

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou
Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : **Microbiologie Appliquée**

Thème

**Isolement de souches hospitalières de *Staphylococcus aureus*
formatrices de biofilms prélevées de pus :
Profil de résistance aux antibiotiques et aux extraits de l'olivier**

Présenté par :

M^{elle} ALOUACHE Ghania

M^{elle} NAIT KACI Melissa

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} ISSELNANE-TAMACHE. S.

MAA à l'UMMTO

Promotrice : M^{me} DERMECHE. S.

MAA à l'UMMTO

Examinatrice : M^{me} AFIF CHAOUCHÉ. T.

MCB à l'UMMTO

Examineur : M^r TITOUCHE. Y.

MCB à l'UMMTO

Année universitaire : 2018-2019

REMERCIEMENTS

On tient à remercier les membres du jury :

-Mme ISSELNANE-TAMACHE S. pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury

-Mme AFIF CHAOUCHE. T et Mr TITOUCHE. Y qui ont accepté d'évaluer ce travail et qui nous honorent de leur présence.

On adresse nos vifs remerciements à Mr TITOUCHE Y pour son énorme soutien et pour ses précieuses informations qu'il nous a prodigué avec intérêt et compréhension.

Nous tenons également à remercier Mr HOUALI .K et Mr BARIZ. K qui nous ont apporté de
de l'aide au laboratoire.

Merci également à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à :

Mes chers parents ; papa, maman nulle dédicace ne pourrait exprimer mes sincères sentiments, ma reconnaissance et ma gratitude.

Ma grande sœur Sabrina pour son soutien et ses encouragements.

Mes deux frères Yanis et Amine pour leur soutien et leur dévouement.

Ma famille, mes amis ainsi que tous ceux qui me sont chers.

Melissa.

DEDICACES

Avant tout je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail que

je dédie

A mes chers parents, mon père, ma mère, pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs

encouragements

A mes très chères grand-mères Yama ouardia et Jida ouardia

A mes sœurs, mes frères qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la

réalisation de ce travail

A mes belles sœurs Wahiba et Zazi pour leurs encouragements, leur aide et leur amour

A ma famille, mes proches, mes amies

A ma très chère cousine Nassima pour ses conseils

A tous mes professeurs que ce soit du primaire, moyen, secondaire ou de l'enseignement

supérieurs

A tous ceux que j'aime

Ghania

Résumé

Staphylococcus aureus est un agent pathogène responsable de nombreuses maladies, dont la septicémie. De nombreuses souches de cette bactérie résistent à de multiples classes d'antibiotiques, ce qui constitue un problème clinique important dans le traitement des infections à *S. aureus*.

Il s'agit d'une étude prospective dont le but est d'isoler, identifier des souches de *Staphylococcus aureus* puis évaluer leur sensibilité vis-à-vis de différents antibiotiques, ainsi que la capacité des souches *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) isolées à former un biofilm.

Cinquante souches de *S. aureus* ont été isolées à partir de prélèvements de pus en 2019 au niveau de différents services de CHU (Centre Hospitalo-Universitaire) de Tizi Ouzou. L'identification des souches a été faite par les tests classiques, la sensibilité aux antibiotiques a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton. Les résultats de l'antibiogramme obtenus sur nos souches de *S. aureus* sont : la pénicilline (100% résistant), la céfoxitine (23%), l'érythromycine (36%), la néomycine (56%), la ciprofloxacine (20%), l'ofloxacine (24%), la lincomycine (22%), la tétracycline (18%), SXT(6%) et le chloramphénicol (0%).

Les résultats montrent que *S. aureus* présente une très grande résistance aux antibiotiques. La détection in vitro de la formation de biofilm chez les 15 souches cliniques de SARM obtenus à été déterminée par la méthode de culture de tissu en plaque (TCP), qui nous a révélé que toutes les souches SARM isolées soit 15 souches sur 50 ont donné des résultats positifs pour la formation de biofilm après 48 heures d'incubation.

Des extraits de feuilles et de brindilles de l'olivier sont préparés et l'effet antimicrobien de ces composés est déterminé par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de huit souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline parmi celles identifiées. Ces composés se sont révélés actifs contre l'ensemble des bactéries testées, de plus, une forte activité de l'extrait polyphénolique vis-à-vis de *S. aureus* (diamètre d'inhibition= 20 mm) est enregistrée.

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

I. Généralités sur *Staphylococcus aureus*.

1. Historique	1
2. Taxonomie.....	1
3. Habitat	2
4. Caractéristiques bactériologiques	2
4.1. Caractères morphologiques	2
4.2. Caractères cultureux	3
4.3. Caractères biochimiques	3
5. Facteurs de virulence et physiopathologie	4
5.1. Les composants de la paroi	5
5.1.1. Le peptidoglycane.....	5
5.1.2. La capsule	5
5.2. Les protéines de surfaces : Facteurs d'invasion et d'adhésion.....	5
5.2.1. Les MSCRAMM	5
5.2.1.1. Protéine de liaison au collagène (Cna)	5
5.2.1.2. Protéine de liaison au fibrinogène (Clf)	5
5.2.1.3. Protéines de liaison aux fibronectines (FnBPA et FnBPB)	6
5.2.2. Les SERAM	6
5.2.2.1. La protéine Eap	6
5.2.2.2. La protéine Efb	6
5.2.2.3. Protéine A	6
5.3. Substances élaborées par <i>S. aureus</i>	7
5.3.1. Les enzymes staphylococciques	7
5.3.2. Les toxines staphylococciques	8
6. Les infections nosocomiales à staphylocoques	8
6.1. Définition.....	8
6.2. Fréquence et incidence	8
6.3. Origine des infections nosocomiales	9

II. Résistance de *S.aureus* aux antibiotiques.

1. Historique	10
2. Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques	10
3. Origine de l'antibiorésistance.....	10
4. Mécanismes de résistance de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques	11
4.1. Résistance à la méthicilline	11
4.2. Autres résistances	12
4.2.1. Résistance aux betalactamines	12
4.2.2. Résistance aux Glycopeptides.....	13
4.2.3. Résistance aux aminosides.....	14
4.2.4. Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramines « MLS » ...	14
4.2.5. Résistance aux tétracyclines.....	15
4.2.6. Résistance aux fluoroquinolones	15
4.2.7. Résistance aux rifampicines.....	16
4.2.8. Résistance aux sulfamides	16

III. Les Biofilms

1. Généralités.....	18
2. Composition de la matrice	18
3. Cycle de vie d'un biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.1. L'attachement	19
3.2. Le Détachement	21
4. Caractéristiques des biofilms	22
5. Rôles des biofilms	23
6. Résistance des bactéries au sein des biofilms.....	23
6.1. Résistance aux défenses de l'hôte	23
6.2. Résistance aux antibiotiques.....	24
7. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	24
7.1. Défaut de pénétration de l'antibiotique	24
7.2. Croissance ralentie des bactéries	24
7.3. Persistance des bactéries	24
8. Moyens de lutte contre les biofilms.....	25
8.1. Stratégies anti-biofilm naturelles	26
8.1.1. Extraits de plantes	26

Partie experimentale

1. Matériel et méthodes 29

 1.1 Matériel 29

Partie 1 :

 1.2 Méthodes 31

 1.2.1. Origine des souches bactériennes. 31

 1.2.2 .Isolement et purification de *S.aureus* 31

 1.2.3. Identification de *S.aureus*..... 32

 1.2.4. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques 34

 1.2.5. Conservation des souches. 36

 1.2.6. Détection de la formation de biofilm de *s.aureus* in vitro par la
méthode de plaque de culture de tissus (TCP) 36

Partie 2 : Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'olivier

(*Olea europaea*)

 1.2.7. Echantillonnage 38

 1.2.8. Extraction des polyphenols 38

 1.2.9. Dosage des polyphénols totaux 40

 1.2.10. Evaluation de l'activité antioxydante 41

 1.2.11. Evaluation de l'activité antimicrobienne..... 43

Résultats et discussion

Références bibliographiques

Annexes

- AAC** : Aminoglycoside *acetyltransferase*
- Aap** : Accumulation associated protein
- Agr** : Accessory gene regulator
- AI** : Auto- inducteurs
- AIP** : Peptides autoinduits
- AZBAC** : Extraits d'acétate d'éthyle des brindilles de la variété *Azeradj*.
- AZBE** : Extraits éthanoliques des brindilles de la variété *Azeradj*.
- AZFAC** : Extraits d'acétate d'éthyle des feuilles de la variété *Azeradj*
- AZFE** : Extraits éthanoliques des feuilles de la variété *Azeradj*.
- Bap**: Biofilm associated protein
- CBAC** : Extraits d'acétate d'éthyle des brindilles de la variété *Chemlal*.
- CBE** : Extraits éthanoliques des brindilles de la variété *Chemlal*.
- CFAC** : Extraits d'acétate d'éthyle des feuilles de la variété *Chemlal*.
- CFE** : Extraits éthanoliques des feuilles de la variété *Chemlal*.
- CL** : Clarck et lubs
- Clf** : Protéine de liaison au fibrinogène
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- Cna** : Protéine de liaison au collagène
- DHPS** : Dihydroptéroate synthétase
- Eap** : Extracellular adherence protein
- Efb** : Extracellular fibrinogen binding protein
- EHEC** : *Escherichia coli* entérohémorragique
- Embp** : Extracellular matrix binding protein
- Emp** : Extracellular matrix binding protein
- FC** : Folin-Ciocalteu
- FnBP** : Protéines de liaison aux fibronectines
- FnBps**: Fibronectin binding proteins
- GISA**: Glycopeptide Intermediate *S.aureus*
- IC50** : Concentration inhibitrice à 50 %
- MDR**: Multi-*drug resistant*.
- MLS** : Macrolides, Lincosamides, Streptogramines
- MSCRAMM** : Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules
- PAB** : Acide para-amino-benzoïque
- PBS** : Phosphate buffered saline

PIA : Adhésines intercellulaires de polysaccharides extracellulaires

PLP : Protéines liant la pénicilline

PNAG : Poly N-acetyl glucosamine

PSM : Phenol soluble modulins

SBAC : Extraits d'acétate d'éthyle des brindilles de la variété *sauvage*.

SBE : Extraits éthanoliques des brindilles de la variété *sauvage*.

SCC : Staphylococcal Chromosomal Cassette

SERAM : Secretable expanded repertoire adhesive molecules

SFAC : Extraits d'acétate d'éthyle des feuilles de la variété *sauvage*.

SFE : Extraits éthanoliques des feuilles de la variété *sauvage*.

TSB : Bouillon Tryptone Soja

VISA : Vancomycin Intermediate *S.aureus*

VRSA : Vancomycin-resistant *S. aureus*

Figure 01: <i>S. aureus</i> sous microscope après coloration de Gram.....	3
Figure 02: Facteur de virulence chez <i>Staphylococcus aureus</i>	7
Figure 03: Mécanismes de résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques.....	17
Figure 04 : Cycle de vie d'un biofilm	22
Figure 05: Moyens de lutte contre les biofilms.. ..	25
Figure 06: Photographie de l'olivier sauvage (<i>Olea europaea sylvestris</i>).....	31
Figure 07 : photographie montrant l'aspect des colonies des isolats de <i>S. aureus</i> sur milieu BHI après purification.. ..	32
Figure 08 : Photographie montrant le résultat positif d'une catalase.	33
Figure 09 : Photographie montrant le résultat positif d'une coagulase.....	33
Figure 10 : Photographie montrant un résultat positif d'une DNase.	34
Figure 11 : Photographie montrant un résultat positif de VP.	34
Figure 12 : Photographie d'une technique de formation de biofilm sur microplaque.....	37
Figure 13: Diagramme des différentes étapes d'échantillonnage.....	38
Figure 14 : Diagramme de différentes étapes d'extraction des polyphénols.....	39
Figure 15: protocole de dosage des phénols totaux par la méthode de Folin- Ciocalteu.....	41
Figure 16 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	42
Figure 17: Protocole d'étude de l'activité du DPPH.....	43
Figure 18 : La Fréquence d'isolement de <i>S. aureus</i>	45
Figure 19 : Les fréquences de résistance et de sensibilité de <i>S.aureus</i> vis-à vis des antibiotiques.....	46
Figure 20 : prévalence des SARM.....	47
Figure 21: Résultats de la quantification de la formation de biofilm in vitro par les SARM..	48
Figure 22: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	51
Figure 23: Teneur en polyphénols des différents extraits des feuilles de l'olivier.....	52
Figure 24: Teneur en polyphénols des différents extraits des brindilles de l'olivier.....	52
Figure 25: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.. ..	54
Figure 26: Photographie des activités des différents extraits éthanoliques contre la souche S21.....	57

Tableau I: Classification du genre <i>Staphylococcus</i>	1
Tableau II : Principaux caractères cultureux des staphylocoques.....	3
Tableau III : Caractères biochimiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Tableau IV : Enzymes élaborées par <i>S.aureus</i>	7
Tableau V : Toxines impliquées dans la virulence de <i>S.aureus</i>	8
Tableau VI: Mécanismes de résistance chez <i>S. aureus</i>	11
Tableau VII: Composés inhibiteurs naturels de quorum sensing connus pour inhiber la formation de biofilm.....	27
Tableau VIII: Appareils et matériel utilisés.	29
Tableau IX: Milieux, réactifs et colorants utilisés.	30
Tableau X: Antibiotiques testés pour <i>S.aureus</i>	35
Tableau XI : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP.....	37
Tableau XII : Classification du biofilm formé par <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la methicilline (SARM) par la technique TCP.....	48
Tableau XIII: Rendement d'extraction des polyphénols totaux.	50
Tableau XIV: Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations brutes des différents extraits des feuilles de l'olivier.	54
Tableau XV: Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations brutes des différents extraits des brindilles de l'olivier.	54
Tableau XVI: Diamètre de zones d'inhibition en mm des extraits de plantes, témoin positif et témoin négatif.	56

Staphylococcus aureus est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus*. Il fait partie des germes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine. On le retrouve aussi bien dans les milieux communautaires qu'hospitaliers, il est au deuxième rang des infections nosocomiales derrière *Escherichia coli* et au deuxième des intoxications alimentaires après les salmonelles. Il intéresse un très grand nombre de sites infectieux et peut être isolé au laboratoire dans tous les types de prélèvements. On le retrouve dans des infections aussi bien locales qu'invasives dont l'issue clinique varie de la simple colonisation asymptomatique au décès rapide du patient (Vieu, 2014). C'est également le germe le plus isolé dans les infections des plaies par des corps étrangers (El azhari, 2009).

C'est l'un des principaux agents étiologique en raison de la présence de nombreux facteurs de virulence, notamment des exotoxines, des enzymes, des protéines de surface, de la capacité de production de biofilms et de l'acquisition de la résistance à plusieurs médicaments (Manadhar *et al.*, 2018). La virulence de cette bactérie dépend essentiellement du développement de résistances à la plupart des antibiotiques en particulier à la méthicilline, et plus récemment aux glycopeptides. Cette évolution de la résistance fait craindre l'émergence des souches résistantes à tous les antibiotiques connus et constitue donc une menace majeure pour la santé publique de part le monde, en raison de la circulation de souches résistantes dans l'environnement et la possible contamination de l'eau et de la nourriture (Boer *et al.*, 2008 ; Challal, 2011).

Parallèlement au développement de l'antibiothérapie, des mécanismes de résistance sont apparus chez *S. aureus* jusqu'à l'émergence de staphylocoques dorés multi-résistants (SARM). Ces germes de traitement difficile étaient autrefois cantonnés au milieu hospitalier. Depuis le début des années 2000, les microbiologistes assistent à l'émergence rapide de souches de SARM communautaires notamment aux Etats-Unis où le nombre de ce type d'infection a considérablement augmenté en dix ans. Ces SARM communautaires ont pour particularité d'exprimer fréquemment la leucocidine de Pantone-Valentine qui peut donc servir de marqueur épidémiologique dans ce contexte (Vieu, 2014).

L'une des raisons pour lesquelles les staphylocoques sont problématiques est leur capacité bien connue à se lier aux surfaces et à se transformer en structures communautaires récalcitrantes, souvent appelées «biofilms». Le développement de biofilms s'est par la suite révélé important dans de nombreux types d'infections et est maintenant un mode de croissance bactérien largement accepté. Selon les instituts nationaux de la santé (INS), pas moins de 80% des infections humaines sont d'origine biofilm (Davies, 2003). Les biofilms présentent un défi

clinique, car ils résistent très bien aux traitements antimicrobiens et se produisent souvent dans des zones du corps difficiles d'accès (Del Pozo et Patel., 2007 ; Jacqueline et Caillon, 2014).

En effet, les biofilms constituent le mode de vie dominant des micro-organismes dans tous les environnements, qu'ils soient naturels ou créés par l'homme, et restent une préoccupation sérieuse dans les secteurs de la santé, de l'alimentation et de la mer. L'élaboration de stratégies efficaces de lutte contre les biofilms est une tâche ardue. De nombreuses approches innovantes d'antibiofilm ont été publiées, mais il est difficile de comparer toutes ces stratégies de manière fiable. Certaines des nouvelles approches émergentes, telles que les substances naturelles à titre d'exemple l'olivier (*Olea europaea*) en raison de sa haute teneur en composés phénoliques qui jouent un rôle majeur dans l'activité antimicrobienne (Aytul, 2010), les bactériophages, et diverses enzymes, sont prometteuses et pourraient aider à trouver des stratégies d'antibiofilm supérieures aux stratégies conventionnelles. En outre, une combinaison de ces nouvelles techniques avec des méthodes conventionnelles (antibiotiques, désinfectants et méthodes physiques) devrait résoudre le «problème du biofilm» dans un avenir proche (Sadekuzzaman *et al.*, 2015).

Le présent travail a pour objectif :

- Isolement et identification des souches de *Staphylococcus aureus* prélevées de pus.
- Etude des profils d'antibiorésistance en testant une gamme d'antibiotiques.
- Détecter la formation de biofilms *in vitro* chez divers isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline.
- Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles et des brindilles de l'olivier.

1. Historique

Le Staphylocoque fut démasqué à la fin du XIX^{ème} siècle, l'observation au microscope faisant apparaître des « amas de grains » dans le pus des furoncles. Observé par Robert Koch en 1878, il fut reconnu par Louis Pasteur deux ans plus tard. En 1881, Alexander Ogston isola la bactérie à partir d'abcès post-opératoires. Ces amas sont à l'origine du nom qu'il lui donna, « staphyle » désignant la grappe de raisin en grec. C'est en 1884, qu'Anton Rosenbach cultiva le staphylocoque in vitro et en décrivit la première espèce connue : *Staphylococcus aureus*, ou Staphylocoque doré, ainsi nommé en raison de la couleur des colonies obtenues en culture (Le Loir et Gautier, 2010).

2. Taxonomie

Selon la deuxième édition de Bergey's Manuel of systematic bacteriology, la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est illustrée dans le tableau I (Delarras, 2007).

Tableau I: Classification du genre *Staphylococcus* (Delarras, 2007).

Domaine	Bacteria ou Eubacteria
Phylum XIII	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

Les staphylocoques appartiennent à la famille des Micrococcacæ qui comprend quatre genres : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* et *Planococcus*. La classification des staphylocoques a été faite sur la base d'analyses des séquences des gènes codants pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S.

Le genre *Staphylococcus* comprend 35 espèces, l'espèce *S. aureus* a été subdivisée en deux sous espèces *S. aureus Supsp.aureus* et *S. aureus supsp.anaerobius*. . Cette dernière est peu connue, en conséquence, seule *S. aureus* est traité dans plusieurs travaux (Le Loir et Gautier, 2010).

3. Habitat

Les staphylocoques sont des germes ubiquitaires et commensaux. Cette espèce bactérienne peut coloniser l'humain aussi bien que plusieurs espèces animales (Burns *et al.*, 2008 ; Gordon *et al.*, 2008 ; Porrero, 2014). Chez l'humain, on peut retrouver *S. aureus* au niveau du nez, des aisselles ou encore dans le système gastro-intestinal (Wertheim *et al.*, 2005). Le nez est la principale région anatomique colonisée chez l'humain. Le portage de la bactérie peut être temporaire ou permanent (Wertheim *et al.*, 2005). Le portage permanent de la bactérie peut aller jusqu'à 50% de la population et le portage temporaire jusqu'à 60% de la population où la durée du portage ne dépasse généralement pas une semaine (Wertheim *et al.*, 2005 ; Lister, 2014).

Ils représentent près de 50% des bactéries aérobies isolées sur la tête, les aisselles, les bras, les jambes et dans les narines. Ils jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière contre les bactéries de la flore transitaire. Leurs distributions sur la peau n'est pas uniforme. Il existe des niches préférentielles (telles que la peau et les muqueuses) qui témoignent d'une adaptation de certaines espèces aux différentes régions de la peau (Corbière Morot-Bizot, 2006).

4. Caractéristiques bactériologiques

4.1. Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, *S.aureus* se présente sous l'aspect de coques immobiles. Il est regroupé en amas formant des grappes de raisin. C'est des cocci mesurant de 0.8 à 1 µm de diamètre, non sporulés. *S.aureus* est isolé en diplocoque ou en très courte chaînette (3 à 5 éléments) (le loir et Gautier, 2010). Après une coloration de Gram, ils se révèlent être des cocci Gram positif (figure 01). La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture (Robert, 2013).

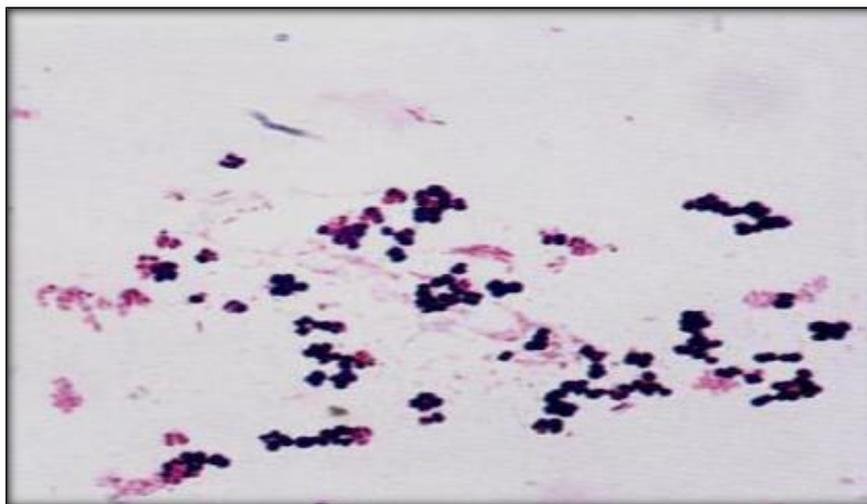


Figure 01: *S. aureus* sous microscope après coloration de Gram (Fasquelle, 1974).

4.2. Caractères cultureux

S.aureus est facilement cultivable sur milieux ordinaires (Le Minor et Veron, 1982). Les différents caractères cultureux de *S. aureus* sont enregistrés dans le tableau II.

Tableau II : Principaux caractères cultureux des staphylocoques (Camille, 2007).

Caractères	<i>S. aureus</i>
Habitat	- Ubiquitaires
Exigence	- Peu exigeants
Type respiratoire	- Anaérobies facultatifs en général
Conditions de culture	- Température optimale à 37 °C ; croissance à 10 °C et à 45 °C selon les espèces. - PH optimal de 7,2 à 7,4
Pigment	- Caroténoïde
Caractères spécifiques	- Halotolérants : 6,5 % de NaCl
Milieux de culture d'usage courant	- Gélose nutritive, gélose trypticase soja ...
Milieux d'isolement sélectif	- Gélose de Baird-Parker; - Milieu de Chapman ...
Milieux d'enrichissement sélectif	- Bouillon de Giolitti-Cantoni

4.3. Caractères biochimiques

La différenciation des espèces staphylococciques repose sur l'hybridation des acides nucléiques et particulièrement sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16s et d'autres techniques de biologie moléculaire. Les *S. aureus* peuvent se distinguer des autres espèces de

staphylocoques par rapport à plusieurs critères distinctifs (tableau III). Les *S. aureus* possèdent une coagulase, une désoxyribonucléase (DNase), une activité catalase positive et peuvent fermenter le mannitol (Boden, 1989).

Tableau III : Caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus* (El Kouri *et al.*, 1998)

Caractères	<i>S. aureus</i>
Pigment	+
Catalase	+
ADNase	+
Coagulase	+
VP	+
Nitrate réductase	+
D. mannitol	+
Hémolysine	+
Protéine A	+
Indole	-
Acétone	+
Uréase	+

Symboles: + : concerne 90% ou plus des souches positives ; - : 90% ou plus des souches négatives.

5. Facteurs de virulence et physiopathologie

Les facteurs de virulence identifiés sont nombreux chez les staphylocoques (figure 02). Ils sont codés par des gènes localisés sur le chromosome ou sur les éléments génétiques mobiles (Fomba, 2006). Ces facteurs codent pour des protéines de surface ou des exoprotéines et permettent à la bactérie de combattre le système immunitaire, d'adhérer aux cellules, de se disséminer dans le corps mais aussi d'utiliser les nutriments et l'énergie disponible (Chevalier, 2009). Les staphylocoques ont aussi des facultés d'adhésion aux structures inertes (corps étrangers, prothèses) et de production d'un biofilm qui est un facteur de virulence important de ces bactéries (Burin Des Rozier, 2002). On peut compter principalement trois classes de facteurs de virulence : les composants de la paroi, les protéines de surface du *S. aureus* et les protéines sécrétées par *S. aureus*. La figure 1 regroupe les principaux facteurs de virulence.

5.1. Les composants de la paroi et la capsule

5.1.1. Le peptidoglycane

Ce composant de la paroi bactérienne permet la liaison (de façon covalente) de plusieurs protéines de surface et ce sont ces dernières qui vont permettre d'adhérer à la surface des cellules à infecter (Thakker *et al.*, 1998).

5.1.2. La capsule

S. aureus exprime une capsule que l'on retrouve dans la majorité des isolats cliniques mais la bactérie perd sa capsule généralement après culture. La capsule a un rôle de facteur de virulence car elle empêche in vitro les neutrophiles de la recouvrir lors du phénomène d'opsonisation. La capsule possède des exopolysaccharides qui peuvent constituer un biofilm. Ce biofilm va enduire les bactéries et former une couche résistante aux globules blancs. (Thakker *et al.*, 1998).

5.2. Les protéines de surfaces : Facteurs d'invasion et d'adhésion

Les protéines de surfaces peuvent intervenir dans la colonisation, l'adhésion, la diffusion et l'invasion dans un organisme cible (Foster, 1998). Elles jouent un rôle dans la capacité à coloniser les tissus en se fixant aux cellules et à la matrice extracellulaire.

5.2.1. Les MSCRAMM

Les MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules) sont des protéines de surface fixées au peptidoglycane de la paroi bactérienne. Il existe plusieurs MSCRAMM et elles ont des rôles différents car elles agissent sur différents composants (Foster, 1998).

5.2.1.1. Protéine de liaison au collagène (Cna)

Elle permet l'attachement au collagène de *S. aureus* lors d'infections articulaires ou osseuses. La liaison au collagène serait un facteur de virulence important (Eveillard, 2007).

5.2.1.2. Protéine de liaison au fibrinogène (Clf)

La Clf (clumping factor) est une protéine de surface qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma permettant de transformer directement le fibrinogène en fibrine. Elle constitue un facteur de virulence pour les plaies et les infections sur corps

étrangers (Eveillard, 2007). C'est le facteur d'adhésion le plus important sur les bio matériaux des implants (Buckingham *et al.*, 2004).

5.2.1.3. Protéines de liaison aux fibronectines (FnBPA et FnBPB)

La fibronectine est une glycoprotéine qui se trouve dans la matrice extracellulaire (sous forme insoluble) et dans le plasma (sous forme soluble). Les récepteurs pour la fibronectine contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques mais également aux biomatériaux comme les cathéters quand ces derniers ont un contact prolongé avec le sang. Elles jouent un rôle important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers (Eveillard, 2007). Il en existe deux : les protéines de liaison a la fibronectine A et les protéines de liaison a la fibronectine B (Al alam, 2008).

5.2.2. Les SERAM

Les SERAM (secretable expanded repertoire adhesive molecules) regroupent plusieurs protéines comme Eap (extracellular adherence protein), Efb (extracellular fibrinogen binding protein), Emp (extracellular matrix binding protein) ainsi que la coagulase.

5.2.2.1. La protéine Eap

Son rôle est de faciliter sa propre phagocytose par les cellules phagocytaires, mais aussi de se fixer aux produits de dégradation de la matrice extracellulaire. Ainsi, *S. aureus* s'attaque de préférence aux tissus lésés et il masque les récepteurs des leucocytes pour limiter leur infiltration (Chavakis *et al.*, 2002 ; Hassen *et al.*, 2006).

5.2.2.2. La protéine Efb

Des chercheurs considèrent que la protéine Efb interagit avec le fragment C3 du complément, cette interaction contrecarre l'activation du complément et l'opsonisation (Lee *et al.*, 2004). De plus, elle inhibe l'agrégation plaquettaire en se liant au fibrinogène (Shannon et Flock, 2004).

5.2.3. Protéine A

C'est une holoprotéine insoluble à l'état natif, caractéristiques de *S.aureus*. Elle est élaborée par plus de 90% des souches d'origine humaine. Elle induit l'hypersensibilité immédiate et retardée (Sutra et Poutrel, 1994 ; Allassane, 2001).

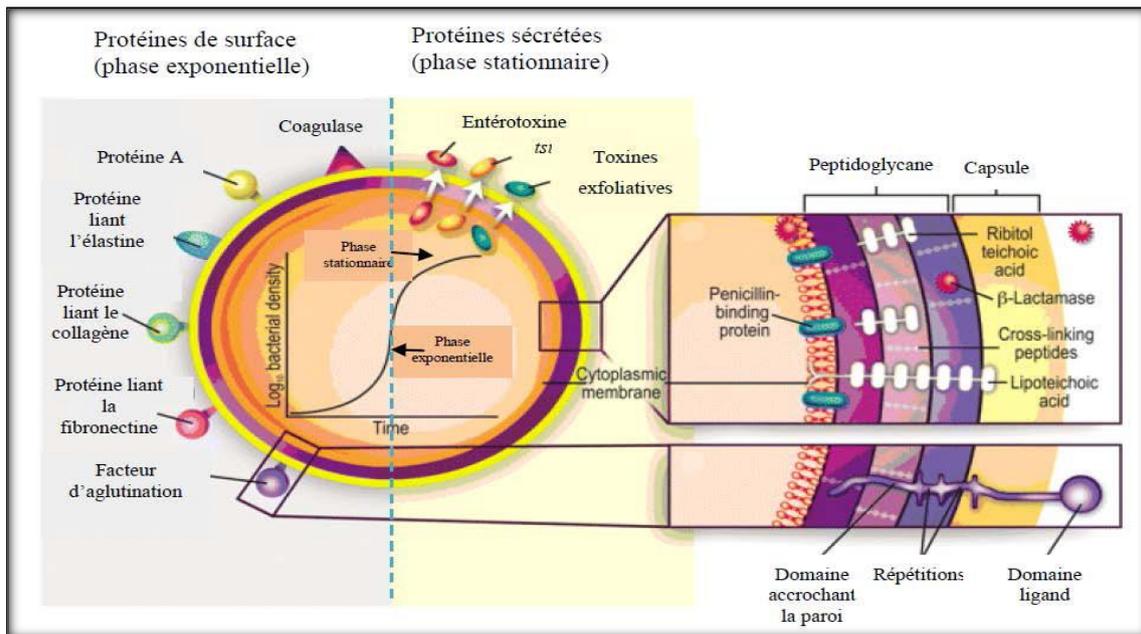


Figure 02: Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* (Gordon *et al*, 2008)

6. Substances élaborées par *S. aureus*

S. aureus est capable de produire des substances qui sont excrétées dans le milieu extracellulaire et sont douées d'une activité enzymatique ou bien d'une activité toxique.

6.1. Les enzymes staphylococciques

Les staphylocoques produisent de nombreuses enzymes (tableau IV) qui lysent les tissus et peuvent faciliter l'extension de l'infection aux tissus adjacents (Karam, 2004).

Tableau IV : Enzymes élaborées par *S.aureus* (Rouergue et Tourret, 2003).

Enzymes	Mode d'action
Coagulase	<ul style="list-style-type: none"> - Est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte et forme un complexe appelé staphylothrombine. La thrombine activée transforme donc le fibrinogène en fibrine. - C'est un marqueur classique de l'identification de <i>S. aureus</i>.
La désoxyribonucléase thermostable	<ul style="list-style-type: none"> - Est une nucléase ayant des propriétés endo- et exonucléasiques et active sur les ADN et les ARN. - Elle est produite par la plupart des souches de <i>S. aureus</i>.

6.2. Les toxines staphylococciques

Les staphylocoques sécrètent une quantité impressionnante de toxines (tableau V) hydrolysant différents constituants cellulaires. Ces toxines extracellulaires contribuent à la pathogénie des staphylocoques (Bisognano, 2000).

Tableau V : Toxines impliquées dans la virulence de *S.aureus* (Vincenot *et al.*, 2008).

Familles	Principales toxines	Mécanismes d'action
Toxines superantigénique	- Toxine du choc toxique staphylococcique - Entérotoxines A à E, G, I à U	- Choc toxique staphylococcique par activation du système immunitaire et libération de cytokines de l'inflammation. - Réaction auto-immune. - Intoxication alimentaire.
Toxines formant des pores	- Toxines à hélice alpha - Alpha-hémolysine - Gamma-hémolysine - Leucocidine de Pantone-Valentine	- Destruction des cellules de défense de l'hôte par formation de pores au niveau des membranes cellulaires.
Toxine à activité protéolytique	Exfoliatines	- Syndrome d'exfoliation généralisé

7. Les infections nosocomiales à staphylocoques

7.1. Définition

Le terme nosocomial, vient du grec « nosos » signifiant maladie et secondairement de « nosokomeone » qui signifie hôpital ; il qualifie ce qui se rapporte à ce milieu, ce qui se contracte lors d'un séjour hospitalier (Margot et Chantal, 2009 ; Prescott, 2009). L'infection nosocomiale est une infection acquise dans le cadre d'une activité de soins, qu'elle soit ambulatoire ou hospitalière. Elle est généralement acquise plus de 48h après l'admission (Menzinger *et al.*, 2008).

7.2. Fréquence et incidence

La fréquence globale des infections nosocomiales, mesurées par des études internationales, varie entre 5 et 10% des personnes hospitalisés (Vincent *et al.*, 2008). L'OMS estime que plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent d'infections nosocomiales,

en permanence. Dans les pays développés, qui disposent d'hôpitaux modernes, entre 5 à 10 % des patients admis contractent une ou plusieurs infections. Un taux qui dépasse parfois 25 % dans les pays en développement (Motaouakkil et Aalloula, 2011).

Aux Etats Unis d'Amérique (USA), c'était 1,7 million de patients touchés en 2002. Dans les pays en voie de développement, la prévalence des infections nosocomiales (IN) est plus élevée, puisque c'est 10 à 15% des patients hospitalisés qui sont concernés (Monnet, 2011).

En Algérie, Les différentes enquêtes réalisées au niveau des structures de santé sur les IN donnent un taux de prévalence national de 12 et 15 (Anonyme, 2012).

7.3. Origine des infections nosocomiales

Il a été montré que la cause majeure de la transmission des bactéries était d'une part, le manque d'hygiène (absence de lavage des mains...) et d'autre part les progrès de la médecine et de la chirurgie avec par exemple des soins et des thérapeutiques de plus en plus agressifs qui peuvent être des sources possibles d'infection (Belhaj Soulami, 2010).

Ces infections peuvent être directement liées aux soins dispensés au patient (par exemple l'infection sur cathéter) ou simplement survenir lors de l'hospitalisation, indépendamment de tout acte médical (par exemple une épidémie de grippe).

1. Historique

L'avènement de l'antibiothérapie, dans les années 1940, a complètement révolutionné le domaine médical et a entraîné une réduction significative de la mortalité associée aux maladies infectieuses (Avorn *et al.*, 2009). Malheureusement, la résistance bactérienne aux antibiotiques traditionnels a rapidement constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (Avorn *et al.*, 2001).

Dans les années quarante, la pénicilline était l'antibiotique de choix pour traiter les infections à *S. aureus*. Cependant, cette sensibilité à la pénicilline a été de courte durée suite à l'apparition de souches résistantes productrices de bêta-lactamases. De nouvelles molécules furent alors commercialisées et deux ans après l'introduction de la méthicilline (pénicilline semi-synthétique) en 1960 comme un antistaphylococcique puissant, les premières résistances à la pénicilline M ont été rapportées (Jevons, 1961). Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) ont actuellement une distribution mondiale (Ayliffe, 1997 ; Naimi, 2003). Et plus récemment, des résistances à la vancomycine, qui est un antibiotique de référence dans les infections à SARM ont été constatées (Garnier *et al.*, 2006). Cette évolution de la résistance fait craindre l'émergence des souches résistantes à tous les antibiotiques connus.

2. Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances chimiques d'origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique n'agissent que sur les bactéries en bloquant leur multiplication (effet bactériostatique) ou en les tuant (effet bactéricide) par différents modes d'action (Barzic et Ioan, 2015).

Un micro-organisme est considéré « résistant » à un antibiotique lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Avorn *et al.*, 2001). Les bactéries sont dites « multirésistantes » lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances naturelles et acquises, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques. Elles sont alors résistantes à plusieurs antibiotiques ou classes pharmacologiques d'antibiotiques (Ahmad, 1999 ; Jones, 2011).

3. Origine de l'antibiorésistance

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra-

chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (Lewis, 2009 ; Mandell *et al.*, 2009).

La résistance naturelle ou intrinsèque correspondant à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. Habituellement le support de cette résistance est chromosomique.

On oppose à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce. Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique qui est un phénomène spontané et rare et n'explique pas toutes les résistances rencontrées en clinique, soit par acquisition de matériel génétique exogène. La résistance acquise par transfert de matériel génétique représente 80 à 90 % des résistances acquises rencontrées chez les bactéries isolées en clinique. Une place à part est conférée à la résistance par les biofilms (Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001).

4. Mécanismes de résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques

S. aureus a développé des résistances quasiment vis-à-vis de tous les antibiotiques mis sur le marché. Quatre grandes catégories (tableau VI) de mécanismes de résistance concernent la plupart des espèces bactériennes, y compris *S. aureus* (Donnio, 2010). La figure 03 décrit les différents mécanismes de résistance de *S. aureus* vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques (Mainardi, 2015).

Tableau VI : Mécanismes de résistance chez *S. aureus* (Mandell *et al.*, 2009).

Mécanismes de résistance	Conséquences
Inhibition enzymatique	- Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique ; - Mécanisme de résistance le plus répandu.
Réduction de la perméabilité cellulaire	- Changements de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible.
Altération des sites de liaison cibles par l'antibiotique	- Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
Pompes à efflux	- Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible.

4.1. Résistance à la méthicilline SARM

Le principal mécanisme de résistance à la méthicilline est lié à la modification de la cible des β -lactamines, enzymes qui ont pour cible les transpeptidases appelées aussi protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP interviennent dans la synthèse de la paroi bactérienne en catalysant la formation de ponts peptidiques entre les chaînes glycaniques (Ghuysen, 1994).

S. aureus produit naturellement 4 PLP, les bêta-lactamines doivent en inhiber plus d'une pour obtenir une activité anti bactérienne efficace, elles vont bloquer la polymérisation de la paroi bactérienne la rendant instable et fragile ainsi provoquant secondairement la lyse de la bactérie (Labischinski, 1992)..

Les SARM synthétisent une 5^{ème} PLP modifiée appelée PLP2a, qui a une faible affinité pour les bêta -lactamines. Cette dernière est autonome, capable de réaliser à elle seule la polymérisation de la paroi bactérienne. Cependant la paroi bactérienne synthétisée par la PLP2a comporte des altérations morphologiques (diminution du degré de réticulation, prédominance de monomères ou dimères) qui ne sont pas favorables à la bonne croissance de la bactérie (Labischinski, 1992).

Le gène qui code pour la PLP2a est le gène *mecA* (Chambers, 1997). Il est transporté dans un élément génétique appelé Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC) *mec* (Katayama *et al.*, 2000). SCC*mec* est un fragment de 21-67 kb qui s'intègre dans un site unique proche de l'origine de réplication du chromosome de *S. aureus*. Il ne contient pas de gènes liés aux phages ni de transposons. Il véhicule des copies de plasmides intégrées responsables de la résistance à des antibiotiques autres que les β -lactamines.

La multirésistance est fréquente chez les SARM hospitaliers. Ainsi, les SARM peuvent être résistants aux fluoroquinolones ; aux macrolides, aux lincosamides et aux aminosides (Diekema *et al.*, 2001). La multirésistance limite les possibilités thérapeutiques à quelques antibiotiques, dont les plus efficaces dans ces situations restent les glycopeptides (Diekema *et al.*, 2001).

4.2. Autres résistances

4.2.1. Résistance aux betalactamines

Les betalactamines sont des antibiotiques bactéricides. Comme les glycopeptides, ils interfèrent avec le métabolisme du peptidoglycane, principal constituant de la paroi bactérienne. En effet ils agissent en inhibant les enzymes appelées « protéines liant les pénicillines » (PLP) qui sont impliquées dans la biosynthèse et le remaniement du peptidoglycane (Waxman et

Strominger, 1983). *Staphylococcus aureus* met en jeu divers mécanismes généraux pour résister aux pénicillines.

➤ **Production de betalactamases**

Les betalactamases sont des enzymes qui catalysent l'inactivation des pénicillines par fixation covalente au niveau du cycle betalactame (zapun, 2008).

➤ **Modification de la cible**

Cette résistance est liée à l'acquisition d'une PLP additionnelle (PLP2a) en plus des PLP déjà présentes chez *S. aureus* de très faible affinité pour les pénicillines M et les autres β -lactamines (Chambers, 1997 ; Kernodle, 2000).

4.2.2. Résistance aux Glycopeptides

Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) sont des antibiotiques agissant principalement sur la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ce sont des antibiotiques d'action bactéricide lente.

Ces molécules ont la capacité de diffuser dans le peptidoglycane et de se fixer sur le D-Ala-D-Ala du disaccharide pentapeptide fixé au lipide de transport et encore lié à la membrane cytoplasmique empêchant ainsi l'action des transpeptidases et des transglycosylases (Lanotte, 2005).

➤ **VRSA** (Vancomycin-resistant *S. aureus*)

Sont des souches ayant des CMI de la vancomycine > 16 mg/L et ayant acquis l'opéron *vanA* d'entérocoques porté par des plasmides. Elles sont également résistantes à la teicoplanine. (Leclercq, 2012).

➤ **VISA et GISA**

Le terme de VISA (Vancomycin Intermediate *S.aureus*) a été le premier utilisé car les souches ainsi nommées, puisqu'intermédiaire à la vancomycine (CMI = 8mg/L), ont été isolées au Japon puis aux Etats-Unis où la vancomycine était le seul glycopeptide utilisé (Hiramatsu *et al.*, 1997 ; Hiramatsu, 2001).

Le terme GISA (glycopeptide Intermediate *S.aureus*) a été ensuite introduit pour tenir compte de la résistance croisée envers la teicoplanine (Leclercq, 2002).

4.2.3. Résistance aux aminosides

Ces molécules agissent sur la traduction des acides ribonucléiques messagers (ARNm) et la synthèse des protéines. Après avoir pénétré de façon passive dans la bactérie, elles sont transportées vers les ribosomes et interfèrent ainsi avec la sous-unité 30S des ribosomes, qui joue un rôle dans la synthèse peptidique en lisant l'ARNm. Il en résulte ainsi des perturbations de la fonction ribosomale, avec blocage de l'initiation de la synthèse protéique, blocage de la traduction et terminaison prématurée ou encore incorporation anarchique d'aminosides qui entraînent la mort bactérienne. Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides rapides et puissants (Peyrat *et al.*, 2005).

La résistance est apportée par des plasmides. Trois familles d'enzymes sont impliquées : des acetyltransferases (AAC), des nucleotidyltransferases (ANT) et des phosphotransferases (APH) qui, respectivement, acétylent une fonction aminée de la molécule, transfèrent un reste adenyle sur un hydroxyle et enfin phosphorylent un hydroxyle en présence d'ATP (peyrat *et al.*, 2005).

4.2.4. Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramines « MLS »

Les Macrolides, Lincosamides, Streptogramines ont un mode d'action similaire. Elles se fixent sur la cible, l'ARN ribosomal 23S de la sous-unité 50S du ribosome en stimulant la dissociation entre ribosome et ARN de transfert, ce qui induit à une inhibition de la synthèse protéique (Leconte-Astruc *et al.*, 2005). Les macrolides et les lincosamides sont considérées comme bactériostatiques alors que les streptogramines sont bactéricides (Leconte-Astruc *et al.*, 2005). Trois grands types de mécanismes sont responsables de résistance aux MLS :

➤ **Modification de cible**

Le principal mécanisme de résistance décrit chez *S. aureus* est la modification de la cible ribosomale par méthylation (Chambers, 2009 ; Strahilevitz et Hooper, 2009). Les souches résistantes produisent une méthylase qui va agir sur une adénine de l'ARN_r 23S, induisant à un changement de conformation de ce dernier. Ce qui va engendrer une diminution de l'affinité de l'antibiotique vis-à-vis de sa cible, conférant ainsi une résistance croisée aux trois classes (Tankovic *et al.*, 1997).

➤ **Modification de l'antibiotique**

Plusieurs enzymes sont capables d'inactiver les MLS. L'érythromycine peut être inactivée par divers enzymes dont des estérases ou des phospho-transférases (Leclercq, 2002). Ce type de mécanisme est surtout décrit dans la résistance aux lincosamides et aux streptogramines. (Strahilevitz et Hooper, 2009).

➤ **Efflux**

Ce mécanisme lié au gene *msrA* peut toucher les macrolides grâce à une pompe ABC transporteur présente chez les staphylocoques (Leclerq, 2002). Ce mécanisme est décrit pour les macrolides et les streptogramines (Tankovic *et al.*, 1997).

4.2.5 Résistance aux tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques, elles ont une bonne diffusion tissulaire et intracellulaire, ce sont des inhibiteurs des synthèses protéiques ARN dépendantes. Elles se fixent au niveau de la sous unité 30S des ribosomes bactériens, ce qui empêche l'ARN_i-aminoacyl de s'y associer et bloquant la synthèse protéique (Lanote, 2005).

Deux mécanismes de résistance ont été rapportés chez *S. aureus*. Le premier est la synthèse d'enzymes inactivatrices qui est lié à la présence de gènes portés par de petits plasmides, porteur du déterminant *tetK* (Donnio, 2010). Ces gènes codent pour des protéines (principalement TetM et TetO) qui se fixent sur le ribosome, induisant l'augmentation de la constante de dissociation du complexe ribosome-tétracycline. Cela a pour effet de relarguer la molécule antibiotique et de rendre le ribosome fonctionnel (Schnappinger et Hillen, 1996 ; Connell *et al.*, 2003). Le deuxième mécanisme consiste en l'expression de pompes à efflux actif réalisé par des protéines membranaires ATP-dépendantes (Speer *et al.*, 1992). Cet efflux réduit la concentration de l'antibiotique dans le cytoplasme, protégeant ainsi les ribosomes (Chopra et Roberts, 2001).

4.2.6. Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la synthèse de l'ADN. Cette action est liée à l'inhibition de deux topo-isomérases bactériennes : l'ADN gyrase, qui catalyse le surenroulement de l'ADN, et la topo-isomérase IV qui est responsable de la décaténation du chromosome au cours de sa réplication (Child *et al.*, 1995).

Le mécanisme de résistance aux fluoroquinolones le plus fréquent est la modification de la cible par mutations au niveau du gène *parC* codant la sous unité C de la topo-isomérase IV (Smith et Jarvis, 1999). Cette résistance touche essentiellement les souches hospitalières, en particulier les SARM (Mc Callum *et al.*, 2006). Un deuxième mécanisme de résistance chez *S. aureus*, probablement de moindre importance, consiste en l'expression de pompes à efflux multiple (*MDR*) (Demarco *et al.*, 2007).

4.2.7. Résistance aux rifampicines

Les rifampicines sont des métabolites secondaires d'*Amycolaptosis mediterranei*. Leur action est essentiellement bactériostatique, agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques. Elles se fixent de façon non covalente sur la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN-dépendante codée par le gène *rpoB*, et interfèrent avec la phase d'initiation de la transcription de l'ADN bactérien. Par conséquent les rifampicines empêchent l'initiation de la transcription ainsi la bactérie meurt (Wehrli et Staehelin, 1971 ; Floss et Yu, 2005 ; Lanotte, 2005).

S.aureus peut développer rapidement une résistance à la rifampicine par la modification de la cible au niveau de sites particuliers du gène *rpoB* par mutation ponctuelle (Damon *et al.*, 1998 ; Zhou *et al.*, 2012).

4.2.8. Résistance aux sulfamides

Les sulfamides forment l'une des rares familles d'antibiotiques dont le mécanisme d'action est élucidé à l'échelle moléculaire (Bushby, 1983). Le mécanisme d'action est lié à son analogue structural l'acide para-amino-benzoïque (PAB) (Barret, 2005). Le PAB est le substrat naturel de dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse la synthèse de certains acides aminés et de bases azotées, à savoir, l'acide folique nécessaire au métabolisme des bases puriques et pyrimidiques (Sköld, 2000). Les sulfamides en se fixant sur DHPS à la place du PAB créant un blocage enzymatique et se forme alors des produits anormaux ne permettant pas la croissance bactérienne (Barret, 2005).

La résistance de *S. aureus* vis-à-vis des sulfamides est due à des mutations chromosomiques. Ces dernières peuvent induire une surproduction du PAB (Oakberg et Luria, 1947 ; Lyon et Skurray, 1987), ou produire des DHPS ayant une affinité réduite à l'antibiotique (Then, 1989).

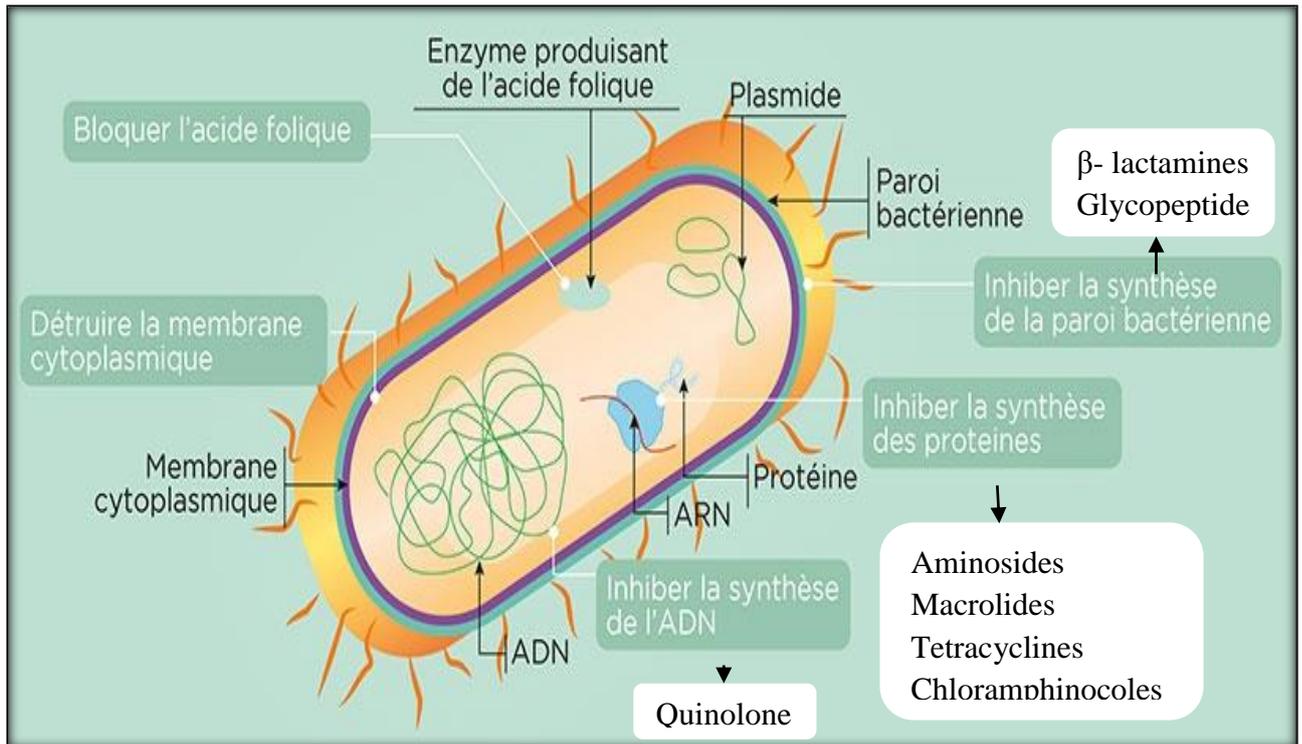


Figure 03: Mécanismes de résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques (Mainardi, 2015).

1. Généralités

Le genre *Staphylococcus* comprend un groupe diversifié de commensales qui colonisent les mammifères sur la peau ou les muqueuses. Certains des membres les plus connus de ce genre, comme *Staphylococcus aureus*, en particulier les souches résistantes à la méthicilline, sont des pathogènes opportunistes et sont responsables de sérieux problèmes de santé (Becker *et al.*, 2014). L'une des raisons pour lesquelles les staphylocoques sont problématiques est leur capacité bien connue à s'attacher aux surfaces et à se développer en structures communautaires récalcitrantes, souvent appelées "biofilms".

Généralement, les biofilms sont définis comme étant des communautés de cellules encastrées dans une matrice d'exopolymères et adhérent sur une surface biotique (ex : muqueuses) ou abiotiques (ex : cathéters), (Costerton *et al.*, 1999). Ils sont reconnus comme étant résistants à la thérapie antimicrobienne et aux défenses de l'hôte (Kiedrowski et Horswill, 2011).

L'état biofilm a d'abord été observé dans des études sur les milieux marins, dans lesquelles des communautés de bactéries adhérentes ont été trouvées dans des milieux aquatiques naturels et industriels (Costerton *et al.*, 1987).

Le développement de biofilm s'est par la suite avéré important dans de nombreux types d'infections et est maintenant un mode de croissance bactérienne largement répandu.

2. Composition de la matrice

La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle contient de l'ADN extracellulaire (ADNe), provenant à la fois de bactéries lysées et potentiellement de la mort des cellules neutrophiles de l'hôte, et est susceptible d'être dispersée par les ADNases (Mann *et al.*, 2009 ; Montanaro *et al.*, 2011). Des adhesines ont également été identifiées dans la matrice staphylococcique du biofilm, elles peuvent être directement associées à des bactéries ou être libres dans la matrice du biofilm (Speziale *et al.*, 2014). Les adhesines intercellulaires de polysaccharides extracellulaires (PIA) ont également été identifiées comme composant majeur du biofilm staphylococcique (Otto, 2013). Un certain nombre de protéines cytoplasmiques ont été identifiées comme composants de la matrice et ont sans aucun doute une fonction importante (Foulston *et al.*, 2014). Les acides teichoïques ont également été impliqués dans la matrice du biofilm (Jabbouri et Sadovskaya, 2010), bien que leur rôle relatif dans les mécanismes de formation des biofilm n'ait pas reçu autant d'attention.

3. Cycle de vie d'un biofilm de *Staphylococcus aureus*.

La formation d'un biofilm représente un changement radical de mode de vie des microorganismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile, est un processus dynamique et complexe (Costerton, 1999), il passe par plusieurs étapes (figure 4) comme décrit ci-dessous.

3.1. Attachement

Dans un premier temps, les cellules bactériennes sous forme planctonique vont venir s'agréger à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire de transport passif (ex : sédimentation) ou alors de transport actif en faisant notamment intervenir des structures spécifiques de la bactérie (Percival *et al.*, 2011). Il s'en suivra une adhésion réversible correspondant à un attachement faible des cellules bactériennes à la surface et faisant intervenir des interactions faibles de type forces de Van der Waals et liaisons électrostatiques. L'attachement sur une surface biotique se fera soit directement à la surface soit indirectement par l'intermédiaire d'un film conditionnant formé par les molécules de la matrice de l'hôte et reconnues par les MSCRAMM qui sont ancrées dans la membrane cellulaire de la bactérie (Otto, 2013).

➤ Film conditionnant

La formation d'un film conditionnant pourra également être observée lors de l'attachement à une surface abiotique. Dans ce cas-là, l'attachement sera dépendant des caractéristiques physicochimiques du matériel impliqué ainsi que de la surface de la bactérie mise en cause (hydrophobicité et exopolysaccharides). Si la cellule réside assez longtemps à la surface, l'adhésion deviendra irréversible et entraînera l'adhésion permanente du microorganisme à cette même surface et cela grâce à des interactions fortes et spécifiques.

➤ Microcolonies et exode

Une fois que l'attachement des cellules bactériennes à la surface sera définitif, celles-ci vont s'agréger entre elles et former des microcolonies. L'une des observations du développement d'un biofilm au moyen de la microscopie à intervalle de temps a été une libération distincte et coordonnée des cellules environ six heures après le début de l'étape de la multiplication. Ce stade, appelé " exode " est un événement de dispersion précoce qui coïncide avec la formation de microcolonies et entraîne la restructuration du biofilm. Il est important de noter que l'exode est médié par la dégradation de l'ADNe en fonction de la nucléase et est indépendant du mécanisme de dispersion de l'Agr (accessory gene regulator) qui se produit après le développement de microcolonies.

La dégradation de l'ADNe dans la matrice du biofilm par une nucléase sécrétée et autoproduite a été démontrée à plusieurs reprises comme réduisant la biomasse totale des biofilms de *S. aureus* (Mann *et al.*, 2009 ; Kiedrowski *et al.*, 2011 ; Beenken *et al.*, 2012 ; Moormeier *et al.*, 2014 ; Kiedrowski *et al.*, 2014). Cependant, ce n'est que récemment, lors d'études utilisant la microscopie à intervalle de temps, qu'il a été déterminé que la dégradation de l'ADN-nucléaire se produit très tôt au cours du développement du biofilm et qu'elle est la cause de l'exode. Il est donc possible que la réduction de la population cellulaire au cours du développement précoce du biofilm (par la mort cellulaire ou l'exode) soit une condition préalable à la formation de la structure secondaire. En effet, en l'absence d'exode, comme chez un mutant de *S. aureus*, la formation de microcolonies n'est pas observée (Moormeier *et al.*, 2014).

➤ **Maturation**

On observera ensuite la croissance et la maturation du biofilm qui sera régit par des forces d'adhésion notamment pour permettre l'agglutination des bactéries entre elles mais également par des forces perturbatrices qui vont quant à elles permettre au biofilm d'acquérir sa structure finale mais également plus tardivement de permettre le détachement d'amas de cellules bactériennes du biofilm (Otto, 2013).

➤ **Molécules d'adhésions**

Chez les staphylocoques, la molécule d'adhésion la plus importante est le PNAG ou PIA (Otto, 2012). Ce dernier est codé par les gènes du locus *ica*, *icaA* et *icaD* interviennent notamment dans la synthèse d'une N-acétyl-D-glucosamine transférase dont le rôle est d'ajouter des résidus N-acétylglucosamine à la chaîne oligo N-acétyl-glucosamine en cours de polymérisation (Otto, 2012).

En revanche, des souches de staphylocoques ayant la capacité de former des biofilms ne possédant pas les gènes du locus *ica* ont permis de mettre en évidence l'implication de protéines dans l'adhésion du biofilm telles que Aap (« Accumulation associated protein »), Embp (« Extracellular matrix binding protein »), FnBps (« Fibronectin binding proteins ») ou encore la protéine A . Leurs mécanismes d'implication dans l'adhésion cellule-cellule ne sont cependant pas encore totalement élucidés. Des polymères semblent également impliqués dans cette phase comme par exemple l'acide teichoïque qui interagit avec d'autres polymères de surface par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques.

L'ADN extracellulaire (ADNe) libéré par les bactéries lysées semble également impliqué dans l'interaction avec d'autres structures de surface de la bactérie et de l'hôte et cela grâce à ses charges négatives (Otto, 2013).

3.2. Détachement

Une fois la taille maximale du biofilm atteinte, différents mécanismes de dispersion vont intervenir (Lister et Horswill, 2014). Ce phénomène pourra être initié par différents facteurs tels qu'une perturbation mécanique (ex : forces de cisaillement), une dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (ex : DNase) ou du substrat sur lequel le biofilm est attaché (ex : hyaluronidase), une induction de la motilité, une production d'agents tensioactifs ou encore un relâchement dans l'environnement extérieur d'exopolysaccharides (Jacques *et al.*, 2010). Le mécanisme majeur mis en place par *S. aureus* est la production d'enzymes et de surfactants dans le but de dégrader plus ou moins spécifiquement les composants de la matrice polysaccharidique.

L'implication des PSM (« phenol soluble modulins »), une famille de toxines isolées notamment dans des souches de *S. aureus* très virulentes, dans le développement du biofilm et surtout dans le détachement des cellules bactériennes a été démontrée (Peschel et Otto, 2013). Chez les staphylocoques, la régulation de ces toxines est prise en charge par le système Agr (Accessory gene regulator).

Le système Agr est le nom donné au quorum sensing (QS) chez les staphylocoques. Ce système est activé par des peptides autoinduits (AIP), codés et produits par l'opéron agr. Ce système contrôle également d'autres facteurs de détachement, quant à eux plus spécifiques, les protéases.

On compte chez *S. aureus*, 10 protéases dont 7 sérine protéases, 2 cystéine protéases et 1 métalloprotéase. Celles ci sont impliquées dans la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et de ce fait de la déstabilisation du biofilm. La protéase V8, par exemple, dégrade spécifiquement Bap (Biofilm associated protein) et FnBPs (Lister et Horswill, 2014).

D'autres mécanismes enzymatiques sont également impliqués dans cette étape de détachement, comme les nucléases ou encore la dispersine B. Cette dernière, isolée chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, va induire une dispersion du biofilm de *S. aureus* et de *S. epidermidis* en hydrolysant la liaison glycosidique du PNAG, dégradant ainsi la matrice et entraînant le détachement de cellules bactériennes du biofilm (Kaplan *et al.*, 2004).

Le détachement est une étape clé dans la transmission et la persistance du biofilm car il entraîne la dispersion de cellules planctoniques qui vont coloniser d'autres surfaces et ainsi pouvoir conduire à la transmission de la bactérie de l'environnement vers un hôte mais aussi entre individus ou encore à une propagation de l'infection chez un même individu.

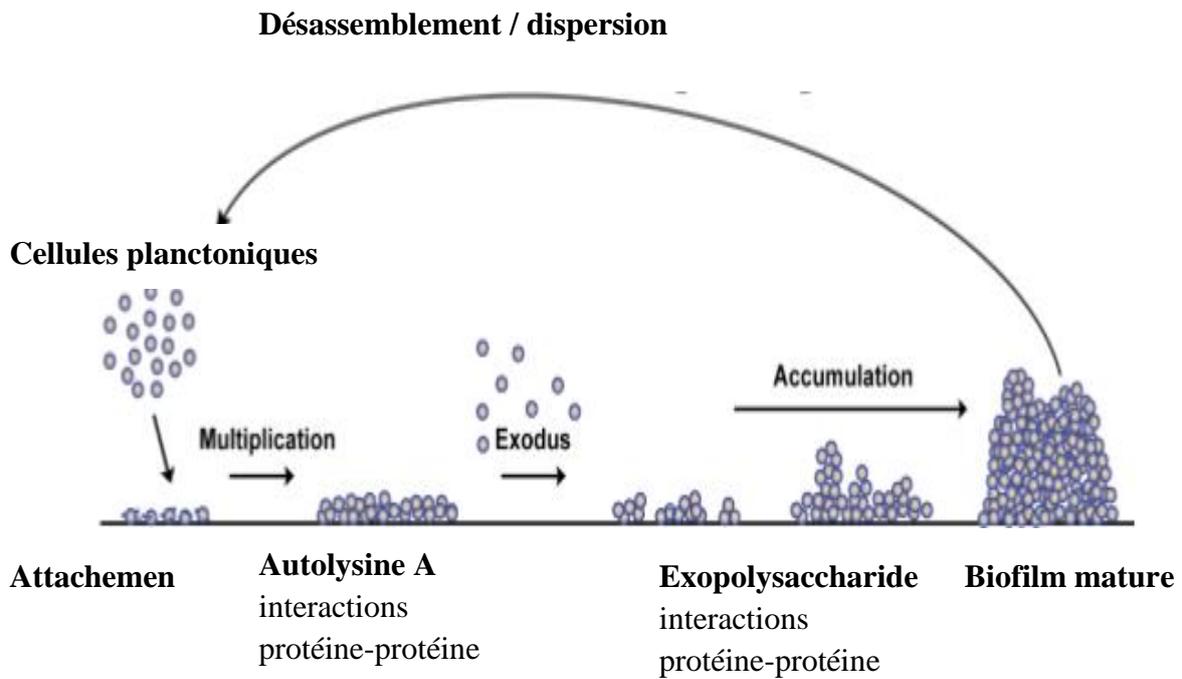


Figure 04 : Cycle de vie d'un biofilm (Alexandra *et al.*, 2015).

4. Caractéristiques des biofilms

Les bactéries ayant la capacité de former un biofilm présentent des caractéristiques communes (Costerton *et al.*, 1999 ; Tremblay *et al.*, 2014):

- Les cellules bactériennes sont retenues ensemble par une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. Chez *S. aureus*, le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellular adhesin ») (Arcilola *et al.*, 2015).
- Le développement du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires, soient présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes par exemple le « quorum sensing » (Miller et Bassler, 2001). Le QS est un mécanisme de régulation de l'expression génique en réponse à des variations de la densité cellulaire (Pan et Ren, 2009).
- Le biofilm protège les bactéries de toute agression extérieure telle que le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation ou encore les biocides (antibiotiques et désinfectants) (Costerton *et al.*, 1999 ; Hall- Stoodley et Stoodley, 2009).

5. Rôles des biofilms

La formation du biofilm procure à la bactérie un certain nombre d'avantages. Nous en présentons quelques uns :

- Coopération métabolique et stockage d'énergie : les bactéries du biofilm accèderaient plus facilement aux nutriments que les bactéries planctoniques grâce à leurs charges électriques ou par d'autres forces physico-chimiques locales (ZOBELL, 1943).
- Protection vis-à-vis des agressions de l'environnement comme les UV, changements de température, de pH et d'osmolarité, grâce à la phase liquide qui peut circuler dans les canaux d'exopolymères. (Costerton *et al.*, 1987).
- Protection envers plusieurs mécanismes antimicrobiens, comme l'application de biocides, d'antibiotiques et l'action de prédateurs (Costerton *et al.*, 1984 ; Costerton *et al.*, 1989 ;Anwar *et al.*, 1992).
- Communication intercellulaire, via le mécanisme de quorum-sensing qui implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signales appelées des auto- inducteurs (AI) (Ahmer, 2004).
- Transfert d'informations génétiques au sein du biofilm : Les transferts horizontaux d'informations génétiques jouent un rôle important dans l'évolution et la diversité génétique des communautés microbiennes. L'un des principaux mécanismes de transfert génétique est celui de la conjugaison qui permet l'échange direct d'ADN par contact physique entre deux cellules via un pilus de conjugaison. Ce mécanisme est essentiel pour l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (Ghigo, 2001).

6. Résistance des bactéries au sein des biofilms

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms en milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants) ainsi qu'aux défenses de l'hôte (Roux et Ghigo, 2006).

6.1. Résistance aux défenses de l'hôte

Les bactéries ayant formé un biofilm stimulent la réponse immunitaire mais son efficacité est limitée par défaut de pénétration des phagocytes et des anticorps dans la matrice du biofilm. Les phagocytes vont libérer leurs enzymes phagocytaires sur place, ce qui induit une réponse inflammatoire qui endommage les tissus environnants et libère des bactéries du biofilms. Une bonne immunité cellulaire et humorale ne suffit donc pas pour éliminer un biofilm (Roux et Ghigo, 2006).

6.2. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries vivant au sein du biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques que leurs homologues planctoniques (Bridier *et al.*, 2011 ; Simoes, 2011). Les concentrations d'antibiotiques nécessaires pour inhiber les bactéries au sein d'un biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique (Simoes, 2011). Plusieurs mécanismes de résistance ont été avancés pour expliquer cette forte réduction de l'activité des antibiotiques qui crée un sérieux problème de santé publique.

7. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

7.1. Défaut de pénétration de l'antibiotique

La matrice d'exopolysaccharide agit comme une barrière empêchant la diffusion de l'antibiotique (König *et al.*, 2001). En effet, les exopolysaccharides sont chargés négativement et fonctionnent comme une résine d'échange ionique pouvant séquestrer des antibiotiques hydrophobes et chargés positivement, comme les aminoglycosides. Ce mécanisme de limitation de la pénétration des agents antimicrobiens au sein d'un biofilm explique les antibiorésistances observées lors d'administration unique d'antibiotiques mais n'est pas valable pour les antibiothérapies de longue durée (Gilbert, 2001).

7.2. Croissance ralentie des bactéries

Dans le biofilm, le métabolisme de la bactérie se stabilise à un niveau bas limitant ainsi l'action des antibiotiques nécessitant une division cellulaire et un métabolisme actif (Cramton *et al.*, 2001). Du fait d'un environnement spécifique du biofilm dont les zones les plus profondes, riches en résidus acides, pauvres en oxygène et en nutriment, les bactéries ont un métabolisme ralenti. Or les antibiotiques agissent en phase de croissance bactérienne (Sotto et Lavigne, 2007).

7.3. Persistance des bactéries

Une dose croissante d'antibiotique entraîne une décroissance initiale du nombre de bactéries vivantes dans un biofilm, jusqu'à un seuil au-delà duquel l'augmentation des doses n'augmente plus le nombre de bactéries tuées, car une population de bactérie persiste quelle que soit la dose administrée (Lewis, 2011). Ce taux de bactéries persistantes serait plus important dans les biofilms que chez les bactéries planctoniques (Stewart, 2002), notamment en profondeur du biofilm (Del Pozo et Patel, 2007).

8. Moyens de lutte contre les biofilms

En ce qui concerne les effets néfastes graves des biofilms sur de nombreuses activités humaines, diverses approches visant à prévenir et à éliminer un biofilm ont été utilisées pendant de nombreuses années (figure 05). Les méthodes physiques et chimiques traditionnelles, telles que le rinçage, la chloration et la désinfection par ultraviolets, sont utilisées pour contrôler et éliminer les biofilms. Cependant, en raison du manque d'efficacité et de sécurité de ces stratégies, les préoccupations ont persisté (Srinivasan *et al.*, 2008), qui ont motivé la recherche, le développement et l'application de nouvelles approches pour disperser et / ou inhiber la formation de biofilms (Sadekuzzaman *et al.*, 2015).

De nombreuses nouvelles méthodes, telles que l'inhibition de la détection du quorum (QS), la perturbation enzymatique, le revêtement bactéricide, la nanotechnologie et l'approche bioélectrique, ont été étudiées avec succès dans le but de trouver des alternatives efficaces pour la prévention et le contrôle des biofilms (Sadekuzzaman *et al.*, 2015).

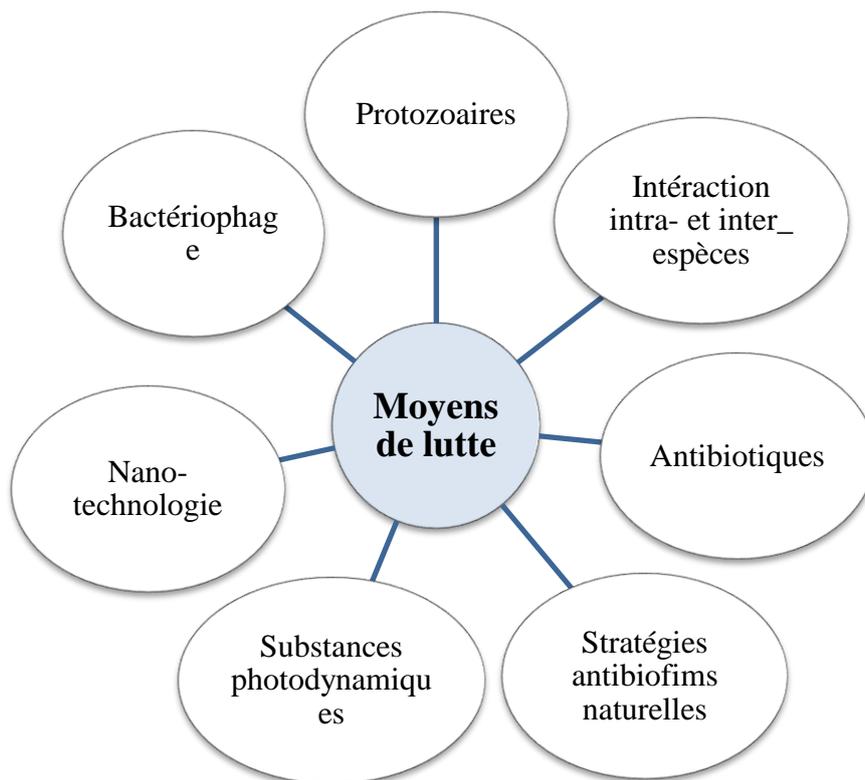


Figure 05 : Moyens de lutte contre les biofilms

Dans cette partie nous allons nous intéresser uniquement aux moyens de luttés naturelles.

8.1. Stratégies anti-biofilm naturelles

Les cultures anciennes connaissaient certaines épices et herbes pouvant aider à conserver les aliments et avaient des effets médicaux. En conséquence, depuis la fin du 19^{ème} siècle, des scientifiques ont testé certains composants naturels afin d'explorer leurs propriétés antimicrobiennes (Cowan 1999). Cependant, l'activité antibiofilm de tels composés n'a pas été validée de manière rigoureuse. Récemment, les propriétés antibiofilm ont été attribuées à plusieurs composés naturels, tels que différents extraits de plantes, huiles essentielles et miel, et ces propriétés ont fait l'objet de nombreuses études (Sadekuzzaman *et al.*, 2015).

8.1.1. Extraits de plantes

La capacité du diterpène casbane isolé de l'extrait de *Croton nepetaefolius* (plante indigène au Brésil) à inhiber la formation de biofilm de deux espèces de bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*, cinq bactéries Gram-négatives (*Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli*) et trois espèces de levures (*Candida tropicalis*, *Candida albicans* et *C. glabrata*) ont fait l'objet de nombreuses études (Carneiro *et al.*, 2011). Ces derniers auteurs ont indiqué que la formation de biofilm était inhibée aux valeurs des CMI et même lorsque la croissance des cellules planctoniques n'était pas réduite. Une autre étude a montré que la formation de biofilm de *Candida* était considérablement réduite par l'huile de *Boesenbergia pandurata* (racine de doigt) (Taweechaisupapong *et al.*, 2010), les biofilms ont été réduits de 63% à 98% lorsque des taux inférieurs à la CMI (de 4 à 32 µL / mL) ont été utilisés. Récemment, divers extraits de plantes ont été examinés contre le biofilm de *E. coli* entérohémorragique (EHEC) O157: H7 (Lee *et al.*, 2013). En effet, ces découvertes indiquent que différents extraits de plantes ont un effet inhibiteur sur les biofilms de nombreux microorganismes (tableau VII).

Tableau VII: Composés inhibiteurs naturels de quorum sensing connus pour inhiber la formation de biofilm

Source	Composé	Effet sur les biofilm	Références
Thé vert	Epigallocatechin Gallat	Inhibe la formation de biofilm chez <i>S.aureus</i> et <i>B.capacia</i>	Huber <i>et al.</i> , 2003; Blanco <i>et al.</i> , 2005
<i>Curcuma longa</i>	Curcumin	Inhibe la formation de biofilm chez <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> , <i>P.Mirabilis</i> , et <i>S.marcescens</i>	Packiavathy <i>et al.</i> , 2014
Extrait de plante (<i>Sabucuschinesis</i>)	Acide ursolique	Inhibe la formation de biofilm chez <i>E.coli</i>	Ren <i>et al.</i> , 2005
Macroalga (<i>Delisea pulchra</i>)	Furanone	Inhibe la formation de biofilm chez <i>A.hydrophila</i>	Ponnusamy <i>et al.</i> , 2010
Extrait d'agrumes	Naringin	Diminution de la formation de biofilm chez <i>Y.enterocolitica</i>	Truchado <i>et al.</i> , 2012

➤ **Rôle de l'olivier dans la lutte antimicrobienne**

L'olivier (*Olea europaea*) est une espèce largement cultivée dans le bassin méditerranéen depuis la plus haute antiquité. Il est considéré comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques. Certains composés identifiés dans les extraits de feuilles, tels que les composés phénoliques sont doués d'activités biologiques extrêmement importantes (Djenane *et al.*, 2012).

➤ **Activités biologiques des composés phénoliques de l'olivier**

Les composés phénoliques sont connus par leurs rôles physiologiques très important dans le règne végétal, ce sont des substances qui présentent dans leur structure au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH. Ce qui confère à ces composés des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Hennebelle *et al.*, 2004). Ces activités biologiques sont principalement liées à la biodisponibilité des composés phénoliques tels que l'oleuropéine et hydroxytyrosol (Silva *et al.*, 2006).

➤ **Mécanismes d'action des composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont la source de substances qui servent comme moyens de défense contre les micro-organismes, les insectes et les herbivores. En effet, les propriétés bactériostatiques et bactéricides sont dues aux fonctions phénols, le site et le nombre de

groupements hydroxyles augmentent la toxicité contre les microorganismes (Cowan, 1999 ; Karou *et al.*, 2005). Les cibles les plus probables dans la cellule microbienne sont les protéines, les polypeptides de la paroi cellulaire et les enzymes de la membrane. Les polyphénols peuvent ainsi rendre les substrats inaccessibles aux microorganismes (Cowan, 1999).

L'activité antimicrobienne est liée à plusieurs mécanismes d'action. Il a été démontré que le mécanisme de toxicité se fait :

- soit par la privation des ions métalliques (fer, magnésium)
- soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des liaisons hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires (les adhésines), afin d'inactiver l'adhésion des microorganismes ou bien les enzymes (protéases et carboxylases) ou autres interactions pour inactiver les transporteurs protéiques membranaires, ce qui conduit à la dénaturation de la membrane cytoplasmique entraînant une fuite des constituants cellulaires (Meyer *et al.*, 1997 ; Karou *et al.*, 2005)

1. Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologies, faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou (UMMTO) ainsi qu'au niveau de laboratoire de microbiologie du CHU (Centre hospitalo-universitaire) de Tizi ousou.

L'objectif principal de notre étude s'est axée sur l'isolement, l'identification de souches hospitalières de *Staphylococcus aureus* prélevées de pus et l'étude du profil de résistance aux antibiotiques et aux extraits organiques de feuilles et de brindilles de l'olivier, ainsi que leur capacité à former un biofilm.

1.1. Matériel

1.1.1. Appareillage

Les appareils et les milieux de culture utilisés sont présentés dans le tableau ci dessous.

Tableau VIII: Appareils et matériel utilisés.

Appareillage	Petit matériel
<ul style="list-style-type: none"> • Autoclave de paillasse (PBINTERNATIONAL) • Bain marie (MEMMERT) • Balance de précision à 0,01mg (SARTORIUS) • Balance (Denver instrument) • Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA 3-18K, SIGMA 4-16K) • Etuve bactériologique 37°C (MAMMERT) • Spectrophotomètre (SCHIMADZU) • Agitateur magnétique (Labinco, Variomag poly15 NETEZ) • Vortex (VELP scientifica, Heidolph) • Réfrigérateur • Congélateur (ENIEM) • Rotavapor (IKA- WERK) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bec bunsen • Microplaques • Micropipettes • Tubes à essai stériles; • Tubes à hémolyse; • Portoirs pour tubes • Pipettes Pasteur; • Anses à boucle; • Tubes eppendorf 1,5 ml; • Cryotubes; • Cuves, • Boîtes de Pétrie en plastique à 90 mm de diamètre; • Boîtes de Pétrie en verre; • Ecouvillons; • pinces, • Embous Jaunes et bleus • Flacons de 200 ml stérile; • Spatule; • Barreaux magnétiques; • Seringues 5 ml; • Erlenmeyers; • Fioles jaugées, • Eprouvettes • Entonnoirs; • Bêchers; • Disques de papier wattman N°1.

1.1.2. Différents milieux, réactifs et solutions utilisés

Tableau IX: Milieux, réactifs et colorants utilisés.

Milieu	Réactifs
<p>Milieux solides</p> <ul style="list-style-type: none"> Gélose nutritive (Fluka Biochimika) Gélose Mueller Hinton (MH) (CONDA) Chapman (CONDA) BHI (brain heart infusion) TSB <p>Milieux liquides</p> <ul style="list-style-type: none"> BHIB (bouillon heart iron bread) Clarck et leubs (CL) 	<ul style="list-style-type: none"> Glycérol (80%); Disques d'antibiotiques en cartouche (Liofilchem, Italie); Eau physiologique (0,9 %); Eau oxygénée; Plasma humain; Acétate d'éthyle; Eau distillée;; VP2 (α naphтол); HCl (2N); NaOH 16 % (VP1); Acide gallique; Acide ascorbique; Cristal violet Ethanol 80 % et 95 % Tampon PBS Carbonate de sodium(Na_2CO_3) à 7%; Folin –Ciocalteu; 2.2.Diphényl-1-Picryl-Hydrazyle(DPPH). Diméthylsulfoxyde (DMSO)

1.1.3. Matériel biologique

➤ Souches étudiées

Les souches utilisées sont des Souches de *Staphylococcus aureus* récoltées à partir de laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou et d'autres souches de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922.

➤ Matériel végétal

Au cours de cette étude on s'est intéressé à une plante qui est l'olivier (*Olea europaea*), la famille Oleaceae, de trois variétés différentes *Chemlal* (*Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*), *Azeradj* (*Olea europaea. L*) et *Sauvage* (*Olea europaea sylvestris*) provenant du village de Beni Kouffi, région de Boghni, Willaya de Tizi Ouzou. La récolte a été réalisée au cours du mois de février 2019.



Figure 06: Photographie de l'olivier (*Olea europaea*)

1.2. Méthodes

Partie 1

1.2.1. Origine des souches bactériennes

70 souches de staphylocoques préalablement identifiées comme étant des souches de *Staphylococcus aureus* au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-ouzou ont été récoltés pour cette étude. Elles ont été isolées de patients hospitalisés au sein des différents services au cours de la période allant du mois de février 2019 jusqu'au mois d'avril 2019. Ces souches provenaient de prélèvements pathologiques : prélèvements sur des cathéters et de pus formés sur des plaies.

1.2.2. Isolement et purification

L'isolement est pratiqué sur le milieu Chapman préalablement coulé en boîtes de Pétri. Les milieux sont ensemencés en stries serrées sur la surface de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37°C pendant 24h. Après incubation, un seul repiquage sur milieu BHI a été suffisant afin de confirmer la pureté des souches pour entreprendre l'étape d'identification.



Figure 07 : photographie montrant l'aspect des colonies des isolas de *S. aureus* sur milieu BHI après purification.

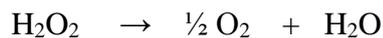
1.2.3. Identification

➤ Examen macroscopique des cultures

Le milieu Chapman est un milieu sélectif pour les staphylocoques, sa teneur élevée en chlorure de sodium limite le développement de certains germes autres que *Staphylococcus*. Les micro-organismes fermentant le mannitol donnent des colonies jaunes. Ce caractère est un critère d'orientation pour l'identification de *Staphylococcus aureus*.

➤ Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles. La réaction se fait selon l'équation suivante :



Technique :

Déposer sur une boîte de pétri une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène);

Prélever une colonie de la souche à identifier à l'aide d'une anse à boucle ;

Dissocier la colonie dans la goutte.

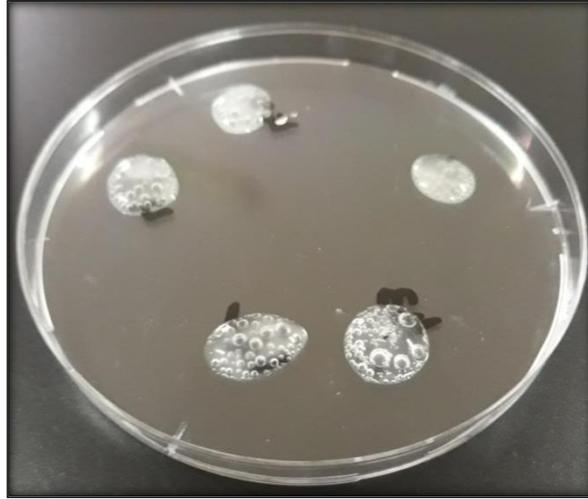


Figure 08 : Photographie montrant le résultat positif d'une catalase.

➤ **Test de la coagulase**

Le test mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma est le principal test caractérisant *S. aureus*. Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma de lapin et quelques colonies de *S.aureus* à tester préalablement ensemencée dans du BHIB pendant 24h à 37°C. Le test positif se traduit par l'apparition d'un coagulum qui est observé en inclinant le tube à 90°C.



Figure 09 : Photographie montrant le résultat positif d'une coagulase.

➤ **Test de la DNase**

Ce test consiste à ensemencer la colonie suspecte issue du milieu BHIB en strie unique à la surface du milieu contenant de l'ADN (gélose à ADN), puis incuber à 37°C pendant 24 heures. Pendant l'incubation si la bactérie possède une DNase il y aura systématiquement une hydrolyse de l'ADN du milieu en polynucléotides.

Après incubation, pour la révélation de cette activité une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 2N est versée sur la gélose. Un test positif se traduit par la formation d'un halo transparent autour de la strie.

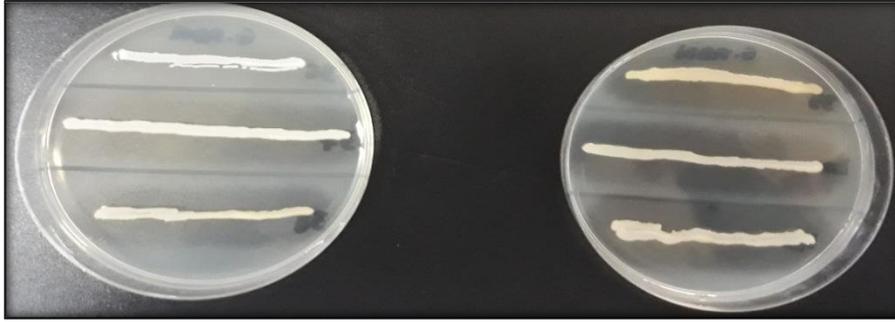


Figure10 : Photographie montrant un résultat positif d'une DNase.

➤ **Le test Voges Proskauer (VP)**

Ce test permet de mettre en évidence la production d'acétoïne (acetyl méthyl carbinol) à partir du glucose. Une suspension bactérienne est réalisée en bouillon Clarck et Leubs (CL) à partir de plusieurs colonies issues du milieu BHI puis incubée à 37°C pendant 48 heures. La production de l'acétoïne est révélée par l'ajout de 15 à 20 gouttes d' α Naphtol à 6% (VPI) et le même volume de NaOH à 4N (VPII), le tube est agité et incliné pour favoriser l'oxygénation du milieu. Après quelques minutes à une heure un résultat positif se traduit par l'apparition d'une coloration rouge (en surface).

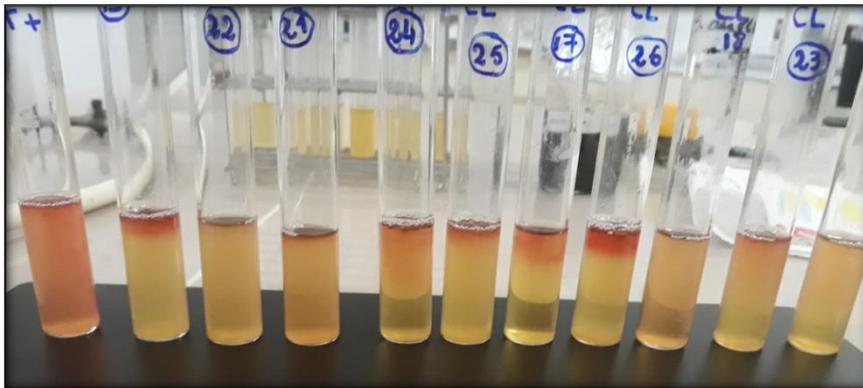


Figure 11 : Photographie montrant un résultat positif de VP.

1.2.4. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité de toutes les souches, vis-à-vis différentes familles d'antibiotiques, est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton(MH)

L'interprétation des résultats a été faite selon le manuel de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CASFM (2018) et les recommandations du CLSI (2018). Le tableau X montre la liste des antibiotiques testés sur *S.aureus* selon les recommandations du CLSI.

Tableau X: Antibiotiques testés pour *S.aureus*.

Familles	Antibiotiques	Abréviation	Charge en µg	Marque
β-lactamines	Pénicilline G	P	10	Liofilchem, Italie
	Céfoxitine	FOX	30	Liofilchem, Italie
Macrolides	Erythromycine	E	15	Liofilchem, Italie
Aminosides	Néomycine	N	30	Liofilchem, Italie
Quinolone	Ofloxacine	OFX	5	Liofilchem, Italie
	Ciprofloxacine	CIP		Liofilchem, Italie
Lincosamides	Lincomycine	MY	15	Liofilchem, Italie
Tétracycline	Tétracycline	TE	30	Liofilchem, Italie
Phénicol	Chlorampénicol	C	30	Liofilchem, Italie
Inhibiteur de synthèse de l'acide folique	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	SXT	25	Liofilchem, Italie

Procédure opératoire :

À partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu BHI, quelques colonies bien isolées sont prélevées puis inoculées dans 7mL d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est homogénéisée au vortex puis ajustée à une D.O. comprise entre 0.08-0.10 lue à 625nm au spectrophotomètre. La suspension bactérienne est ajustée soit en ajoutant de la culture à la suspension soit de l'eau physiologique stérile.

Un écouvillon stérile est plongé dans la suspension bactérienne. Le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois internes du tube afin de le décharger au maximum. À l'aide de cet écouvillon, ensemercer toute la surface gélosée de Mueller-Hinton(MH) par des stries serrées, en tournant la boîte trois fois de 60°. L'ensemencement fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

À l'aide d'une pince préalablement flambée, les disques d'antibiotiques (dont la liste est indiquée dans le tableau X) sont appliqués sur la surface de la gélose. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37 °C.

Les différents diamètres des zones d'inhibition, obtenus autour des disques d'antibiotiques, sont mesurés. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations de CLSI.

1.2.5. Conservation des souches

Une fois que toutes les souches sont identifiées elles sont conservées dans des cryotubes à -20°C contenant le bouillon cœur-cerveille (BHIB) additionné de Glycérol (30% V/V) lequel est un cryoprotecteur.

1.2.6. Détection de la formation de biofilm de *S.aureus*

➤ Etude de la formation du biofilm par la méthode in vitro par coloration au cristal violet sur microplaques (TCP)

La capacité de formation d'un biofilm a été testée uniquement sur les souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), obtenues dans cette étude, par la méthode in vitro de coloration au cristal violet sur microplaques en polystyrène de 96 puits (TCP). La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits a été réalisée selon les recommandations de Christensen *et al.* (1985).

A partir de cultures pures et jeunes de 18 h ensemencées préalablement dans le milieu BHI. Chaque culture jeune est ajustée pour obtenir 10^8 UFC/mL par ajustement de l'absorbance à 0.08 - 0.1 à une longueur d'onde de 630nm. Chaque puits stérile de la microplaque est rempli avec 50µL de la suspension plus 150µL du milieu TSB. La microplaque est ensuite Incubée à 37°C pendant 48H.

Après incubation, les puits de la microplaque sont vidés de leurs contenus. Trois lavages consécutifs sont réalisés avec 200µL de tampon PBS afin d'éliminer les bactéries libres planctoniques.

Les cellules bactériennes adhérentes à la paroi interne des puits formant un biofilm sont colorées avec du cristal violet 0,1% (m/v). Après 10 à 15 minutes, la solution de cristal violet est éliminée et les puits sont lavés trois fois avec le tampon PBS afin d'éliminer toute trace de colorant non fixé. Les microplaques renversées sont couvertes de papier absorbant et laissées sécher à température ambiante pendant 15 minutes. Enfin, les puits sont remplis de nouveau avec 150µL d'une solution d'éthanol (95%) pour libérer le colorant fixe au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé. Les densités optiques (DO) de tous les puits sont déterminées par l'intermédiaire d'un lecteur ELIZA à une longueur d'onde 590 nm. Nous nous sommes référés à la classification de Mathur *et al.* (2006) basée sur les valeurs de la DO (Tableau XI).

Tableau XI : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP selon Mathur *et al.* (2006).

Valeurs DO	Adhérence	Formation de biofilm
< 0,120	Non adhérente	Non formatrice
0,120- 0,240	Faiblement adhérente	Faiblement formatrice
>0,240	Fortement adhère	Fortement formatrice

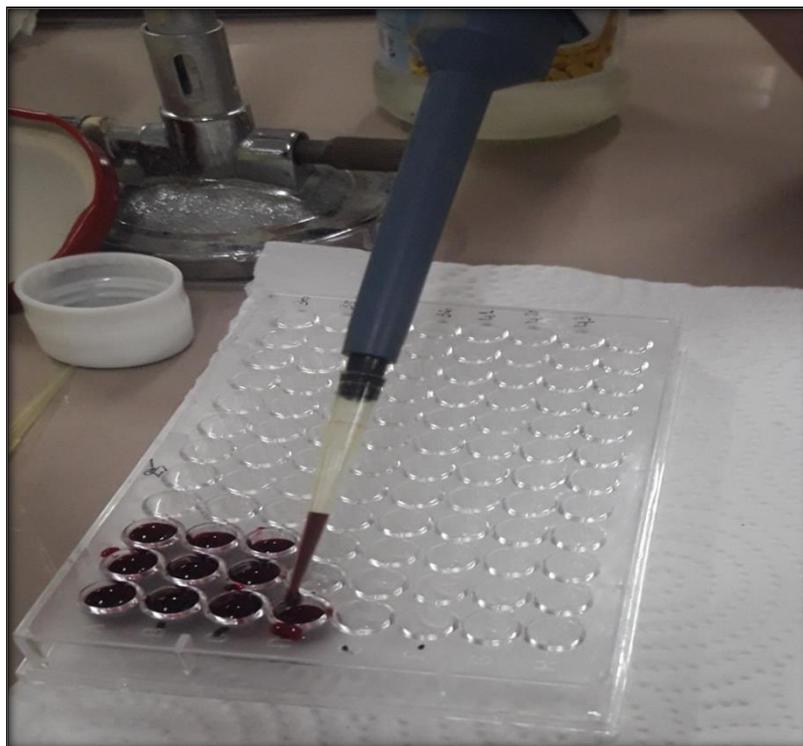


Figure 12 : Photographie d'une technique de formation de biofilm sur microplaque

Partie 2 Activité antimicrobienne des extraits des feuilles et des brindilles de l'olivier

Les objectifs de cette partie :

- Extraction des polyphénols de l'olivier (feuilles et brindilles) des trois variétés *Chemlal*, *Azeragj* et *Sauvage* par extraction organique.
- Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits vis-à-vis des souches multirésistantes.

1.2.7. Echantillonnage

Cette étude a été réalisée sur la partie aérienne de *Olea europaea* avec ses trois variétés. Les brindilles et les feuilles ont été récoltées dans un endroit naturel loin de la pollution. Les différentes étapes d'échantillonnage sont résumées dans la figure 13.

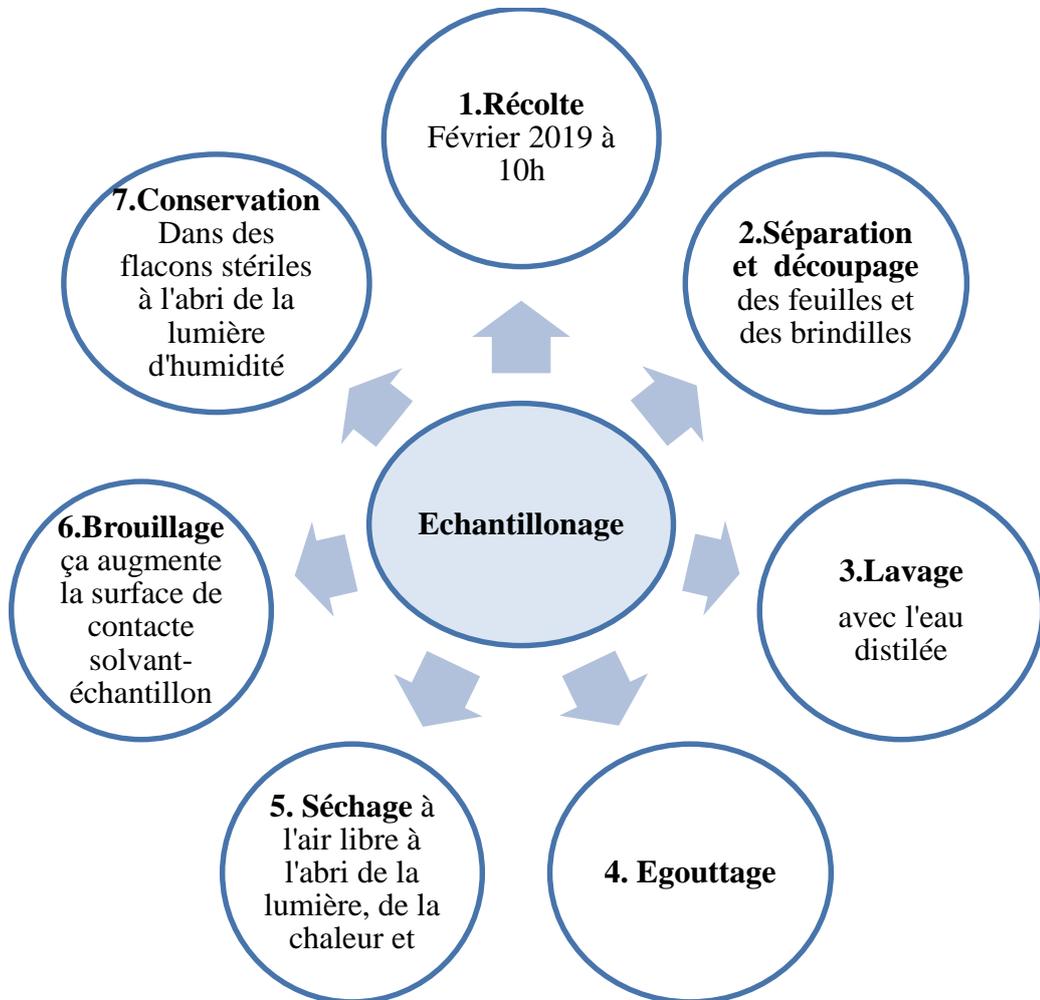


Figure 13: Diagramme des différentes étapes d'échantillonnage.

1.2.8. Extraction des polyphénols de la plante

➤ Extraction par solvants organiques

La méthode d'extraction suivie dans notre étude est l'extraction par macération effectuée selon le protocole de Turkmen *et al.* (2006) avec quelques modifications.

➤ Principe

Le principe de cette méthode est basé sur l'extraction sélective liquide-solide des composés phénoliques en utilisant des solvants de différentes polarités. Durant ce processus

d'extraction, le transfert des molécules actives recherchées vers le milieu extérieur a lieu grâce à une diffusion.

Le choix du solvant organique utilisé dépend de la nature des composés à extraire, de leurs solubilités dans le solvant et surtout de la nature du matériel végétal. Dans notre étude, l'extraction des polyphénols est réalisée en utilisant deux solvants organiques : l'éthanol à 80% et l'acétate d'éthyle. Le diagramme de la figure 14 représente les différents modes d'extraction suivis tout au long de ce travail :

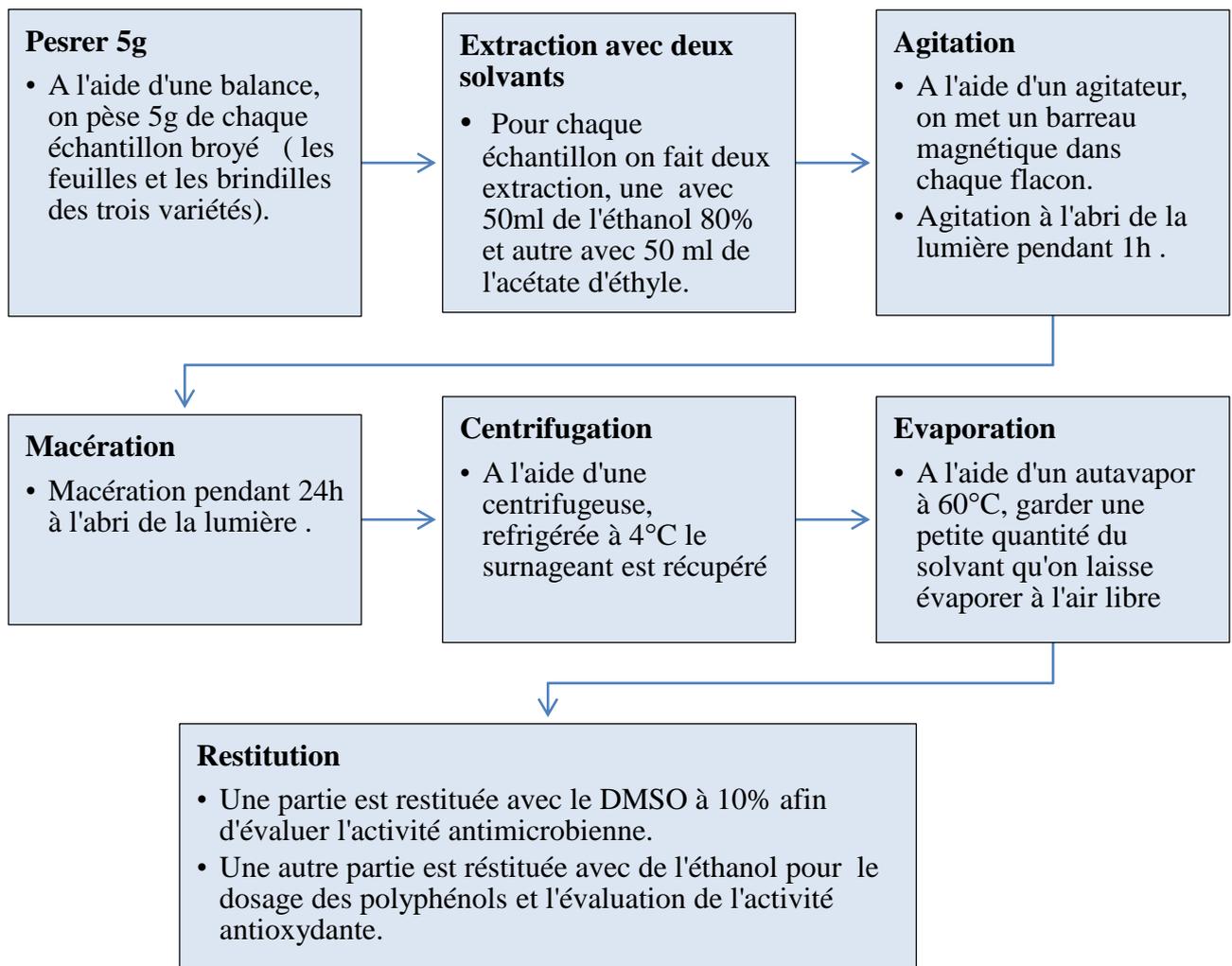


Figure 14 : Diagramme des différentes étapes d'extraction des polyphénols.

➤ **Rendement d'extraction des composés phénoliques**

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = M/M_0 \times 100$$

Avec :

- **R(%)** : Rendement exprimé en % ;
- **M** : Masse en gramme de l'extrait sec résultant ;
- **M₀** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

1.2.9. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits obtenus a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Yap *et al.* , 2009) dans le but d'évaluer quantitativement leur contenu en composés phénoliques.

➤ **Principe**

L'ensemble des composés phénoliques des extraits sont oxydés par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolibdique (H₃PMO₁₂O₄₀), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃), (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982). La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. Elle est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu.

➤ **Protocole expérimental**

Le contenu en phénols totaux des extraits a été déterminé en utilisant le protocole de (Yap *et al.*, 2009), avec quelques modifications. Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer les concentrations en phénols totaux des extraits exprimées en mg équivalent acide gallique/g d'extrait. Les solutions des différents échantillons à doser et la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions (figure 15). Deux essais ont été réalisés.

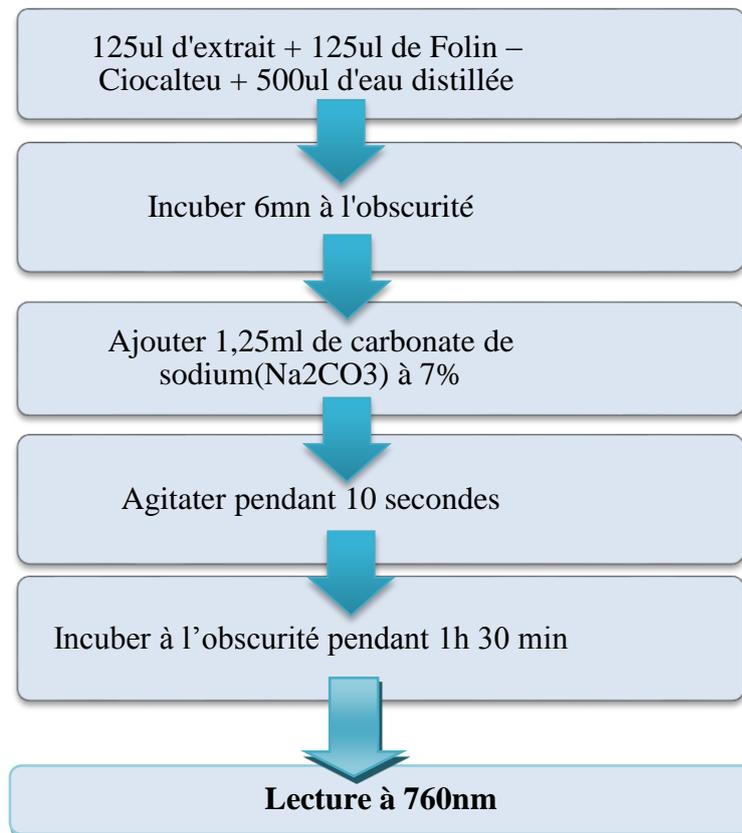


Figure 15: protocole de dosage des phénols totaux par la méthode de Folin- Ciocalteu (Yap *et al.*, 2009)

➤ **La teneur en polyphénols totaux (PPT)**

La quantité des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la droite établie avec l'acide gallique « $y = ax$ », où y correspond à la densité optique de l'extrait et x correspond à sa concentration. Elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche (MS) issue de la matière brute des extraits.

1.2.10. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

L'activité antioxydante a été évaluée en testant en duplicata l'activité du radical DPPH. Le radical DPPH est généralement l'un des composés le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical et la simplicité de l'analyse (Paixao *et al.*, 2007)

➤ Principe

DPPH (2,2-diphényl-2-picryl-hydrazole) est un radical libre stable de couleur violette. Le test de DPPH• permet de mesurer le pouvoir anti-radicalaire des extraits végétaux. Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composé phénolique) à réduire le radical chimique DPPH par transfert d'un hydrogène, accompagné par un changement de sa couleur qui passe du violet au jaune (figure 16) mesurable par spectrophotométrie à 517nm (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008).

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH• est exprimée par la concentration inhibitrice à 50% (IC50) qui correspond à la concentration des polyphénols nécessaires pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH•. L'IC50 est inversement proportionnel à l'activité anti-radicalaire. Tous les IC50 sont calculés à partir de l'équation de régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration des composés phénoliques présents dans les différents extraits testés

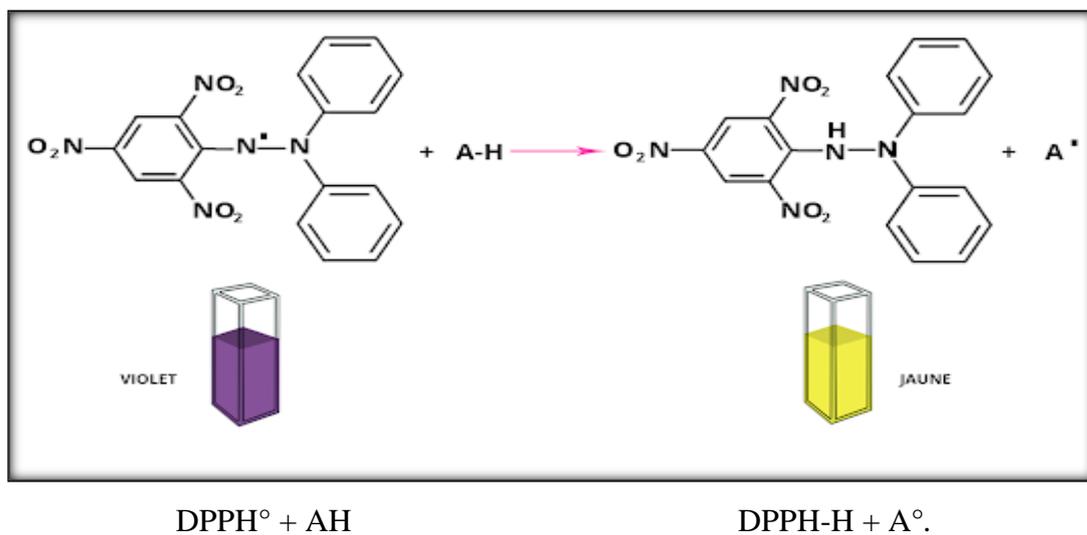


Figure 16 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Paixao *et al.*, 2007).

AH est un composé capable de céder un H⁺ au radical DPPH. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (Molyneux, 2004).

➤ Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé est celui de Brand-Williams *et al.* (1995). Avec quelques modifications (figure 17). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml d'éthanol. Les différentes étapes suivies lors de ce protocole sont illustrées dans la figure 17:

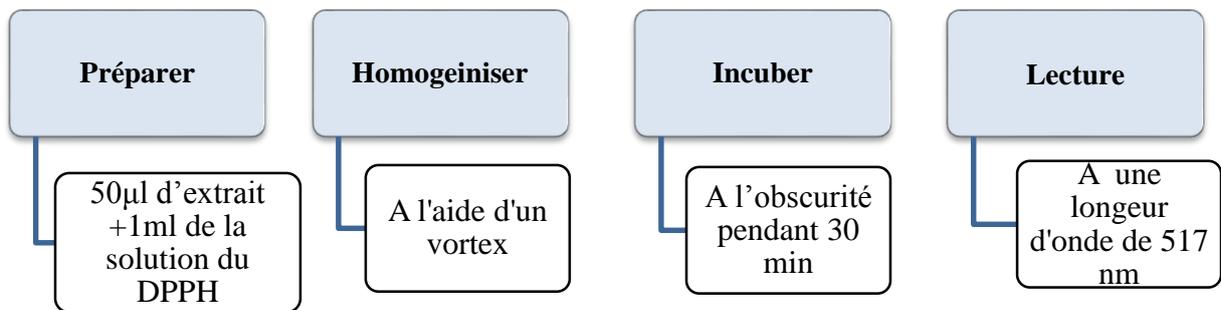


Figure 17: Protocole d'étude de l'activité du DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Les témoins positifs sont présentés par une solution d'acide ascorbique comme antioxydant standard à différentes concentrations en allant de 20 à 250 µg/ml. Pour exprimer les résultats obtenus, le pourcentage d'inhibition est calculé, il qui correspond au pourcentage de DPPH qui a été inhibé par les antioxydants présents dans les échantillons testés. La diminution de l'absorbance est mesurée par IC_{50} (quantité équivalente en extrait qui neutralise 50% du DPPH \cdot). Une IC_{50} faible correspond à une activité antioxydante élevée de l'extrait. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\%DPPH \text{ inhibé} = \frac{[(\text{Absorbance du blanc} - \text{Absorbance d'échantillon}) / \text{Absorbance du blanc}] \times 100}{1}$$

1.2.1.1. Test de l'activité antimicrobienne

Le but de cette étape est d'étudier l'activité antimicrobienne des extraits organiques restitués par le DMSO (diméthylsulfoxyde) vis-à-vis de 08 souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) identifiées préalablement.

La méthode utilisée pour cette analyse est celle de la diffusion sur milieu gélosé qui permet de déterminer la sensibilité des germes aux extraits végétaux étudiés (Bagamboula *et al.*, 2004 ; Gutierrez *et al.*, 2009).

➤ **Principe**

Cette méthode consiste à déposer des disques du papier wattman N°1 stériles de 6mm de diamètre sur la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri, puis ensemer avec la souche à tester qu'on impregne 20 ul de notre extrait. Incuber à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire indemne de colonies autour du disque absorbant, appelée : Halo ou zone d'inhibition.

➤ **Mode opératoire**

À partir d'une culture pure de 18 heures sur gélose nutritive, quelques colonies bien isolées sont prélevées puis inoculées dans 7mL d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est homogénéisée au vortex puis ajustée à une DO comprise entre 0.08-0.10 lue à 625nm au spectrophotomètre. Puis à l'aide d'un écouvillon on enseme toute la surface gélosée de Mueller-Hinton (MH) par des stries serrées.

Des disques de 6mm de diamètre sont ensuite appliqués sur la surface de la gélose. 20µl de l'extrait sont pipetés et déposés délicatement sur les disques. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37 °C.

L'activité des extrais utilisés sur la souches se manifeste par l'apparition ou l'absence d'une zone d'inhibition autour du disque (Mustafa *et al.*, 2009).

Partie 1

1. Fréquence de prélèvement

Sur les 70 souches appartenant au genre *staphylococcus*, 50 souches ont été identifiées à l'espèce *S.aureus* (figure 18) après avoir été soumises à une vérification par des tests biochimiques. *S. aureus* est un agent commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. Il présente le potentiel de pathogénicité le plus important de toutes les espèces du genre *Staphylococcus*. Ce germe est responsable d'infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité à adhérer à des dispositifs médicaux et à former un biofilm (Liesse Iyamba, 2012).

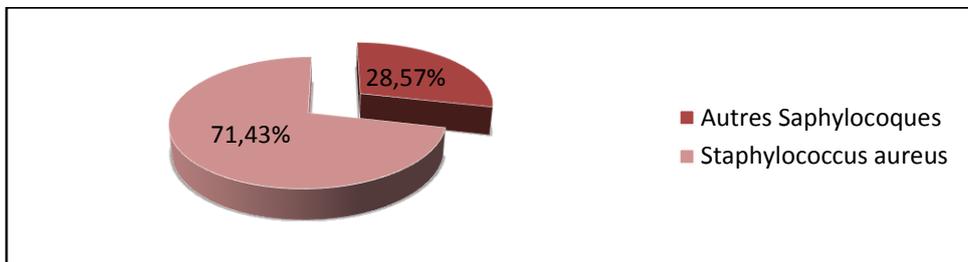


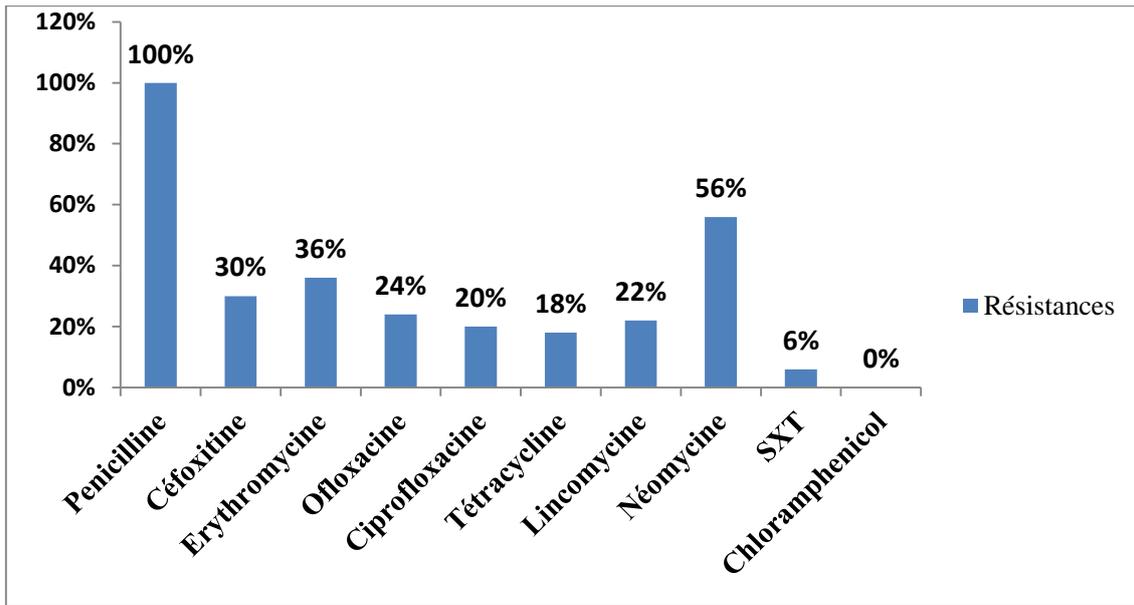
Figure 18 : La Fréquence d'isolement de *S. aureus*.

2. Résultats de l'antibiogramme

➤ Résistance des souches de *S. aureus* aux antibiotiques

La détection des phénotypes de résistance, des souches bactériennes isolées, a été réalisée en pratiquant la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du CLSI(2018).

Les profils de résistances déterminés montrent que les 50 souches de *S.aureus* présentent différents comportements vis-à-vis des ATB testés. Les fréquences de résistance de *S. aureus* vis-à-vis des antibiotiques sont représentées dans la figure 19.



SXT : Trimétoprim-Sulfaméthoxazole

Figure 19 : Les fréquences de résistance de *S.aureus* vis-à-vis des antibiotiques.

Pour la famille des bêta-lactamines, toutes les souches isolées se sont révélées résistantes à la pénicilline (100%), ce qui est en accord avec des études menées en Inde par Khurana *et al.* (2018). Ce résultat s'explique par le fait qu'actuellement plus de 90% des souches de *S.aureus* sont résistantes à la pénicilline G par production de pénicillinase (Ouidri, 2018).

La céfoxitine est en revanche active sur 30% des souches isolées, taux moins élevé que celui rapporté par Surbihi et ses collaborateurs où ils ont obtenu une résistance de 49% Khurana *et al.* (2018). Une autre étude réalisée en Ethiopie par Dilnessa et Bitew (2016) qui ont annoncé un taux nettement moins élevé qui est de 17,5%.

36% des souches isolées sont résistantes à l'érythromycine. Une étude similaire a été réalisée par Khurana *et al.* (2018), une autre en Mauritanie par Ould Salem *et al.* (2016) où ils ont obtenu des résistances de 52% et 31% respectivement.

Quant à la famille des quinolones, nous avons rapporté une résistance de 24% pour l'ofloxacine et 20% pour la ciprofloxacine, ces résultats sont nettement plus élevés que ceux décrits par Ould Salem et ses collaborateurs où aucune résistance n'a été trouvée pour ces deux molécules (Ould Salem *et al.*, 2018). Cette différence est probablement due à l'utilisation des antibiotiques qui est totalement différente d'un pays à l'autre.

La résistance des souches isolées à la tétracycline et la lincomycine était respectivement de 18% et 22%. Décrit au Maroc un taux de 29% pour la tétracycline et de 4,8% à la lincomycine (El anzi, 2014).

La néomycine était active sur 56% des souches. Ce taux de résistance dépasse largement celui rapporté à Singapour qui est de 6% (Chan *et al.*, 2018).

La résistance à la Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT) est de l'ordre de 6%. Nos résultats ne rejoignent pas ceux obtenus par Khurana *et al.* (2018) qui rapportent un taux de 52%.

Cependant aucune résistance n'a été observée vis-à-vis du chloramphénicol, toutes nos souches étaient sensibles à cet antibiotique. Nos résultats sont relativement semblables à ceux enregistrés au Népal avec un taux de 4% (Belbase *et al.*, 2017).

3. Prévalence des SARM

Dans notre étude, la prévalence des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) est de 30%, soit 15 souches sur un nombre total de 50. Comme illustré dans la figure 20.

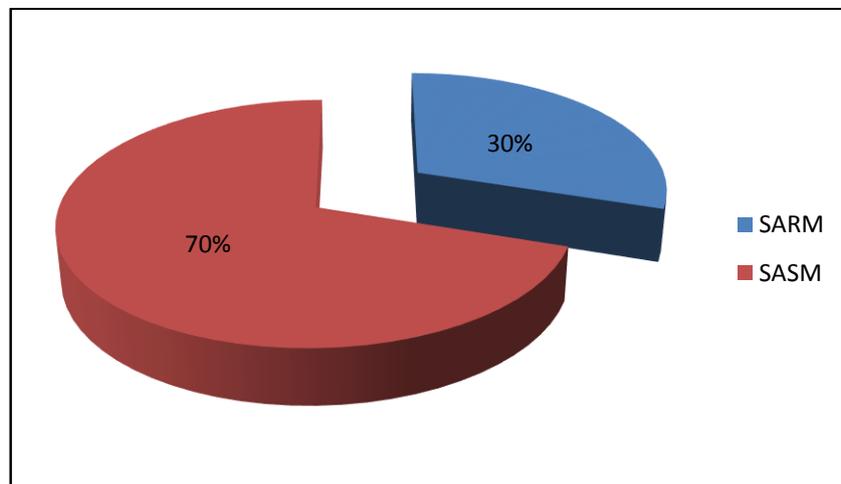


Figure 20 : prévalence des SARM

Un taux de prévalence des SARM plus élevé est recensé par rapport aux taux de prévalence obtenus lors des études précédentes menées dans d'autres pays. Cependant un taux de 10% et de 19,7% ont été recensés par El Anzi (2014) ainsi par Shen *et al.* (2019) respectivement. En revanche un taux de 52% a été observé lors d'une étude menée à Tlemcen (Rebiahi *et al.*, 2011).

4. Détection de la formation de biofilm des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM)

➤ Classification du biofilm formé par les SARM

La détermination quantitative de la formation de biofilm chez toutes nos souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) a été réalisée par la technique sur microplaque(TCP).

Toutes les souches SARM isolées (15 souches) sont formatrices de biofilm. Cette capacité est modérée chez deux souches uniquement qui sont S21 et S29. Les fortes productrices sont en nombre de 13 (tableau XII).

Tableau XII : Classification du biofilm formé par les SARM par la technique TCP.

Formation de biofilm	Absente	Modérée	forte
Nombre de souches	0	2	13

Les grandes valeurs d'absorbance (DO) sont notées pour les souches S20 (1,457), S36 (2,174), S42 (1,301), S43 (2,006) à l'opposé des souches S21 et S29 qui ont donné de faibles valeurs 0,186 et 0,238 respectivement.

Les valeurs de densités optiques des souches restantes S10 S13 S14 S25 S27 S30 S33 S41 sont respectivement 0,537 0,395 0,369 0,391 0,354 0,546 0,701 0,461

Les valeurs des densités optiques (DO) obtenues par le lecteur d'absorbance pour microplaques ont été converties en histogramme sur Excel (Figure 21). La valeur moyenne des puits de control (sans biofilm) est égale à 0.15.

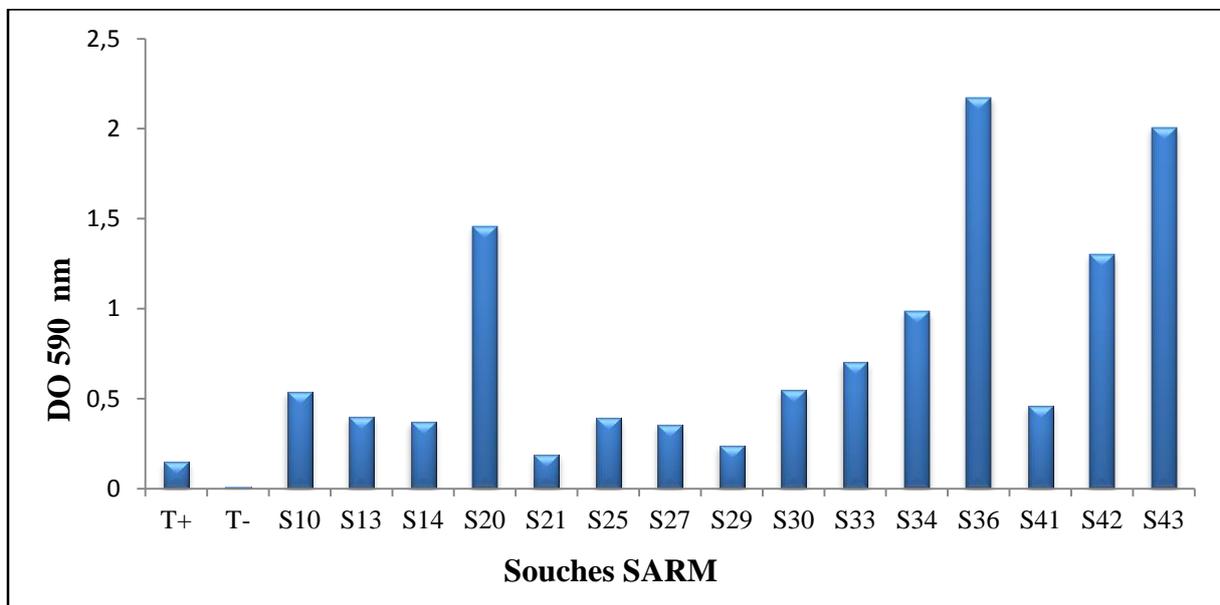


Figure 21: Résultats de la quantification de la formation de biofilm in vitro par les SARM.

Nos résultats (100%) ne sont pas en accord avec les observations de Belbase *et al.* (2017) qui ont montré que 46,1% seulement (soit 35 souches sur un total de 76) sont formatrices de biofilm.

Oliveira *et al.* (2016), ont montré dans leur étude que 4% uniquement étaient fortement adhérentes, 20,5% faiblement adhérentes et 75,5% non adhérentes. Une étude similaire réalisée par Mandhar *et al.* (2018) a enregistré que sur un total de 375 de souches *S. aureus*, seulement 21 souches (5,6%) étaient fortement adhérentes, 91 souches (24,3%) modérées et 263 (70,1%) ne sont pas formatrices de biofilm.

Partie 2 : Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits

5. Taux d'extraction

Les rendements d'extraction des polyphénols des différents échantillons sont exprimés en pourcentage (%) de masse d'extrait par rapport à la masse de la poudre de chaque échantillon. Le tableau XIII représente les pourcentages de rendement obtenus.

Tableau XIII : Rendement d'extraction des polyphénols totaux.

Echantillons	Rendement (%)	
	Extraits d'éthanol	Extraits d'acétate d'éthyle
Feuilles <i>Chemlal</i>	14,60	2,29
Feuilles <i>Sauvage</i>	16,13	2,76
Feuilles <i>Azeradj</i>	7,80	2,05
Brindilles <i>Chemlal</i>	7,36	1,14
Brindilles <i>Sauvage</i>	4,52	1,57
Brindilles <i>Azeradj</i>	6,15	1,02

Le calcul du rendement d'extraction des extraits de l'olivier des trois variétés *Chemlal*, *Azeradj* et *sauvage* révèle un grand écart entre les extraits éthanoliques et d'acétate d'éthyle. Nous constatons que les rendements le plus élevés sont ceux des extraits éthanoliques. Benaliliche (2016) a rapporté dans son étude sur *Cinnamomum zeylanicum* que les rendements des extraits diffèrent selon le solvant d'extraction utilisé.

Les résultats présentés dans le tableau XIII montre que les rendements des extraits des feuilles sont les plus élevés par rapport aux rendements des extraits des brindilles.

Pour les extraits éthanoliques des feuilles des variétés *Chemlal*, *sauvage* et *Azeradj* on a enregistré un rendement de 14,60%, 16,13% et 7,80% respectivement. Tandis que les rendements des extraits éthanoliques des brindilles des mêmes variétés sont de 7,36%, 4,52% et 6,15% respectivement.

Concernant les extraits d'acétate d'éthyle, des rendements de 2,29%, 2,76% et 2,05% ont été respectivement enregistrés pour les feuilles des variétés *Chemlale*, *sauvage* et *Azeradj* et de 1,14%, 1,57% et 1,02 respectivement pour les brindilles de même variété.

Selon une étude réalisée par Arab *et al.* (2013), le rendement en polyphénols obtenu à partir de 5g de feuilles est de 38,74% pour l'olivier sauvage. Ces résultats sont supérieurs à ceux de notre étude.

Araqaq a signalé dans son étude que les rendements d'extraction de 100g de la matière sèche obtenus avec les feuilles fraîches, sèches et blanchies en utilisant l'eau comme solvant d'extraction sont de 5,5%, 16,16% et 24,46% respectivement tandis que les rendements d'extraction en utilisant un mélange d'éthanol et d'eau à donné un rendement de 8,7%, 30,2% et 46,56% respectivement (Araqaq, 2013).

D'après les résultats réalisés par ces deux auteurs et ceux obtenus dans notre étude, on constate que le taux d'extraction des composés phénoliques dépend de la méthode d'extraction, de la nature du solvant, de la taille des particules constituant la poudre et de l'organe de la plante.

6. Teneur en polyphénols totaux (PPT)

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées car ils sont réputés pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes, etc...). Au cours du dosage des polyphénols, après l'addition du réactif de Folin-Ciocalteu, une couleur bleue est apparue, ce qui confirme la présence des polyphénols dans nos extraits. Cela permet de mesurer l'intensité de la couleur à une longueur d'onde de 765 nm (Huang *et al.*, 2005).

L'analyse quantitative des polyphénols est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage (Figure 22) exprimée en mg d'acide gallique par g d'extrait sec.

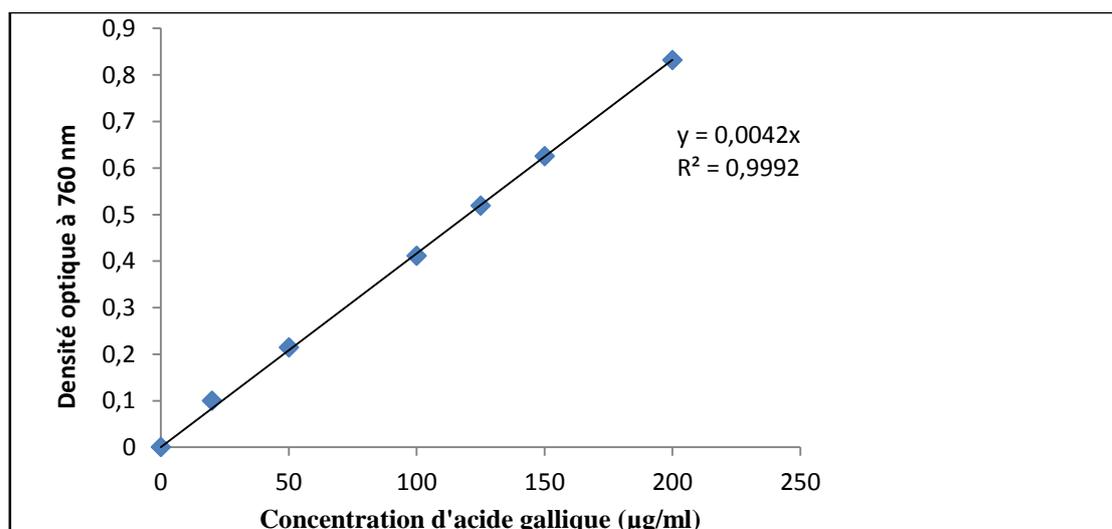
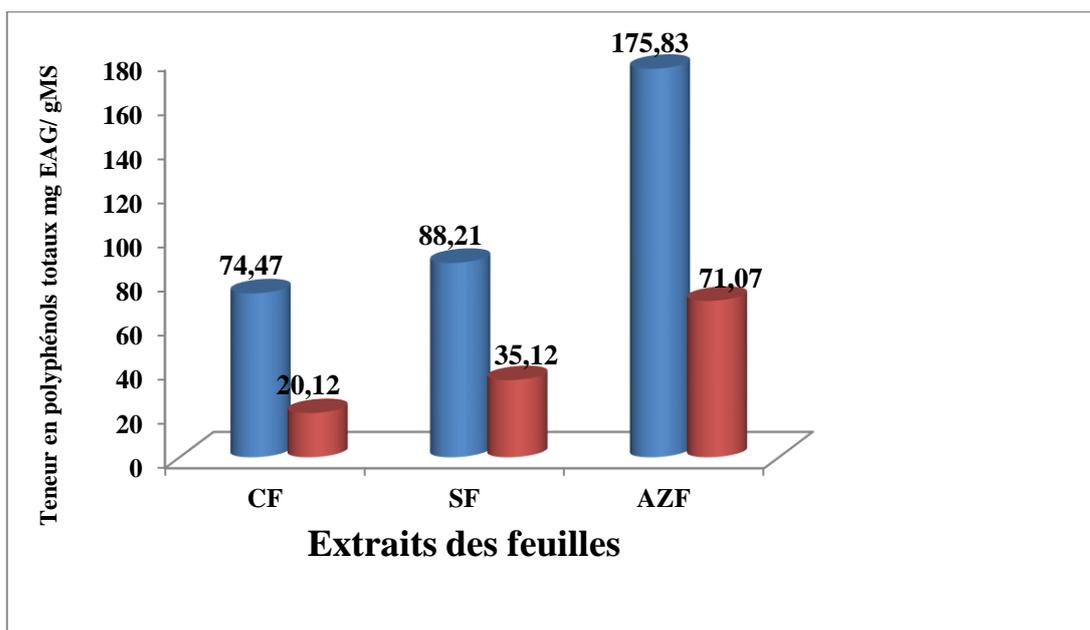


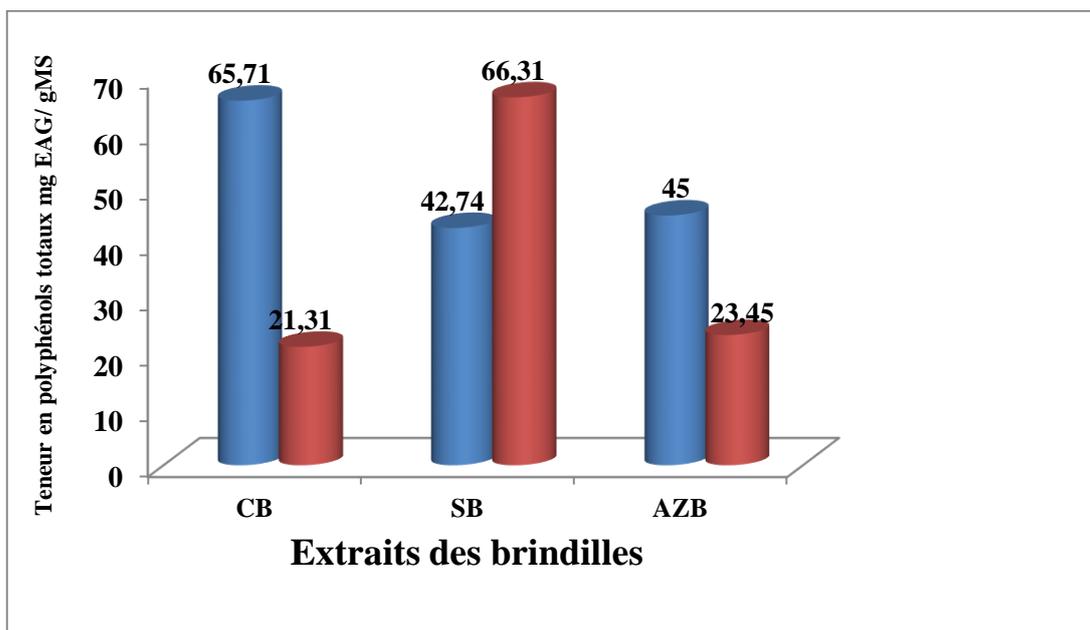
Figure 22 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les deux figures 23 et 24 représentent les teneurs obtenus en phénols totaux des extraits étudiés.



F: feuilles; C: *Chemlal*; S: *Sauvage*; AZ: *Azeradj*.

Figure 23 : Teneur en polyphénols des différents extraits des feuilles de l'olivier.



B: brindilles; C: *Chemlal*; S: *Sauvage*; AZ: *Azeradj*.

Figure 24 : Teneur en polyphénols des différents extraits des brindilles de l'olivier.

Les deux figures 23 et 24 montrent que les extraits étudiés présentent des teneurs élevées en polyphénols. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'ils contiennent une plus grande diversité de produits bioactifs.

Les teneurs enregistrées pour les polyphénols sont de 75,47 ; 88,21 et 175,83 mg EAG/ gMS pour les extraits éthanoliques des feuilles des variétés *Chemlal*, *Sauvages* et *Azeradj* respectivement, et des teneurs de 20,12 ; 35,12 ; 71,07 mg EAG/ gMS pour les extraits d'acétate d'éthyle des mêmes variétés respectivement.

En ce qui concerne les brindilles des variétés *Chemlal*, *Sauvage* et *Azeradj*, des teneurs de 65,71 ; 42,74 et 45 mg EAG/ gMS ont été obtenues pour les extraits éthanoliques et de 21,31 ; 66,31 et 23,45 pour les extraits de l'acétate d'éthyle respectivement.

D'après ces résultats on constate que :

- Les extraits éthanoliques présentent des teneurs élevées par rapport aux teneurs des extraits de l'acétate d'éthyle.
- Les feuilles de l'olivier sont très riches en polyphénols, une teneur de 75,83 mg EAG/ gMS est enregistrée par l'extrait éthanolique de la variété *Azeradj*.
- L'éthanol est le meilleur solvant d'extraction des polyphénols de l'olivier.

On déduit que le contenu phénolique dans les extraits examinés, dépend de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction, et aussi de l'organe de la plante.

Selon l'étude d'Aouidi *et al.* (2009), l'éthanol possède des rendements d'extraction des phénols totaux plus importants que le méthanol, et ceci indépendamment des organes étudiés. Fabbri *et al.* (2008), ont signalé que la teneur en phénols totaux est influencée par le degré de maturité des feuilles d'olivier. Ces auteurs ont enregistré des résultats supérieurs à ceux qu'on a obtenus, ils ont déclaré un taux qui varie entre 29,34 mg/MS et 51,56 mg/MS pour les extraits éthanoliques des feuilles et un taux de 24,27 mg/MS pour l'extrait éthanolique des brindilles.

7. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques par le test DPPH

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des plantes a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. L'évaluation de l'activité antioxydante avec le radical DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition.

L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant standard à différentes concentrations en allant de 20 à 250 µg/ml. La figure 25 représente le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

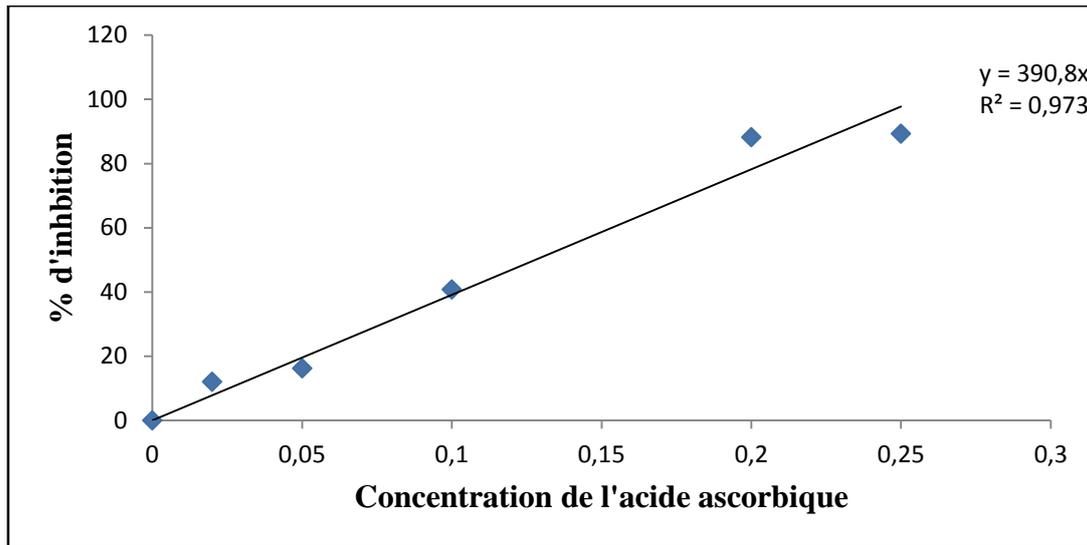


Figure 25 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits, (tableaux XIV et XV).

Tableau XIV : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations brutes des différents extraits des feuilles de l'olivier.

Ech	CFE	SFE	AZFE	CFAC	SFAC	AZFAC
[] (µg/ml)	243,33	269,87	195,01	57,3	61,28	29,23
% d'inhibition	50,14±0	73,01±0,19	67,16±0,19	30,48±0,33	60,16±0,06	66,62±0,06

F: feuilles; E: éthanol; AC: acétate d'éthyle; C: *Chemlal*; S: *Sauvage*; AZ: *Azeradj*.

Tableau XV: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations brutes des différents extraits des brindilles de l'olivier.

Ech	CBE	SBE	AZBE	CBAC	SBAC	AZBAC
[] (µg/ml)	147,2	90,48	153,8	18,93	26,13	25,4
% d'inhibition	90,22± 0	83,56±0,06	91,37±0,12	62,68±0,59	89,04±0,39	89,70±0,26

B: brindilles; E: éthanol; AC: acétate d'éthyle; C: *Chemlal*; S: *Sauvage*; AZ: *Azeradj*.

D'après les résultats des deux tableaux XIV et XV, les extraits de l'olivier sont dotés d'un pouvoir antioxydant intéressant. Ce pouvoir antioxydant est fort probablement dû à la richesse de l'olivier en composés phénoliques. Selon Van Acker et *et al.* (1995), les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules, il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, le tocophérol, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (De Pooter et Schamp, 1986). Les polyphénols contenus dans les extraits végétaux sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits.

Les extraits éthanoliques représentent des pourcentages d'inhibitions élevés, comparé à ceux de l'acétate d'éthyle. Les extraits organiques des brindilles expriment des pourcentages d'inhibitions les plus élevés. Le potentiel antiradicalaire le plus important est celui des extraits éthanoliques de la variété *Azeradj* $91,37\% \pm 0,12$ suivi par le poucentage de l'extrait de la variété *Chemlal* $90,22 \pm 0,0$ %. Comme pour les extraits d'acétate d'éthyle des pourcentages d'inhibition de $62,68 \pm 0,59\%$, $89,04 \pm 0,39\%$ et $89,70 \pm 0,26\%$ pour les variétés *Chemlal*, *sauvage* et *Azeradj* respectivement.

Concernant les extraits des feuilles, on a enregistré des pourcentages moins importants que ceux des brindilles, ils varient entre $50,1 \pm 0,0\%$ et $73,01 \pm 0,19\%$ pour les extraits éthanolique et entre $66,62 \pm 0,06$ et $30,48 \pm 0,33$ pour les extraits d'acétate d'éthyle.

Les résultats qu'on a obtenus sont comparés à un antioxydant très puissant, la vitamine C, l'analyse a révélé une valeur très proche, soit $89,3\%$.

8. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

La résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique. La propagation de la multirésistance nécessite la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes qui inhibent les mécanismes de résistance des souches pathogènes. Ces molécules naturelles dérivées de plantes constituent une nouvelle source d'agents antimicrobiens.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits de plante obtenus. L'action antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo au tour du disque de papier imprégné de l'extrait. Le degré de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne aux composés contenus dans les différents extraits est estimé par le diamètre de la zone d'inhibition.

A cet effet, l'échelle de mesure de l'activité antibactérienne de Ponce *et al.* (2003) répartissant les diamètres des zones d'inhibition en quatre classes a été utilisée pour évaluer l'effet inhibiteur de nos extraits :

- Extrêmement sensible : le diamètre de zone d'inhibition > 20mm ;
- Très sensible : le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 15mm et 19mm ;
- Sensible : le diamètre de la zone d'inhibition est comprise entre 9mm et 14mm ;
- Résistante : le diamètre de la zone d'inhibition est < 8mm.

Les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de l'olivier testés à l'égard des huit souches bactériennes, sont regroupés dans le XVI, et la figure 26 représente les diamètres des zones d'inhibition de la souche 21.

Tableau XVI : Diamètres des zones d'inhibition en mm des extraits de plantes, témoin positif et témoin négatif.

Extraits	Souches							
	S10	S13	S14	S20	S21	S25	S27	S34
CBE	8± 0,4	11±0,2	9±0,11	9±0,29	13±0,5	6±0,32	9±0,23	10±0,2
SBE	9±0,8	11±0,5	11±0,2 3	8±0,42	13±0,2 2	7±0,32	8±0,5	13±0,3 3
AZBE	11±0,2	7±0,23	6±0,1	8±0,6	9±0,11	7±0,4	10±0,5 1	7±0,5
CBAC	12±0,4 2	10±0,5	11±0,4	10±0,3	14±0,1	10±0,1 9	7±0,29	6±0,2
SBAC	10±0,6	8±0,8	12±0,1	13±0,4 5	20±0,2 1	13±0,2 2	13±0,5 1	12±1,1
AZBA C	7±0,52	7±0,2	11±0,8 2	11±0,3 2	14±0,1 1	12±0,6	10±0,1 2	12±1,2
CFE	9±0,27	10±0,4 1	10±0,2	10±0,2 9	12±0,8	10±0,2 1	9±0,2	10±0,3 2
SFE	13±2,1 1	6±0,3	13±0,4	12±0,3	15±0,7	9±0,11	9±0,24	11±0,2 9
AZFE	11±1,9	6±0,32	10±0,3	10±0,4 5	9±0,45	8±0,13	11±0,7	9±0,5
CFAC	9±0,5	6±0,81	14±0,8	12±0,3 2	8±0,67	6±0,21	7±0,52	11±0,2 2
SFAC	6±0,52	7±0,12	7±0,2	10±0,1 1	17±0,3	9±0,23	10±0,2 9	10±0,3
AZFAC	7±0,21	8±0,2	9±0,21	13±0,2 1	13±0,1 2	9±0,15	12±1,4 5	10±0,4
Témoin positif (Antibiotique)								
SXT	19±0,2	25±0,1	19±0,1	20±0,1 3	18±0,1 2	19±0,2	20±0,1	20±0,1 3
Témoin négatif								
DMSO	6	6	6	6	6	6	6	6

C: variété *Chemlal*; **S:** variété *Sauvage*; **AZ:** variété *Azeradj*; **F:** feuilles; **B:** brindilles; **E:** éthanol; **AC:** acétate d'éthyle; **SXT:** Triméthoprim-Sulfaméthoxazole; **DMSO:** Diméthylsulfoxyde.

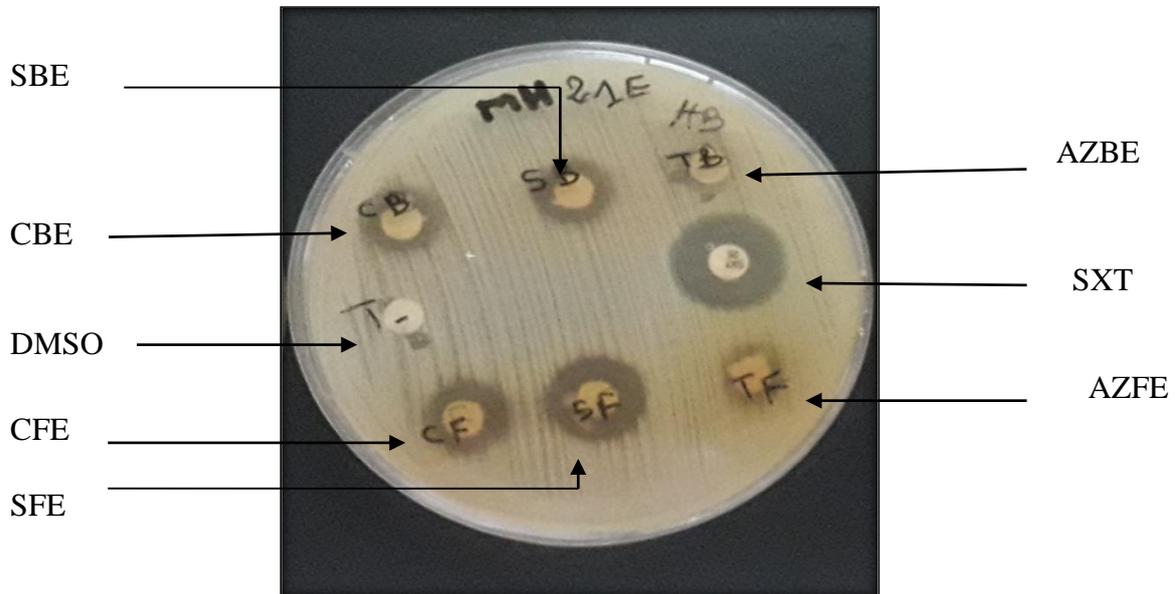


Figure 26 : Photographie des activités des différents extraits éthanoliques contre la souche S21

D'après le tableau XVI et selon l'échelle citée par Ponce *et al.* (2003), les résultats obtenus peuvent s'interpréter comme suit :

Les résultats des tests de diffusion sur disque en gélose MH montre que les extraits organiques de l'olivier ont des activités antimicrobiennes contre les souches SARM testées. De nombreux travaux soulignent cet effet antibactérien des principes actifs naturels (Djahra, 2013).

Des études confirment le rôle positif des extraits des feuilles d'olivier dans l'inhibition des bactéries pathogènes. Aliabadi *et al.* (2012) ont également signalé que l'extrait aqueux de feuilles de l'olivier, avec une concentration de 0,6% (mg/ml) peut inhiber *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *K. pneumonie* en 3h d'exposition et selon Liu *et al.* (2017), 62,5 mg/ml d'extrait d'olivier peut inhiber presque totalement la croissance de quelques bactéries pathogènes.

Les activités des extraits éthanoliques des feuilles qu'on a enregistré varient de 9 à 11mm pour la souche S10, de 6 à 10mm pour la S13, de 10 à 13mm pour la S14, de 10 à 12mm pour la S20, de 9 à 15mm pour la S21, de 8 à 10mm pour la S25, de 9 à 11mm pour les deux souches la S27 et la S34. Donc au total, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 6 et 15mm. Les effets antimicrobiens observés dans notre travail sont comparables à ceux rapportés dans la littérature scientifique. Selon Owen *et al.* (2003), les composés phénoliques contenus dans

l'extrait des feuilles d'olivier ont montré une activité antimicrobienne contre plusieurs micro-organismes, y compris : *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. typhi* et *V. parahaemolyticu*.

Les activités concernant les extraits d'acétate d'éthyle des feuilles varient entre 6 et 20mm.

D'après ces résultats, on constate que les extraits d'acétate d'éthyle des feuilles ont une activité supérieure à celle des extraits éthanoliques. On déduit que la nature du solvant joue un rôle important dans l'activité antimicrobienne.

Korukluogluoglu *et al.* (2010) ont étudié l'effet du solvant d'extraction sur l'efficacité antimicrobienne de *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. thypimurium* et autres souches. Ils ont rapporté que le type de solvant avait une incidence sur la distribution et la concentration des composés phénoliques dans les extraits et sur l'activité antimicrobienne contre les bactéries testées. Ils ont signalé que les extraits éthanoliques de l'olivier ont une efficacité antimicrobienne la plus élevée contre *E. coli* et *S. enteritidis*.

Selon Faiza *et al.* (2011), les extraits de l'acétate d'éthyle et d'acétone ont révélé une large gamme d'activité antimicrobienne. Ils ont signalé que les extraits d'olives ont montré une action antibactérienne et antifongique.

Nos résultats se rapprochent de ceux rapportés par Djenane *et al.* (2012), réalisés sur l'extrait des feuilles d'olivier, qui exerce une activité inhibitrice vis-à-vis *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 16,33mm.

Selon une étude qui a été faite en Turquie par Gökmen *et al.* (2014), les extraits des feuilles d'olivier ont une activité antibactérienne contre des bactéries Gram positif et Gram négatif. Le diamètre d'inhibition était de $18,67 \pm 1,5$ mm contre *S. aureus*.

Une autre étude qui réalisée à Baghda par Malik. (2015) a démontré l'efficacité d'un extrait d'olive, contre les deux souches Gram-positives (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*). Cet extrait a montré une inhibition élevée contre *Staphylococcus aureus*. Mais une faible activité a été observée contre la souche Gram-négative (*Bacillus cereus*).

Dans une étude récente, Lee et Lee. (2010) ont testé l'activité antimicrobienne de différents composés phénoliques des extraits de feuilles d'olivier. Il a été constaté que la force et le spectre d'activité antimicrobienne varient entre les types d'extraits et le type de Gram des bactéries. Cependant, les bactéries à Gram positif ont été généralement plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques. Cette résistance générale plus élevée chez les bactéries à Gram négatif a été attribuée à la présence de leur membrane phospholipidique externe, presque imperméable aux composés lipophiles. L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche

phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne, où ils apportent leur effet ; quoique ce soit, ils entraînent une augmentation de la perméabilité aux ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou l'altération des systèmes enzymatiques bactériens.

Peu d'études ont été menées sur les brindilles de l'olivier. Nos essais sur les brindilles ont donné une activité vis-à-vis des souches cibles avec des diamètres d'inhibitions qui varient entre 6 et 13mm pour les extraits éthanoliques et entre 6 et 20 pour les extraits d'acétate d'éthyle. Lee-huang et *et al.* (2003) ont démontré pour la première fois que les brindilles de l'olivier ont des propriétés antivirales, comme l'activité anti-VIH.

Les polyphénols sont des composés principaux antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'une grande catégorie de micro-organismes. Plusieurs travaux ont été réalisés pour évaluer l'activité biologique de certains extraits issus de plusieurs plantes méditerranéennes. Les résultats ont montré que dans la plupart des cas, ces extraits ont démontré une activité antimicrobienne efficace (Wendakoon *et al.*, 1995).

Conclusion

Les infections bactériennes sont la cause majeure de la morbidité et de la mortalité en milieu hospitalier dont la majorité peut être due aux staphylocoques. L'importance médicale de ces espèces bactériennes est leurs capacités à provoquer de nombreux types d'infections chez l'homme. Ces infections aggravées, dues au développement de biofilms à staphylocoques constituent actuellement un vrai problème de santé publique. Ce travail a été réalisé sur une collection de cinquante souches cliniques de *Staphylococcus aureus*, isolées en 2019 au niveau de différents services de CHU de Tizi Ouzou.

Dans cette étude, les cinquante souches de *S. aureus* ont été isolées à partir de prélèvements de pus formé sur des plaies ou sur cathéters. L'identification de *S. aureus* a été effectuée selon les méthodes conventionnelles. Ces souches ont fait l'objet de l'étude de leurs profils de résistance aux ATB, la capacité des SARM à produire des biofilms in vitro selon la méthode TCP considérée comme étant la mieux indiquée pour une évaluation quantitative de l'adhésion bactérienne sur une surface, ainsi que l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'olivier (*Olea europaea*) sur huit SARM parmi celles identifiées.

L'étude de l'antibiorésistance a montré que toutes les souches de *Staphylococcus aureus* présentent des pourcentages de résistances de 100% vis-à-vis de la pénicilline; 56% vis-à-vis de la néomycine; 36% vis-à-vis de l'érythromycine; 30% vis-à-vis de la céfoxitine, ce qui nous laisse penser à des SARM (soit 15 souches sur 50 sont considérées comme étant des SARM); 24% vis-à-vis de l'ofloxacine; 22% vis-à-vis de la lincomycine; 20% vis-à-vis de la ciprofloxacine; 18% vis-à-vis de la tétracycline; 6% vis-à-vis de SXT et enfin 0% vis-à-vis de chloramphénicol.

D'autre part les résultats obtenus à l'issue de la méthode TCP ont montré que toutes les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline ont la capacité de produire des biofilms. Dont 13 souches sont fortement formatrices de biofilm et deux souches sont faiblement formatrices de biofilms.

L'éradication d'un biofilm bactérien pose de gros problèmes cliniques, car l'antibiothérapie active habituellement sur les bactéries à l'état planctonique se révèle bien souvent moins efficace sur des structures organisées en biofilm. Il devient pourtant essentiel d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la formation de biofilms, afin de trouver de nouveaux moyens de prévenir ou de traiter les infections associées aux biofilms. Les approches expérimentales classiques pour étudier les bactéries d'intérêt médical doivent être adaptées à l'étude de leur mode de vie complexe en biofilms.

Les extraits organiques de l'*Olea europaea* se sont montrés actifs contre les souches étudiées. La souche S21 a enregistré le taux d'inhibition le plus élevé, les diamètres varient entre 9 et 13mm pour les extraits éthanoliques des brindilles, et entre 9 et 15mm pour les extraits éthanoliques des feuilles, pour ce qui est des extraits d'acétate d'éthyle nous avons enregistré des diamètres allant de 14 à 20mm pour les brindilles et de 8 à 17mm pour les feuilles.

Ces résultats montrent que l'espèce *Staphylococcus aureus* demeure toujours une espèce très résistante aux antibiotiques. L'inhibition de ces souches multirésistantes par les différents extraits de l'*Olea europaea* montre non seulement que cette plante pourrait constituer une source naturelle de principes actifs antimicrobiens mais également la richesse et le potentiel régional en termes de plantes médicinales.

- **Ahmad M, Urban C, Mariano N, Bradford PA, Calgani E, Projan JS et coll. (1999).** Clinical characteristics and molecular epidemiology associated with imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Clin Infect Dis., 29:352-5.
- **AHMER BM. (2004).** Cell-to cell signaling in Eschericia coli and Salmonella enterica. Mol. Microbiol., **52**, 933-945.
- **Al alam D. (2008).** Impacte de l'interaction entre les cellules epithéliale bronchique et *Staphylococcus aureus* sur le chimiotactisme des lymphocytes t dans la mucovisidose. Thèse de doctorat. Université de reims champagne ardenne ufr de pharmacie.185p.
- **Alexandra E, Paharik, Alexander R, Horswill. (2015).** The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA 52242.
- **Allassane H (2001).** Sensibilité et évolution de la résistance des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques à l'hôpital national de Niamey. Bamako.
- **Anwar H, Dasgupta M, Lam K, Costerton JW. (1992).** Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy, Antimicrob Agents Chemother., 36: 1347.
- **Aouidi F Perraud-Gaime I, Roussos S, Hamd M. (2009).** Etude de la répartition quantitative des phénols totaux dans l'olivier en fonction des organes et leur degré de maturité. Olivebioteq S2-P5. ISBN., 978-9938-9513-0-1
- **Arab k, Bouchenak O, Yahiaoui K. (2013).** Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. ISSN 1813-548X.
- **Araqas H. (2013).** Extraction des composés phénoliques de l'olivier et étude de leurs activités biologiques. Mémoire de fin d'étude.
- **Arciola C.R, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro I. (2015).** Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. Front. Cell. Infect. Microbiol., 5:7. Ecollection 2015. Review.
- **Avorn JL, Barrett JF, Davey PG, McEwen SA, O'Brien TF, Levy SB. (2009).** Organisation mondiale de la sante (OMS). Antibiotic resistance : synthesis of recommendations by expert policy groups : alliance for the prudent use of antibiotics, 2001. http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.10.pdf (site visite le 30 mars.

- **Avorn J.L, Barrett J.F, Davey P.G, McEwen S.A, O'Brien T.F, Levy S.B. (2001).** Organisation mondiale de la santé (OMS). Antibiotic resistance :synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics. http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.10.pdf (site visité le 30 mars 2009).
- **Ayliffe G. (1997).** The progressive inter continental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. (suppl 1)., S74-S79.
- **Azizollahi Aliabadi1 M, Kazemi Darsanaki R, Laleh Rokhi M, Nourbakhsh1 M, Golnaz Raeisi1 G. (2012).** Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. Annals of Biological Research 3 (8)., 4189-4191
- **Bagamboula C, Uyttendaele M, Debevere J. (2004).** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food microbiology, 21(1), 33-42.
- **Barret R. (2005).** Sulfamide antibactériens. In Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. Coordinateur, Gaudy C, Buxeraud J. Edition ELSEVIER. Campus médecine.
- **Barzic A.T, Ioan S. (2015).** Antimicrobial drugs from basic concepts to complex therapeutic mechanism of polymer systems. Edition Concepts Compounds and the Alternatives of Antibacterials.
- **Becker K, Heilmann C, Peters G. (2014).** Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 27:870–926. 2. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339., 520–532.
- **Beenken KE, Spencer H, Griffin LM, Smeltzer MS. (2012).** Impact of extracellular nuclease production on the biofilm phenotype of *Staphylococcus aureus* under in vitro and in vivo conditions. Infection and immunity., 80:1634–1638. [PubMed: 22354028]
- **Belbase A, Pant N.D, Nepal K, Neupane B, Baidhya R, Baidya R, Lekhak B. (2017).** Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal. DOI 10.1186/s12941-017-0194-0.
- **Belhaj Soulami O.(2010).** Surcoute de l'infection nosocomiale en réanimation médicale au chu ibn rochd (a propos de 10 cas), université sidi mohammed ben abdellah faculté de médecine et de pharmacie, fès., Thèse n° 091 ; p : 38-39.
- **Benaliliche M, Benaliliche Y. (2016).** Essaisbio-guidésdup e rcolât de

biofilm development. *J Dent Res.* 88(11):982-990.

- **Blanco AR, Sudano-Roccaro A, Spoto G.C, Nostro A, Rusciano D. (2005).** Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular *Staphylococcal* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 49., 4339–43.
- **Boden MK. (1989).** Flock, JI. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 1989; 57 (8): p., 2358-2363.
- **Brainte R, Francesco L.C, Ferdinando F, al. (2000).** Hydrolysis of oleuropein by recombinant β -glycosidases from hyper thermophilic *Archea sulfobolus* immobilised on chitosan matrix. *J Biotechnol* 71., 275–86.
- **Bridier A, Briandet R, Thomas V. Et Dubois-Brissonnet F.(2011).** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.*, 27. 1017-1032.
- **Bronner S, Monteil H, Prévost G. (2003).** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28(2):183–200. doi:10.1016/j.femsre.,. 09.003.
- **Burin des roziers M .P. C. (2002).** Les biofilm. Thèse de doctorat : Ecole national Vétérinaire d'Alford.92P.
- **Burns A, al. (2014).** A longitudinal study of *Staphylococcus aureus* colonization in pigs in Ireland. *Veterinary Microbiology.* 174(3): p., 504-513.
- **Bushby S.R.M. (1983).** Antibacterial Activity in *Handbook of Experimental Pharmacology*, 64. Springer, New York.
- **Camille D. (2007).** *Microbiologie pratique pour le laboratoire.* Ed. Tec et doc. Paris: p., 357-361.
- **Carneiro VA, Santos HS, Arruda FV, Bandeira PN, Albuquerque MR, Pereira MO, Henriques M, Cavada BS, Teixeira EH. (2011).** Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules* 16., 190–201.
- **Chambers H.F. (2009).** Antimicrobial Resistance and Therapy of *Staphylococcus aureus* Infection in *Staphylococcus aureus* : Molecular and Clinical Aspect. Horwood Publishing, Chichester.
- **Chambers HF. (1997).** Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.*, 10: 781-791.
- **Chana M.K.L, Koob S.H, Quekc Q, Pangc W.S, Jianga B, Yong Nga L.S, Si Huei Tana, Thean Yen Tana. (2018).** Development of a real-time assay to determine the

frequency of *qac* genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods.*, 153 133–138.

- **Characklis WG, Bryers JD, Trulear M G, Zelter N. (1980).** Biofouling film development and its effects on energy losses: a laboratory study. In *Condenser Biofouling Control*(Edited by Garey J F et al) Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich.
- **Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock J.I., Herrmann M, Preissner K.T. (2002).** *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med.* 8 (7): p.,687-693.
- **Chevalier C. (2009).** Fonction et mécanismes d'action de l'ARNIII et de nouveau ARN non codant de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat : Université de strasbourg, école doctorale des sciences de la vie et de la santé. 290p.
- **Child J, Andrews J, Boswell F, Brenwald N, Wse R. (1995).** The in vitro activity of CP-99, 219, a new naphthyridone antimicrobial agent: a comparison with fluoroquinolone agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 35, 869-876.
- **Chopra, I. et Roberts, M. (2001).** Tetracycline Antibiotics : Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 65 (2), 232-260.
- **Christensen G.D, Simpson W.A, Yonger J.J, Baddor L.M, Barrett F.F, Melton D.M, Beachey E.H .(1985).** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology.* 22., 996-1006.
- **Connell S.R, Tracz D.M, Nierhaus K.H, TAYLOR D.E. (2003).** Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 47 (12), 3675–3681.
- **Costa S.S, Viveiros, M, Marall, Couto I. (2013).** Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update.*The Open Microbiology Journal.*, 7, 59-71.
- **Costerton j. W. (1999).** Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents.*, 11(3), 217-221.
- **Costerton j.w, Stewart p.s, Greenberg E.P. (1999):** bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.*, 284, 1318-1322.

- **Costerton J.W, Cheng K.J, Geesey G.G, Ladd T.I, Nickel J.C, Dasgupta M, Marrie T.J. (1987).** Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41: 435–464.
- **Costerton J.W, Geesey G.G, Cheng G.K. (1978).** How bacteria stick? *Scientific American.*, 238: 86-95.
- **Costerton J.W, Lappin-Scott H.M. (1989).** Behaviour of bacterial biofilms, *Am. Soc. Microbiol. News.*, 55: 650.
- **Costerton J.W, Lashen E.S. (1984).** The influence of biofilm efficacy of biocides on corrosion-causing bacteria, *Mat. Perform.*, 23: 34.
- **Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12:564–82.
- **Cramton S.E, Gerke C, Götz F. (2001).** In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. *Methods Enzymol.*, 336: 239-255.
- **Damon H.A, Soussy C.J, Courvalin P. (1998).** Characterization of Mutations in the *rpoB* Gene That Confer Rifampin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (10)., 2590-2594.
- **Davies D. (2003).** Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2:114–122. 6. del Pozo JL, Patel R. 2007. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 82:204–209. 7.
- **De Pooter H.L, Schamp N. (1986).** Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In *progress in essential oil research*. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin., 139-150p.
- **De Pooter H.L, Schamp N. (1986).** Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In : *Progress in essential oil research*. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin.,139-150p.
- **Del Pozo, J. L. Et Patel, R. (2007).** The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther.*, 82. 204-209.
- **Delarras C. (2007).** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Paris: Editions Tec & Doc.
- **Dermaco C.E, Cushing L.A, Frempong-Manso E, Seo S, M, Jaravaza, T, A, Kaatz G, W. (2007).** Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.*, 51, 3235-3239.

- **Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, al. (2001).** Survey of infections due to *staphylococcus species* : frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis.32 Suppl 2., S114-32 .
- **Dilnessa T, Bitew A. (2016).** Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples at Yekatit 12 Hospital Medical College, Addis Ababa, Ethiopia. DOI 10.1186/s12879-016-1742-5.
- **Djahra A.B, Bordjiba S Benkherara. (2013).** Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marruba blanc (*Marrubium Vulgare L*). Phytothérapie, volume 11 ,pp 348-352.
- **Djenane D, Yangüela J, Derriche F, Bouarab L, Roncales P. (2012).** Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde. Phytothérapie:10–18 © Springer-Verlag France. DOI 10.1007/s., 10298-011-0665-y.
- **Donio P.Y. (2010).** Sensibilité de la bactérie aux agents bactériostatiques ou bactéricides. In. *Staphylococcus aureus*. Le Loir, Y., Gautier, M. Tec & Doc, Lavoisier. France., p 112-133.
- **Ebrahimzadeh M.A, Pourmorad F, Hafezi S. (2008).** Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. Turk. J. Biol., 32, 1-7.
- **El kouri D, Pottier M.A, Trewick D, Le Gallou F, Baron D, Potel G. E.D (1998).** Infections à *staphylocoques*: aspects cliniques et bactériologiques. Encycl méd chir. Paris.
- **El-anzi Ouïam. (2014).** Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées au centre hospitalier ibn Sina de Rabat. thèse de doctorat.
- **Eveillard M. (2007).** Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat, Université d'Angers, n°749. p158.
- **Fabbri A, Galaverna G, Ganino , (2008).** Polyphenol composition of olive leaves with regard to cultivar, time of collection and shoot type. In proceedings of the \lh International Symposium on Olive Growing. ISHS Acta Horticulturae 791.

- **Faiza I, Wahiba K, Nassira v, B Chahrazed; Atik V. (2011).** J. Microbiol. Biotech.,169-73.
- **Fasquelle R. (1974).** Éléments de bactériologie médicale, 9th edn. Paris: Flammarion., 27-36
- **Faye K. (2005).** Le point sur l'usage vétérinaire des antibiotiques : impact sur l'antibiorésistance des bactéries en santé animale et humaine. Masson, Paris., 7, 45-52.
- **Ferron A. (1985).** Bactériologie médicale: À l'usage des étudiants en médecine, 12th edn. La Madeleine (France): Editions C. et R., 87-94.
- **Floss H.G, Y.U, T.W. (2005).** Rifamycins-Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. Chemical Review. 105 (2)., 621-632.
- **Fomba M. (2006).** Rôle pathogène et sensibilité aux antibiotiques des *Acinitobacter baumani* et des staphylocoques à coagulase négative a l'hôpital du point G thèse de doctorat : Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie.95P.
- **Foster TG, Hook M (1998).** Surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 6 (12). p., 484-488.
- **Foulston L, Elsholz AK, DeFrancesco AS, Losick R. (2014).** The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. mBio 5:e01667-14. doi:10.1128/mBio., 01667-14.
- **Garnier F, Chainier D, Walsh T, Karlsson A, Blomström A, Greland C, Mounier M, Denis F, Ploy M.C. (2006).** Surveillance des souches de *Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides pendant 1 an dans un hôpital Français. J Antimicrob Chemother 57.,146-149.
- **Ghigo JM. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature., 412, 442-445.
- **Ghuysen J.M. (1994).** Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta lactamases. Trends Microbiol 2., 372-380.
- **Gilbert P, McBain A .J . (2001).** Biocide usage in the domestic setting and concern about antibacterial and antibiotic resistance. J. Infect., 43: 85-91
- **Gökmen K, Kara R, Akkaya L, Torlak E, Önen A. (2014).** Evaluation of antimicrobial activity in olive (*Olea europaea*) leaf extract. American Journal of Microbiology 5 (2).,37-40, 2014.

- **Gordon L, Cloeckaert A, Doublet B, Schwarz S, Agnès Bouju-Albert A, Ganière J. P, Le Bris H, Le Fleche-Mateos A, Giraud E. (2008).** Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 65–71.
- **Gordon R.J, Lowy F.D. (2008).** Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 46.P., S350-S359.
- **Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. (2009).** Antimicrobial activity of plant essential oils using food mode l media: efficacy, synergistic potential and interactions with food com ponents. *Food microbiology*, 26(2)., 142-150.
- **Hall-Stoodley L, Stoodley P. (2009).** Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.*, 11, 1034-1043.
- **Hassan Z.K, Elamin M.H, Omer S.A, Daghestani M.H, Al-Olayan E.S, Elobeid M.A, Virk P. (2013).** Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 14. 6739–6742, <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.11.6739>.
- **Bruckner P. (2006).** The anchorless adhesion Eap(extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol.*2006; 25 (4), p252-260.
- **Hassen U, Hussain M, Villone D, HerrmannM, Robenek H, Peters G, Sinha B, Bruckner P.(2006).** The anchorless adhesion Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol.* 25 (4): p., 252-260.
- **Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér.*, 1, 3-6.
- **Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover F.C. (1997).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob.Chemother.* 40., 135-136.
- **Hiramatsu K. (2001).** Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* : a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis* 1., 147-155.
- **Huang D, Ou B. Prior R.L. (2005).** Th e che mistry behind antioxidant capacity assays.*J of Agr Food chem.*53.,1841-1856.

- **Huber B, Eberl L, Feucht W, Polster J. (2003).** Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum sensing. *Z Naturforsch C* 58., 879–84.
- **Huber B, Eberl L, Feucht W, Polster J. (2003).** Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum sensing. *Z naturforsch c* 58.,879–84.
- **Jabbouri S, Sadovskaya I. (2010).** Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of *Staphylococcus epidermidis* associated with medical implant infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 59:280–291.
- **Jacqueline C, Caillon J. (2014).** Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 69., 37–i40.
- **Jacques M, Aragon V., Tremblay Y.D. (2010).** Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim. Health Res. Rev.*, 11, 97-121.
- **Jevons MP. (1961).** Celbenin - resistant Staphylococci. *BMJ*;1(5219):124–125. doi:10.1136/bmj.,1.5219.124-a.
- **Jones RN. (2001).** Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest*.119., 397-404.
- **Kaplan J.B, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine D.H, Ramasubbu N. (2004).** Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 2633-2336.
- **Karou D, Dicko M. H, Simpore J, Traore A.S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from the traditional plant of Burkina Faso. *African journal of biotechnology*. (4)., 823-828.
- **Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. (2000).** A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44: 1549-1555.
- **Kernodle D.S (2000).** Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. Pp., 609-620. In V.A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. Portnoy, and J.I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- **Kiedrowski M.R, Crosby H.A, Hernandez F.J, Malone C.L, Mcnamara J.O, Horswill A.R. (2014).** *Staphylococcus aureus* nuc2 is a functional, surface-attached extracellular nuclease. *Plos one*. 9., e95574.

- **Kiedrowski M.R, Kavanaugh J.S, Malone C.L, Mootz J.M, Voyich J.M, Smeltzer MS, Bayles k.w, Horswill A.R. (2011).** Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
- **Kiedrowski MR, Crosby HA, Hernandez FJ, Malone CL, McNamara JO 2nd, Horswill AR. (2014).** *Staphylococcus aureus* Nuc2 is a functional, surface-attached extracellular nuclease. PloS one., 9:e95574. [PubMed: 24752186]
- **Kiedrowski MR, Horswill A.R. (2011).** New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. Ann N Y Acad Sci 1241., 104–121.
- **König C, Schwank S, Blaser J. (2001).** Factors compromising antibiotic activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20: 20-26.
- **Korukluoglu M, Sahan Y, Yigit A, ET Ozer E.T, Gucer S. (2010).** Journal of Food Processing and Preservation 34.,383-396.
- **Labischinski H. (1992).** Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. Med Microbiol Immunol (Berl).,181: 241-265.
- **Lanotte P, (2005).** Glycopeptide. In Antibiotiques: pharmacologi et thérapeutique. Coordinateur, Gaudy C, Buxeraud J. Edition ELSEVIER. Campus medecine.
- **Le loir Y, Gautier M. (2010).** « monographie de la microbiologie : *Staphylococcus aureus* ». Tec et doc, lavoisier, paris.
- **Leclercq R. (2002).** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides : nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin. Infect. Dis 15.,482-492.
- **Leclercq R. (2012).** Glycopeptides et *Staphylocoques*. In antibiogramme. Courvalin P, Leclercq R. 3^e édition.
- **Lecont-Astruc V. (2005).** Cycline. In Antibiotiques: pharmacologi et thérapeutique. Coordinateur, Gaudy C, Buxeraud J. Edition ELSEVIER. Campus medecine.
- **Lee J.H, Cho H.S, Joo S.W, Regmi C.S, Kim J.A, Ryu S.H, Yong R.C, Cho M.H, Lee J. (2013).** Diverse plant extracts and trans resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli*. O157:H7. Biofouling 29.,1189–203.
- **Lee L.Y, Hook M, Haviland D, Wetsel R.A, Yonter, E.O, Syribeys P, Vernachio J, Brown E.L. (2004).** Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. J infect Dis. 190 (3): p.,571-579.

- **Lee O.H, Lee B.Y. (2010).** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Biores Technol* 101: 3751–4
- **Lee-huang S, Zhang L, Huang L, Chang Y, Huang P.L. (2003).** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307 1029–1037, <https://doi.org/10.1016/S0006>.
- **Lewis R. (2009).** The rise of antibiotic-resistant infections. http://www.fda.gov/fdac/features/795_antibio.html (site visité le 23 avril 2009).
- **Lewis, K. (2001).** Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45., 999-1007.
- **Liesse Lyamba J M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat : Université libre de Bruxelles, Faculté de Pharmacie, Ecole Doctorale en Sciences Pharmaceutiques. 226p
- **Lister J.L, Horswill A.R. (2014).** *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 4,178.
- **Liu Y, Lindsay C. McKeever, Nasir S. A. Malik. (2017).** Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens.
- **Lyon B, Skurray R. (1987).** Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* : Genetic basis. *American Society for Microbiology*. 51 (1)., 88-134.
- **Malik S.N. (2015).** Antibacterial Activity of Olive (*Olea europaea*) Leaves and Arugula (*Eruca sativa*) Seeds Extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 2015; 7(2); 307-310 ISSN., 0975-4873.
- **Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. (2018).** Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by *Staphylococcal* clinical isolates. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3820-9>.
- **Mandell G.L, Bennett J.E, Dolin R. Mandell.(2001).** Douglas and bennett's principles and practice of infectious diseases. Sixieme edition, elservier, churchill livingstone editeurs, usa. Edition en ligne. <Http://www.ppidonline>.
- **Mandell G.L, Bennett J.E, Dolin R, Mandell. (2009).** Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Sixième édition, Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA. Édition en ligne. <http://www.ppidonline.com>

- **Mann E.E, Rice K.C, Boles B.R, Endres J.L, Ranjit D ,Chandramohan L, Tsang L.H, Smeltzer M.S, Horswill A.R, Bayles K.W. (2009).** Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. PloS One., 4:e5822.
- **Margot P, Chantal G. (2009).** Les infections nosocomiales - Agir ensemble pour des milieux cliniques sains et sécuritaires, La gestion des risques 1re partie : p., 1-19.
- **Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D.J, Fatma T, Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology .24 (1)., 25-9.
- **Mc Callum N., Bergi-Bachi B, Senn M. (2010).** Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology., 300, 118-129.
- **Menzies BE (2003).** The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. Curr Opin infect Dis. 16 (3): p., 225-229.
- **Menzinger S, Schneider A, Tschopp C. (2008).** Immersion en communauté Infections nosocomiales.
- **Meyer A, Deiana J, Leclerc H. (1994).** Cours de microbiologie générale . Ed. reviews. 12(4)., 564-582.
- **Miller m.b, Bassler b.(2001).** Quorum sensing in bacteria. annu. rev. microbiol., **55**, 165-199.
- **Molyneux P. (2004).**The use of the stable free radical diphenyl picryldrazyl(DPPH.) for estimating antioxidant activity Song klanakarim. Journal of Sciences and Technologies.26 (2) ., 211-219.
- **Monnet T. (2011).** Les infections nosocomiales : L'importance d'un suivi épidémiologique et de l'identification rapide des bactéries en causes, thèse de doctorat a la faculté de pharmacie de Grenoble ; dumas 2012: P., 15-16.
- **Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, Arciola CR. (2011).** Extracellular DNA in biofilms. Int J Artif Organs., 34:824–831.
- **Moormeier D.E, Bose J.L, Horswill AR, Bayles KW. (2014).**Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. MBio., 5:e01341–e01314. [PubMed: 25316695].
- **Motaouakkil S, Aalloula O. (2011).** Infections nosocomiales : L'affaire de tous, 2em Edit .<http://www.Doctinews.com> .

- **Oskay M, Oskay D, Kalyoncu F. (2009).** Activity of Some Plant Extracts Against Multi-Drug Resistant Human Pathogens. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (4): 293-300.
- **Naimi T.S. (2003).** Comparison of Community- and Health Care–Associated Methicillin-Resistant. EMPH TYPE. ITAL. *Staphylococcus aureus*. EMPH. *Infection*. *JAMA*; 290(22):2976-2984 doi:10.1001/jama., 290.22.2976. 70
- **Oakberg E.F, Luria S.E. (1947).** Mutations to Sulfonamide Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Genetics.*, 32, 249-261.
- **Oliveira A, Pereira V.C, Pinheiro L, Riboli D.F.M, Martins K.B, Ribeiro M.L de Souza da Cunha. (2016).** Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1423; doi:10.3390/ijms., 17091423.
- **Otto M. (2012).** Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.*, 2012, 34, 201-214.
- **Otto M. (2013).** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.*, 64,175-188.
- **Ouidri M.A. (2018).** Screening of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during admission of patients to Frantz Fanon Hospital, Blida, Algeria. *New Microbe and New Infection, ELSEVIER.*,23, 52–60.
- **Ould Salem M.L, Ghaber S.M, Ould Baba S.W, Ould Maouloud M.M. (2016).** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* communautaires dans la région de Nouakchott (Mauritanie). *Pan African Medical Journal.* 24:276 doi:10.11604/pamj.,2016.24.276.9865.
- **Owen, R.W., Haubner R , Mier W, Giacosa A, Hull W.E. et al. (2003).** *Food Chem. Taxicol.*, 41., 703-717. DOI: 10.1016/S0278-6915(03)00200-X
- **Packiavathy IA, Priya S, Pandian S.K, Ravi A.V. (2014).** Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chem* 148., 453–60.
- **Paixao N, Perestrelo R, Marques J.C, Camara J.S. (2007).** Relation ship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.*, 105, 204–214.
- **Pan j, Ren d. (2009).** Quorum sensing inhibitors: a patent overview. *expert opin. ther. pat.*, 19, 1581-1601.

- **Percival S.L, Malic S, cruz h, Williams D.W. (2011).** Introduction aux biofilms. In Percival SL (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): Biofilms and veterinary medicine, Springer, Heidelberg., 41-69.
- **Peschel A, Otto M. (2013).** Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nat. Rev. Microbiol., 2013, 11, 667-673.
- **Peyrat J.F et al, (2005).** β lactamines. In Antibiotiques: pharmacologi et thérapeutique. Coordinateur, Gaudy C, Buxeraud J. Edition ELSEVIER. Campus medecine.
- **Ping Shen P, Kai Zhou, Yu Wang, Jingjie Song, Yang Liu, Yanzi Zhou, Yonghong Xiao. (2019).** High prevalence of a globally disseminated hypervirulent clone, *Staphylococcus aureus* CC121, with reduced vancomycin susceptibility in community settings in China. doi:10.1093/jac/dkz232.
- **Ponce A. G, Fritz R. Del Valle C, Roura S. I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss cheese. LWT-Food Science and Technology, 36(7), 679-684.
- **Ponnusamy K, Paul D, Sam Kim Y, Kweon J.H. (2010).** 2(5H)-Furanone: a prospective strategy for biofouling control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. Braz J Microbiol 41., 227–34.
- **Porrero M.C, al. (2014).** Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain. Applied and Environmental Microbiology, 2014. **80**(16): p., 4865-4870.
- **Raisin. (2009).** A national program early warning investigation and surveillance of healthcare associated infection in France. Descenlos JC RAISIN working group eurosurveil: 14(46) pii., 19408.
- **Rebiahi Sa, Abdelouahid De, Rahmoun M, Abdelali S. Et, Azzaoui H. (2011).** Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West-Algeria). Médecine et Maladies Infectieuses., 41, 646-665.
- **Ren D, Zuo R, González-Barrios A.F, Bedzyk L.A, Eldridge G.R, Pasmore M.E, Wood T.K. (2005).** Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. Appl Environ Microbiol 71., 4022–34.
- **Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudraud P, Ribéreau Gayon p.(1982).** Composés phénoliques, In Traite d'oenologie, sciences et technique du vin .Paris: Dunod., 477-499.

- **Robert d. (2013).** « *staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (sarm) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive ». Thèse de doctorat en pharmacie. Université d'angers des sciences pharmaceutiques et d'ingénierie de la santé, france.
- **Roux A, Ghigo J. M. (2006).** Les biofilms bactériens. Bull. Acad. Vét. France — 2006-Tome., 159 - N°3.
- **Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan M.F.R, Ha S.D. (2015).** Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms.
- **Schnappinger D, Hillen W. (1996).** Tetracyclines : Antibiotic Action, Uptake, and Resistance Mechanisms . Arch Microbiol., 165, 359-369.
- **Schultz, Ambroscheit .(1989).** Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actif: texturation par détente instantanée contrôlée. Thèse.
- **Schwank S, Rajacic Z, Zimmerli W, Blaser J. (1998).** Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. Antimicrob. Agents Chemoth. 42(4)., 895-898.
- **Schwarz S, Chalus-Dancla E. (2001).** Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet Res. 32(3-4):201–225. doi:10.1051/vetres., 2001120.
- **Shannon O, Flock J.I. (2004).** Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibits platelet aggregation. Thromb Haemost. 2004; 91 (4): p.,779-789.
- **Silva S, Gomes L, Leitão F, Coelho A.V, Boas L.V. (2006).** Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. Fruits and leaves, Food Sci. Technol. Int. 12. 385–396, <https://doi.org/10.1177/1082013206070166>.
- **Simoes M. (2011).** Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. Curr Med Chem 18., 2129-2145.
- **Sköld O. (2000).** Sulfonamide Resistance : Mechanisms and Trends. Drug Resistance Update., 3, 155-160.
- **Smith T.L, Jarvis W.R. (1999).** Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*. Microbes and Infection., 795-805.

- **Sotto A, Lavigne J.P. (2007).** Le biofilm. Forum du Comité d'Infectiologie de l'AFU. Association française d'urologie.
- **Speer B.S, Shoemaker N.B, Salyers A.A. (1992).** Bacterial Resistance to Tetracycline : Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance, *Clinical Microbiology Reviews.*, 5 (5), 387-399.
- **Speziale P, Pietrocola G, Foster T.J, Geoghegan J.A. (2014).** Protein based biofilm matrices in staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol.*, 14:171.
- **Stewart P. S. (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292., 107-113.
- **Strahilevitz J, Hooper D.C. (2009).** Resistance to Other Agents in *Staphylococci* in Human Disease. Wiley-BlackWell, Singapore.
- **Sutra L, Poutrel B.(1994).** Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J med microbiol* 1994;40(2):79–89. Doi:10.1099/00222615-40-2-79.
- **Sylvie M, Lagrèfeuille R, Souweine B, Forestier C. (2016).** Anti-biofilm Activity as a Health Issue. Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement – UMR, CNRS 6023, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, 2 Service de Réanimation Médicale Polyvalente, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-FerrandFrance.
- **Tankovic J, Damon H.A, Leclercq R. (1997).** Résistance aux Antibiotiques Autres que les β -lactamines chez *Staphylococcus aureus*. *Méd Mal Infect* 27., 207-216.
- **Taweekhaisupapong S, Singhara S, Lertsatitthanakorn P, Khunkitti W. (2010).** Antimicrobial effects of Boesenbergia pandurata and Piper sarmentosum leaf extracts on planktonic cells and biofilm of oral pathogens. *Pak J Pharm Sci* 23., 224–31.
- **Thakker M, Park J.S, Carey V, Lee J.C. (1998).** *Staphylococcus aureus* serotypes 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun.* 1998; 66 (11): p.,5183-5189.
- **Then R.L. (1989).** Resistance to Sulfonamides in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 91. Springer, New york.
- **Tremblay y.d, Hathroubi s, Jacques m. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *can. j. vet. res.*, 78, 110– 116.
- **Truchado P, Gimenez-Bastida J.A, Larrosa M, astro Ib a nez I, Esp in J.C, Tomas-Barber an F.A, Garc ia-Conesa MT, Allende A. (2012).** Inhibition of quorum sensing

- (QS) in *Yersinia enterocolitica* by an orange extract rich in glycosylated flavanones. *J Agric Food Chem* 60:8885–94.
- **Turkmen N, Sari F, Velioglu Y. S. (2006).** Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), 835-841.
 - **Van Acker S.A, Tromp M.N, Haenen G.R, Van Der Vijgh W.J, Bast A (1995).** Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214 -755–759
 - **Vincent A, Saint G.L, Laprugne-Garcia E, Saint G.L. (2008).** Infections Associées Aux Soins définition, Fréquence et facteurs de risque. Octobre 2008 ; CCLIN Sud-Est.,1-5.
 - **Waxman D. J, Strominger J. L. (1983).** Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.*, 52., 825-868.
 - **Wehrli W, et Staehelinm. (1971).** Actions of the Rifamycins. *Bacteriological reviews.*, 35 (3), 290-309.
 - **Wendakoon CN, Sakaguchi M .(1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Prot* 58., 280–3
 - **Wertheim H.F, al. (2005).** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*. 5(12): p., 751-762.
 - **Yap C.F, HO C.W, Aida W.M, Chan S.W, Lee C.Y, Leong Y.S. (2009).** Optimazation of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola* L)residues .*Sains malaysiana*,38(4)., 511-520.
 - **Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. (2008).** Penicillin-binding proreins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev* 32., 361-385.
 - **Zhou W, Shan W, MA X, Chang W, Zhou X, LU, H, DAI Y. (2012).** Molecular Characterization of Rifampicin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in a Chinese Teaching Hospital from Anhui, China. *BMC Microbiology.*,12 (240), 1-5.
 - **Zobell CE. (1943).** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.*, 46, 39-56.

- <http://www.forcesdz.com>. (2012).

Annexes

Annexes A : Milieux de culture, solutions utilisés et leurs compositions

Bouillon cœur-cervele (BHIB)

Extrait cœur- cervelle	17g
Peptone pancréatique de gélatin.....	10g
Na.....	5g
Phosphate disodique.....	2.5g
Glucose.....	2g

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.
Pour l'obtention du milieu solide BHI, 20g d'agar bactériologique ont été additionnés à 1L de bouillon BHIB lors de sa préparation.

Muller Hinton (MH)

Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Infusion de viande.....	2g
Amidon soluble.....	1.7g
Agar bactériologique.....	17g

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.

Gélose à ADN

Hydrolysate tryptique de caséine.....	20 g
ADN.....	2 g
NaCl.....	5 g
Gélose.....	12 g
Eau distillée.....	1000 mL

Préparation : 39 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.

Milieu Chapman

La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcine).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin ou porcine).....	10g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Agar	15g
Rouge de phénol	0.025g

Préparation : 111g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 15 mn.

Bouillon Clark et Lubs (CL)

Peptone.....	5g
Glucose.....	5g
Hydrogénophosphate de potassium.....	5g
Eau distillée.....	100 mL

Eau physiologique

Chlorure de sodium.....	9g
Eau distillée	1000mL

Cristal violet (1%)

Cristal violet.....1g
 Eau distillée.....100 ml

Tampon PBS

Chlorure de sodium (NaCl).....8g
 Chlorure de potassium (KCl).....0,2g
 Hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄).....1,44g
 Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄).....0,24g

Annexes B : Valeurs des diamètres de zone d'inhibition selon le CLSI 2018 et la CASFM 2018.

Familles	Antibiotiques	Diamètre critique			Références
		Sensible	Intermédiaire	Résistant	
β-lactamines	Pénicilline	≥29	-	≤28	CLSI 2018
	Céfoxitine	≥22	-	≤21	CLSI 2018
Quinolones	Ciprofloxacine	≥21	16-20	≤15	CLSI 2018
	ofloxacine	≥18	15-17	≤14	CLSI 2018
Macrolides	Erythromycine	≥23	14-22	≤13	CLSI 2018
Aminoglycosides	Néomycine	≥18	-	<18	CASFM 2018
Tétracyclines	Tétracycline	≥19	15-18	≤14	CLSI 2018
Lincosamides	lincomycine	≥21	-	≤17	CLSI 2018
Phénicol	Chloramphénicol	≥18	13-17	≤12	CLSI 2018
Inhibiteurs de synthèse de l'acide folique	Triméthoprim-Sulfamethoxazole	≥16	11-15	≤10	CLSI 2018

Annexe C : Résultats détaillés de l'antibiogramme pour chaque souche de *S. aureus* isolée vis-à-vis de 10 molécules d'antibiotiques.

	C	FOX	OFX	N	P	CIP	E	SXT	MY	TE
S01	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
S02	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S03	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S
S04	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S05	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S06	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R
S07	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R

S08	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
S09	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
S10	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
S11	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S12	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S13	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S
S14	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S
S15	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S16	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S17	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S
S18	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S19	S	S	S	R	R	S	I	S	S	R
S20	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
S21	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S
S22	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
S23	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
S24	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S25	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
S26	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S27	S	R	S	R	R	S	R	S	R	I
S28	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S29	S	R	S	R	R	S	R	S	R	I
S30	S	R	S	R	R	S	R	S	R	I
S31	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S32	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
S33	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S
S34	S	R	R	R	R	S	I	S	R	R
S35	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S
S36	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S
S37	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S38	S	S	S	R	R	S	S	S	I	S
S39	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S40	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
S41	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S
S42	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R
S43	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
S44	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
S45	S	S	S	R	R	S	S	S	I	S
S46	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
S47	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
S48	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
S49	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S
S50	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

S : sensible, R : résistante, I : intermédiaire

Annexe D : Valeurs des diamètres d'inhibition des souches de *S. aureus* isolées

Souche	C	FOX	OFX	N	P	CIP	E	SXT	MY	TE
S1	26	26	26	24	10	30	6	26	27	20
S2	24	26	25	20	7	27	24	25	26	23
S3	26	28	28	25	10	30	22	24	26	22
S4	26	27	26	21	7	30	25	24	23	22
S5	27	28	28	24	10	33	26	25	27	22
S6	27	25	23	20	6	29	11	27	26	11
S7	26	26	24	21	8	27	10	28	26	10
S8	26	25	28	22	11	30	23	28	26	10
S9	26	25	26	24	9	30	25	28	27	10
S10	27	6	6	8	6	6	26	21	10	11
S11	27	29	25	18	7	26	24	24	25	24
S12	28	25	26	24	10	29	26	22	28	25
S13	26	17	11	21	6	15	26	25	16	21
S14	26	20	9	22	6	13	6	19	6	24
S15	28	26	25	23	8	33	27	24	24	22
S16	26	26	26	28	8	27	23	25	22	28
S17	25	26	25	28	8	28	22	25	24	30
S18	30	27	28	16	26	26	23	22	25	26
S19	25	28	25	10	6	29	21	22	22	12
S20	29	13	6	15	6	6	6	18	26	21
S21	25	20	9	9	6	11	6	17	6	22
S22	29	28	24	18	9	30	6	23	22	23
S23	26	28	26	17	12	32	8	20	23	26
S24	25	28	25	15	8	22	23	23	22	23
S25	27	6	6	6	6	6	24	20	10	11
S26	25	25	25	16	7	28	23	20	21	23
S27	26	6	26	15	6	30	6	21	6	17
S28	26	28	24	16	6	28	23	22	22	24
S29	24	6	23	15	6	26	6	19	6	17
S30	26	6	25	16	6	29	6	21	6	15
S31	27	28	26	16	7	29	23	24	23	24
S32	26	27	25	17	10	30	6	22	22	26
S33	24	20	8	9	6	9	6	17	6	24
S34	29	6	6	9	6	22	17	20	10	11
S35	25	26	24	15	7	22	21	23	22	23
S36	30	6	12	10	6	16	6	6	25	22
S37	27	29	27	16	9	31	23	24	23	25
S38	27	29	28	17	10	33	23	26	20	29
S39	27	33	26	17	7	29	23	23	23	24
S40	28	30	26	17	8	26	6	24	23	24
S41	28	16	9	17	6	10	25	23	15	24
S42	18	16	6	21	6	6	24	6	24	9
S43	32	6	6	15	6	6	6	6	26	23
S44	26	29	27	16	10	31	24	24	25	25
S45	26	30	28	17	10	30	23	26	20	31

S46	27	33	26	20	7	25	23	25	23	24
S47	28	32	26	22	8	30	8	23	23	23
S48	28	27	25	23	10	30	6	28	26	20
S49	24	27	26	20	7	25	22	25	28	23
S50	26	27	28	22	7	31	24	24	23	21

Annexe E: Résultat de la formation de biofilm par la technique TCP

Souche	DO	Souches	DO
T+	0,15	S30	0,546
S10	0,537	S33	0,701
S13	0,395	S34	0,983
S14	0,369	S36	2,174
S20	1,457	S41	0,461
S21	0,186	S42	1,301
S25	0,391	S43	2,006
S27	0,354	T-	0,013
S29	0,238		

Annexe F: Préparation des solutions

➤ Solution DMSO à 10%

Mélanger 10ml de DMSO pure d'une concentration de 90% avec 90ml d'eau distillée.

➤ DPPH

Peser 1mg de DPPH dans 100ml d'éthanol

➤ Na_2CO_3 à 7%

Dissoudre 7g dans un volume de 100 ml d'eau distillée

➤ Préparation de la solution d'acide gallique à des concentrations allant de 0 à 200 $\mu\text{g/ml}$

Une quantité de 20mg d'acide gallique pesée sur une balance de précision est dissoute dans 10 ml d'eau distillée pour obtenir une solution de 2000 $\mu\text{g/ml}$.

• Préparation de la solution mère (SM)

La solution mère est obtenue en appliquant la loi $C_1.V_1 = C_2.V_2$, sachant que:

- C_1 : Concentration de la solution de l'acide gallique (2000 $\mu\text{g/ml}$);

- V1 : Volume inconnu qu'il faut prélever à partir de la solution d'acide gallique, puis ajuster avec de l'eau distillée à un volume défini, dans notre cas (5 ml);
- C2 : Concentration de la solution mère que l'on veut préparer (200 μ g/ml);
- V2 : Volume total de la solution mère.

- **Préparation de la gamme étalon**

A partir de la solution mère, on prépare des dilutions allant de 20 μ l à 200 μ l

Concentration de la dilution en μ g/ml	0	20	50	100	125	150	200
Volume à prendre de la solution mère	0	0.625	1.250	2.5	3.125	3.75	5
Volume de l'eau distillée en μ l	5	4,375	3,75	2,5	1,875	1,25	0