

Délégation médicale de Fès
Laboratoire Régional de Diagnostic
Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu



Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques-Fès
Département des Sciences de la Vie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'obtention du Master de Biotechnologie Microbienne
ANNEE UNIVERSITAIRE 2010 - 2011

**Surveillance microbiologique des surfaces
de l'hôpital IBN AL KHATEB de Fès
et étude de l'effet des huiles essentielles
sur les souches hospitalières**

Présenté par :

MOUNIA EL KHADIR

WOUNIA EL KHADIR

Encadré par :

Mme. L. ZBADI

Dr. A. EL OUALI LALAMI

Pr. K. FIKRI BENBRAHIM

Soutenu le 25/06/2011

Devant le jury :

Mme. L. ZBADI

Dr. A. EL OUALI LALAMI

Pr. K. FIKRI BENBRAHIM

Pr. KH. BEKHTI

Mr. A. EL OUALTI

Dédicaces

A mes chers Parents que Dieu protège :

En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissante. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

A mon cher frère Rachid, à mes chères sœurs Nahida, Fatima et Souad.

A toute ma Famille.

A tous mes Amis (es).

A tous les miens.

Je vous dédie ce modeste travail

Remerciements

Au terme de ce mémoire, il m'est particulièrement indispensable d'exprimer ma gratitude et mes remerciements à tous ceux qui, par leur enseignement, leur soutien et leurs conseils, m'ont aidé à sa réalisation.

Ma gratitude va d'abord à mon encadrante Mme L.ZBADI, responsable de l'unité d'hygiène hospitalier au LDHEM qui a bien voulu diriger ce travail avec beaucoup de compétence et d'efficacité. J'ai eu le privilège de bénéficier de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.

Mes remerciements sont adressés au Dr. A.ELOUALI LALAMI responsable du Laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de la ville de Fès, pour son soutien et son accueil si chaleureux tout au long de la période de stage. Je le remercie également de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de bien vouloir encadrer ce modeste travail.

Je remercie de tout mon cœur mon Co-encadrante Pr. K. FIKRI BENBRAHIM, professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences et de Techniques pour son aide bienveillante et ses remarques qui m'ont beaucoup aidé à améliorer la rédaction de ce mémoire, qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Que le responsable du Master Biotechnologie Microbienne, Pr. M. IRAQUI HOUSSAINI, trouve dans ce rapport l'expression de ma gratitude pour les efforts considérables qu'il n'a cessé de déployer pour la réussite de cette formation.

Mes sincères remerciements s'adressent au Médecin chef de l'hôpital IBN AL KHATIB Mr K. KASRI. Qu'il trouve ici le témoignage de ma respectueuse gratitude, mon grand respect et ma très haute considération.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Z. MARSO présidente du comité de Lutte Contre les Infections Nosocomiales au sein de l'hôpital IBN AL KHATIB pour son soutien continu au cours de la réalisation de ce travail.

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude et mes remerciements au Dr. A. BAROUDI; responsable du laboratoire d'analyse à l'hôpital IBN AL KHATIB Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je ne peux oublier d'adresser mes remerciements à Mr Hassan, infirmier chef du laboratoire d'analyse à l'hôpital IBN AL KHATIB pour sa sympathie et son fructueux conseil et à toute l'équipe. Qu'il me soit permis de vous exprimer mon estime et ma sincère reconnaissance.

J'adresse aussi mes vifs remerciements au Pr. KH. BEKHTI et à Mr. A. EL OUALATI pour avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et mon respect.

Mes respectueux remerciements au Personnel du Laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de la ville de Fès pour leur disponibilité et leur sympathie.

Liste des abréviations

ADH : Arginine Dihydrolase

AFNOR : Association Française de Normalisation

AMP : Adénosine Monophosphate

ARECLIN : Association Régionale des Comités de Lutte contre les Infections Nosocomiales

ASPEC : Association pour la Prévention et l'Etude de la Contamination

ATP : Adénosine Tri-phosphate

BGN f : Bacille Gram Négatif fermentaire

BGN nf : Bacille Gram Négatif non fermentaire

BGP : Bacille Gram Positif

F.M.A.T. : Flore Mésophile Aérobie Total

HE : Huile essentielle

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

KESH : *Klebsiella, Enterobacter, Serratia et Hafnia*

LDA : lysine désaminase

LDC : lysine décarboxylase

NF : Norme Française

ODC : Ornithine Décarboxylase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PPi : Pyrophosphate

RLU : Unité Relative de Lumière.

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Classification classique et phylogénétique de *Rosmarinus officinalis* (p 20)

Tableau N°2 : Classification classique et phylogénétique d'*Artemisia absinthium* (p 21)

Tableau N°3 : Classification classique et phylogénétique de *Pistacia lentiscus* (P 21)

Tableau N°4 : Classification classique et phylogénétique de *Citrus limon* (p 22)

Tableau N°5 : Classification classique et phylogénétique de *Juniperus communis* (p 23)

Tableau N° 6 : Proposition de sectorisation selon le guide d'ARECLIN de prélèvement d'environnement dans les établissements de santé (2001) (p 24)

Tableau N° 7 : Caractères biochimiques des germes isolés et leur identification (p 46)

Tableau N° 8 : Effet de l'HE *Rosmarinus officinalis* (p 46)

Tableau N° 9 : Effet de l'HE d'*Artemisia absinthium* (p47)

Tableau N° 10 : Effet de l'HE de *Pistacia lentiscus* (p48)

Tableau N° 11 : Effet de l'HE de *Citrus limon* (p 48)

Tableau N° 12 : Effet de l'HE *Juniperus communis* (p 49)

Listes des figures

Figure N° 1 : Adhésion d'une bactérie à un support inerte et formation d'un biofilm (p 5)

Figure N° 2: Montage de l'hydrodistillation (p 17)

Figure N°3 : Principe de l'alambic pour distiller les huiles essentielles (p 18)

Figure N°4 : Pourcentages des microorganismes isolés à partir des surfaces hospitaliers dans les deux cycles (p 40)

Figure 5 : Répartition des germes isolés dans les deux cycles (p 41)

Figure N° 6 : Répartition des microorganismes en fonction des services en mois Février (p 42)

Figure N°7 : Répartition des microorganismes en fonction des services en mois d'AVRIL (p 43)

INTRODUCTION

Un siècle et demi avant Pasteur, déjà, Antonie van Leeuwenhoek découvrait l'existence d'un nouveau monde biologique, infiniment petit, en explorant tout ce qui l'entourait sous le premier microscope, qu'il avait conçu lui-même : ainsi, il nous dévoile l'existence de bactéries et de levures.

L'ère pastorienne décrit d'abord les bactéries comme des agents pathogènes responsables des maladies infectieuses puis peu à peu découvre leur rôle bénéfique pour l'environnement.

Les premières descriptions de microbes présents dans l'environnement et responsables de maladies datent de 1865 avec Villemin et la tuberculose, de 1882 avec Gessart et l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* dans le pus bleu et enfin, à la même époque, Semmelweis réussit la compréhension des fièvres puerpérales.

De nos jours, les bactéries de l'environnement tiennent une grande place tant par rapport à l'enjeu qu'elles représentent dans la défense de cet environnement que par l'impact en santé publique des infections nosocomiales survenues à l'hôpital. (Hygis, 1998).

Sous le terme général de « biocontamination » on désigne la contamination par les bactéries des différents milieux de l'environnement : l'eau, l'air, les surfaces et les objets. Cette biocontamination est souvent liée aux systèmes de chauffage, ventilation et climatisation mal conçus ou mal entretenus. Par ailleurs, l'utilisation croissante et abusive d'antibiotiques, antiseptiques et désinfectants a permis la sélection de germes de plus en plus résistants. En outre des techniques de plus en plus poussées mais aussi plus agressives pour les malades (tels que, cœlioscopie, cystoscopie, fibroscopie, mise en place d'une prothèse.....etc.) se sont développées dans les hôpitaux. Alors que parallèlement ces malades sont devenus plus immunodéprimés et par là « à haut risque infectieux ». Ces facteurs ont contribué à l'apparition de « l'hospitalisme » c'est-à-dire la survenue d'infections nosocomiales contractées par des malades fragilisés à partir de germes souvent peu virulents de l'environnement hospitalier. Il est important de noter la gravité que peuvent revêtir ces infections sur des terrains fragiles comme les immunodéprimés ou les prématurés, en particulier les infections à *Pseudomonas aeruginosa*, l'un des principaux germes pathogènes nosocomiaux (Hygis, 1998).

Ces infections nosocomiales sont un problème de santé publique majeur qui devient de plus en plus préoccupant dans tous les pays du fait de leurs incidences, de la qualité des soins apportés aux malades et des coûts entraînés par leur prévention. L'OMS note qu'à tout instant ; 1,4 million de personnes sont malades dans le monde des suites d'infections contractées en milieu hospitalier. Dans les pays développés, elles touchent 5% à 10% des patients. Dans certains pays en développement, il arrive que près d'un quart des patients soient touchés (OMS, 2006).

Une étude récemment menée dans 27 hôpitaux en Algérie, en Égypte, en Italie, au Maroc et en Tunisie, a montré que la prévalence des infections nosocomiales était de 10,5 % ; avec des taux plus élevés dans les centres non universitaires et dans les hôpitaux de taille moyenne (Amazian et al., 2010).

A l'échelon national une enquête de prévalence, a été réalisée en 1994. Les résultats de cette enquête indiquaient que le taux de prévalence moyen de l'infection nosocomiale, dans le secteur hospitalier, était de 5% dans les hôpitaux provinciaux, 10% dans les hôpitaux régionaux et plus de 11% dans les centres hospitaliers universitaires.

Une étude réalisée en 2007 a révélé que le taux de prévalence des infections nosocomiales dans les trois hôpitaux de la ville de Fès (les hôpitaux El Ghassani, Omar Drissi et Ibn El Khatib.) est de 6,7% (El Rhazi et al., 2007).

L'environnement hospitalier joue certainement un rôle dans la transmission des germes responsables des infections nosocomiales, cet environnement comprend habituellement l'eau, l'air, et les surfaces. Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux surfaces de certains services de l'hôpital IBN AL KHATEB de Fès.

L'objectif de cette étude est de :

- ✓ Evaluer le niveau de contamination des surfaces en milieu hospitalier en vérifiant l'absence de microorganisme indicateurs d'une biocontamination de surface (l'aspect qualitatif du contrôle) ; les microorganismes concernés sont les entérobactéries, les *Pseudomonas*, les Staphylocoques à coagulase positive, *Acinetobacter sp*, et *Candida sp*.
- ✓ Etudier la sensibilité des souches isolées à partir des surfaces de l'hôpital à certaines huiles essentielles.

A decorative scroll frame with a black outline and grey shading on the top and bottom edges, resembling a rolled-up document. The text is centered within this frame.

Revue Bibliographique

1^{ère} Partie



Vue d'ensemble sur la contamination des surfaces hospitaliers, leur mécanisme de contamination et les germes fréquemment isolés

I. Les infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont définies comme les accidents infectieux contractés par les malades au cours de l'hospitalisation. L'infection est habituellement considérée comme nosocomiale si elle apparaît après un délai minimum de 48 h d'hospitalisation. Pour les infections du site opératoire, on considère comme nosocomiales les infections survenues dans les 30 jours suivant l'intervention, ou, s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervention. Les infections nosocomiales sont dues à de très nombreux micro-organismes, incluant bactéries, champignons (*Candida*, *Aspergillus*...), parasites (*Pneumocystis carinii*...) et virus (hépatite B, Herpesviridae, virus respiratoire syncytial...). Cependant, les bactéries sont à l'origine de près de 90% des infections nosocomiales (*Berche et al., 1991*).

I.1. Origines des infections nosocomiales

On distingue plusieurs types d'infections nosocomiales qui relèvent de modes de transmission différents :

- Les infections d'origine "endogène" : le malade s'infecte avec ses propres germes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière.
- Les infections d'origine "exogène" : il peut s'agir soit :
 - D'infections croisées, transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical.
 - D'infections provoquées par les germes du personnel porteur.
 - D'infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation, surface...).

I.2. Facteurs de risque infectieux

Les infections nosocomiales ont une plus grande probabilité de survenue dans un certain nombre de circonstances parfaitement définies. Les facteurs de risque se classent en facteurs intrinsèques et en facteurs extrinsèques (*Berche et al., 1991*).

Les facteurs intrinsèques : ils ne sont pas tous maîtrisables, on cite :

- Les âges extrêmes de la vie.
- Le sexe : l'infection urinaire est plus fréquente chez les femmes (*Cavallo et al., 2003*)

- La durée de séjour qui augmente l'incidence des infections.
- Le poids de naissance chez les prématurés : un poids inférieur à 1 Kg double l'incidence des infections sur les cathéters des nouveaux nés ventilés. (*Tiran-Rajaofera et al., 2001*)

Les facteurs extrinsèques : Toutes les prothèses, les sondes urinaires, les cathéters vasculaires, les drains, les sondes digestives.... L'infection est favorisée par :

- La durée de maintien en place des prothèses et leurs manipulations.
- L'utilisation mal maîtrisée des antibiotiques.
- Les actes invasifs.

II. L'environnement hospitalier : Surface

Les surfaces sont naturellement contaminées par des microorganismes : bactéries, champignons filamenteux, levures.... Le niveau de contamination varie qualitativement et quantitativement au cours du temps et en fonction des services et des patients. La contamination dépend aussi des conditions hygrométriques et de la température.

II.1. Contamination des surfaces

À l'hôpital, les surfaces susceptibles d'entrer en contact avec le patient soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de dispositifs médicaux ou les mains des personnes peuvent constituer des réservoirs microbiens (*Tattawasart et al., 1999*). Toutes les espèces bactériennes isolées à partir de ces surfaces ne sont pas obligatoirement pathogènes mais la flore issue de l'activité humaine comme les bactéries de la flore cutanée ou des flores muqueuses et certaines espèces bactériennes des flores hydriques naturelles comme *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être responsables d'infection liées aux soins (*Rouillon et al., 2006*).

La contamination des surfaces a deux sources : le dépôt de microorganismes présents dans l'air, et l'apport direct par des objets ou mains porteurs de microorganismes.

La contamination de l'air est liée à un "bruit de fond" provenant de l'air extérieur, à l'apport par les personnes et à la génération d'aérosols par le fonctionnement de machines et matériel. Le mouvement de l'air dans "l'îlot de chaleur" provenant autour de tout être vivant va arracher des microorganismes et les disperser dans l'atmosphère. Là, selon l'effet Coanda, une veine d'air se déplaçant dans une enceinte crée une zone de dépression à sa partie supérieure qui tend à la plaquer contre les parois. L'air ainsi contaminé va "ruisseler" le long

des murs, et d'après les théories de l'impact abandonnera les particules en suspension dans les filets d'air à chaque déviation de flux (*Hartemann et al., 1997*).

II.2. Survie des agents infectieux dans l'environnement

Le rôle potentiel d'un environnement contaminé dans la transmission des micro-organismes dépendra en partie de la capacité du micro-organisme à survivre à la dessiccation sur diverses surfaces de l'environnement hospitalier et en particulier sur les surfaces touchées par les mains des patients et du personnel.

Diverses études ont montré une capacité de survie allant de quelques heures à plusieurs semaines (*Kramer et al., 2006 ; Kusumaningrum et al., 2003*).

II.3. Mécanismes de la contamination des surfaces

L'adhésion bactérienne débute par l'attachement des cellules grâce à des forces physiques, relativement labiles, puis la cellule bactérienne secrète des substances polymériques constituant le « glycocalyx » qui lui permet d'adhérer plus fortement à la surface (*Figure N°1*) (*Squinazi, 2006*).

La présence de molécules organiques est un facteur aggravant car la surface devient alors une *surface-substrat* pour le développement des micro-organismes. Lorsque les conditions sont réunies (température, humidité), les bactéries se développent en micro-colonies ou par plaques et forment progressivement un biofilm, structure multicouche de bactéries enrobées dans un magmat de substances polymériques extracellulaires. Celui-ci est composé de cellules bactériennes vivantes, de cadavres bactériens et de diverses espèces microbiennes recrutées en superficie (*Squinazi F., 2006*).

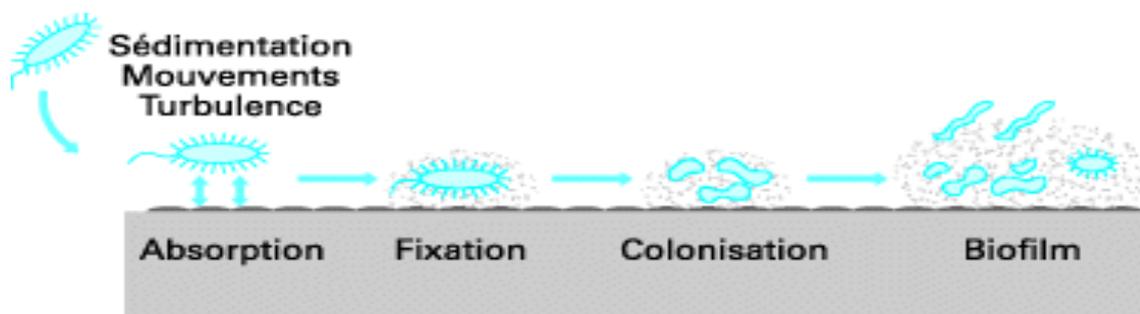


Figure N° 1 : Adhésion d'une bactérie à un support inerte et formation d'un biofilm.

II.4. Mesure de la contamination des surfaces

La mesure de la contamination microbiologique des surfaces s'effectue en récupérant les micro-organismes viables, à l'aide de dispositifs de prélèvement, par contact direct ou indirect, ou par dépôt sur une boîte par sédimentation gravitationnelle. Il s'exprime en unités formant colonies par surface échantillonnée (*Squinazi F., 2006*).

- *Les Rodacs ou « boîtes de contact »*

Les Rodacs sont des boîtes de Pétri de 25 cm² remplies d'un milieu de culture microbiologique (ou gélose), de façon à ce que celui-ci présente une forme convexe. Ce milieu de culture peut être sélectif ou non, en fonction des germes que l'on désire détecter. La Rodac est appliquée sur la surface à tester avec une pression (500 g ± 50 g) et une durée (10 secondes) bien décrites dans les normes existantes (NF V 08-037 de mai 2003 et ISO 18593 de juin 2004). Des applicateurs, sont d'ailleurs souvent utilisés dans le but d'uniformiser cette pression et cette durée d'application. Au moment de l'application de la gélose sur les surfaces, des restes de désinfectants peuvent également être récoltés. C'est pourquoi le milieu de culture comporte un complexe neutralisant les désinfectants.

Les Rodacs sont alors incubées pendant un temps et à une température précis, variant en fonction du milieu de culture utilisé. Il suffit ensuite de compter les colonies qui ont poussé, exprimées en UFC/25 cm². Cette méthode vise donc à quantifier et permet éventuellement d'identifier la population bactérienne ou fongique présente sur la surface à évaluer.

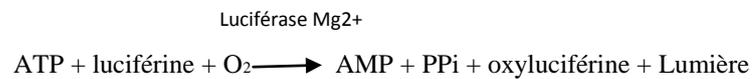
- *L'écouvillonnage*

L'écouvillon est une tige terminée par du coton stérile que l'on va frotter sur la surface à tester. La façon de frotter (stries dans deux directions perpendiculaires, angle entre 30 et 45°, pression constante), ainsi que la surface à couvrir (20 ou 100 cm², utilisation d'un gabarit conseillée) sont à nouveau bien décrites. Le prélèvement est alors plongé dans une solution stérile, présente dans le tube dans lequel l'écouvillon est conservé. Cette solution est maintenue à 4°C pour limiter les phénomènes de multiplication de flore. Le diluent est ensuite agité pour mettre les bactéries en solution et remis en culture sur boîte de Pétri. Enfin des UFC est réalisé après l'incubation.

○ *ATP-métrie*

L'ATP est une molécule que l'on retrouve dans toutes les cellules vivantes, ou même parfois peu après leur mort. Il peut donc provenir de restes alimentaires, de bactéries, de levures, de moisissures ou autres micro-organismes, et permet donc d'évaluer le « niveau de contamination » d'une surface.

L'ATP métrie est une méthode qui consiste à frotter un écouvillon sur une surface de, par exemple, 100cm². Puis le prélèvement est dilué dans un liquide stérile et mis en contact avec des réactifs, dont le principal est la luciférine. Cette enzyme, en présence d'ATP, va provoquer l'émission d'une certaine quantité de lumière.



Les appareils d'ATPmétrie mesurent la lumière émise (en RLU), directement proportionnelle à la quantité d'ATP qui a réagi.

Cette méthode trouve donc son intérêt dans la comparaison entre les niveaux de contamination (quantité d'ATP mesurée) avant et après nettoyage, mais ne permet pas le dénombrement des micro-organismes présents (*Programme des aliments d'origine végétale 2010*).

II.5. Risque infectieux lié aux surfaces

La flore retrouvée sur les surfaces dépend de plusieurs facteurs :

➤ L'activité humaine

Elle entraîne un apport de micro-organismes par le patient lui-même, par les soignants et par les visiteurs. En effet, il est clairement établi que sur les surfaces de l'environnement immédiat du patient, on retrouve la flore présente chez celui-ci.

➤ La qualité de l'air

Les particules en suspension dans l'air vont finir inévitablement par se déposer sur les surfaces et ce d'autant plus rapidement qu'elles sont plus volumineuses.

➤ La qualité de l'eau

Les bacilles Gram négatifs de type *Pseudomonas* et germes apparentés sont souvent présents dans les réseaux d'eau en particulier non traités :

- Ils se multiplient rapidement dans les tuyauteries où l'entartrage facilite la colonisation et ils sont rapidement recouverts d'un biofilm propice à leur survie et à la colonisation.

- Ils se multiplient aisément dans les points d'eau stagnante comme les siphons, les barboteurs à O₂ à usage multiple ou les bacs humidificateurs des couveuses par exemple, si leur entretien n'est pas parfaitement assuré et/ou que de l'eau stérile n'est pas utilisée pour le remplissage.

- La présence de nutriments

La présence de nutriments sur les surfaces dépend de:

- Ce qui a pu y être déposé.
- La qualité du bionettoyage.

Ceci sous-entend que les comportements soient adaptés aux risques dans les milieux de soins et que les règles soient également draconiennes dans les secteurs de cuisine où le risque est d'autant plus élevé que les aliments ne sont pas par essence « stériles » et qu'ils représentent en eux mêmes un milieu de culture idéal.

- La qualité du bionettoyage

On admet aujourd'hui qu'un entretien adapté de l'environnement d'un patient diminue le risque de transmission des infections. Celui-ci passe par :

- L'intelligence de la conception des locaux.
- La qualité du matériel et des produits choisis pour le nettoyage.
- La formation et l'information des personnels responsables dans chaque secteur, à qui il est sans doute judicieux d'expliquer l'importance de cette tâche en termes clairs.
- La traçabilité de ce bionettoyage.
- Et éventuellement l'utilisation de prélèvements microbiologiques de surface pour valider la qualité du travail effectué, encourager le personnel ou bien détecter un dysfonctionnement, et sensibiliser chacun au rôle de l'environnement dans un phénomène infectieux ou une épidémie par exemple.

II.6. Relation entre la contamination environnementale et l'infection nosocomiale

Le rôle de l'environnement hospitalier inanimé (par exemple, les surfaces et de l'équipement) dans la propagation des infections nosocomiales est controversée. Bien que la contamination de l'environnement inanimé par les microorganismes est reconnu depuis longtemps, son importance n'est pas claire (*Hota, 2004*). Le lien de causalité entre contamination environnementale et infection nosocomiale reste souvent très difficile à prouver. En effet, celle-ci peut être la cause ou la conséquence de l'infection. Tout patient infecté ou simplement colonisé peut contaminer son environnement proche. La présence de microorganismes dans l'environnement n'est pas une condition suffisante pour impliquer ce réservoir dans la survenue d'une infection nosocomiale.

L'interprétation du résultat devra tenir compte à la fois de la nature du microorganisme, de son inoculum, de sa virulence, de son mode de transmission, de la porte d'entrée (procédure invasive) et de la réceptivité de l'hôte (immunodépression). Il y a 7 critères permettant d'évaluer le degré d'imputabilité d'un réservoir environnemental dans la survenue d'une infection nosocomiale (*Barbut et al., 2004*):

1. Le microorganisme doit pouvoir survivre dans l'environnement inerte,
2. Le microorganisme doit pouvoir s'y multiplier,
3. Le microorganisme doit pouvoir être cultivé à partir de cet environnement,
4. Aucune autre voie de transmission ne peut être identifiée,
5. L'exposition à l'environnement contaminé est démontrée par des études prospectives comme étant la seule cause de relation entre l'exposition et l'infection,
6. Une association entre l'exposition à la contamination environnementale et l'infection est démontrée par des études cas-témoin,
7. La transmission est interrompue si l'on supprime le réservoir environnemental.

II.7. Les microorganismes contaminants les surfaces en milieu hospitalier

II.7.1. Virus

Les virus peuvent contaminer l'environnement inanimé et même y survivre.

Le virus de la grippe se transmet généralement par les gouttelettes de grandes voies respiratoires et, éventuellement, par l'intermédiaire des noyaux de gouttelettes aéroportées.

Les études classiques ont montré que le virus de la grippe peut contaminer l'environnement, persister après le séchage, et devenir à nouveau sous forme d'aérosol au cours de balayage de plancher. Le virus de la grippe peut survivre pendant 24 – 48 h sur des surfaces non poreuses, et des virus viables peuvent se propager à la peau, ce qui suggère que la contamination de l'environnement peut conduire à la contamination des patients par les mains des personnels de la santé (*Buxton et al., 2003*). D'autres virus peuvent être responsables d'infections nosocomiales notamment l'adénovirus, le *Rhinovirus*, l'*Enterovirus* et le cytomégalovirus, mais leur incidence réelle reste méconnue.

II.7.2. Moisissures

Les champignons sont des eucaryotes et se distinguent ainsi fondamentalement des procaryotes, bactéries et virus. Leur paroi est différenciée comme celles des végétaux, mais constituée de chitine et de glycogène propres aux animaux. Ils possèdent des mitochondries comme les cellules animales et ne font pas de photosynthèse. Ils représentent donc un règne à part entre les mondes animal et végétal (*Develoux et al., 2005*).

La présence des moisissures en milieu hospitalier est devenue un sujet de préoccupation tant pour les professionnels de la santé que pour les usagers. En effet, malgré l'absence d'indicateurs permettant de mesurer leurs rôles dans la survenue des infections fongiques, il est établi que la bio contamination à l'hôpital constitue un risque majeur pour les patients fragilisés.

Une étude réalisée par (*Zahlane et al., 2008*) montre que le rôle de moisissures au niveau des surfaces inertes peut être suspecté devant la présence de tâches d'humidité évocatrices d'une humidité intérieure importante. Une inspection visuelle a permis de constater une absence de développement de moisissures aussi bien au niveau des locaux que sur les surfaces inertes telles les couveuses ou les sondes. La prévalence des moisissures au niveau des surfaces inertes est de 37,50%.

Les moisissures du genre *Aspergillus* sont des contaminants très communs. Ce genre comprend de 180 à 250 espèces. Seuls *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *A. nidulans*, *Aspergillus terreus* et *Aspergillus niger* sont considérés comme thermotolérants et peuvent être à l'origine d'infection chez des malades particulièrement fragiles. La taille réduite (2 à 4 µm) de la plupart des spores (conidies) d'*Aspergillus* permet à ce germe d'atteindre l'alvéole pulmonaire (Reboux et al., 2010).

II.7.3. Levures

Les levures sont des champignons microscopiques se multipliant par bourgeonnement ou scissiparité. Par opposition aux champignons filamenteux constitués d'un complexe de filaments plus ou moins ramifiés avec des fructifications, les champignons levuriformes ont une forme arrondie ou ovale. Certaines levures peuvent donner des filaments issus d'une levure mère. La levure est la forme végétative et, dans la plupart des cas, la forme de résistance et de dissémination de l'espèce (Develoux et al. 2005).

Le genre *Candida*, le plus représenté en pathologie humaine, compte ainsi 166 espèces. Ce genre regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices (exemple : *C. albicans*) ou non (exemple : *C. glabrata*) de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture (Develoux et al. 2005).

Bien que la majorité des infections à *Candida* sont probablement dues à des sources endogènes (c'est-à-dire de la colonisation du patient), des études de typage moléculaire de la levure provenant des mains de patients, des personnels médicaux, et de l'environnement laissent à penser que les matières contaminées peuvent jouer un rôle dans la propagation de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* chez les patients qui subissent une greffe de moelle osseuse (Vazquez et al., 1998).

II.7.4. Les bactéries

Klebsiella sp.

Les *Klebsiella* sont des *Enterobacteriaceae* immobiles et capsulées (sauf 6% des souches de *K.pneumoniae subsp. Pneumoniae*). Elles font partie du groupe « KESH » (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Hafnia* mais rare.), elles fermentent le glucose par la voie du butan-2,3-diol avec production de gaz, ODC négative, ADH négative et TDA négative.

Klebsiella pneumoniae est un important agent pathogène bactérien qui provoque une lourde charge des infections nosocomiales et des infections communautaire, y compris les infections des voies respiratoires, urinaires, la circulation sanguine et des infections de plaies. *K. pneumoniae* est également un organisme commun de l'environnement qui est souvent présent dans le sol, l'eau et la surface des plantes (Zhang et al. 2010).

Serratia marcescens

Serratia est un genre de bactérie à gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Serratia est variée, elle peut se trouver chez le personnel hospitalier ou les patients au niveau du nez, de la gorge ou du tube digestif, soit dans l'environnement hospitalier (sols, air, eau ou siphons des éviers), soit enfin dans le matériel hospitalier : matériel d'aérosols, appareillage d'endoscopie, matériel et solutés de perfusion, certaines solutions désinfectantes (ammonium quaternaire) ou antiseptiques (chlorure et hexachlorure) (M'boup et al. 1990).

Serratia marcescens est un pathogène opportuniste pouvant provoquer des infections urinaires, des infections de blessures, des pneumonies, des septicémies et des infections nosocomiales (Bizio, 1823).

Escherichia-coli

Escherichia-coli est un bacille gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Chez l'homme, il y a 4 types d'*Escherichia-coli* qui sont à l'origine de maladies gastro-intestinales : *Escherichia -coli* enteropathogène, *Escherichia -coli* enterotoxinogène, *Escherichia -coli* enteroinvasive, *Escherichia -coli* verotoxinogène. *Escherichia.coli* peut être responsable d'infections nosocomiales.

Les Proteus

Caractérisés par leur grande mobilité, les bactéries du genre *Proteus* sont commensales du tube digestif. Certaines espèces d'intérêt médical tels *P.mirabilis*, *P.vulgaris*, *Morganella morganii* (ancien *Proteus morganii*), peuvent induire des infections des voies urinaires (dans 60% des cas d'infections urinaires), des infections cutanées (surinfections des plaies chirurgicales, brûlures...), des infections des voies respiratoires (otites chroniques suppurées, sinusites ...), et même des septicémies (Berche, 1989).

Pseudomonas aeruginosa

Bactérie hydrique ubiquitaire dans l'environnement, parfois commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste très important par le nombre des infections causées et leur gravité. Les nombreux facteurs de virulence de cette bactérie s'expriment préférentiellement sur les terrains immunodéprimés (Bertrand et al., 2003).

Stenotrophomonas maltophilia

Stenotrophomonas maltophilia (Smalto), bactérie à Gram négatif, aérobie stricte, mésophile, non fermentaire, est considéré comme peu virulent. Néanmoins, il représente un pathogène nosocomial notoire, fréquent chez les patients immunodéprimés surtout présentant des co-morbidités sévères telles les pathologies malignes et chez les patients hospitalisés pour une longue durée et traités par des antibiotiques à large spectre (Adjidé et al., 2010).

Acinetobacter baumannii

Les *Acinetobacter* appartiennent à la famille des *Moraxellaceae* sont des bactéries à Gram négatif, aérobie, non fermentaire ubiquitaires par excellence, mais on les rencontre également sur les revêtements cutanés de l'homme et des animaux. *A. johnsonii* fait partie de la flore cutanée normale. Les *Acinetobacter* ont une morphologie caractéristique des diplobacilles à extrémités arrondies avec des formes coccoïdes et des formes longues. Ils sont comme leur nom l'indique toujours immobiles (Bérézin et al., 1987 ; Joly-Guillou et al., 1990 ; Buisson et al., 1990).

Historiquement, *l'acinetobacter* a été un agent pathogène des climats chauds et humides, où il a été une cause majeure des infections, particulièrement dans les unités des soins intensifs (Silvia et al., 2008).

Acinetobacter baumannii à émergé dans le monde ces dernières décennies comme un des principaux germes responsables d'infections nosocomiales. Ces infections englobent les bactériémies, les pneumonies, les infections du tractus urinaire et des parties molles et enfin les méningites. Les méningites nosocomiales dues à *Acinetobacter baumannii* sont rares et exceptionnelles après intervention neurochirurgicale. Toutefois, sa survenue ainsi que la fréquente multi résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* posent un sérieux problème thérapeutique du fait du nombre réduit de molécules diffusant dans les méninges (Mi Kyong et al., 2010).

Clostridium difficile

Les spores de *Clostridium difficile* sont durables et sont résistants aux méthodes habituelles de nettoyage. La contamination de l'environnement inanimé par *Clostridium difficile* a été signalée dans les zones à proximité des patients infectés ou colonisés (Hota, 2004).

Le taux de contamination des spores de C. difficile dépasse 58% ; les surfaces sont couramment touchées, ainsi que les équipements (commodes, bassines, brassards de tensiomètre, murs, sols, lavabos et les meubles (Hota, 2004).

Staphylococcus aureus

Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Ces bactéries se présentent de cocci en amas (grappes de raisin), Gram positif, catalase positif et coagulase positif. L'homme les héberge notamment dans les fosses nasales et sur la peau (à la base des poils en particulier). Le staphylocoque est un germe pyogène (susceptible de provoquer la formation de pus) (Nour et al., 2005).

Ubiquiste et saprophyte, *Staphylococcus aureus* constitue l'une des espèces les plus couramment isolées en milieu hospitalier avec *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie est impliquée dans la survenue d'infections nosocomiales et représente le deuxième agent pathogène responsable de ce type d'infections après *Escherichia coli*, mais son isolement en milieu communautaire est également de plus en plus fréquent (Vincenot et al., 2008).

Les staphylocoques à coagulase négatif

Longtemps considérés comme des bactéries commensales de la peau, leur isolement à partir de produits pathologiques à longtemps été interprété comme sans signification. En réalité, ils sont responsables d'authentiques infections avec une fréquence accrue depuis une quinzaine d'années notamment en milieu hospitalier. Les staphylocoques à coagulase négative font partie des germes les plus fréquemment isolés au laboratoire. Aussi, pour affirmer la réalité d'une infection à staphylocoques coagulase négative et la différencier d'une simple colonisation, il faut s'appuyer sur des critères microbiologiques et épidémiocliniques.

Les infections nosocomiales sont dues principalement à *Staphylococcus epidermidis*, plus rarement à d'autres espèces comme *Staphylococcus saprophyticus*,

Staphylococcus haemolyticus, *Staphylococcus hominis*. Elles sont observées surtout dans les unités de réanimation, de chirurgie et de néonatalogie (Songa et al., 2010).

III. Surveillance des surfaces hospitalières

Les surfaces à l'hôpital constituent des réservoirs microbiens susceptibles de contaminer les mains des soignants ou directement les patients. Il est difficile d'évaluer avec précision la part des surfaces et de l'environnement hospitalier dans l'origine des infections nosocomiales, mais ce risque est pris en compte dans les recommandations d'hygiène. Il s'avère très nécessaire de surveiller les surfaces hospitalières afin de :

- Compléter la surveillance de l'air
- Refléter la qualité du traitement de l'air
- Apprécier directement et rapidement l'efficacité des méthodes du bionettoyage
- Sensibiliser les personnels d'entretien
- Evaluer la qualité du nettoyage s'il y a changement du produit de nettoyage ou des procédures
- Réaliser une enquête épidémiologique
- Valider un protocole de nettoyage et de désinfection

2ème Partie

Généralités sur les huiles essentielles



I. Introduction

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans la lutte contre les maladies infectieuses. Mais la découverte des antibiotiques a provoqué le déclin de la phytothérapie et l'a reléguée à un rang secondaire. Sans aucun doute, les antibiotiques représentent actuellement l'un des groupes de médicaments les plus employés en médecine. Leur utilisation clinique, dès la fin de la première moitié du 20^{ème} siècle, a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, la recherche de nouvelles molécules s'avère nécessaire car, dès le début de l'ère de l'antibiothérapie, ces substances ont montré un certain nombre d'inconvénients et de limites d'utilisation résumés comme suit :

- Effets secondaires et toxicité des molécules antimicrobiennes pour l'organisme traité.
- Tolérance et résistance croissante des germes infectieux aux antibiotiques.
- Difficultés rencontrées dans le traitement des maladies exigeant l'élimination des germes pathogènes indépendamment des facultés de défense du malade (patients immunodéprimés) (*Siegenthaler et al., 1978*).

Les saveurs caractéristiques de plusieurs plantes, viennent de produits chimiques présents, variant en quantité, de partie par billion à partie par million. Dans la nature, quelques espèces de plantes évoluent avec de hauts niveaux de composants odorants que d'autres. Telles herbes et épices ont été utilisées depuis très longtemps pour aromatiser certains aliments, et même pour le traitement de certaines maladies (*Wright et al., 1995*).

Avec la découverte de la distillation, il est devenu possible de séparer le mélange de produits chimiques odorants du matériel végétal, ainsi, les huiles essentielles sont nées (*Wright et al., 1995*).

II. Définition

En complément aux constituants de base de la plante (minéraux, glucides, lipides et protéides), il existe de nombreuses autres substances, dont certaines interviennent directement dans le métabolisme de la plante et contribuent à donner à chaque individu (quelquefois à des genres entiers tel que *Lavendula, Mentha, Thymus ...*) son caractère spécifique. Ainsi, les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes,

synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques, au cours de leur métabolisme secondaire. Le terme "essence" est utilisé pour désigner des produits odorants qui ne préexistent pas dans le végétal mais qui résultent, après l'altération des tissus, de la dégradation enzymatique d'un substrat (Bruneton et al., 1999).

Selon la norme AFNOR NFT 75-006 (Février 1998) on définit une huile essentielle comme suit: "Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par procédé mécanique à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition [par exemple: redistillation, aération,...]"

III. Aperçu sur quelques méthodes d'extraction des huiles essentielles

III.1. Hydrodistillation

La distillation à la vapeur d'eau est une méthode ancienne et très répandue, pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques. Elle est simple, dans son principe, et utilise un équipement peu coûteux. Elle se présente sous trois variantes: l'entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion.

Le dispositif expérimental utilisé, pour l'hydrodistillation, est composé d'un cuiseur à vapeur ménager d'une capacité de 18 l, munie d'une claie et surmontée d'une colonne vigreux à laquelle est adapté un réfrigérant (Figure 2), (Silou et al., 2004).

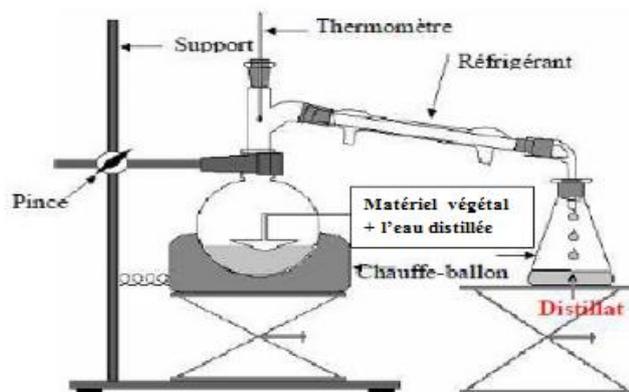


Figure N° 2: Montage de l'hydrodistillation

Ce dispositif est chauffé à l'aide d'une plaque chauffante réglable par l'intermédiaire des plots de puissances croissantes (500, 1000, 1500 W) (Silou et al., 2004).

L'hydrodistillation du matériel végétal placé sur la claie, de telle sorte qu'il ne soit pas en contact avec l'eau, permet de recueillir, après décantation du distillat, l'huile essentielle. On prend 250 g de matière végétale pour 2l d'eau, et après hydrodistillation, on mesure le volume (en ml) de l'huile essentielle extraite (Silou et al., 2004).

Après distillation à la vapeur, l'huile essentielle est isolée et conservé au réfrigérateur.

III.2. ALAMBIC

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération est l'une des plus difficiles et des plus délicates puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité. La distillation à la vapeur d'eau est le procédé le plus couramment employé. Elle s'effectue à l'aide d'un appareil appelé «Alambic », dont le montage de distillation est schématisé dans le figure N°3 (Lardry et al., 2007).

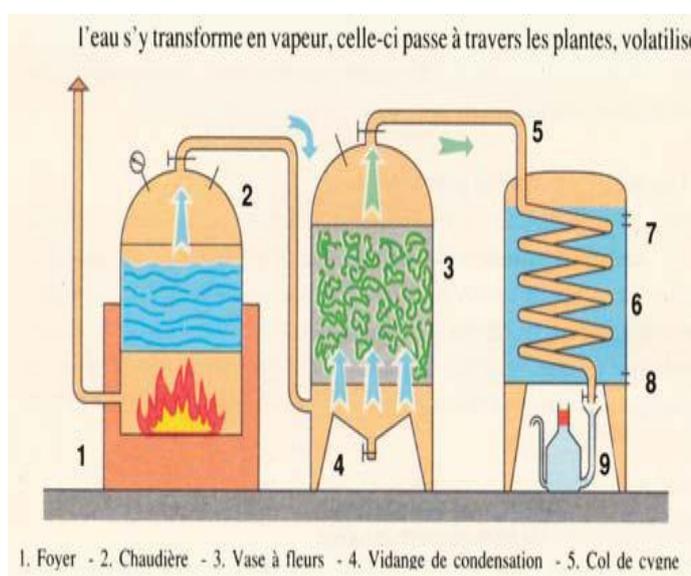


Figure N°3 : Principe de l'alambic pour distiller les huiles essentielles

Celui-ci est constitué :

- d'une chaudière

– d'un vase ou chaudron en cuivre dans lequel sont placés les végétaux à distiller, isolés du fond du vase par un plateau grillagé. Ce vase possède une évacuation inférieure pour vidanger l'eau de condensation.

– d'un chapiteau qui coiffe le vase. Ce chapiteau est prolongé par un col de cygne

– d'un serpentin de refroidissement plongé dans une cuve d'eau froide qui possède trois ouvertures : une pour l'arrivée d'eau froide, une pour l'évacuation de l'eau chaude et une pour accéder au vase florentin.

– d'un vase florentin ou essencier, chargé de recueillir l'huile essentielle. Celle-ci, moins dense que l'eau, flotte à la surface de l'eau de distillation (les huiles essentielles, à part quelques rares exceptions, sont plus légères que l'eau, avec une densité variant de 0,75 à 0,98) (*Lardry et al., 2007*).

Le produit d'extraction peut varier en qualité, quantité et en composition en fonction du climat, la composition du sol, l'organe végétal, l'âge et le stade du cycle végétatif (*Angione et al., 2006*).

IV. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir environ 20-60 composants à différentes concentrations, qu'elles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. Ils sont caractérisés par deux composants majeurs à assez fortes concentrations (20-70%) par rapport à d'autres composants présents en quantités infimes. Par exemple :

- le groupe de *Terpénoides* (les plus volatils c'est-à-dire à masse moléculaire peu élevée), spécialement les monoterpènes: (C 10) cinéol, menthol... qui constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle, en plus des sesquiterpènes: (C 15) caryophyllène, humulène...et parfois des diterpènes (C 20).

- Le groupe des composés aromatiques: des dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, comme le safrol, l'apiol, l'ansaldéhyde, l'eugénol, la vanilline et le cinnamaldéhyde.

Divers produits issus de processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (qui contribuent souvent aux arômes des fruits) (*Betts, 2001*).

V. Emplois et Propriétés pharmacologiques

Les huiles essentielles ont été largement utilisées pour leurs propriétés déjà observées dans la nature, c'est à dire pour leur activité antibactérienne (*Haddouchi et al., 2009 ; Juteau et al., 2002*), antifongique (*Pinto et al., 2006*), antioxydant (*Billerbeck et al., 2002*), insecticide (*Pavela et al., 2011*) et même dans la conservation des aliments (*Burt, 2004*). À l'heure actuelle, environ 3000 huiles essentielles sont connus, dont 300 sont commercialement importantes en particulier pour les industries pharmaceutiques, agronomiques, alimentaires, sanitaires, cosmétiques et des parfums. Les huiles essentielles ou certains de leurs composants sont utilisés dans les parfums et produits de maquillage, dans les produits sanitaires, en dentisterie, en agriculture, comme agents de conservation et additifs alimentaires, et comme des remèdes naturels. Certains huiles essentielles semblent présenter notamment des propriétés médicinales qui ont été réclamés pour soigner un dysfonctionnement organique ou d'un trouble systémique (*Silva et al., 2003*). Les huiles essentielles sont volatiles, cette caractéristique permet donc d'envisager leur utilisation en tant qu'agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment en milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air des locaux (*Billerbeck et al., 2002*).

VI. Monographie de certaines plantes étudiées

VI.1. *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis appartient à la famille des *Lamiacées* (Tableau N° 1). C'est un arbuste aromatique avec un parfum agréable qui rappelle l'intense odeur du bois de pin. Le genre *Rosmarinus* est cultivé principalement dans les pays méditerranéens, comme l'Espagne, le Maroc, la Tunisie, la France et l'Italie (*Jiang, 2011*), (*Szumny, 2010*).

Le romarin renferme 0,5% (plante sèche) d'une essence à la senteur camphrée très pénétrante. Composée de : α pinène (constituant de l'essence de térébentine), bornéol, cinéol, et de 5 à 15% de camphre. La plante contient aussi de la choline, des acides organiques et des hétérosides.

Tableau N°1 : Classification classique et phylogénétique de *Rosmarinus officinalis*

<u>Classification classique</u>	
<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Division</u>	<i>Magnoliophyta</i>
<u>Classe</u>	<i>Magnoliopsida</i>
<u>Ordre</u>	<i>Lamiales</i>
<u>Famille</u>	<i>Lamiaceae</i>
<u>Genre</u>	Rosmarinus
<u>Classification phylogénétique</u>	
<u>Ordre</u>	<i>Lamiales</i>
<u>Famille</u>	<i>Lamiaceae</i>

VI.2. *Artemisia absinthium*

L’Absinthe ou Grande Absinthe, *Artemisia absinthium*, de la famille des *Astéracées* (Tableau N°2), est une plante vivace herbacée d’Europe, d’Asie centrale et occidentale, d’Afrique du Nord, introduite en Amérique du Nord et en Nouvelle-Zélande.

L’huile essentielle d’*Artemisia absinthium* est composée essentiellement de thuyone, zulènes, terpènes, pinène et absinthiol (Lamarti et al., 1996).

Tableau N°2 : Classification classique et phylogénétique d’*Artemisia absinthium*

<u>Classification classique</u>	
<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Division</u>	<i>Magnoliophyta</i>
<u>Classe</u>	<i>Magnoliopsida</i>
<u>Ordre</u>	<i>Asterales</i>
<u>Famille</u>	<i>Asteraceae</i>
<u>Genre</u>	<i>Artemisia</i>
<u>Classification phylogénétique</u>	
<u>Ordre</u>	<i>Asterales</i>
<u>Famille</u>	<i>Asteraceae</i>

VI.3. *Pistacia lentiscus*

Le **lentisque**, ou **pistachier lentisque** (*Pistacia lentiscus* L.), est un arbuste poussant dans les garrigues et surtout les maquis des climats méditerranéens. Plante de la famille des Anacardiaceae, (Tableau N°3) à feuillage persistant, elle donne des fruits, d'abord rouges, puis noirs. L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est obtenue par hydrodistillation des feuilles, de fruits ou d'un tronc d'exsudat appelé mastic. Elle contient principalement : α -pinène, myrcène, limonène, β -caryophyllène et δ -cadinène (*Castola et al., 2000*).

Tableau N°3 : Classification classique et phylogénétique de *Pistacia lentiscus*

<u>Classification classique</u>	
<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Division</u>	<i>Magnoliophyta</i>
<u>Classe</u>	<i>Magnoliopsida</i>
<u>Ordre</u>	<i>Sapindales</i>
<u>Famille</u>	<i>Anacardiaceae</i>
<u>Genre</u>	<i>Pistacia</i>
<u>Classification phylogénétique</u>	
<u>Ordre</u>	<i>Sapindales</i>
<u>Famille</u>	<i>Anacardiaceae</i>

VI.4. *Citrus limon*

Le **citronnier** (*Citrus limon*) est un petit arbre de la famille des Rutacées (Tableau N°4), cultivé dans les régions méditerranéennes et subtropicales pour son fruit le citron, dont le jus est utilisé principalement comme condiment. Les principaux constituants biochimiques de *Citrus limon* sont :

-Monoterpènes : limonène, bêta-pinène, gamma-terpinène, sabinène, alpha-pinène, myrcène, terpinolène.

-Monoterpénols : linalol

-Aldéhydes terpéniques : géranial, néral.

Tableau N°4 : Classification classique et phylogénétique de *Citrus limon*

<u>Classification classique</u>	
<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Division</u>	<i>Magnoliophyta</i>
<u>Classe</u>	<i>Magnoliopsida</i>
<u>Ordre</u>	<i>Sapindales</i>
<u>Famille</u>	<i>Rutaceae</i>
<u>Genre</u>	<i>Citrus</i>
<u>Classification phylogénétique</u>	
<u>Ordre</u>	<i>Sapindales</i>
<u>Famille</u>	<i>Rutaceae</i>

VI.5. *Juniperus communis*

Le genièvre ou *Juniperus communis* est un arbuste de la famille de *Cupressaceae* (Tableau N°5), à cônes bleu violacé ressemblant à des baies, et aux feuilles épineuses. Au Maroc, *Genevrier* représente la ressource bois unique (pour le chauffage, la cuisson, et la construction) pour les populations berbères locales, et est le principal fournisseur du fourrage pour le bétail en hiver (moutons et chèvres) (Montès et al., 2002). La composition de l'huile de *Juniperus communis* est la suivante :

- Sesquiterpènes : 70%
- Sesquiterpènes alcool : 5 à 10 %
- Cétones et Aldéhydes 3 à 4 %
- Phénols 0,3 %
- Acides 0,7 %

Tableau N°5 : Classification classique et phylogénétique de *Juniperus communis*

<u>Classification classique</u>	
<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Division</u>	<i>Pinophyta</i>
<u>Classe</u>	<i>Pinopsida</i>
<u>Ordre</u>	<i>Pinales</i>
<u>Famille</u>	<i>Cupressaceae</i>
<u>Classification phylogénétique</u>	
<u>Ordre</u>	<i>Pinales</i>
<u>Famille</u>	<i>Cupressaceae</i>



Matériel et Méthodes

Pour une surveillance microbiologique des surfaces de l'hôpital IBN AL KHATEB nous avons jugé de réaliser des prélèvements au niveau de 64 points, ces derniers ont été choisis et définis en concertation avec le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN), suite à des prospections et des réunions au niveau de l'hôpital.

I. Hôpital IBN AL KHATIB

L'hôpital IBN AL KHATIB est un Centre Hospitalier Régional (CHR) construit en 1912 comptant actuellement 380 lits, il est en cours d'accréditation et comprend différentes disciplines :

- ✓ Service des urgences
- ✓ Centre de diagnostic
- ✓ Chirurgie générale
- ✓ Gynéco-obstétrique
- ✓ Réanimation chirurgicale
- ✓ Pédiatrie
- ✓ Cardiologie
- ✓ Pneumologie
- ✓ Médecine générale et médecine interne
- ✓ Dermatologie
- ✓ Endocrinologie
- ✓ Hémodialyse

Les prélèvements de surface qui vont être réalisés concerneront les services et les points les plus critiques et sensibles aux infections nosocomiales, tels que le bloc opératoire central, le service de réanimation, le service gynéco-obstétrique, le service de pédiatrie et le service de pneumologie et ceci en accord avec les recommandations de la bibliographie (*Al Akoum et al., 2004 ; Rundstadler et al., 2002 ; Habzi et al., 2001*).

II. L'évaluation de la contamination du milieu hospitalier

Le guide d'ARECLIN (Association Régionale des CLIN du Nord Pas de Calais, publié en juin 2001 en partenariat avec l'Institut Pasteur de Lille) de prélèvement d'environnement dans les établissements de santé, définit quatre zones de risque de biocontamination des surfaces en fonction du lieu et du malade : la zone 4 à très haut risque, la zone 3 à haut risque, la zone 2 à risque modéré et la zone 1 à risque minime (Tableau N°6).

Tableau N° 6 : Proposition de sectorisation selon le guide d'ARECLIN de prélèvement d'environnement dans les établissements de santé (2001)

Secteur 1	Risques minimales : Maison de retraite, Bureau ...
Secteur 2	Risques moyens : Maternité, Psychiatrie, Service de long et moyen séjour, Consultation externe...
Secteur 3	Risques sévères : Pédiatrie, Soins intensifs, Urgences, Salles de travail, Médecine, Radiologie, Hémodialyse, Réanimation, Exploration fonctionnelle, Hématologie, Chimiothérapie, Bloc opératoire septique et obstétrical, Stérilisation centrale, Salles d'eau, Toilettes, Cuisines, Biberonnerie...
Secteur 4	Très haut risques : Néonatalogie, Bloc opératoire aseptique, Service de brûlés, Immunodéprimés, Service de greffe, Chimiothérapie, Oncologie, Onco-hématologie...

En se basant sur ces recommandations, nous avons choisi 4 points de prélèvements représentatifs pour le secteur 3 et 2 points pour le secteur 4 (Tableau N° 6). Ainsi, nos prélèvements sont réalisés dans les services suivants :

- Bloc opératoire central,
- Salle de stérilisation et de décontamination.
- Service de Réanimation,
- Service de Gynécologie,
- Service de Pédiatrie,
- Service de Pneumologie.

Nous avons réalisé un deuxième cycle de prélèvements sur les mêmes points du premier cycle, en respectant la même méthodologie de prélèvement, afin de faire un suivi comparatif.

III. Prélèvement au niveau de surface

III.1. Condition de prélèvements

Nous avons réalisé les prélèvements à partir des surfaces après nettoyage, en dehors de toute activité humaine, et en respectant les règles de l'hygiène (port de gants, de blouse...)

III.2. Mode de prélèvement

Prélèvement par écouvillonnage

A l'aide d'un écouvillon stérile et imbibé avec de l'eau physiologique stérile, nous avons frotté une surface définie, par des stries successives dans deux directions perpendiculaires.

III.3. Technique d'analyse de la solution de prélèvement

Après le prélèvement, nous avons placé l'écouvillon humidifié dans un volume de liquide nutritif approprié qui, après agitation, nous l'avons incubé 24 h à 37°C, puis nous avons ensemencé les milieux sélectifs des microorganismes suivants :

a. *Pseudomonas aeruginosa*

Après étalement sur la gélose de Cétrimide (Annexe 1), nous avons incubé pendant 48h à 42°C. Etant donné la présence des inhibiteurs, il en résulte une croissance sélective des *Pseudomonas* caractérisées par des colonies blanches pigmentées avec un contour lisse circulaire et brillant d'un diamètre d'environ 1,5 à 2mm.

b. *Staphylocoques*

Après étalement sur le milieu Baird Parker (Annexe1), l'incubation s'est faite à 37°C durant 24h ou, si besoin durant 48h. Le chlorure de lithium, le tellurite et une forte concentration en glycine inhibent la flore secondaire. Le pyruvate et la glycine agissent comme accélérateurs sélectifs de croissance pour les staphylocoques.

Les colonies de staphylocoques présentent deux diagnostics caractéristiques :

- ✓ Elles donnent naissance par lipolyse et protéolyse à des halos clairs caractéristiques.
- ✓ La réduction du tellurite en tellure développe une coloration noire.

La réaction du jaune d'œuf et la réduction du tellurite sont habituellement constatées en présence d'une coagulase positive et peuvent donc servir d'indicateur pour cette dernière.

La confirmation des Staphylocoques passe par le milieu BHI d'enrichissement (Annexe 1), pour effectuer le test de coagulase en utilisant le plasma de lapin. Ce test, mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma, est le principal test caractérisant *Staphylococcus aureus*. Il permet donc de différencier le Staphylocoque doré des Staphylocoques à coagulase négative (Annexe 2).

Dans ce test, nous avons incubé pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma de lapin et de la souche à tester. Ensuite nous avons observé l'apparition d'un caillot en inclinant le tube à 90°C.

Nous avons également utilisé le milieu Chapman (Annexe1), qui présente une forte concentration en NaCl, ce qui a pour effet d'inhiber la croissance des bactéries sensibles comme les bactéries Gram(-). De plus, il permet de mettre en évidence l'utilisation du mannitol comme source de carbone et d'énergie.

c. Entérobactéries

Après l'étalement sur le milieu EMB ou bien Mac Conkey (Annexe 1), l'incubation s'est faite à 37°C durant 24h pour les entérobactéries ou, 48h pour les autres bactéries à Gram négatif qui sont difficilement cultivables. Mac Conkey est un milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram⁻, il contient deux inhibiteurs de la flore Gram⁺, les sels biliaries et le cristal violet. De plus, il contient un critère de différenciation, le lactose dont l'utilisation est révélée par l'indicateur coloré du milieu, le rouge neutre. Il vire au rouge en milieu acide.

EMB est aussi un milieu sélectif et différentiel dans lequel l'utilisation du lactose se traduit par un centre foncé ou un aspect métallique des colonies. Dans le cas contraire les colonies sont incolores. Les colonies sont normalement des bacilles Gram négatifs mais quelques Gram + peuvent cultiver de façon limitée.

III.3.1 Purification et identification

Purification

A partir de la culture obtenue sur les géloses PCA, EMB, Mac Conkey, BP ou Cétrimide; nous avons ensemencé par épuisement chaque type de colonies, à l'aide d'une

anse stérile la surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu PCA de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

Nous avons fait des repiquages successifs jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

III.3.2. Identification biochimique des microorganismes

L'identification complète des bactéries fait appel à de nombreux tests biochimiques. Ces tests étant pratiqués sur des milieux donnant des réponses parfaitement interprétables.

III.3.2.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen que nous avons effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation.

Les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées. La colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies.

Pour cet examen nous nous sommes basés sur la taille, la forme, l'aspect de la surface, la couleur et/ou pigmentation.

III.3.2.2. Coloration de Gram

- PRINCIPE

C'est la coloration de base en Bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- La différence de composition chimique de bactéries ;
- La différence de perméabilité de la paroi bactérienne.

- TECHNIQUE

Un étalement aussi mince que possible est effectué à l'aide d'une anse sur une lame. Ensuite la lame est séchée avant de la colorer totalement avec le violet de Gentiane entre 20 secondes à 1min. Nous avons rincé la lame, puis il est recouvert de Lugol (1min). Ensuite une décoloration est réalisée à l'aide de l'alcool-acétone (5 à 10 secondes). Après la lame est

rincée à l'eau, puis recouverte de la solution de fuchsine, pendant 30 secondes. Enfin la lame est rincée à l'eau et séchée entre deux feuilles de papier filtre.

III.3.2.3. Recherche d'oxydase

- PRINCIPE

Le terme exact est « recherche du cytochrome oxydase ». Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes. En fait, ce test recherche le cytochrome c-oxydase.

Depuis plusieurs décennies, et bien avant que ne soit connu dans le détail le rôle des cytochromes, la recherche de l'oxydase est un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles des bactéries à Gram négatif.

Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées.

- TECHNIQUE

Un inoculum bactérien est écrasé sur un disque d'oxydase à l'aide d'une pipette pasteur, le changement de coloration est observé.

- RESULTAT

Une réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où nous avons déposé la colonie, soit immédiatement, soit quelques secondes après.

III.3.2.4. Test ONPG (Orthonitrophényl β -D-Galactopyranoside)

Le terme ONPG hydrolase est plus propre que celui de β -galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté nitro-2-phénol et non celui du β -galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase sans fermenter le lactose.

Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl-β-D galactopyranoside ou le 2-naphtol-β-D-galactopyranoside.

Ceux-ci sont utilisés comme substrat et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le b-naphtol.

- TECHNIQUE

Nous avons réalisé une suspension épaisse des bactéries testées à partir du milieu Kligler dans 1ml d'eau distillé stérile, puis nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG

- RESULTAT

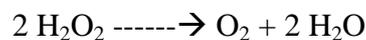
Une réaction positive s'est traduite par un virage du milieu au jaune.

III.3.2.5.Recherche de la catalase

- PRINCIPE

Certaines réactions métaboliques aboutissent, dans les conditions de l'aérobiose, à la production de peroxyde d'hydrogène (= eau oxygénée ou H₂O₂). Mais ce composé peut être le produit de la chaîne respiratoire. Cependant, ce peroxyde d'hydrogène doit être éliminé. C'est en effet un poison cellulaire. Sa décomposition dans l'organisme microbien peut être réalisée soit par des peroxydases, soit par la catalase (la peroxydase ayant toutefois une activité plus faible). En absence de système enzymatique destructeur, la vie en aérobie devient généralement impossible : les micro-organismes sont alors anaérobies strictes.

La catalase est une enzyme importante. Elle joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



La plupart des micro-organismes aérobies possèdent une catalase. Parmi les bactéries Gram positives, seule les *Streptococcaceae*, les *Lactobacillus*, les *Erysipelothrix* (et bien sûr les *Clostridium*) sont dépourvues de catalase.

- TECHNIQUE

A partir d'un milieu solide, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile une quantité suffisante de culture et on l'a met en suspension dans une goutte d'eau oxygénée.

- LECTURE

Une réaction positive s'est traduite par un dégagement gazeux (parfois très faible) d'oxygène.

III.3.2.6. Milieux minimum d'identification

• *Milieu mannitol mobilite*

- PRINCIPE

Montre l'utilisation du Nitrate comme accepteur final d'électrons, et le Mannitol comme source de carbone.

- TECHNIQUE

Elle est ensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une anse de platine.

- LECTURE

- Le milieu est devenu jaune → le pH est acide.
- Les bactéries fermentent le mannitol et produisent des acides qui acidifient le milieu : Mannitol +
- Les bactéries ont diffusé dans tout le milieu en tourbillon : Elles sont mobiles.

• *Sur milieu klinger hajna*

- PRINCIPE :

Il s'agit d'un milieu différentiel. C'est un milieu de couleur rouge qui permet de confirmer la fermentation du glucose et du lactose, la production des gaz et aussi la réduction des composés soufrés qui se traduit par la production de H₂S. Comme les milieux contiennent des sels de fer, la production de H₂S est révélée par la formation du sulfure métallique de couleur noire.

- TECHNIQUE

A partir d'une culture sur milieu solide :

- La pente est ensemencée en stries serrées et parallèles.

- Le culot est ensemencé par piqûre centrale.

- **RESULTATS**

Ce milieu nous a donné 4 réponses en 24 heures :

- L'utilisation du glucose : le culot vire au jaune.
- L'utilisation de lactose : la pente devient jaune.
- Si la fermentation s'accompagne de production de gaz, on peut avoir, soit quelques bulles, soit une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu gélosé du tube (le culot peut même être fragmenté).

La production de H₂S se traduit par un noircissement du milieu qui se développe de long de la piqûre et envahit parfois le culot.

• *Utilisation du citrate de simmons (cs)*

- **PRINCIPE**

A l'aide du milieu du citrate de simmons, nous avons **d**éterminé si la bactérie peut utiliser le citrate comme seule source de carbone.

- **TECHNIQUE**

A partir d'une colonie obtenue sur gélose, à l'aide d'une anse de platine, nous avons fait un prélèvement peu abondant, puis ensemencé en stries serrés la surface de la pente du milieu gélosé.

Nous avons incubé à 37°C pendant 18-24 heures.

- **RESULTATS**

- Réaction positive: croissance accompagnée d'un virage du milieu du vert au bleu.
- Réaction négative: pas de croissance, le milieu reste vert.

• *Milieu Urée-Indole*

- **PRINCIPE**

Le milieu Urée-tryptophane, improprement appelé urée-indole est un milieu de culture synthétique utilisé en bactériologie permettant la mise en évidence simultanée :

- De la production d'indole (par l'hydrolyse du tryptophane par la tryptophanase en pyruvate, indole et N_2) ;
- De l'hydrolyse de l'urée (par une uréase) ;
- **TECHNIQUE :**

Nous avons ensemencé le milieu avec la bactérie étudiée et après l'incubation à 37°C pendant 18 à 24h, le caractère uréase est lu, après nous avons procédé à diviser la suspension en deux parties.

Après l'addition du réactif de Kovacs dans la première partie de la suspension, le diméthyle-amino-4-benzaldéhyde contenu dans ce dernier réagit avec l'indole, produit de l'activité de la Tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge.

- **RESULTATS**

- La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium : **uréase+**
- Si le milieu persiste orange alors pas d'alcalinisation test uréase –
- Formation d'un anneau rouge : **indole +**
- Absence de coloration rouge : **indole –**

- ***Milieu de lysine de Fer***

- **PRINCIPE**

Ce milieu peut être utilisé en routine, il permet la mise en évidence de la LDC (lysine décarboxylase) et de la LDA (lysine désaminase) pour des bactéries fermentant le glucose.

- **TECHNIQUE**

L'ensemencement de la pente est pratiqué avec des stries et le culot par piqure centrale.

- **LECTURE**

- Pente violette, culot jaune : bactérie **LDA -, LDA -, H₂S –**
- Pente violette, culot violet : bactérie **LDA – LDC +, H₂S -**

- Pente violette, culot jaune : bactéries **LDA -**, **LDC - H₂S -**
- Pente violette, culot violet avec noircissement : bactérie **LDA - LDC +**, **H₂S+**
- Pente rouge vineux, culot jaune : bactéries **LDA +**, **LDC - H₂S -**

- ***Milieux King***

Les milieux de King (milieu King A et milieu King B) permettent de différencier entre les différentes espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques.

➤ **PRINCIPE :**

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents :

✚ La production de pyocyanine, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A.

✚ La production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de sa production est effectuée sur milieu King B.

➤ **TECHNIQUE :**

A partir d'une culture sur gélose Cétrimide, nous avonsensemencé le milieu en faisant des stries à la surface de la gélose avec l'anse.

L'incubation est réalisée en aérobiose.

La présence de pigments diffusibles se traduit par l'apparition d'une couleur qui peut diffuser sur toute la pente :

✚ Couleur bleue sur le milieu King A (présence de pyocyanine)

✚ Couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B (présence de pyoverdine) sous UV.

III.3.3. Identification par Galerie Api

La galerie API est un système standardisé pour l'identification des souches bactériennes, comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

PRINCIPE

La galerie API comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans des solutions spécifiques pour chaque type de galerie. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

Ensemencement d'une galerie api

Préparation de la galerie :

- Nous avons mis de l'eau distillée stérile sur le fond de la boîte (partie alvéolée), toutes les alvéoles doivent être remplies, ensuite nous avons éliminé l'excès d'eau en renversant la boîte au dessus de l'évier.

- Nous avons placé la galerie sur le fond de la boîte **elle doit être manipulée avec la pince.**

- Nous avons recouvert la boîte avec son couvercle.

- Nous avons inscrit le nom, la référence de la souche, la date et la température d'incubation sur la languette latérale de la boîte.

Préparation de l'inoculum

On a réalisé une suspension de la souche à étudier. La suspension doit avoir une densité suffisante

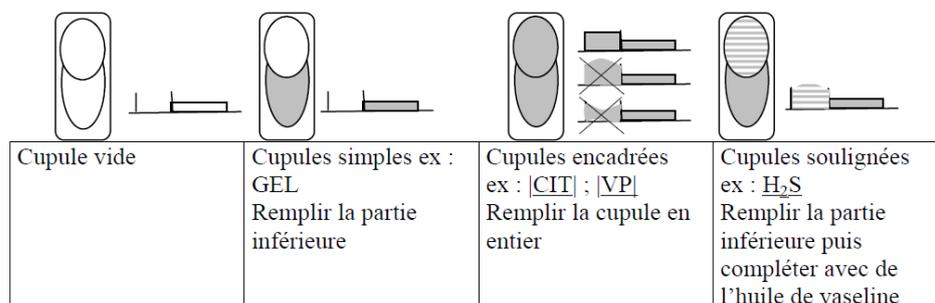
1 colonie dans 5 mL	trouble correspondant au tube 0,5 de l'échelle McFarland	trouble correspondant au tube 4 de l'échelle McFarland
Api 20 e	Api 20 ne * Rapid ID32 e Rapid 20 e Api Staph Api Listeria	Api NH Api 20 Strep Api 50 CHL*

* l'ensemencement se fait en plusieurs étapes

Inoculation de la galerie

- Nous avons rempli les cupules avec la suspension bactérienne à identifier en évitant les bulles d'air.

Mode de remplissage :



Incubation

37°C	30°C
Api 20 e Api Listeria Api Staph Api 20 Strep Rapid 20 e Rapid ID 32 (4 heures) Api NH (2 heures)	Api 20 NE (24 à 48 heures) Api 50 CHL (48 heures)

IV. Etude du pouvoir antibactérien de certaines huiles essentielles

La prolifération actuelle inquiétante de certaines bactéries responsables d'infection à l'hôpital et leurs résistances aux désinfectants usuels, nous a motivé à évaluer l'effet antibactérien de quelques huiles essentielles (cinq), par la méthode de diffusion sur gélose, dans le but de trouver une alternative à l'usage des produits de nettoyage.

IV.1. Les huiles essentielles utilisées

Dans cette étude, nous avons utilisé les huiles essentielles extraites à partir des plantes suivantes :

Rosmarinus officinalis, *Artemisia absinthium*, *Pistacia lentiscus*, *Citrus limon* et *Juniperus communis*.

IV.2. Les souches bactériennes

Les cinq huiles essentielles seront testées sur certains germes isolés à partir des prélèvements de surfaces hospitaliers qu'ils soient Gram positif ou Gram négatif.

IV.3. Test de l'activité antibactérienne (Méthode de Vincent)

Pour évaluer l'activité antibactérienne des souches sélectionnées, nous allons utiliser la technique de l'antibioaromatogramme également appelée méthode de diffusion sur gélose. L'utilisation de l'aromatogramme pour tester l'activité antibactérienne a fait l'objet d'un grand nombre de publications internationales (*Haddouchi et al.2009 ; Burt, 2004 ; Prabuseenivasan et al., 2006 ; Ghalem et al., 2008 ; Tepe et al., 2005 ;Rattanachaikunsopon et al., 2010*).

L'étude du pouvoir antibactérien par diffusion sur gélose est basée sur le même principe que celui de la technique de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatiques.

IV.4. Préparation de l'inoculum

■ A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement (âgée au maximum de 24 h), nous avons raclé à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

■ Nous avons déchargé l'anse ou la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %. Nous avons bien homogénéisé la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland.

IV.5. L'ensemencement

■ Le milieu de culture utilisé est Muller – Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

■ Nous avons trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

■ Nous l'avons essoré en le pressant fermement,

■ Nous avons frotté l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

 Nous avons fini l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

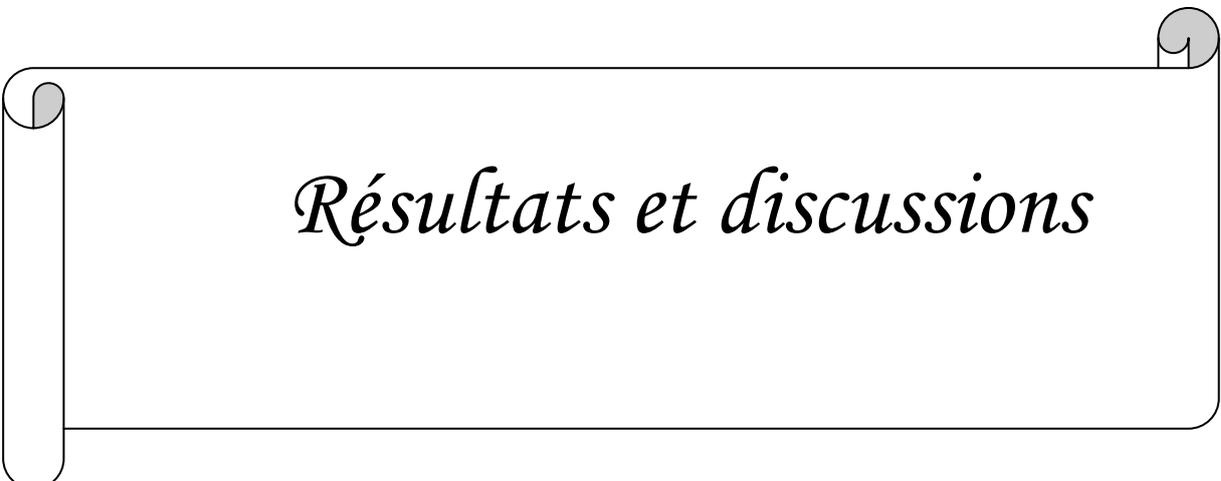
IV.6. Préparation des disques d'aromatogramme

Nous avons utilisé des disques de papier filtre stériles, de 6 mm de diamètre.

Nous les avons placés sur gélose, puis, à l'aide d'une micropipette nous avons mis sur chaque disque 5 µl de chaque huile essentielle.

IV.7. Incubation et Lecture

Toutes les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18h à 24h. Les résultats sont observés en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques, et qui correspondent aux zones d'inhibition.



Résultats et discussions

A. PREMIERE PARTIE : SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DES SURFACES HOSPITALIERS

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats des analyses microbiologiques réalisées au niveau des points de prélèvement de surface sous forme de deux volets :

- Analyses microbiologiques des surfaces réalisées pour avoir une idée sur le niveau de contamination des services de l'hôpital IBN AL KHATEB.
- Identification des microorganismes isolés.

I. Analyse microbiologique des prélèvements à partir des surfaces de l'hôpital IBN AL KHATEB

I.1. Répartition globale des microorganismes isolés au cours des deux cycles

A partir des 128 points de prélèvement de surface répartis sur cinq services de l'hôpital IBN AL KHATIB, nous avons noté une absence totale des bactéries dans 12 points seulement (soit 9,37%) ; alors que 92 points (soit 71,87%) sont exemptes de levures et 67 points (soit 52,34%) ne contiennent aucune moisissure. Ce qui reflète une prépondérance des bactéries par rapport aux champignons dans les surfaces du milieu hospitalier analysées, c'est pour cette raison que nous nous sommes focalisés sur l'identification des bactéries parmi lesquelles : *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas sp.* *Pseudomonas sp.* *Serratia sp.*....

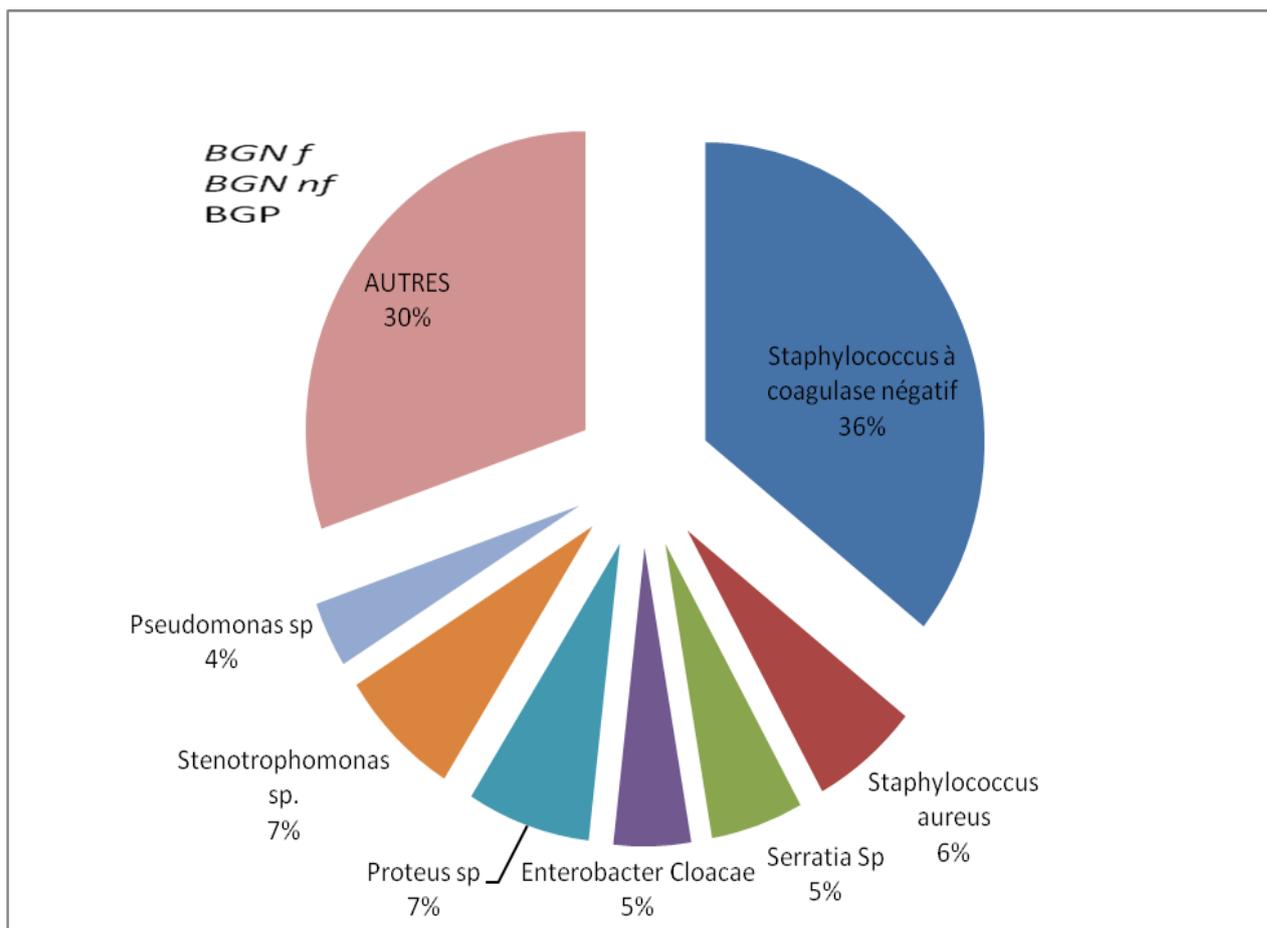


Figure N°4 : Pourcentages des microorganismes isolés à partir des surfaces hospitalières dans les deux cycles

Les staphylocoques à coagulase négatif sont les microorganismes les plus souvent rencontrés dans les points de prélèvement étudiés, avec un pourcentage de 36%, suivis d'autres microorganismes qui constituent 30% y compris les Bacilles Gram Négatif fermentaires, les Bacilles Gram Négatif non fermentaires et les Bacilles Gram positif. Les *Stenotrophomonas sp.* et *Proteus sp* avec un pourcentage de 7%, les *Staphylococcus aureus* à 6% et 5 % d'*Enterobacter cloacae* et de *Serratia sp.* ont été également isolés.

La dominance des Staphylocoques concorde avec une étude, réalisée par *Lemmen et al.* (2004), sur la répartition des bactéries Gram négatif multi-résistantes par rapport à des bactéries Gram positif dans l'environnement inanimé de l'hôpital. Ils ont montré que le degré de contamination de l'environnement par les bactéries Gram positifs multi-résistantes était beaucoup plus étendu que pour les bactéries Gram négatifs multi-résistantes.

La mise en évidence d'un pourcentage élevé des bactéries issues de la flore cutanée humaine telles que les staphylocoques à coagulase négatif et les *Staphylococcus aureus* reflète une activité humaine intense dans les locaux des services étudiés. D'où l'intérêt d'améliorer les conditions hygiéniques du travail.

I.2. Effectifs des microorganismes isolés en fonction du temps

Les microorganismes identifiés sont présentés dans la figure ci-dessous :

Effectifs/point

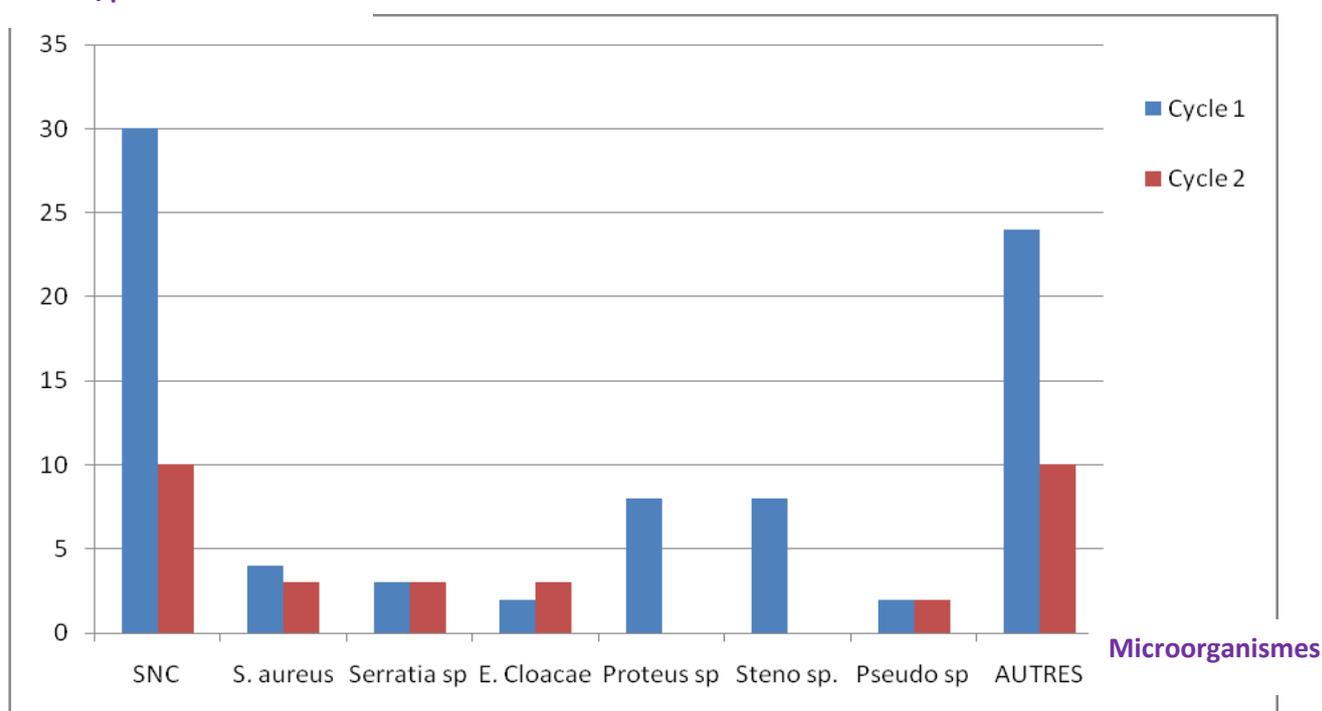


Figure 5 : Répartition des germes isolés dans les deux cycles

La comparaison des microorganismes isolés dans les deux cycles de prélèvements montre une diminution voir une absence de certains germes comme *Proteus sp.* et *Stenotrophomonas sp.* au deuxième cycle, ce qui pourrait être dû à l'amélioration des conditions d'hygiène par le personnel.

I.3. Répartition des microorganismes identifiés en fonction de l'espace

Les bactéries isolées à partir des services étudiés sont représentées par les figures N°6 et N° 7.

➤ **En mois Février**

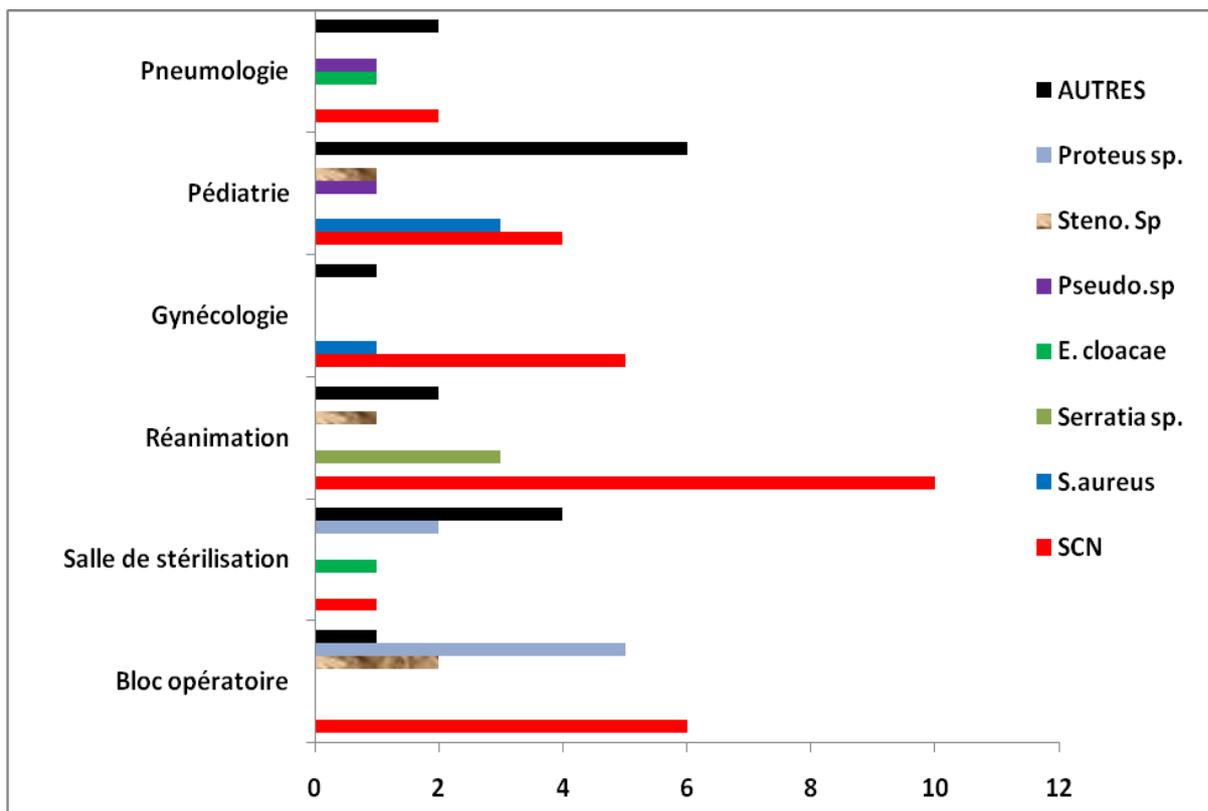


Figure N° 6 : Répartition des microorganismes en fonction des services en mois Février

D'après la figure N°6, on remarque que les staphylocoques à coagulase négatif (SCN) sont prépondérants dans tous les services, suivit de *Proteus sp.* dans le Bloc opératoire central et la salle de stérilisation, après *Serratia sp.* en Réanimation, et de *Staphylococcus aureus* en Gynécologie et en Pédiatrie, aussi les Staphylocoques à coagulase négatif sont suivis de *Pseudomonas sp.* et d'*Enterobacter cloacae* dans le service de Pneumologie.

➤ **En Mois Avril**

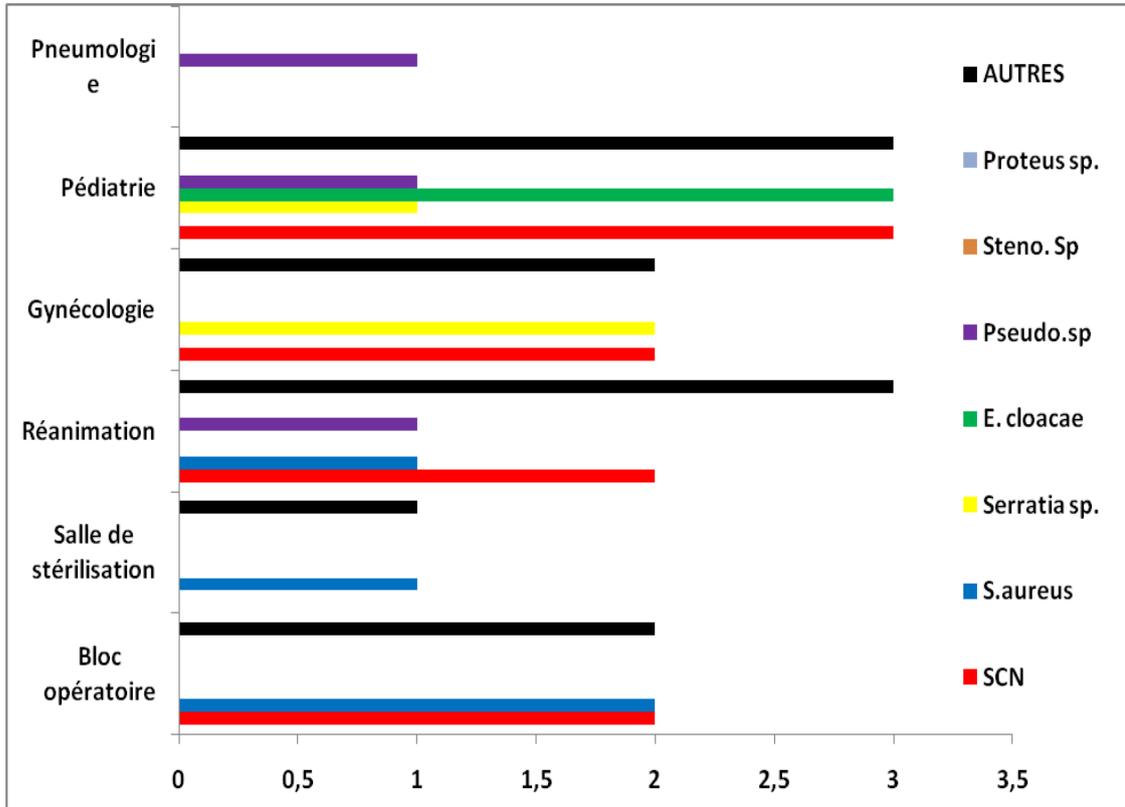


Figure N°7 : Répartition des microorganismes en fonction des services en mois d'AVRIL

En Avril :

- Une prépondérance des staphylocoques à coagulase négatif a été observée dans la majorité des services à l'exception du service de Pneumologie et de la salle de stérilisation.
- Les *Staphylococcus aureus* sont présentes au Bloc opératoire central, Salle de stérilisation et en Réanimation.
- Les *Pseudomonas sp.* sont identifiées en Réanimation, Pédiatrie, et Pneumologie.
- L'*Enterobacter cloacae* n'est rencontré que dans le service de Pédiatrie

II. Identification des microorganismes isolés

En se basant sur la systématique bactérienne du Bergey's manual (Xème édition); nous avons pu identifier les bactéries par les méthodes biochimiques

classiques (catalase, oxydase, fermentation des sucres.....), puis par confirmation sur les galeries Api (20 E et 20 NE). Ainsi, nous avons isolé, purifié et identifié :

- ✓ Staphylocoques à coagulase négatif
- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Serratia sp.*
- ✓ *Enterobacter cloacae*
- ✓ *Proteus sp.*
- ✓ *Stenotrophomonas sp.*
- ✓ *Pseudomonas sp.*
- ✓ Autres
 - Bacille Gram négatif fermentaire
 - Bacille Gram négatif non fermentaire
 - Bacille Gram positif

Le tableau N° 7 représente les différentes espèces bactériennes isolées ainsi que leurs caractères biochimiques.

Tableau N° 7 : Caractères biochimiques des germes isolés et leur identification.

Tests d'identification		Identification des germes isolés						
		<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Stenotrophomonas paucimobilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram		BGN	BGN	BGN	BGN	BGN	BGN	BGN
Oxydase		Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Positive	Positive
Kligler hajna	Glucose	Positive	Positive	Positive	Négative	Positive	Négative	Négative
	Lactose	Négative	Négative	Positive	Négative	Négative	Négative	Négative
	H ₂ S	Négative	Négative	Négative	Positive	Négative	Négative	Négative
	Gaz	Positive	Négative	Positive	Négative	-	Négative	Négative
Urée/ Indole	Urée	Positive	Négative	Positive	Négative	-	Négative	Négative
	Indole	Positive	Négative	Négative	Négative	-	Négative	Négative
Citrate de Simmons		Positive	Négative	Négative	Positive	-	Négative	Négative
ONPG		Positive	Négative	Négative	Positive	-	Négative	Négative
Lysine décarboxylase	LDA	Positive	Négative	-	Négative	-	Négative	-
	LDC	Négative	Négative	-	Négative	-	Positive	-
Mannitol mobilité	Mannitol	Négative	Positive	Positive	Positive	-	Négative	-
	Mobilité	Positive	Positive	Négative	Positive	-	Positive	-
Code API		3305773	0076020	-	5214773	5307763	0467345	1354475

(- : non réalisé)

La plupart des germes isolés sont incriminés dans les infections nosocomiales, d'où la nécessité des conditions hygiéniques ; lavage des mains et la mise en place des procédures de nettoyage.

B. Etude de la sensibilité de certaines souches isolées dans des surfaces de l'hôpital IBN AL KHATEB par aromatoigramme

Pour compléter ce travail, nous avons testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Plectranthus barbatus*, *Citrus limon* et *Juniperus communis* contre certaines souches hospitalières isolées: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia liquefaciens* et *Pseudomonas aeruginosa*. Pour cela, nous avons utilisé la méthode d'aromatoigramme en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour d'un disque de papier filtre contenant l'huile essentielle testée.

Ensuite, nous avons déterminé le pouvoir antibactérien des huiles essentielles en mesurant le coefficient d'activité (A), qui est estimé selon *Haddouchi et al.* (2009) comme suit :

$$A = z^2 / q \text{ avec}$$

$$z^2 = \pi (z^2 / 4)$$

z^2 : la surface d'inhibition ; q : la quantité de l'huile essentielle (en μl) ;

z : le diamètre d'inhibition (cm), diamètre du disque imbibé inclus.

IV. Etude du pouvoir antibactérien de l'HE de *Rosmarinus officinalis*

L'activité antibactérienne in vitro de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* estimée par le diamètre d'inhibition, varie selon les souches bactériennes (Tableau N° 8).

Tableau N° 8 : Effet de l'HE *Rosmarinus officinalis*

<i>Rosmarinus officinalis</i>					
Souches	Méthode du disque diamètres d'inhibition (mm)/ 5 μl				Coefficient d'activité
	1	2	3	M	
<i>S. aureus</i>	34	14	8	18,67	0,56
<i>K.pneumoniae</i>	8	7	8	7,67	0,1
<i>Serratia liquefaciens</i>	7	7	8	7,33	0,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	7	6	6,33	0,06
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	9	10	9	0,12

M: moyenne. 1, 2 et 3: nombres d'expériences

L'activité antibactérienne in vitro de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* estimée par le diamètre d'inhibition, varie selon les souches bactériennes.

L'HE de *Rosmarinus officinalis* a inhibé la croissance des bactéries testées (Tableau N° 7). Cependant, L'activité la plus élevée a été observée contre *S. aureus* avec une zone d'inhibition autour du disque d'environ 18,67 mm. Nos résultats étaient similaires à ceux rapportés par *Jarrar et al.*, (2010) pour la même espèce bactérienne en utilisant la même méthode.

V. Etude du pouvoir antibactérien de l'HE d'*Artemisia absinthium*

L'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* a révélé une activité antibactérienne contre les souches testées (Tableau N° 9).

Tableau N° 9 : Effet de l'HE d'*Artemisia absinthium*

<i>Artemisia absinthium</i>					
Souches	Méthode du disque diamètres d'inhibition (mm)/ 5µl				
	1	2	3	M	Coefficient d'activité
<i>S. aureus</i>	20	32	22	24,67	0,95
<i>K.pneumoniae</i>	18	12	13	14,33	0,32
<i>Serratia liquefaciens</i>	8	8	8	8,00	0,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	7	7	7,33	0,08
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	17	12	13,33	0,27

M: moyenne. 1, 2 et 3: nombres d'expériences

Les résultats du tableau N° 9 montrent que toutes les souches étudiées ont une sensibilité à l'HE d'*Artemisia absinthium*, avec une activité antibactérienne remarquable contre *Staphylococcus aureus* dont le diamètre de la zone d'inhibition est de 24,67 mm, et contre *Klebsiella pneumoniae* dont le diamètre de la zone d'inhibition est de 14,33 mm. La zone d'inhibition obtenue pour *Staphylococcus aureus* est voisine de celle retrouvé par *Mighri et al.* (2010).

VI. Etude du pouvoir antibactérien de l'HE de *Pistacia lentiscus*

L'effet de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* évalué par diffusion sur gélose, varie en fonction des souches, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Serratia liquefaciens* qui ont presque le même diamètre (Tableau N° 10).

Tableau N° 10 : Effet de l'HE de *Pistacia lentiscus*

<i>Pistacia lentiscus</i>					
Souches	Méthode du disque diamètres d'inhibition (mm)/ 5µl				Coefficient d'activité
	1	2	3	M	
<i>S. aureus</i>	25	18	26	23	0,83
<i>K.pneumoniae</i>	0	0	0	0	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	6	6	6	6	0,056
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	7	6	7	0,076
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	9	10	9,33	0,136

M: moyenne. 1, 2 et 3: nombres d'expériences

Dans le tableau N° 10 on remarque une grande activité de *Pistacia lentiscus* contre *Staphylococcus aureus* dont le diamètre d'inhibition est de 23 mm. Ce diamètre est supérieur à celui rapporté par Derwich et al., 2010 qui est de 14 mm.

On remarque une modeste activité contre *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae*, avec des zones d'inhibition de 6 mm, 7 mm et 9,33 mm respectivement (Tableau N° 10).

Pistacia lentiscus n'inhibe pas la croissance de *Klebsiella pneumoniae*. Ce résultat est discordant avec celui de Derwich et al (2010) qui a trouvé une zone d'inhibition de 24 mm pour *K. pneumoniae*.

VII. Etude du pouvoir antibactérien de l'HE de *Citrus limon*

Les souches testés apparaissent plus au moins résistantes au l'HE de *Citrus limon* (Tableau 11).

Tableau N° 11 : Effet de l'HE de *Citrus limon*

<i>Citrus limon</i>					
Souches	Méthode du disque diamètres d'inhibition (mm)/ 5µl				Coefficient d'activité
	1	2	3	M	
<i>S. aureus</i>	16	10	10	12	0,22
<i>K.pneumoniae</i>	0	0	0	0	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	8	8	8,33	0,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	11	12	11,33	0,2

M: moyenne. 1, 2 et 3: nombres d'expériences

Les diamètres des zones d'inhibition générées par *Citrus limon* révèlent une faible activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et

Enterobacter cloacae avec des diamètres d'inhibition de 12 mm, 8,33 mm, et 11,33 mm respectivement (Tableau N°11).

L'HE de *Citrus limon* n'inhibe pas la croissance de *Serratia liquefaciens* et de *Klebsiella pneumoniae*, la résistance de ces deux bactéries Gram négatif pourrait être expliquée par l'incapacité de *Citrus limon* de perturber la barrière de perméabilité de la membrane cellulaire.

Contrairement à nos résultats pour *Klebsiella pneumoniae*, une étude réalisée en INDE a rapporté que la zone d'inhibition de *Klebsiella pneumoniae* est de 16 mm (De Upadhyay et al., 2010). Notons que pour cette étude, il a utilisé un volume de 32 µl pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

VIII. Etude du pouvoir antibactérien de l'HE de *Juniperus communis*

L'activité antibactérienne in vitro de l'huile essentielle de *Juniperus communis* estimée par le diamètre d'inhibition, varie selon les souches bactériennes (Tableau N° 12).

Tableau N° 12 : Effet de l'HE *Juniperus communis*

<i>Juniperus communis</i>					
Souches	Méthode du disque diamètres d'inhibition (mm)/ 5µl				Coefficient d'activité
	1	2	3	M	
<i>S. aureus</i>	23	25	26	24,67	0,95
<i>K.pneumoniae</i>	10	16	9	11,67	0,21
<i>Serratia liquefaciens</i>	10	18	14	14,00	0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0,00	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	14	14	13,33	0,27

M: moyenne. 1, 2 et 3: nombres d'expériences

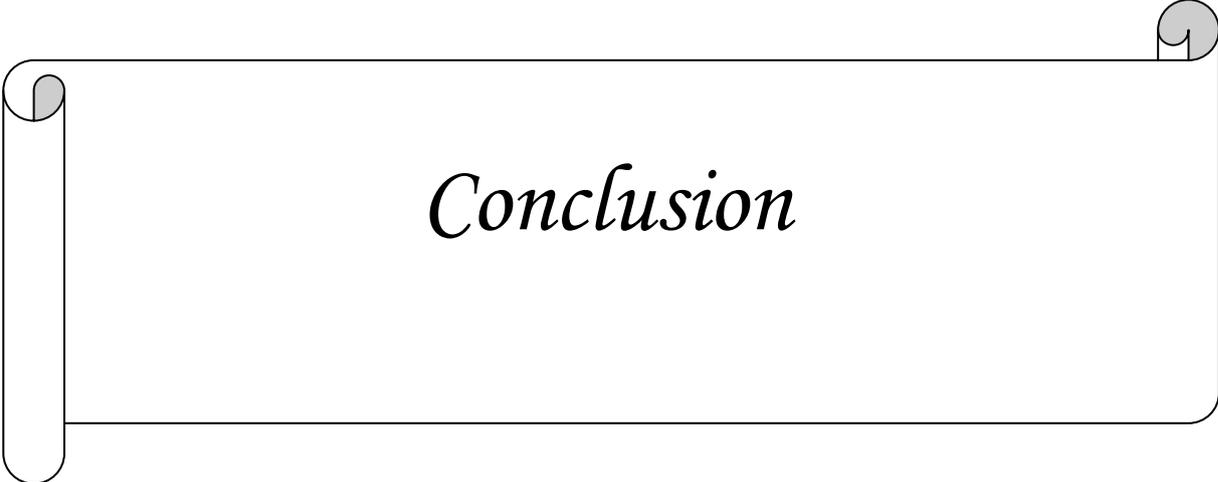
A l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* toutes les souches étudiées ont une sensibilité à l'HE de *Juniperus communis*.

Ces résultats de l'activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* ne rejoignent pas ceux trouvés dans une étude préalable de Panjak et al., (2009) qui a montré une activité de l'HE de *Juniperus communis* contre *Pseudomonas aeruginosa*, alors qu'il n'a aucun effet sur *Klebsiella pneumoniae*.

Globalement, les huiles essentielles testées sont plus efficaces contre les bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus*), que contre les bactéries Gram-négatif (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae*).

La plus grande résistance chez les bactéries Gram négatif, par rapport aux bactéries Gram positifs, pourrait être due à des différences dans les membranes cellulaires de ces groupes bactériens. En effet la membrane externe des bactéries Gram négatif rend leurs surfaces très hydrophobe (*Smith-palmer et al., 1998 ; Prabuseenivasan et al.,2006*). Alors que les extrémités lipophiles des acides lipoteichoïques de la membrane des bactéries Gram positives peuvent faciliter la pénétration par des composés hydrophobes (Cox et al. 2000 ; Ultee et al. 1999)

Ainsi, La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram positif les rend plus sensibles à l'action des huiles essentielles (Burt, 2004).



Conclusion

Conclusion

Les surfaces inertes à l'hôpital constituent des réservoirs microbiens susceptibles de contaminer les personnes hospitalisés directement ou indirectement par l'intermédiaire des dispositifs médicaux ou des mains du personnel. Dans notre étude nous avons évalué la contamination des surfaces du milieu hospitalier en réalisant deux cycles de prélèvement (en Février à partir de 64 points et en Avril au niveau des mêmes sites) dans cinq services considérés comme étant les plus chauds (Bloc opératoire central, Réanimation, Gynécologie, Pédiatrie et Pneumologie).

Les résultats des analyses microbiologiques portant sur 128 points de prélèvements ont montré :

- La présence des Staphylocoques à coagulase négatif dans tous les services, ils constituent 36% des germes isolés, ainsi d'autres microorganismes tels que les *Stenotrophomonas sp.* et *Proteus sp.* (7%), *S. aureus* (6%), *Enterobacter cloacae* et *Serratia sp.* (5%).
- La contamination de tous les services par des germes à risque nosocomiale.
- La diminution des microorganismes dans le deuxième cycle (Avril) par rapport au premier cycle (Février) grâce aux efforts déployés par la Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales et à la volonté de l'administration de l'hôpital.

L'étude de l'effet des huiles essentielles a montré que les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, *d'Artemisia absinthium*, *Pistacia lentiscus*, *Citrus limon* et *Juniperus communis* sont plus efficaces contre les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) que contre les bactéries Gram négatif (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter cloacae*). En effet, *Rosmarinus officinalis*, *d'Artemisia absinthium*, *Pistacia lentiscus*, *Citrus limon* et *Juniperus communis* ont montré des coefficients d'activité respectivement de 0,56, 0,95, 0,83, 0,22 et 0,95.

Annexes (1)

Pour 1000 ml d'eau distillée :

Milieu à la Cétrimide : (BIOKAR DIAGNOSTICS)

Peptone.....	20.0
Chlorure de magnésium.....	1.400
Sulfate de potassium.....	10.00
Cétrimide (bromure de tétradonium).....	0.300
Gélose	15.00
pH = 7.2 + / - 0.2	

Milieu Hajna kligler : (Oxoid)

Extrait de viande de bœuf	3.00
Extrait de levure.....	3.00
Peptone (riche en lysine).....	20.00
NaCl.....	5.00
Citrate ferrique.....	0.30
Thiosulfate de sodium.....	0.30
Lactose	10.0
Glucose	1.00
Rouge de phénol (solution à 1%).....	5 ml
Agar	12.00

Milieu eau peptonée exemple d'indole : (LIOFILCHEM)

Tryptone	10.00
Chlorure de sodium	5.000

pH final : 7.2 + / - 0.2 à 25 ° C

Milieu Clark et Lubs : (Oxoid)

Pastone (IPP).....	10.00
Glucose	10.00
Phosphate bipotassique.....	2.000

Milieu Citrate de Simmons : (Oxoid)

Sulfate de magnésium.....	0.20
Citrate de Na ⁺	2.00
NaCl.....	5.00
Hydrogénophosphate d'ammonium.....	0.20
Hydrogénophosphate d'ammonium monosodique	0.80
Bleu de Bromothymol.....	0.08
Agar.....	15.0

Milieu de King A (PRONADISA)

Peptone de gélatine.....	20.00
Sulfate de potassium anhydre.....	10.0
Chlorure de magnésium anhydre.....	1.40
Agar	13.6

Milieu de King B (PRONADISA)

Polypeptone.....	20.00
Phosphate bipotassique anhydre.....	150
Sulfate de magnésium (7H ₂ O).....	1.50
Agar	14.0

Bouillon cœur-cervelle

protéose-peptone.....	10
-----------------------	----

infusion de cervelle de veau.....	12,5
infusion de cœur de bœuf.....	5
glucose.....	2
chlorure de sodium.....	5
hydrogénophosphate de sodium.....	2,5
PH = 4,7	

Milieu Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	2 g
Hydrolysate de caséine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Agar.....	13 g

EMB (gélose)

Peptone.....	10 g
Lactose.....	10 g
Eosine.....	0.4 g
Bleu de méthylène.....	0,0625 g
Hydrogénophosphate de potassium.....	2 g
Agar	15 g
PH = 6,8	

GELOSE BAIRD-PARKER

Bio-Trypcase.....	10
Extrait de viande de boeuf.....	5
Extrait de levure	2
Chlorure de lithium.....	5
Pyruvate de sodium.....	10
Glycocolle	12
Tellurite de potassium	1 mL

Emulsion de jaune d'oeuf à 10 % 1 mL

Agar..... 15

pH = 7,2

MILIEU MAC CONKEY

Peptone..... 20

Lactose..... 10

Sels biliaires..... 1,5

Cristal violet..... 0.001

Rouge neutre..... 0.05

Chlorure de sodium..... 5

Agar..... 15

pH = 7,1

Gélose pour dénombrement PCA (Plate Count Agar)

Tryptone..... 5

Extrait autolytique de levure..... 2,5

Glucose..... 1

Agar..... 15

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C: 7,0 +/- 0,2.

500 g de poudre permettent de préparer 21 ,2 litres de milieu.

Gélose Chapman

Peptone..... 10

Extrait de viande de bœuf..... 1

Chlorure de sodium..... 75

Mannitol..... 10

Rouge de phénol..... 0.025

Agar-Agar..... 15

pH = 4,7

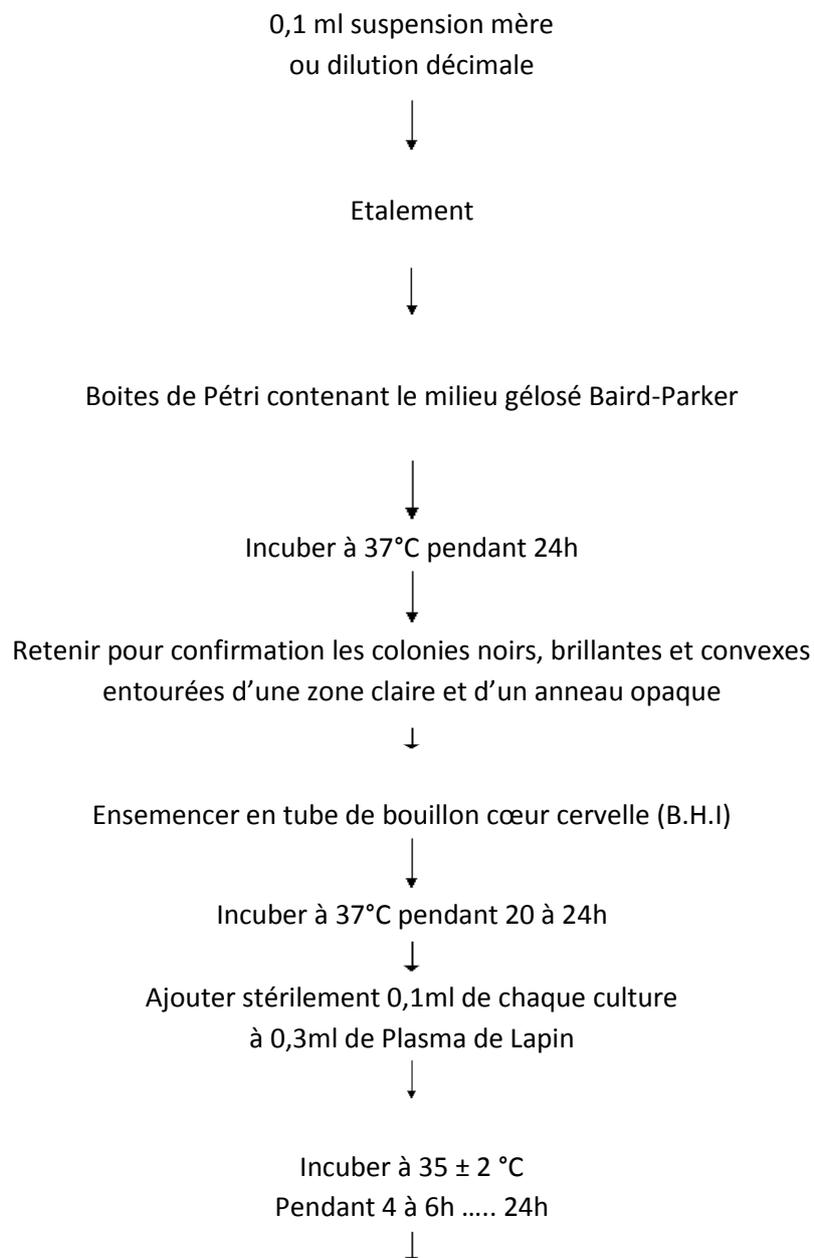
Gélose de Sabouraud

Peptone.....	10
Glucose massé.....	20
Agar-agar.....	15
vitamines et facteurs de croissance.....	

pH = 6

Annexes (2)

Dénombrement de *Staphylococcus aureus* Méthode par comptage de colonies



La coagulation est positive quand le coagulant occupe plus de trois quart du volume

Références Bibliographiques

Adjidé CC., De Meyer A., Weyer M., Obin O., Lamory F., Lesueur C., Trouillet L., Biendo M., Ganry O., F. Eb (2010). La mise au point d'un milieu sensible, spécifique et prédictif de recherche de *Stenotrophomonas maltophilia* dans l'environnement des soins. Pathologie Biologie 58 11–17.

Al Akoum M., Duprat S., Lidove A., Rundstadler Y. (2004). Modélisation aéraulique de salles d'opération. ITBM-RBM 25 107–112

Amazian K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki S., Dhidah L., Abdelmoumène T., Fabry J. et les membres du réseau NosoMed, (2010). Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne). Volume 16 No.10 October

Angione A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. J. Agric. Food Chem. **54** ; pp. 4364–4370.

Barbut F., Neyme D. (2006). Les difficultés d'interprétation des contrôles microbiologiques environnementaux. Revue Francophone des Laboratoires, N° 382.

Berche P., Gaillard JL., Simonet M. (1991). Bactériologie « les bactéries des infections humaines » chapitre 5 (Les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention) page : 64. Ed. Médecine science Flammarion.

Bérézin BE., Joly-Guillou ML., Vieu-f JF. (1987). Epidemiology of nosocomial infections due to *Acinetobacter calcoaceticus*. Journal of Hospital Infection 10, 105-1 13

Bertrand X., Blasco G., Belle E., Boillot A., Capellier G., Talon D. (2003). Importance de la transmission croisée dans l'épidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa* en service de soins intensifs. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 22 ; 505–509

Betts TJ. (2001). Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. Journal of Chromatography A, 936 ; 33–46

Billerbeck VG., Roques C., Vanière P., Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Hygiènes - 2002 - Volume X - N°3

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisier. 3^{ème} édition.

Buisson Y., Tran Van Nhieu G., L. Ginot, P. Bouvet, H. Schill, L. Driot and M. Meyran (1990). Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant tobramycin-sensitive *Acinetobacter* species: correlation with amikacin usage. Journal of Hospital Infection ;15, 83-93.

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review International Journal of Food Microbiology 94; 223 – 253

Buxton C., Matthew B., Kuehnert J., Hall CB. (2003). Transmission of Influenza: Implications for Control in Health Care Settings. Clinical Infectious Diseases; 37:1094–1101

Hartemann P., Eblech M., Simon L. (1997). Les contrôles microbiologiques de l'environnement hospitaliers. Revue française des laboratoires, Revue française des laboratoires, mars 1997, N ° 291 43

Castola V., Bighelli A., Casanoval J. (2000). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. Biochemical Systematics and Ecology 28, 79-88

Cavallo JD., Garrabé É. (2003). Outils du diagnostic biologique des infections urinaires nosocomiales (IUN) : analyse critique. Médecine et maladies infectieuses 33 ; 447–456

Cox SD., Mann CM., Markham JL., Bell HC., Gustafson JE., Warmington JR.; Wyllie SG. (2000). Le mode d'action antimicrobienne de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (huile d'arbre à thé). Journal de la microbiologie appliquée 1364-5072.

Derwich E., Manar A., Benziane Z., Boukir A. (2010). GC/MS Analysis and In vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Leaf of *Pistacia lentiscus* Growing in Morocco. World Applied Sciences Journal 8 (10): 1267-1276

Develoux M., Bretagne S. (2005). Candidiasis and yeast infections. EMC-Maladies Infectieuses 2 ; 119–139.

El Rhazi, Elfakir S., Berraho M., Tachfouti N. (2007). Prévalence et facteurs de risque des infections nosocomiales au CHU Hassan II de Fès (Maroc). Revue de santé de la Méditerranée Orientale, Vol.13, No 1 ; 56-63.

Gangneux JP., Bousseau A., Cornillet A., Kauffmann-Lacroix C. (2006). Maîtrise du risque fongique environnemental dans les établissements de santé. Journal de Mycologie Médicale 16 , 204–211

Ghalem BR., Mohamed B. (2008). Contribution to the Antiseptic Effect Study of Two Eucalyptus Species. Advances in Natural and Applied Sciences, 2(3): 170-177, 2008

Guide d'ARECLIN (Juin 2001). Prélèvements d'environnement dans les établissements de santé : Modes opératoires.

Habzi A., Benomar S. (2001). Les infections nosocomiales néonatales. J Pédiatre Puériculture ; 14:419-24

Haddouchi F., Lazouni H., Meziane A., Benmansour A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Afrique Science 05(2) (2009) 246 – 259

Hota B. (2004). Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization: Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? Clinical Infectious Diseases; 39:1182–9

Hygis N. (1998). Hygiène hospitalière, chapitre « les flores de l'environnement humains »

Jarrar N., Abu-Hijleh A., Adwan K. (2010). Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Asian Pacific Journal of Tropical Medicine; 121-123

Jiang Y., NanWu, Yu Jie-Fu , WeiWang, MengLuo,Chun-JianZhao , Yuan-GangZu, Xiao Lei-Liu. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environmental toxicology and pharmacology

Joly-Guillou ML., Bergogne-Berezin E., Vieu JF. (1990). A study of the relationships between antibiotic resistance phenotypes, phage-typing and biotyping of 117 clinical isolates of *Acinetobacter sp.* *Journal of Hospital Infection* 16, 49-58.

Juteau F.; Masotti V., Bessiere J., Dherbomez M., Viano J., (2002). Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia* 73 :532–535

Kramer A., Schwebke I., Kampf G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:130

Kusumaningrum HD., Riboldi G., Hazeleger WC., Beumer RR. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* 85 ; 227–236

Lamarti A., Sadki I., Badoc A., Deffieux G, Carde JP. (1996). Obtention par culture in vitro de clones d'absinthe, *Artemisia absinthium* L., dénués de thuyone. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 135, 25-43

Lardry JM., Haberkorn V. (2007). Les huiles essentielles: principes d'utilisation. *Kinesither Rev*; (61):18-23.

Lemmen SW., Hafner H., Zolldann D., Stanzel S., Luttkicken R. (2004). Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal of Hospital Infection* 56, 191–197

M'boup S., Gr1mont F., David MP., Boyle CS., Cisse MF., Gay A., Thioye DI., Denis F., Correa P., Samb A. (1990). Etude épidémiologique d'infections néonatales sévères à *Serratia marcescens* en zone tropicale. *Méd Mal Infect.* ; 20: 542- 5.

Mi Kyong Joung, Ki Tae Kwon, Cheol-In Kang, Hae Suk Cheong, Ji-young Rhee, Dong Sik Jung, Seung Min Chung, Jeong A. Lee, Soo-youn Moon, Kwan Soo Ko, Doo Ryeon Chung, Nam Yong Lee, Jae-Hoon Song, Kyong Ran Peck. (2010). Impact of inappropriate antimicrobial therapy on outcome in patients with hospital-acquired pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Infection* ; 61, 212e218

Mighri H., Hajlaoui H., Akrouf A., Najjaa H., Neffati M. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *C. R. Chimie* 13 (2010) 380–386

Montès N., Bertaudière-Montes V., Badri, El.H. Zaoui W., Gauquelin T. (2002). Biomass and nutrient content of a semi-arid mountain ecosystem: the *Juniperus thurifera* L. woodland of Azzaden Valley (Morocco). *Forest Ecology and Management* 166 ; 35–43

Norme française NF V 08-037 (mai 2003): « Microbiologie des aliments – Surfaces d’environnement agro-alimentaire – Prélèvement d’échantillons destinés à l’analyse microbiologique ».

Norme ISO 18593 (juin 2004) : « Microbiologie des aliments – Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d’écouvillons ».

Nour M., Mastouri M., Ben Nejma M. (2005). Le staphylocoque doré résistant à la méticilline : émergence et bases moléculaires de la résistance. *Pathologie Biologie* 53 ; 334–340

OMS (2006). Rapport de situation sur 22 pays participant à la campagne « A bonne hygiène, bons soins-un soin propre est un soin plus sûr »

Pankaj K., Prasad R., Harish C.; Bhatt RP. ; Sati, OP. (2009). In-vitro antibacterial activity of *Juniperus communis* L. against bacterial pathogens. *Environment Conservation Journal* Vol. 10 No. 3 pp. 101-104

Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., José Gonçalves M., Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C., Palmeira A., Rodrigues A. J. Martinez-de-Oliveira. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1367–1373

Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:39

Programme des aliments d'origine végétale (2010). Programme de surveillance de l'hygiène des entreprises : Écouvillonnage de contrôle de l'efficacité des mesures d'assainissement.

Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. (2010). Potentail of Coriander (*Coriandrūn sativum*) oil as a natural antimicrobial compound in controlling campylobacter jejuni in Raw Meat. Biosci, Biotechnol, Biochem, 74 (1), 31-35

Reboux G., Bellanger AP., Roussel S., Grenouillet F., Millon L. (2010). Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. Revue française d'allergologie 50 ; 611–620.

Roman P. (2011). Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against of the pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Fabricius) adults. Industrial Crops and Products

Rouillon S., Ourdanabia S., Jamart S., Hernandez C., Meunier O. (2006). Susceptibility of the hospital environmental bacterial strains to a detergent and disinfectant product for surfaces. Pathologie Biologie 54 ; 325–330

Rundstadler Y., Di majo P. (2002). Lutter contre la contamination au bloc opératoire. ITBM-RBM 2002 ; 23 : 180- 185

Siegenthaler W., Luthy R. (1978). Current chemotherapy. Proceeding 10th international congress of chemotherapy.II. Washington DC, Am. Soc. Microbiol,

Silou T., Malanda M., Loubaki L. (2004). Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce a un plan factoriel complet. Journal of Food Engineering 65 ; 219–223

Silva J., Abebe W., Sousa SM., Duarte VG., Machado MI., Matos FJ. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. Journal of Ethnopharmacology 89; 277–283.

Silvia L., Munoz-Price M.D., Robert A., Weinstein, MD. (2008). *Acinetobacter* Infection. N Engl J Med ;358:1271-81.

Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology, 26, 118–122

Sonja M., Schoenfelder K., Lange C., Eckart M., S.Hennig S., Kozytska S., Ziebuhr W. (2010). Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *International Journal of Medical Microbiology* 300 ; 380–386

Squinazi F. (2006). Analyses en microbiologie - Environnement microbien (air, surfaces, eau).

Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé 2002. Air, eaux et surface. Ministère de la Santé, de la Famille et des Personnes Handicapées. Comité Technique des Infections Nosocomiales,

Szumny A., Figiel A., Ortizet A., Ángel A., Barrachina C. (2010). Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering* 97, 253–260

Tattawasart U., Maillard JY., Furr JR., Russel AD. (1999). Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect*; 42:219–29.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90, 333–340

Tiran-Rajaofera I., Sampériz S., Trouilloud C., Pilorget H., Montbrun A., Attali T., Alessandri J.L. (2001). Cathéters épicutanéocaves 27 gauge : utilisation chez les nouveau-nés de très faible poids de naissance et les grands prématurés dans un service de réanimation néonatale. *Arch Pédiatre* 2001 ; 8 : 816-23

Ultee A., Kets EPW., Smid (1999). Mécanismes d'action du carvacrol sur *Bacillus cereus*. *Applied And Environmental Microbiology* p. 4606–4610

Upadhyay RK., Dwivedi P., Shoeb A., (2010). Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils against Pathogenic Bacterial Strains. *Asian Journal of Medical Sciences* 2 (3): 1 5 2 - 1 5 8

Vazquez JA., Dembry LM., Sanchez V., Vazquez MA., Sobel JD., Dmuchowski C., Zervos MJ. (1998). Nosocomial *Candida glabrata* Colonization: an Epidemiologic Study. *Journal of clinical microbiology*, p. 421–426.

Vincenot F., Saleh M., Prévost G. (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires*

Werry C., Lawrence JM., Sanderson PJ. (1988). Contamination of detergent cleaning solutions during hospital cleaning. *Journal of Hospital Infection* (1988) 11, 44-49

Wright J. (1995). Essential oils. *In* Ashurst PR (Ed) *Food flavorings*. Blackie Academic and Professional Edition.

Zahlane K., Sahnoune I., Boukachabine Kh., Goumi A. (2008). Approach of fungi biocontamination in hospital: Transverse inquiry carried out on an intensive care new born unit. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 2, N°1*, pp: 27-40.

Zhang J., Jo Jurriaan van Aartsen , Xiaofei Jiang, Yucheng Shao, Cui Tai, Xinyi He, Zhilei Tan, Zixin Deng, Shiru Jia, Kumar Rajakumar, Hong-Yu Ou (2010). Expansion of the known *Klebsiella pneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands integrated into tmRNA gene sites. *Journal of Microbiological Methods* 84; 283–289