, le tube sera mis dans un densitomètre afin d'obtenir une suspension de densité 0.5 Mac Ferland. Un écouvillon stérile sera trempé dans la suspension bactérienne et l'excès sera enlevé par pression sur les bords du tube. Cet écouvillon sera ensemencé régulièrement sur un milieu gélose de MH. Par la suite, les disques d'ATB seront déposés sur le fond de la boîte, en prenant soin de les éloigner, au minimum, de 1 cm du bord et 24 mm les uns des autres. Un total de 6 disques sera déposé dans chaque boîte. L'incubation se fait à 35°C pendant de 18 à 24 h (**Figure 2.2**).

- **Lecture** : se fait en mesurant les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

Les résultats obtenus seront comparés à ceux des valeurs critiques établies par la CLSI. Par la suite, les bactéries seront classées dans l'une des trois catégories : sensible, résistante ou intermédiaire.

2.2.2.1.1. Recherche de la résistance à la méticilline

La résistance des *S. aureus* à la méticilline (Oxacilline) permet de répartir les souches de *S. aureus* en deux catégories :

- **SASM (méti-S)** : souches de *S.aureus* sensible à la méticilline
- **SARM (méti-R)** : souches de *S.aureus* résistant à la méticilline

La détection de la résistance à la méticilline se fait par plusieurs tests :

2.2.2.1.1.1. Test de diffusion du disque de céfoxitine

- **Principe** : Pour le genre *Staphylococcus*, seul le disque de céfoxitine (30 µg) doit être testé dans l'antibiogramme standard pour la détection de la résistance à l'oxacilline par production de PLP2a, les disques d'oxacilline n'étant pas fiables selon CLSI.

- **Technique** : Déposer un disque de céfoxitine (30 µg) dans les conditions standard de l'antibiogramme incubé à 33-35°C pendant 16 à 18h.

- Si le diamètre d'inhibition de FOX est ≤ 21 mm, la souche est résistante à l'oxacilline (SARM).
- Si le diamètre d'inhibition de FOX est ≥ 22 mm, la souche est dite sensible à l'oxacilline (SASM).

2.2.2.1.1.2. Recherche de la PLP2a (SLIDEX™ - MRSA)

Il s'agit d'un test rapide au latex pour la détection de la Pénicilline Binding Protein 2' (PLP2a) et la confirmation des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

Des particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal dirigé contre la PLP2a vont réagir après extraction spécifiquement avec le SARM entraînant l'apparition d'une agglutination visible à l'œil nu (Technique et lecture en annexe 1).

2.2.3. Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

La recherche de l'activité antibactérienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'HE de thym commun. Pour cela, deux méthodes qualitatives (aromatogramme et microatmosphère) et une quantitative (CMI) ont été examinées.

2.2.3.1. Technique de diffusion en milieu solide (aromatogramme)

Cette méthode utilisée par certains auteurs (**Tyagiet Malik., 2012**) est la technique que nous avons utilisée pour évaluer, dans un premier temps, l'activité antimicrobienne de l'HE. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie, l'antibiogramme (**Satrani, 2007**).

Dans cette méthode (**Figure 2.2**), nous avons utilisés des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne) que nous avons imprégnés d'une certaine quantité d'HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. L'étude du pouvoir anti-SARM par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des disques d'ATB par des extraits aromatiques.

Dans notre étude, nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'HE en imprégnant les disques par 2 quantités croissantes en HE à savoir 20 et 40 μL , séparément. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action "dose-dépendante" de l'essence sur la croissance des germes microbiens.

Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (35°C pendant 24h). L'essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les SARM croissent sur toute la surface gélosée sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence aromatique suffisante qui inhibe leur croissance.

À la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne des SARM se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en millimètres (mm). Plus le DZI est grand, plus la souche est sensible à l'HE.

2.2.3.2. Technique de diffusion en phase vapeur (Microatmosphère)

Nous avons utilisés cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés inhibitrices de la phase volatile de l'HE. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux (**Tyagi et Malik, 2011**).

La différence entre cette technique et les aromagrammes réside principalement dans la position du disque imprégné. Cette méthode permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte Pétri (**Figure 2.3**).

Le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 2 quantités croissantes au disque. En premier lieu, 20 μL goutte d'huile a été déposée sur un disque de papier filtre de 2 cm de diamètre. Dans le 2^{ème} essai, un disque de 4 cm a été imprégné par 40 μL d'HE. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement de l'essence sur le couvercle et, par conséquent, une meilleure diffusion et évaporation. La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière que la première méthode (Aromatogramme). La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à 35°C pendant 24 h. Il se produit une évaporation des substances qui, en contact avec les SARM ensemencés sur la gélose, va inhiber leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire.

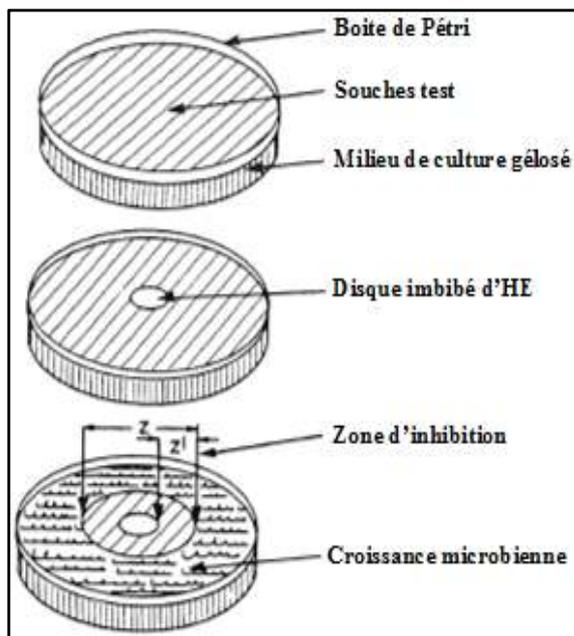


Figure 2.1 : Illustration de la méthode de l'aromatogramme(Zaika, 1988).

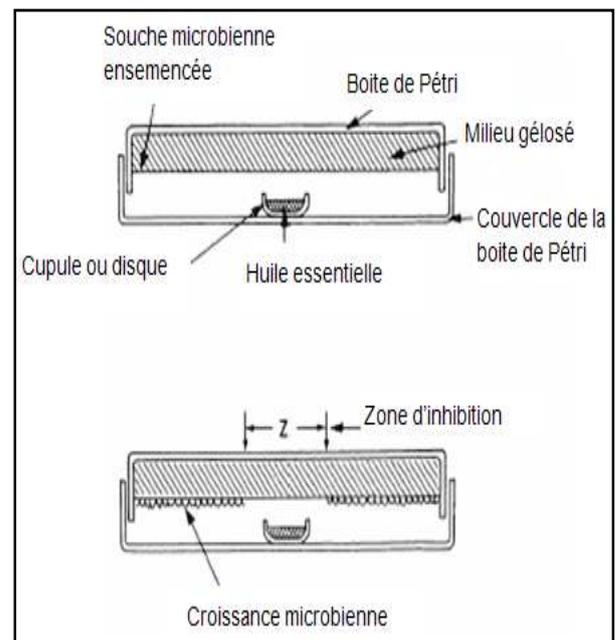


Figure 2.2 : Illustration de la méthode de microatmosphère(Zaika, 1988).

2.2.3.3. Technique de dilution en milieu gélosé

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) pour évaluer la sensibilité des bactéries micro-aérophiles aux agents antibactériens. Elle consiste à ensemencer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE dispersée de façon homogène et stable dans le milieu de

culture. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'un agent dispersant et solubilisant inerte, en l'occurrence le Tween 80.

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

Une série de dilution de l'HE est préparée avec un intervalle de concentrations qui varie entre 2% à 0,03125%. L'ensemencement de chaque milieu sera fait par touche à l'aide d'un écouvillon stérile. Les boîtes Pétri seront incubées à 35°C pendant 24h.

La lecture des résultats se fait visuellement en observant s'il y a l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin (exempte d'HE). La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Le résultat sera exprimé en % (v/v).

A noter que les CMI ont été déterminées uniquement pour les souches ayant manifesté une certaine sensibilité à l'action inhibitrice de l'HE par les méthodes préliminaires.

CONCLUSION

Le diagnostic bactériologique des infections humaines revêt une importance particulière. Il permet une surveillance épidémiologique et guide l'antibiothérapie, à l'heure de résistances bactériennes toujours plus fréquentes. Les infections humaines dues aux staphylocoques occupent une place importante en pathologie infectieuse en raison de leur fréquence et de leur gravité, tant au niveau de l'hôpital qu'au sein des populations.

Notre travail s'est axé principalement sur le diagnostic bactériologique des prélèvements cliniques provenant de différents services hospitaliers du CHU Mustapha d'Alger, en vue de déterminer la proportion des souches de *Staphylococcus aureus* et des SARM isolées et d'évaluer ainsi leur profil de résistance aussi bien aux antibiotiques conventionnels qu'à l'huile essentielle du thym commun et ce afin de mieux définir les stratégies thérapeutiques et préventives.

Les résultats obtenus montrent une grande résistance des *S. aureus* vis-à-vis de la pénicilline, kanamycine et érythromycine. Aussi, toutes les souches des SARM sont résistantes à la pénicilline, l'oxacilline et l'ofloxacine. Différents phénotypes de résistance aux aminosides et aux macrolides ont été constatés lors de cette étude.

La multirésistance des staphylocoques est devenu remarquablement répandue dans les prélèvements humains, d'où la nécessité de la mise en œuvre d'une stratégie active et efficace garantissant une sécurité microbiologique afin d'éviter la propagation de cette résistance. Seules des approches stratégiques et innovantes peuvent nous aider à surmonter ce désastre. Les huiles essentielles se présentent comme les meilleurs candidats pour participer à la recherche d'alternatives. Actuellement, personne ne peut nier l'action des huiles essentielles sur les souches bactériennes résistantes, voire multirésistantes, aux antibiotiques et la bibliographie regorge d'études sur leur pouvoir antimicrobien.

L'essence du thym commun, objet de notre étude, a démontré son efficacité inhibitrice de la croissance de toutes les souches de SARM en phase liquide et vapeur et confirmé, dans le même sillage, le bien-fondé de son application en aromathérapie anti-infectieuse. Son utilisation comme ingrédient actif dans des préparations galéniques topiques anti-infectieuses est pleinement justifié.

La multirésistance des *S. aureus* reste un problème d'actualité et un sujet de préoccupation légitime. La tenue rigoureuse de statistiques locales constamment remises à jour est indispensable pour établir les protocoles de traitement probabiliste. Le monitoring de la sensibilité antibactérienne des types staphylocoques isolés a une grande importance et devrait être continué.

Comme perspectives, il serait intéressant d'apprécier l'action antimicrobienne de cette huile aromatique, en comparaison avec les composés terpéniques isolés, afin de dégager des conclusions sur les possibles effets synergiques entre différents constituants, majoritaire et minoritaire.

Faire des études toxicologiques demeure une priorité et une nécessité, quoique ce type de recherche soit coûteux. Les composés terpéniques complexes peuvent donner un éventail d'interactions avec l'organisme humain, et ceci devrait être pris en compte. Il faut également tenir du compte du fait que les études menées sur les huiles aromatiques, *in vivo*, n'en sont qu'au stade préliminaire.

Le thym et d'autres feront certainement encore, dans un proche avenir, l'objet d'études qui leur permettront (peut-être) de rejoindre le champ glorieux de l'« EvidenceBasedMedicine ».

En définitive, l'objectif final de notre travail a été atteint puisque nous avons contribué à valoriser la fraction aromatique du thym commun comme ingrédient potentiel dans la lutte-prévention des infections bactériennes liées aux SARM. Son intégration dans l'arsenal thérapeutique paraît pleinement justifiée. L'avenir nous dira si l'intérêt qu'elle suscite est cliniquement justifié.

Belle revanche des Aborigènes Australiens qui, depuis des lustres, utilisent ces huiles essentielles pour traiter une large gamme d'infections !

Chapitre 3

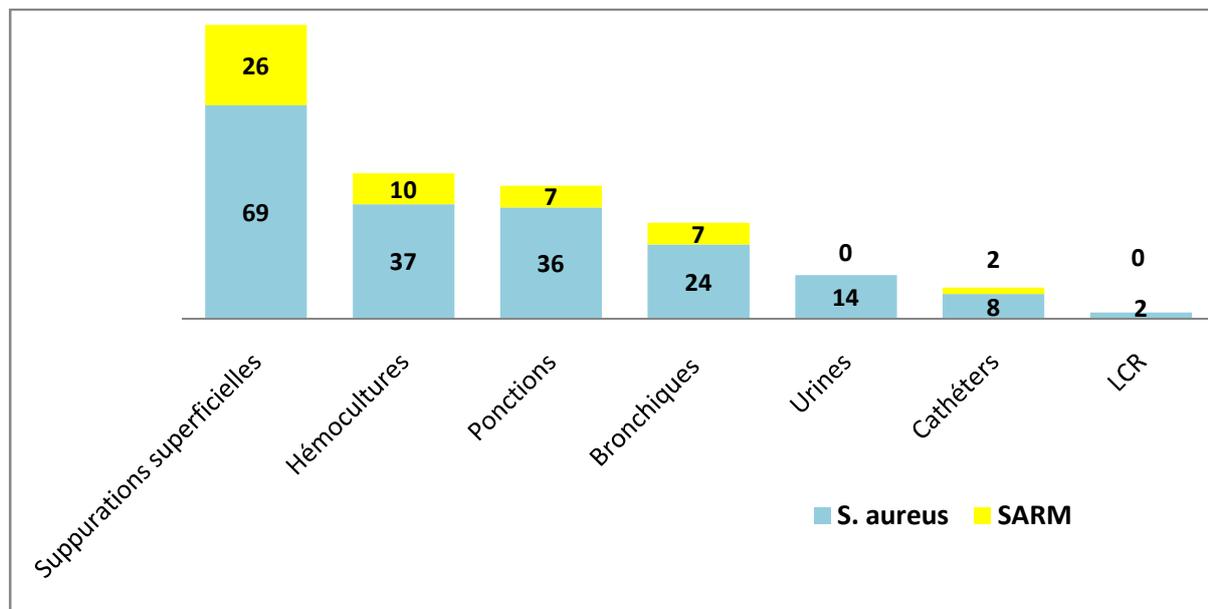
RESULTATS ET DISCUSSION**3.1. Analyses microbiologiques des prélèvements**

Lors de notre étude, plusieurs types de prélèvement ont été analysés (30 prélèvements d'hémocultures, 2 d'LCR, 14 des urines, 22 des prélèvements bronchiques, 63 des suppurations superficielles, 33 des ponctions ainsi 8 des cathéters). L'analyse bactériologique de tous ces prélèvements s'est axée sur l'isolement ainsi que l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* et des SARM. Cette démarche du diagnostic bactériologique a été menée en suivant plusieurs étapes (examens macro et microscopique, identification biochimique et tests de pathogénicité).

Au cours de notre période d'étude, un total de 190 souches de *S. aureus* ont été isolées de différents prélèvements cliniques chez 172 patients.

3.1.1. Répartition des souches selon le type de prélèvement

La répartition des 190 souches de *S. aureus* selon le type de prélèvement est consignée dans la **Figure 3.1**. La majorité 69 souches est issue de suppurations superficielles soit un taux de (36,32%), suivi par les hémocultures où le nombre des souches était de 37(19,47%) et les ponctions avec un nombre de 36 isolats (18,95%). Le reste des prélèvements est représenté par un taux inférieur à 13%.



LCR: Liquide céphalo-rachidien. Bronchiques : prélèvement distal protégé, crachat, aspiration endo-trachéale.
Ponctions : suppurations profondes, liquide pleurale, liquide articulaire.

Figure 3.1 : Répartition des souches de *S. aureus* et SARM selon le type de prélèvement.

Les souches de SARM étaient principalement isolées des suppurations superficielles avec un nombre de 26 souches correspondant à un taux de 13,68%, suivi par les hémocultures 10 souches 5,26 %, les ponctions et les prélèvements bronchiques où le nombre des isolats était de 7 pour les deux types de prélèvement soit un taux de 3,68 %. Il est à noter que les SARM n'ont pas été détectés dans les prélèvements provenant des urines et de LCR.

3.1.2. Répartitions des souches selon les services hospitaliers

Dans la **Figure 3.2**, nous détaillons la répartition des souches de *S.aureus* selon le service d'hospitalisation des malades. Il en ressort de cette répartition que les services de dermatologie et d'anesthésie réanimations sont les principaux pourvoyeurs de souches de *S. aureus* avec 43 et 35 isolats respectivement. Les patients qui consultent en externes viennent en 3^{ème} position avec 25 isolats.

En ce qui concerne les SARM, 48 souches ont été isolées chez des patients hospitalisés et 4 souches chez des malades externes.

Les SARM sont présents dans de nombreux services du CHU (au moins une souche par service). Le nombre de SARM le plus élevé est signalé dans le service d'anesthésie – réanimation avec 16 souches, suivi par le service de dermatologie 13 souches.

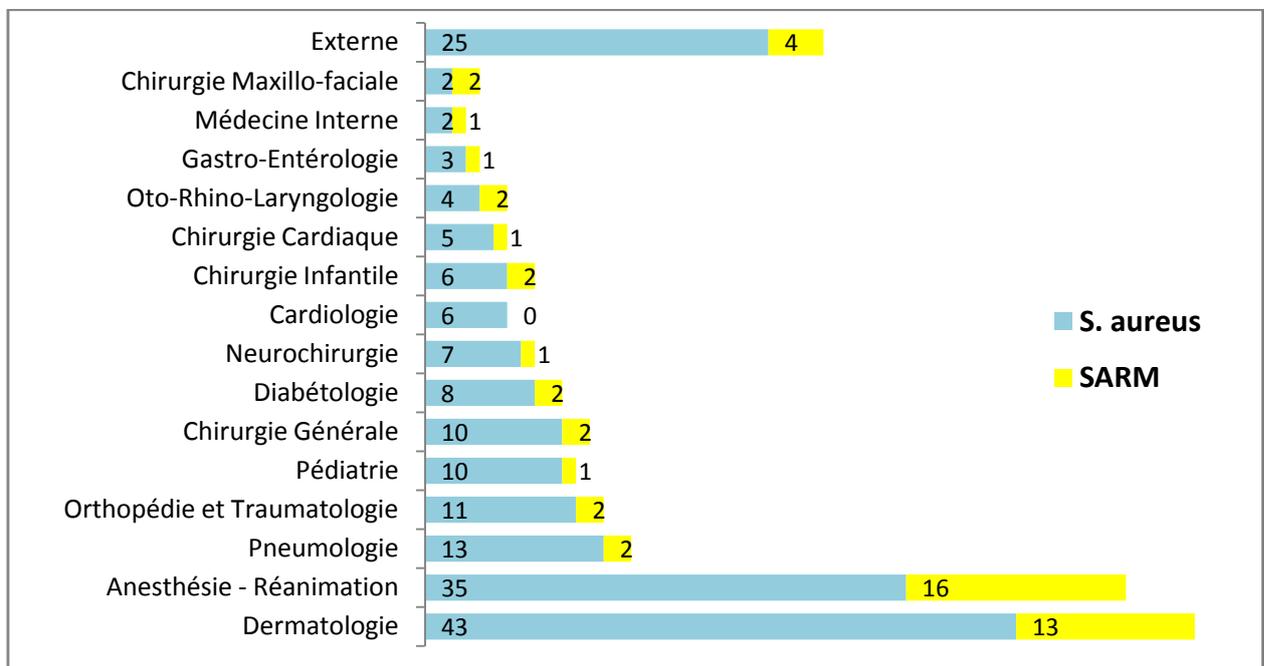


Figure 3.2: Répartition des souches en fonction des services d'hospitalisation.

3.1.3. Répartition des staphylocoques selon le sexe

Nous rapportons, dans le **Tableau 3.1.**, les résultats de la répartition des *S. aureus* isolés, sur un total de 190 souches, selon le sexe des patients. Il en ressort de ces résultats que le nombre des staphylocoques isolés n'est pas similaire chez les deux sexes, avec une prédominance masculine (61%).

Pour ce qui est des SARM, 52 souches ont été isolées chez 16 (8%) Féminin et 36(19 %) Masculin.

Tableau 3.1 : Répartition des staphylocoques isolés selon le sexe des patients.

Sexe	<i>S. aureus</i>		SARM	
	n	%	n	%
Masculin	115	61	36	19
Féminin	75	39	16	8
Total	190		52	

3.2. Antibiorésistance des souches staphylococciques isolées

Une fois les étapes d'isolement et d'identification des souches staphylococciques ont été terminées, une étude du profil d'antibiorésistance de ces isolats a été effectuée en utilisant la technique de diffusion à partir de disque selon les recommandations du CLSI.

3.2.1. Profil de résistance des *Staphylococcus aureus*

Toutes les souches de *S. aureus* ont été soumises à un antibiogramme pour vérifier leur résistance vis-à-vis de 15 ATB appartenant à différentes familles. Les résultats de cette analyse sont rapportés dans la **Figure 3.3.**

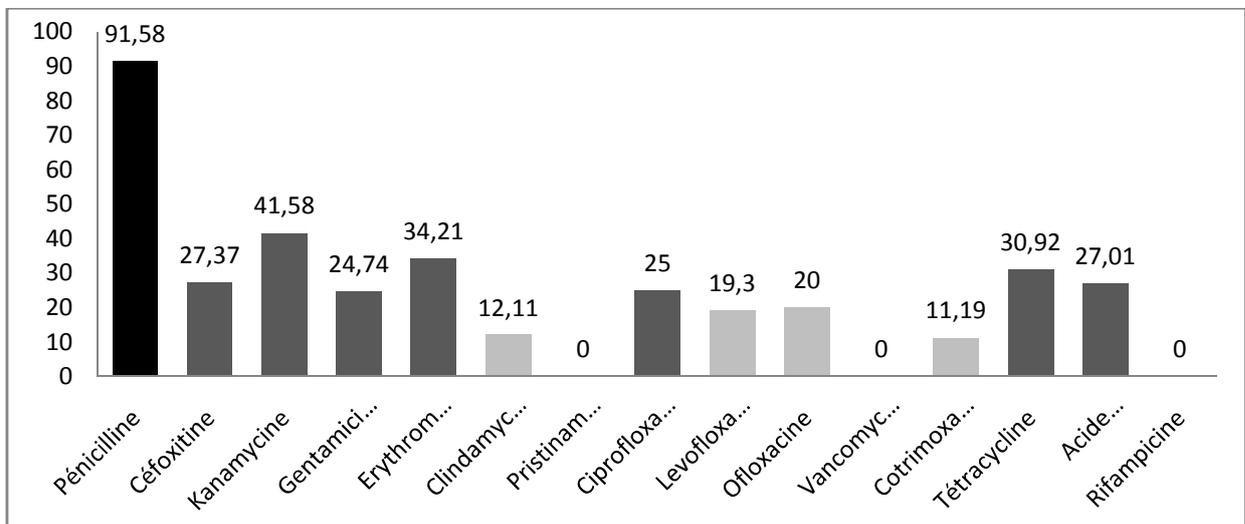


Figure 3.3 : Profil de résistance des *Staphylococcus aureus*.

Un total de 52 souches de *S.aureus*, soit un taux de 27,37%, étaient résistantes à la céfoxitine. De plus, la résistance aux aminosides était plus marquée pour la kanamycine. Pour les trois fluoroquinolones testées, la fréquence de résistance ne dépasse pas les 25%. Les résultats obtenus montrent aussi une grande résistance des *S. aureus* vis-à-vis de la pénicilline avec un taux de 91.58%, suivie de la kanamycine (41.58%) et l'érythromycine (34.21%).

Nos souches restent relativement sensibles au cotrimoxazole (11.19%). Par ailleurs, vancomycine, pristina mycine et rifampicine restent parmi les ATB les plus efficaces car aucune résistance n'a été notée pour les souches staphylococciques pathogènes.

3.2.2. Profil de résistance des *Staphylococcus aureus* résistants à la Méricilline

Concernant les souches SARM, nous avons effectué aussi un antibiogramme pour chaque isolat identifié. Le profil de cette antibiorésistance est rapporté dans la **Figure 3.4**.

Toutes les souches des SARM sont résistantes à la pénicilline, la céfoxitine et l'ofloxacine (100%). Une importante résistance a été signalée pour les ATB de la famille des aminosides, en l'occurrence kanamycine et gentamicine avec un taux de 80.77% et 61.54%, respectivement.

Dans le même sillage que celui des *S. aureus*, vancomycine, pristina mycine et rifampicine restent parmi les ATB les plus efficaces car aucune résistance n'a été notée pour les souches staphylococciques résistantes à la méricilline.

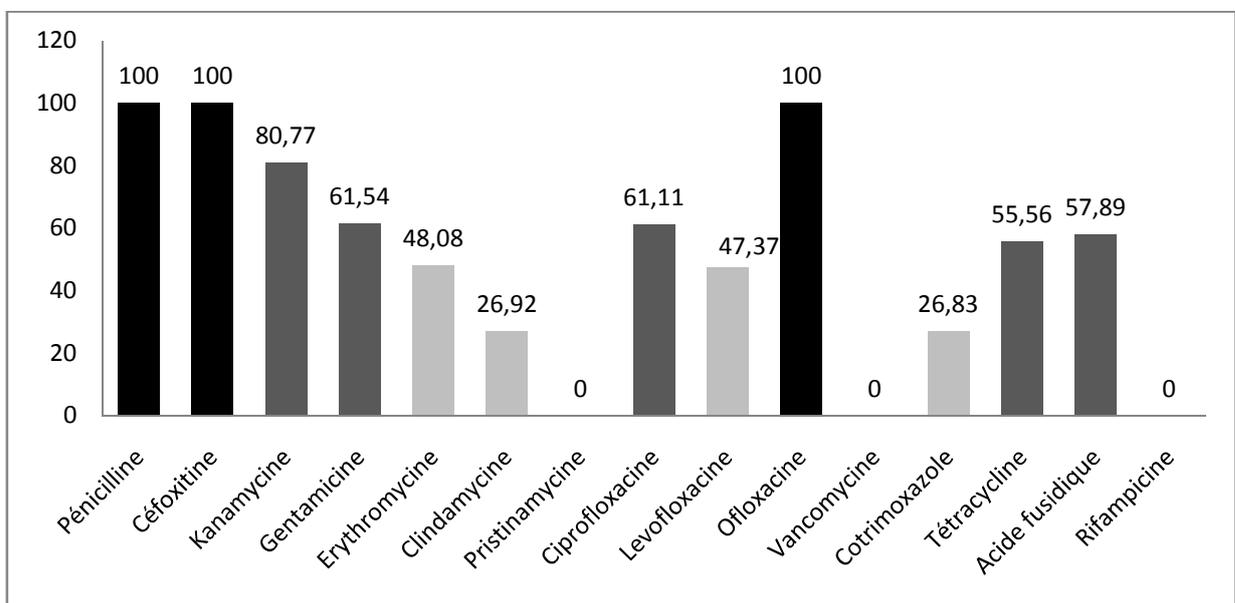
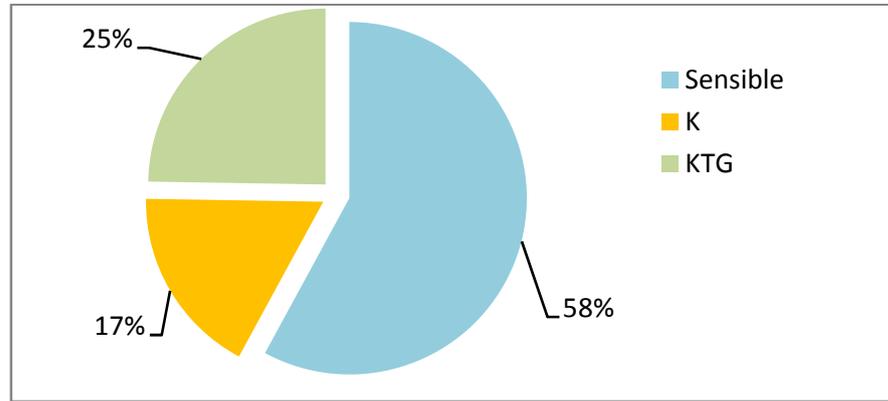


Figure 3.4: Profil de résistance des *Staphylococcus aureus* résistants à la méricilline.

3.2.3. Résistances associées aux antibiotiques

3.2.3.1. Résistance aux aminosides

Pour la totalité des souches *S. aureus*, les différents phénotypes de résistance aux aminosides sont illustrés dans la **Figure 3.5**. Le principal mécanisme de résistance des souches de *S. aureus* isolées est le phénotype KTG car 25% des souches sont résistantes à la Kanamycine-Tobramycine-Gentamycine.



K : Kanamycine ; KTG : Kanamycine-Tobramycine-Gentamycine.

Figure 3.5 : Phénotypes de résistance des *S. aureus* aux aminosides (n =190).

Concernant les souches de SARM, les différents phénotypes de résistance aux aminosides sont illustrés dans le **Figure 3.6**. Il apparaît clairement que c'est le mécanisme de résistance est lié au phénotype KTG qui est prédominant car un taux de 62% des souches sont résistantes aussi bien à la gentamycine que la tobramycine et la kanamycine.

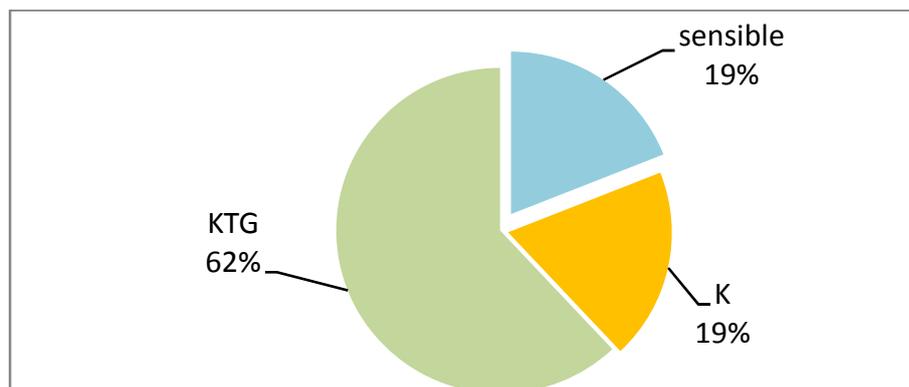
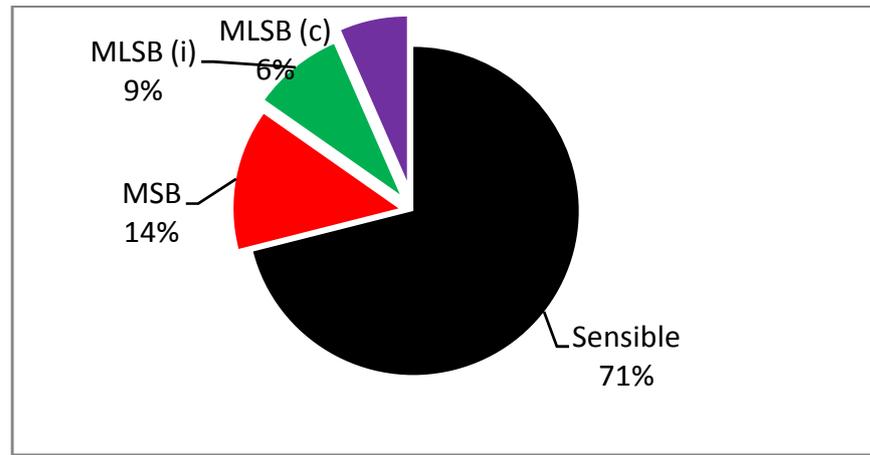


Figure 3.6 : Phénotypes de résistance des SARM aux aminosides (n=52).

3.2.3.2. Résistance aux Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS)

Pour la totalité des souches *S. aureus*, les différents phénotypes de résistance aux MLS sont illustrés dans la **Figure 3.7**.

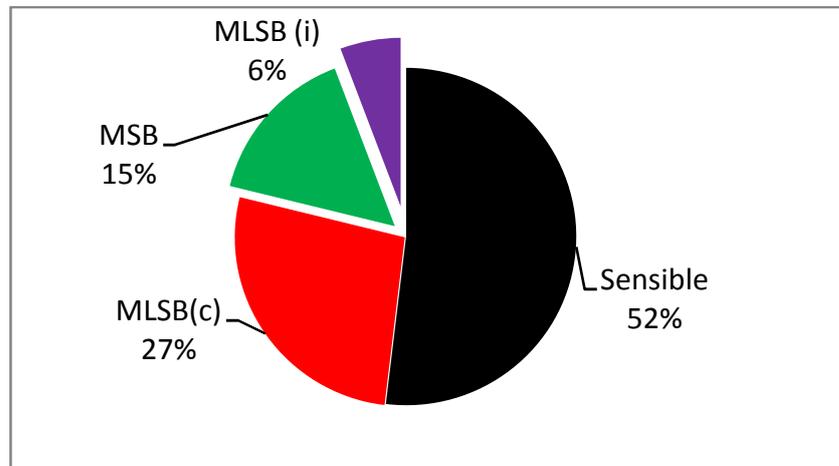
Pour des MLS, le phénotype sensible est majoritaire avec un taux de 71%. Le phénotype MLSB est d'expression inductible dans 9% des (résistances induites par les macrolides à 14 et 15 atomes) et constitutif dans 6% des cas (résistance permanente et indépendante de l'antibiotique).



MLS : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines ; MLSB c: constitutive ; MLSB i : inducible.

Figure 3.7: Phénotypes de résistance des *S. aureus* aux Macrolides-Lincosamides-Streptogramines.

Pour les souches de SARM, les phénotypes de résistance aux MLS sont illustrés dans la **Figure 3.8**. Le phénotype sensible est prédominant dans 52% des cas. Le phénotype MLSB est d'expression inducible dans 6% des et constitutif dans 27% des cas. Concernant la résistance liée à la Macrolides-Streptogramines B (MSB) par efflux, le taux était de 15%.



MLS : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines ; MLSB c: constitutive ; MLSB i : inducible ; MSB : Macrolides-Streptogramines B.

Figure 3.8: Phénotypes de résistance des SARM aux Macrolides-Lincosamides-Streptogramines.

3.3. Screening anti-SARM de l'huile essentielle du thym commun

3.3.1. Diffusion en milieu solide (Aromatogramme)

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle du thym a été réalisée *in vitro* sur des souches microbiennes de *S. aureus*, isolées cliniquement. Au total, 52 souches des SARM ont été étudiées. Les résultats de ce screening antimicrobien sont rapportés dans les **Figures 3.9** et **3.10**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

En phase liquide et à faible dose (20 μL), toutes les souches de SARM ont été inhibées par l'HE du thym avec des DZI qui varient entre 30 et 44 mm pour les souches isolés des prélèvements bronchiques, entre 30 et 50 mm pour les souches isolées des ponctions et entre 32 et 50 mm pour les SARM des suppurations superficielles. C'est derniers ont présenté la moyenne des DZI la plus élevée avec une valeur de 41.26 mm, suivis par ceux des ponctions (39.42 mm) et des prélèvements bronchiques (38.28 mm).

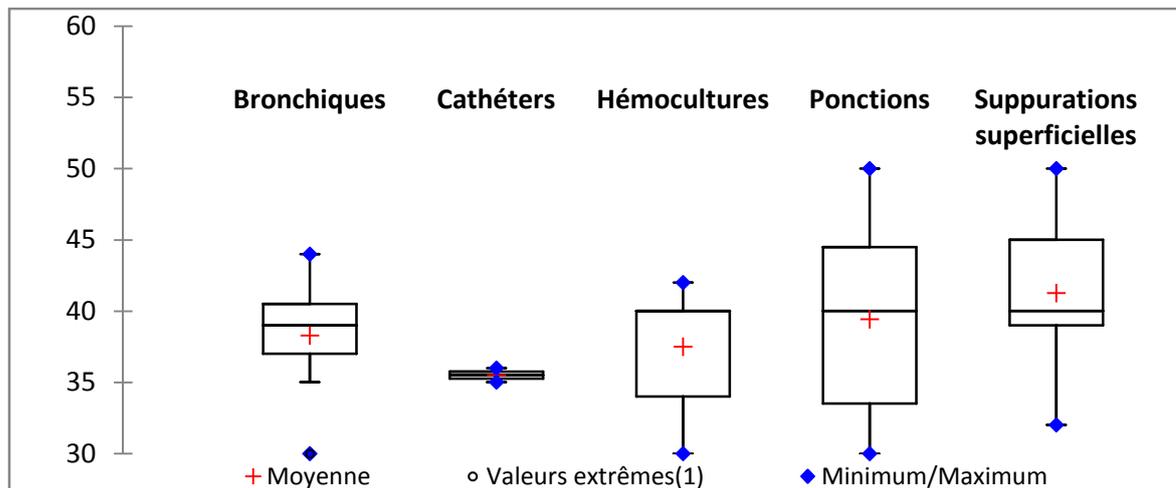


Figure 3.9 : Activité anti-SARM de l'essence du thym en aromatoigramme (20 μL /disque).

A forte dose (40 μL), de meilleurs résultats ont été obtenus (**Figure 3.10** et **3.11**) où nous avons enregistré des valeurs de DZI comprises entre 33 et 53 mm pour les souches isolés des ponctions, entre 33 et 60 mm pour les suppurations superficielles et entre 32 et 80 mm pur celles des prélèvements bronchiques. Ces dernières avec celles des cathéters ont manifesté une grande sensibilité à l'action inhibitrice de la phase liquide de l'HE avec une moyenne de DZI de 48.28 mm et 51 mm, respectivement. Dans tous les cas cette action antibactérienne vis-à-vis des SARM est largement supérieure à celle des ATB étudiés où les DZI obtenus ne dépassent pas, dans les meilleurs des cas, 30 mm pour gentamycine et clindamycine.

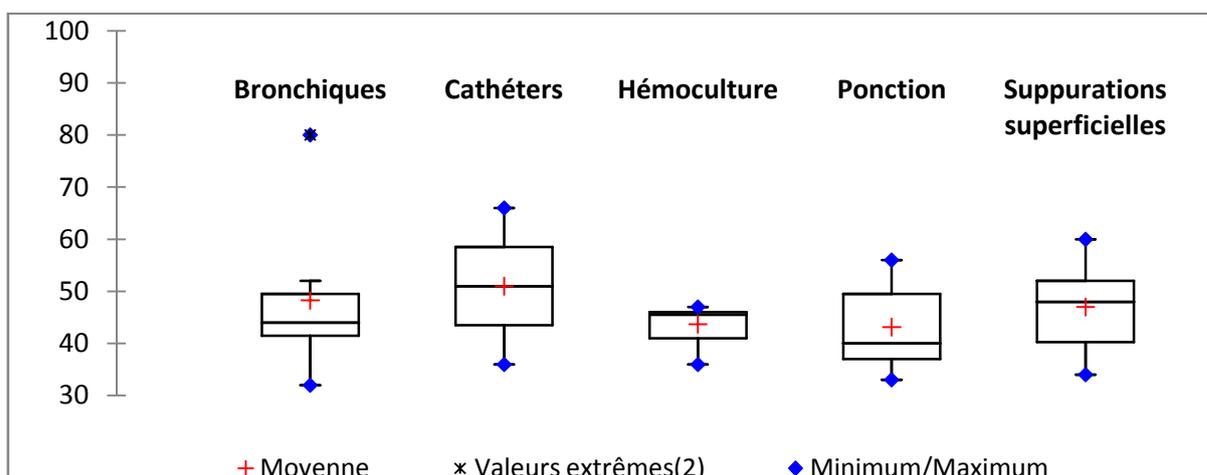


Figure 3.10 : Activité anti-SARM de l'essence du thym en aromatoگرامme (40 µL/disque).

En outre, nous avons constaté que les différentes souches de SARM étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés, ce qui montre leur caractère mutagène leur permettant ainsi d'acquérir une résistance aux ATB. La plupart ont montré d'ailleurs une multirésistantes.

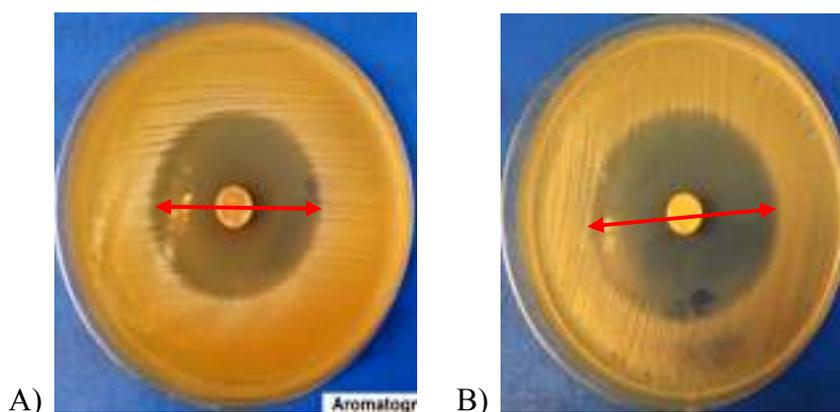


Figure 3.11 : Diamètre des zones d'inhibition en aromatoگرامme à 20 µL (A) et 40 µL (B) d'huile.

3.3.2. Diffusion en phase vapeur (Microatmosphère)

Etant donné que les huiles aromatiques sont constituées de molécules terpéniques volatiles, nous avons penché sur l'évaluation de leur pouvoir antibactérien en microatmosphère qui explore les propriétés inhibitrices de la phase vapeur de l'huile essentielle (**Figure 3.12**).

En phase vapeur, l'essence aromatique du thym commun a exhibé une inhibition importante sur les souches SARM, particulièrement ceux isolées des suppurations superficielles où les DZI notés oscillent entre 42 et 60 mm et entre 35 et 60 mm pour les germes provenant des ponctions. Aussi, la moyenne des DZI la plus importante a été enregistrée pour les SARM des suppurations superficielles avec une valeur de 51.88 mm, suivie par ceux des prélèvements septicémiques (hémoculture) (50.8 mm).

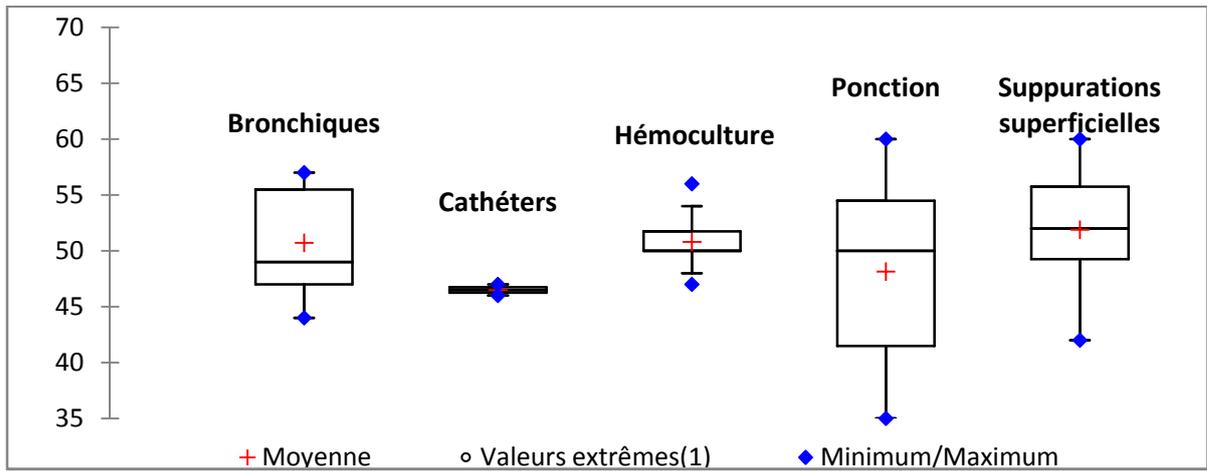


Figure 3.12 : Activité anti-SARM de l'essence du thym en microatmosphère (20 µL/disque).

Et en chargeant le disque avec une quantité de 40 µL d'HE (**Figure 3.13**), des résultats exceptionnels ont été obtenus, en particulier pour les SARM isolés des prélèvements bronchiques où toutes les souches ont été inhibées totalement (90 mm).

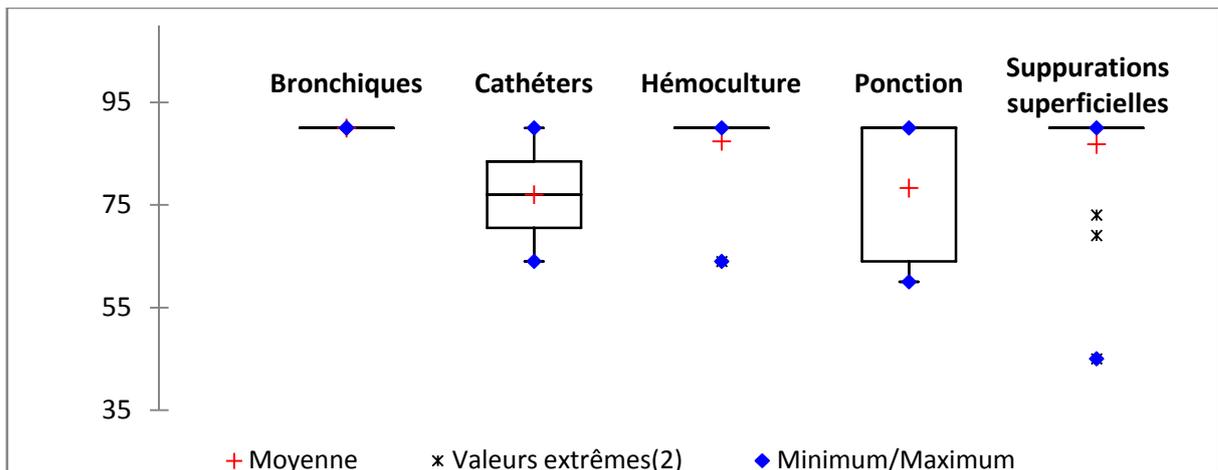


Figure 3.13 : Activité anti-SARM de l'essence du thym en microatmosphère (40 µL/disque).

Les isolats SARM des autres prélèvements ont aussi été inhibés d'une façon importante par la phase vapeur de l'huile avec des DZI appartenant à l'intervalle 60-90 mm. A noter que cette action antibactérienne est dose-dépendante et ce pour toutes les SARM (**Figure 3.16**).

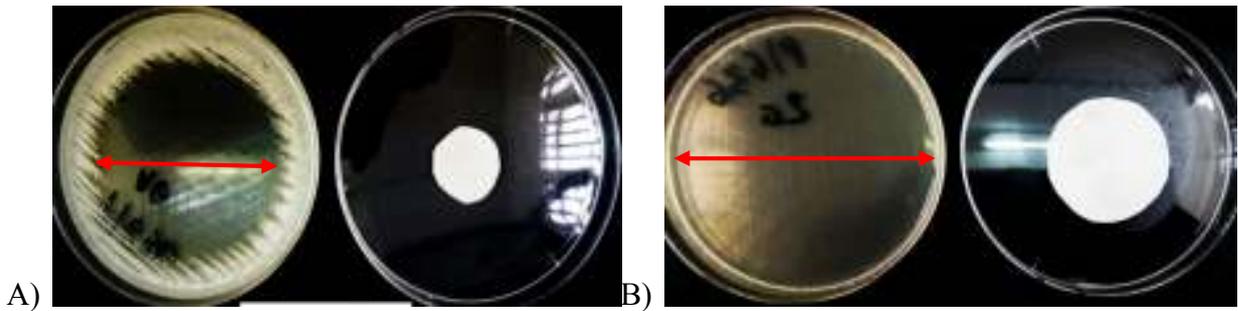


Figure 3.14 : Diamètre des zones d’inhibition en microatmosphère à 20 μ L (A) et 40 μ L (B) d’huile.

3.3.3. Dilution en milieu gélosé

Une technique quantitative, dilution en milieu gélosé, a été abordée pour déterminer les CMI pour toutes les souches SARM. Les résultats de cette étude sont illustrés dans la **Figure 3.15**.

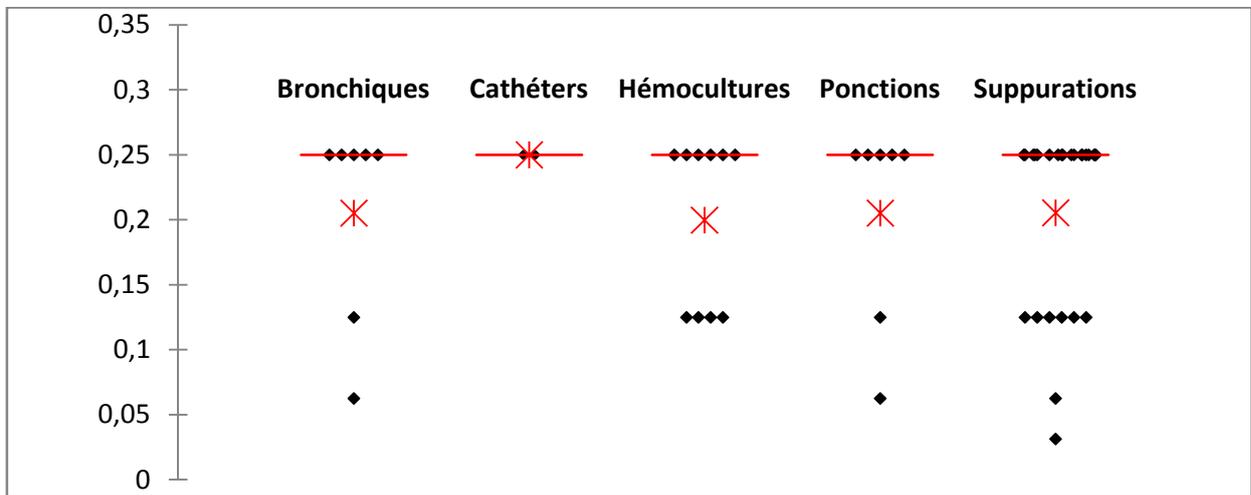


Figure 3.15. Distribution des valeurs des concentrations minimales inhibitrices pour les souches SARM isolées différents prélèvements cliniques.

A la lecture des résultats obtenus en CMI, il apparaît clairement que les souches SARM ont manifesté une grande sensibilité à l’action inhibitrice de l’essence du thym avec des CMI faibles, allant jusqu’à atteindre des valeurs de 0.031% et 0.0625% pour certaines espèces provenant de prélèvements purulents superficiels, des ponctions ou des prélèvements bronchiques. En outre, les souches de ces deux derniers prélèvements ont eu une moyenne de CMI identique (0.205%).

Pour les prélèvements septicémiques, les CMI s’échelonnent entre 0.12 à 0.25% alors qu’elles sont plus faibles pour les suppurations superficielles (0.031 à 0.25%).

3.4. DISCUSSION

Les staphylocoques occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance s'explique aussi bien par la variété des espèces bactériennes qui les composent qu'à leur incidence au niveau de la santé des populations. La fréquence, la gravité des infections dont elles sont responsables traduisent des difficultés de prise en charge liées, entre autres, à des difficultés d'identification et à leur résistance aux ATB.

Notre travail s'est axé principalement sur le diagnostic bactériologique des prélèvements cliniques provenant de différents services hospitaliers du CHU Mustapha d'Alger, en vue de déterminer la proportion des souches *Staphylococcus aureus* et des SARM isolées et d'évaluer ainsi leur profil de résistance aussi bien aux antibiotiques conventionnels qu'à l'huile essentielle du thym commun et ce afin de mieux définir les stratégies thérapeutiques et préventives.

Chaque institution doit réaliser une évaluation périodique de la sensibilité des isolats staphylococciques aux ATB actuellement utilisés. Notre étude répond à cet objectif par l'analyse de l'activité, *in vitro*, de plusieurs ATB contre 190 souches de *S. aureus*, dont 52 SARM, ont été isolées de différents prélèvements cliniques chez 172 patients au niveau du CHU Mustapha d'Alger. En effet, la connaissance et la surveillance du profil de sensibilité des staphylocoques sont primordiales dans la prise en charge des infections générées par cette espèce bactérienne, ainsi que la maîtrise de leur diffusion clonale. On les rencontre dans les prélèvements d'origine diverse, mais particulièrement dans les suppurations superficielles et prélèvements septicémiques, destinés à l'hémoculture, qui constituent une part très importante des activités du laboratoire de Bactériologie. Ceci a été le cas lors de notre étude.

Nos souches étaient essentiellement isolées des prélèvements de pus (36,32 %) et d'hémocultures (19,47%). Des prévalences comparables ont été rapportées par l'étude Tunisienne de différents hôpitaux, LART (**L'Antibio-Résistance en Tunisie., 2014**) où les pus superficiels et les hémocultures étaient les principaux prélèvements positifs à *S. aureus* (43,3% et 18,6% respectivement). Selon **Triolet et al. (2012)**, le *S. aureus* partage avec *E. coli* le 1^{er} rang des germes responsables de bactériémies. La survenue d'infections systémiques secondaires à la lésion cutanée (septicémie, endocardite, ostéomyélite) est une complication à prendre en compte (**Dubrouset al., 2007**). Les suppurations superficielles représentaient 13,68 % des isolats de SARM, les atteintes cutanées sont expliquées par les facteurs de virulence que possède le *S aureus* et par la proximité du réservoir le plus souvent nasal ou même cutané. D'autres facteurs peuvent favoriser aussi ces infections, il s'agit des facteurs d'atteintes générales comme le diabète, les thérapeutiques immunodépressives ou le traitement par les corticoïdes (**Hamze et al .,2003**) .

Selon **Brown et Ngeno (2007)** les bactériémies à *Staphylococcus aureus* sont fréquentes et peuvent constituer jusqu'à 21 % des bactériémies nosocomiales, et sont responsables d'une plus grande mortalité.

le type *S. aureus* est plus rarement isolé dans les uro-infections, son importance comme agresseur des papilles rénales est très connue. On accepte que la colonisation précède l'infection staphylococcique, comme **Archer (1998)**, qui nous signale qu'à peu près 30 % des personnes saines sont colonisées au *S. aureus*. La porte d'entrée est avant tout nasale, mais aussi vaginale et péri-anale (**Archer, 1998 ; Fabre et al., 2013**).

La plupart des auteurs considérant que la cause de plus en plus fréquente des uro-infections à staphylocoques est la cathétérisation urétrale surtout après une thérapie antibactérienne standard. La transmission de l'infection entre les patients est souvent assurée par les mains du personnel (**Archer, 1998 ; Conlan et al., 2012 ; Gilbert et al., 2013**).

Nos isolats de *S. aureus* provenaient dans 61% des cas de patients de sexe masculin, montrant ainsi une légère prédominance masculine, qui est aussi rapportée dans différentes études notamment celle de (**Thibaut et al., 2014**) au CHU de Nantes (France) où les hommes représentaient 65% de l'ensemble des patients.

En revanche il existe une nette prédominance du sexe masculin dans notre étude avec 19 % contre 8% de femmes, ce qui laisse suggérer que le sexe est un facteur de risque d'infection à SARM.

Les staphylocoques constituent les agents étiologiques les plus fréquemment décrits dans les infections communautaires. Les espèces de cette famille ont été, depuis une vingtaine d'années, largement exposées à une utilisation extensive des ATB. Revers de la médaille, elles n'ont pas été épargnées par la résistance croissante aux molécules les plus fréquemment utilisées.

Staphylococcus aureus a un fort pouvoir adaptatif et a développé différents mécanismes de résistance aux anti-staphylococciques. Dans notre étude, la totalité des souches (91,58%) produisent une pénicillinase. L'oxacilline reste active contre ces souches (27% de résistance). Certains auteurs signalent que des staphylocoques hospitaliers, et plus récemment communautaires, ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M (mécicilline, oxacilline) et les autres β -lactamines par la production d'une protéine liant les pénicillines (PLP) et ayant une faible affinité pour ces composés (**Fernandez-Gerlinger et Mainardi, 2014**). Ces résultats ont été confirmés lors de notre étude où nous avons noté que les isolats staphylococciques demeurent très résistants aux ATB de la famille des β -lactamines, en particulier la pénicilline.

La fréquence de la résistance globale des *S. aureus* à la pénicilline et la kanamycine (41.53%) demeure élevée. Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par **Lowy et al. (2003)** et **Elhamzaoui et al. (2009)** qui indiquent qu'actuellement plus de 90 % des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline G par production de pénicillinase.

Le support génétique de cette résistance a été décrit par **Pinho et al. (2001)**. Le gène de la pénicillinase appartient à un transposon, localisé le plus souvent sur un large plasmide, qui peut porter également des gènes de résistance à d'autres ATB (aminosides, macrolides), à des antiseptiques ou à des métaux lourds. Il peut également s'intégrer dans le chromosome **Elhamzaoui et al. (2009)**.

Par ailleurs et eu égard des résultats obtenus lors de notre étude, il a été constaté que le taux de résistance à l'oxacilline chez *S. aureus* était de 27 %, taux plus élevée que celui trouvé dans les cinq principaux hôpitaux du district de Thessalie (Grèce centrale) puisque 14.8 % des isolats étaient résistants (**De Sousa et al., 2003**) et plus élevé encore que dans les pays nordiques (Suède, Danemark) où le pourcentage de *S. aureus* résistant à l'oxacilline est resté très bas (< 2 %) (**Elhamzaoui et al., 2009**).

En outre, nous retrouvons dans notre étude les mêmes résultats que ceux obtenus par **Lelièvre et al. (1999)**, montrant une plus grande sensibilité parmi les souches sensibles à la gentamicine, à la rifampicine et au cotrimoxazole.

Par l'intermédiaire de ces souches, la résistance à l'oxacilline diffuse même dans le monde animal, pire encore, il est prouvé maintenant qu'il y a une transmission horizontale de la résistance entre les SCN et les souches de *S. aureus*, ce qui ne laisse augurer rien de bon pour l'avenir (**Wielders et al., 2002 ; Van Duijkeren et al., 2004**).

L'étude des phénotypes de résistance de nos souches aux aminosides montrait deux types, impliquant deux enzymes in activatrices. 33 souches de *S. aureus* (17%) avaient un phénotype K, dû à la production de l'enzyme Aminocyclitol-phospho-transférases APH (3')-III et 47 (25 %) souches avaient le phénotype KTG exprimé par la production de l'enzyme bi-fonctionnelle APH (2'')- Aminocyclitol acétyl transférases AAC (6'). Alors que pour les SARM 10 souches (19%) avaient le phénotype K et 32 (62%) avaient le phénotype KTG, ces résultats se rapprochent de ceux rapportés dans une étude réalisée entre juillet 2009 et juin 2010 à Abidjan où 23 souches (82,1%) de SARM avaient un phénotype KTG et 3(10,7%) seulement avaient un phénotype K (**Lathro et al., 2013**).

La résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines était plus marquée pour les souches SARM (48,08 % à l'érythromycine, 26,92% à la clindamycine) comme ça été rapportée dans différentes études rétrospective sur huit ans dans un hôpital d'instruction, Rabat (**Frikh et al., 2007-2014**) 54,1% et 24,5% respectivement . Dans notre étude, le phénotype MLSB inductible, était retrouvée chez 9% des souches de *S.aureus*, leMLSB constitutif chez 6% des souches et MSB chez 14%.

Chez les SARM le phénotype MLS est bien représenté (25 souche) 48% et d'expression le plus souvent constitutif (27 %) qu'inductible (6 %) alors que le phénotype MSB est de (15 %) nos résultat se rapproche des résultats de (**Uzun et al 2014**) Avec 5,6% inductible et 67,2% constitutif et 27,6 % MSB.

Par ailleurs, vancomycine et pristinamycine demeurent les ATB les plus actives sur la totalité des souches *S. aureus* (100%), contrairement à **Garnier et al. (2002)**, qui a retrouvé une plus grande résistance dans un centre pédiatrique de la région parisienne. La même constatation a été faite par **Ravaoarino et Therrien (1996)** qui ont démontré que la teicoplanine et la vancomycine sont deux à huit fois plus actives que les autres ATB testés contre la majorité des staphylocoques, en particulier les SARM.

Rappelant que la vancomycine a été sur le marché depuis 30 ans et est le médicament de choix pour le traitement des infections graves causées par les bactéries à Gram positif dans de nombreux hôpitaux. Toutefois, son utilisation abusive a abouti, ces dernières années, à l'apparition de résistance très élevée chez les staphylocoques à coagulase négative (de 65 à 80 %) même dans les pays nordiques (de 30 à 40 %) (**Gosbell, 2004 ; Elhamzaoui et al., 2009 ; David et Daum, 2010**).

Pendant les années 1960, les chercheurs ont constaté que nombre des staphylocoques se manifestent résistants aux semi-synthétiques bêta-lactame et, suite à cela, ils étaient nommés méticilline résistants staphylocoques. Les choses sont devenues plus compliquées quand des différentes études ont prouvé que ces souches sont résistantes à tous les bêta-lactame, y compris les céphalosporines. Cela a posé des difficultés de guérison des infections causées par eux-mêmes.

Aujourd'hui où la résistance des staphylocoques aux ATB devient de plus en plus préoccupante, les huiles essentielles montrent leur efficacité.

Dans notre étude, l'activité inhibitrice de l'HE du thym vis-à-vis des souches SARM a été largement supérieure à celle des ATB. Ce pouvoir inhibiteur pourrait être lié à la présence, dans notre échantillon d'huile, de plusieurs éléments (carvacrol et terpinene) connus pour leur activité bactéricide.

La plupart des composés chimiques des HE sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés inhibitrices les plus importantes, en particulier les phénols (**Dorman et Deans, 2000**).

Garreta,(2011) ont démontré que la nature antimicrobienne des HE est en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et carvacrol. Ils ont prouvé que plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles sont efficaces. **Pinto et al. (2006)** ont rapporté que les espèces du genre *Thymus*, qui contiennent une quantité importante en phénols, présentent un large spectre d'activité sur les germes bactériens. Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *S. aureus*. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive.

Des observations au microscope électronique ont montré des déformations cellulaires de *S. aureus*. Le largage du matériel cellulaire et l'altération de la surface cellulaire suggèrent une altération de la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne une perturbation de la sécrétion de protéines et pourrait être responsable des propriétés anti-staphylocoques du carvacrol et du thymol **Souza et al. (2014)**.

D'autres auteurs suggèrent que l'efficacité de l'HE de Thym contre *S. aureus* est due à une synergie entre ses principaux constituants : carvacrol et thymol (**Lambert et al., 2001**).

Le *p*-cymène semblerait faciliter la pénétration intracellulaire du carvacrol en potentialisant ainsi son action (**Ultee et Smid, 2001**). De cette manière, la valeur d'une HE tient à son "Totum", c'est à dire dans l'intégralité de ses composants.

En 2010 paraissait, dans la revue *Phytomedicine*, un article publié par des auteurs iraniens (**Tohidpouret al., 2010**) du département de bactériologie de l'université « TarbiatModares » reprenant plusieurs études et observations évaluant l'intérêt de certaines huiles essentielles sur des bactéries résistantes aux antibiotiques. On pouvait y constater que, testées sur des staphylocoques dorés résistants à la méticilline, selon la classique technique de diffusion en gélose, l'HE de thym révélait de remarquables propriétés inhibitrices, et que cet effet était sans doute dû au thymol, composé majeur mis en évidence par analyse chromatographiques. Les auteurs, bien évidemment, souhaitaient pour finir que ces résultats obtenus *in vitro* soient confirmés *in vivo*.

Pour intéressante qu'elle apparaisse, l'étude de **Tohidpouret al. (2010)** n'est pas novatrice et force est de constater que les données sur le sujet s'accumulent, avec des résultats assez concordants. En témoigne, cet autre travail de **Warnke et al. (2009)** ciblant les infections nosocomiales et, encore une fois, le SARM (mais pas seulement) :

de larges zones d'inhibition autour d'un extrait de thym révélèrent là aussi son efficacité, alors que l'huile d'olive ou la paraffine prises pour témoins s'avéraient sans aucun intérêt.

Les auteurs prenaient soin de souligner que des effets globalement comparables pouvaient être obtenus avec d'autres HE, et que d'autres micro-organismes s'y avéraient aussi sensibles, dont des levures du genre *Candida*. Ils en concluaient qu'il existait bien là une alternative efficace et bon marché aux antibiotiques, au moins pour une utilisation en topique.

Par ailleurs, l'efficacité avérée de la fraction terpénique du thym odorant en aromathérapie anti-infectieuse a suscité l'intérêt de plusieurs industriels. A cet égard, plusieurs formulations cosmétiques, à visée antiseptique, ont été mises au point et brevetées **Ali et al. (1999)**. D'ores et déjà, ces résultats et autres travaux (**Goetz et Ghedira, 2012**) laissent entrevoir la réalité de l'action anti-infectieuse de la fraction aromatique du thym.

Sur un autre plan, le pouvoir antimicrobien de la phase gazeuse des terpènes n'est pas surprenant du moment que plusieurs travaux ont été publiés en ce sens mais la littérature scientifique reste peu prolixe (**Tyagi et Malik, 2011 ; Laird et Phillips, 2012**).

A l'heure actuelle, nous pouvons affirmer, sans conteste, qu'il existe des centaines de publications et autres travaux publiés qui mettent en exergue le potentiel antimicrobien des extraits végétaux aromatiques en phase liquide. Cependant, ce nombre ne dépasse pas, au mieux, une vingtaine d'articles de recherche ou revues de synthèse qui mettent en évidence l'effet bactériostatique des produits volatils en microatmosphère.

En thérapie, la fraction terpénique du thym pourra trouver une place comme désinfectant atmosphérique en milieu hospitalier afin de lutter contre les infections nosocomiales et les contaminations aéroportées, ainsi que pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air. Rappelons pour mémoire que, ancêtres des CLIN hospitaliers (Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales), dès le XVI^e siècle et jusqu'à la fin du XIX^e siècle, ce sont médecins, « parfumeurs et fumigateurs », qui sont chargés de la désinfection des locaux et de l'hygiène hospitalière **Pibiri (2005)**. En plus de leurs actions bactéricide et fongicide, les essences terpéniques ont la particularité d'avoir des effets psychophysiologiques bénéfiques. Bien conduite, la diffusion atmosphérique devient un procédé idéal visant à la protection et à la prévention contre les infections nosocomiales et les pathologies hivernales (**Laird and Phillips, 2012**).

Le thym et d'autres feront certainement encore, dans un proche avenir, l'objet d'études qui leur permettront (peut-être) de rejoindre le champ glorieux de l'« Evidence Based Medicine ». C'est d'ailleurs presque chose faite si l'on en croit la communication que viennent de faire les Grecs du « Technological Educational Institute » des Iles Ioniennes lors de la réunion de printemps 2010 de la « Society for General Microbiology » à Edimbourg.

Pour eux, l'HE de thym serait la plus efficace qui soit contre les staphylocoques, capable de détruire presque 100 % d'un inoculum de ces bactéries en moins d'une heure, et ce pour de nombreuses espèces du genre ; sans aucun doute, les HE, ou certains de leurs composants, devraient être largement incorporés à des crèmes et autres gels destinés au traitement d'infections cutanées et autres, quand elles sont accessibles. Ils vont encore plus loin, évoquant quelques indications dans l'industrie alimentaire, en packaging ou pour remplacer des composés chimiques utilisés comme conservateurs.

Références Bibliographiques

- 1- Ali Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI. 1999. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42(11-12), 665-672.
- 2- Archer GL. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 26(5), 1179-1181.
- 3- Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Arlet G. 2014. Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, 62(3), 169-178.
- 4- Batard E, Montassier E, Ballereau F, Potel G. 2012. De la consommation d'antibiotiques aux résistances bactériennes: l'exemple de la résistance de *staphylococcus aureus* aux quinolones. *Médecin Thérapeutique*, 17(4), 294-301.
- 5- Cleef BA, Broens EM, Voss A, Huijsdens XW, Züchner L, Van Benthem BH, Kluytmans JA, Mulders MN, Van De Giessen AW. 2010. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. *Epidemiology Infections*. 138, 756-763.
- 6- Conlan S, Mijares LA, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, Brooks S, Segre JA .2012. *Staphylococcusepidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biology*, 13(7), R64.
- 7- Courvalin P, Leclercq R. 2012. *Antibiogramme*. 3ème éd .Paris : Eska, p.137-405.
- 8- Daurel C, Leclercq R. 2008. L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2008(407), p.81-90
- 9- David MZ, Daum RS. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 616-687.
- 10- De Sousa MA, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Sanches IS, Crisostomo MI, De Lencastre H. 2003. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2027-2032.
- 11- Del Giudice P, Tattevin P, Etienne J. 2012. Infections à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline communautaires. *La Presse Médicale*, 41(7), 713-720.
- 12- Dorman HJ, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- 13- Dubrous P, Cuguillère A, Gendrot A, Koeck JL. 2007. Pneumopathie nécosante à *Staphylococcus aureus* producteur de la leucocidine de Panton-Valentine. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 65, No. 3, pp. 277-281. doi:10.1016/j.reaurg.2007.02.019
- 14- Dupouy-Camet J. 2002. Richinellosis a worldwide zoonosis. *Veterinary Practice*, 93,191-200.
- 15- Elhamzaoui S, Benouda A, Allali F, Abouqual R, Elouennass M. 2009. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans deux hôpitaux universitaires à Rabat, Maroc. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 39(12), 891-895.
- 16- Fabre R, Mérens A, Tabone-Ledan C, Epifanoff G, Cavallo JD, Ternois I. 2013. *Staphylococcus saprophyticus* isolés d'examen cytobactériologiques urinaires en ville: épidémiologie et sensibilité aux antibiotiques (étude Label Bio Elbeuf-novembre 2007-juillet 2009). *Pathologie Biologie*, 61(2), 44-48.
- 17- Fang H, Hedin G. 2003. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 2894-2899.
- 18- Fernandez-Gerlinger MP, Mainardi JL. 2014. Nouvelles associations dans le traitement des infections graves à cocci à Gram positif. *Journal des Anti-infectieux*, 16(1), 18-23.
- 19- Fessler A, Scott C, Kadlec K, Ehrlich R, Monecke S. 2010. Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 619-625.

- 20- FrikhM ,Lemouer A , Belfquih BK , kiplagat V , Maleb A, Elouennass, M. (2007-2014). Profils de sensibilité des isolats de *staphylococcus aureus* étude rétrospective sur huit ans dans un hôpital d'instruction, Université Mohammed V Soussi, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.
- 21- Ganter P, Jollès G. 1970. *Histochimie normale et pathologique*.
- 22- Garnier F, Mariani-Kurkdjian P, Nordmann P, Ferroni A, Vu-Thien H, Philippe JC, Raymond J. 2002. Sensibilité aux antibiotiques des souches de staphylocoques et d'entérocoques isolées en pédiatrie. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 32(8), 432-438.
- 23- Garreta R. 2007. Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales. Presses Univ. du Mirail.
- 24- Garrity GM, Bell JA ,Lilburn TG .2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- 25- Gilbert NM, O'Brien VP, Hultgren S, Macones G, Lewis WG, Lewis AL. 2013. Urinary tract infection as a preventable cause of pregnancy complications: opportunities, challenges, and a global call to action. *Global Advances in Health and Medicine*, 2(5), 59-69.
- 26- Goetz P, Ghedira K. 2012. *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer Science & Business Media.
- 27- Gomez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernandez-Perez R, Aspiroz C. 2010. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Food-borne Pathology and Diseases*, 7, 1269-1277.
- 28- Gorden L, Cloeckeaert A, Doublet B, Schwarz S, Bouju-Albert A, Ganiere JP, Le Bris H, Le Fleche-Mateos A, Giraud E. 2008. Complete sequence of the flocculating multiresistance plasmid Pab5S9 from fresh water *Aeromonas bestiarum*. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. 62, 65-71.
- 29- Gosbell IB. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Clinical Dermatology*, 5(4), 239-259.
- 30- HamzeM ,Dabboussi F, Daher W, Izard D. 2003. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* at north Lebanon: place of the methicillin resistance and comparison of detection methods. *Pathologie-biologie*, 51(1), 21-26. Doi : 10.1016/S0369-8114(02)00315-2.
- 31- Jensen SO, Lyon BR. 2009. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 4, 565-582.
- 32- Karthik S. 2007. Role of MSA in the regulation of virulence and biofilm formation. The University of Southern Mississippi. Edition UMI Microform USA, 20-24.
- 33- Kempf I, Zeitouni S. 2012. Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences. *Pathologie Biologie*, 60(2), e9-e14.
- 34- Köck R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, Deurenberg, RH, Voss A, Becker K, Friedrich AW. 2009. Prevalence and molecular characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28, 1375–1382.
- 35- Laird K, Phillips C. 2012. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
- 36- Lambert RJ W, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- 37- Lathro J, Edoh V, Loukou Y. 2013. Production de leucotoxines et résistance à la méticilline chez des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à Abidjan. *J. SCI*, 14(1-2013).
- 38- Lelièvre H, Lina G, Jones ME, Olive C, Forey F, Roussel-Delvallez M, Etienne J. 1999. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3452-3457.

- 39- Loeza-Lara PD, Soto-Huipé M, Baizabal-Aguirre VM, Ochoa-Zarzosa A, Valdez-Alarcon JJ. 2004. pBMSa1, a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus*, encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling-circle mechanism. *Plasmid*, 52, 48-56.
- 40- Lowy FD. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265-1273.
- 41- Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gomez-Sanz E, Zarazaga M. 2011. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. *Clinical Microbiology and Infections*, 17, 923-927.
- 42- Martínez JL, Baquero F, Andersson DI. 2009. Predicting antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), 958-965.
- 43- McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM. 2010. Emergence of resistance among USA 300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3804-3811.
- 44- Michel MC, Pharm B. 2013. Infection nosocomiale à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez un patient adulte hospitalisé: quel antibiotique choisir?. *Pharmactuel*, 46(1), 23.
- 45- Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehricht R. 2007. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Veterinary Microbiology*, 125, 128-140.
- 46- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: Approved standard M7-A5. Fourth Edition. Villanova, Pa: NCCLS; 2000;
- 47- Nehal M, Zuel-Fakkar MD, Mona H, El-Shokry MD. 2010. Study of erythroderma and psoriasis exacerbation by Staphylococcal Superantigens. *Journal of Egyptian Women Dermatology Society*, 7, 113-17.
- 48- Nuemi G, Astruc K, Aho S, Quantin C. 2013. État des lieux et évaluation de la surveillance des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM): PMSI versus surveillance Raisin. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 61(5), 455-461.
- 49- Pibiri MC, Roulet CA. 2005. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse (No. oai: infoscience. epfl. ch: thesis-3311).
- 50- Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H, Tomasz A. 2001. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6525-6531.
- 51- Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Martinez-de-Oliveira J. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55(10), 1367-1373.
- 52- Quincampoix JC, Mainardi JL. 2001. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*, 10(3), p. 267-275.
- 53- Ravaoarino M, Therrien C. 1996. Comparative in vitro activity of nine antistaphylococcal agents against 275 recent isolates of Gram-positive cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 7(3), 167-170.
- 54- Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Fougrach H, Bourkhiss B, Talbi M. 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 146, 85-89.
- 55- Schijffelen MJ, Boel CH, Van Strijp JA, Fluit AC. 2010. Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics*, 11, 376.
- 56- Souza S, Trindade M, Almeida JR, Souza Araujo AA, Duarte MC, Quintans-Junior LJ. 2014. Structure-activity relationship of terpenes with anti-inflammatory profile—A systematic review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115(3), 244-256.

- 57- Tankovic J, Aubry-Damon H, Leclercq R. 1997. Résistance aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. Médecine et maladies infectieuses, 27, p.207-216.
- 58- Tchougoune L. 2007. *Prévalence de souches de staphylococcus aureus résistantes à la méticilline au CHU du point G. Thèse de docteur en pharmacie*, université de Bamako, 89p.
- 59- Thibaut S, Caillon J, Marquet A, Huon JF, Grandjean G, Ballereau, F et le réseau de Laboratoires de Biologie Médicale. 2012. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées dans la communauté par le réseau MedQual, Université de Médecine, EA 3826, (LBM) MedQual. Nantes.
- 60- Thibaut S, Marquet A, Renard MA, Grandjean G, Boutoille D, Caillon, J et le réseau de Laboratoires de Biologie Médicale. 2014-2015. Etude de la sensibilité et de la résistance aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de bactériémies en milieu communautaire, (LBM) MedQual-Ville. MedQual, 2 CHU de Nantes.
- 61- Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. 2007. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem Immunology and Allergy 93, 24-41.
- 62- Todar K. 2005. Todar's Online Textbook of Bacteriology, Staphylococcus.
- 63- Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Phytomedicine, 17(2), 142-145.
- 64- Trémolières F. 2013. Les antibiotiques: pourquoi tant d'émois? Première partie: de «l'âge d'or» au miracle dépassé. Médecine, 9(8), 366-368.
- 65- Tyagi AK., Malik, A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. Food Chemistry, 126(1), 228-235.
- 66- Tyagi AK, Malik A. 2012. Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ions. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 13, 169-177.
- 67- Ultee A, Smid EJ. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology, 64(3), 373-378.
- 68- Uzun B, Güngör S, Pektaş B, Aksoy GA, Yula E, Kocal F, Kaya S. 2014. Macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance phenotypes in clinical *Staphylococcus* isolates and investigation of telithromycin activity. *Mikrobiyolojibulteni*, 48(3), 469-476.
- 69- Van Duijkeren E, Box A, Heck M, Wannet W, Fluit AC. 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. Veterinary microbiology, 103(1), 91-97.
- 70- Warnke PH, Becker ST, Podschun R, Sivananthan S, Springer IN, Russo PA, Sherry E. 2009. The battle against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 37(7), 392-397.
- 71- Wielders CLC, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, Schmitz FJ. 2002. mecA gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. Journal of Clinical Microbiology, 40(11), 3970-3975.
- 72- Wulf MW, Markestein A, van der Linden FT, Voss A, Klaassen C, Verduin CM. 2008. First outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital. Euro Surveillance, 13, 8051.
- 73- Zaika LL. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
- 74- Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. 2011. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. BMC Research Notes, 4, 453.

ANNEXE (1)

Recherche de la PLP2a (SLIDEX™ - MRSA)

➤ **Technique :**

Procédure d'extraction

- ✓ Déposer 4 gouttes (200µl) de Réactif d'extraction 1 (R3) dans un eppendorf
- ✓ Prélever suffisamment de colonies et mettre en suspension avec le réactif d'extraction 1 placer l'eppendorf dans un bain marie à 100°C pendant 3 minutes.
- ✓ Sortir l'eppendorf du bain marie et laisser refroidir à température ambiante ;
- ✓ Après refroidissement ajouter une goutte (50µl) de Réactif d'extraction 2 (R4) dans le tube et bien mélanger ;
- ✓ Centrifuger à 1500 g pendant 5 minutes ;
- ✓ Utiliser immédiatement le surnageant de centrifugation comme test échantillon dans la procédure d'agglutination au latex.

Agglutination

- ✓ Ajouter une goutte de latex sensibilisé (par un anticorps monoclonal anti-PLP2a) (R1) dans le cercle test puis déposer 50µl du surnageant (extrait de culture) ;
- ✓ Bien mélanger le tout à l'aide d'un bâtonnet, en étalant le mélange sur toute la surface ;
- ✓ Répéter cette technique d'agglutination pour le latex contrôle négatif(R2) ;
- ✓ Donner à la carte, un léger mouvement de rotation manuellement ou à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 3mn ;
- ✓ Observation : l'apparition éventuelle d'une agglutination.

Lecture :

- ✓ La présence d'agglutination du latex sensibilisé uniquement indique que la souche possède la protéine PLP2a et peut être déclarée SARM présumptive.
- ✓ L'absence d'agglutination du latex sensibilisé et du latex de contrôle indique que la souche ne possède pas de PLP 2a et peut être déclarée *S. aureus* SASM (*S. aureus* sensible à la méthicilline) présumptive.

ANNEXE (2)

Antibiotiques	Abréviations	Doses (µg)
Pénicilline	PEN	6
Céfoxitine	FOX	30
Kanamycine	KMN	30
Gentamycine	GMN	10
Érythromycine	ERY	15
Clindamycine	CMN	2
Pristinamycine	PTN	15
Ciprofloxacine	CIP	5
Levofloxacine	LVX	5
Ofloxacine	OFX	5
Vancomycine	VAN	30
Cotrimoxazole	SXT	25
Tétracycline	TET	30
Acide fusidique	FAD	10
Rifampicine	RIF	5

Chapitre 1

Généralités sur les Staphylocoques

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Chapitre 3

Résultats et Discussion