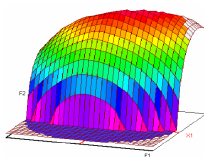


Année Universitaire : 2013-2014



Master Sciences et Techniques CAC Agiq
Chimiométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion
industrielle de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles
essentielles, sur des germes isolés de l'environnement
d'hémodialyse de l'hôpital Al Ghassani, et criblage des
facteurs influençant cette activité par les plans
d'expérience

Présenté par:

♦ M^{elle} CHAHBI Asmae

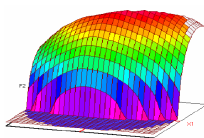
Encadré par:

♦ Dr. Sanae BERRADA	LRDEHM
♦ Dr. Abdelhakim ELOUALI LALAMI	LRDEHM
♦ Mr. Elhadi LAMCHARFI	FSTF

Soutenu Le 17 Juin 2014 devant le jury composé de:

- Dr. S.BERRADA	LRDEHM
- Dr. A.ELOUALI LALAMI	LRDEHM
- Mr. E.LAMCHARFI	FSTF
- Mr. M.ELHADRAMI	FSTF
- Mr. F.OUAZZANI	FSTF

Stage effectué au : Laboratoire Régional De Diagnostic Epidémiologique Et D'hygiène Du Milieu



Master ST CAC Agiq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: Chahbi Asmae

Année Universitaire : 2013/2014

Titre: Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles, sur des germes isolés de l'environnement d'hémodialyse de l'hôpital Al Ghassani, et criblage des facteurs influençant cette activité par les plans d'expérience

Résumé

Vecteurs de contamination, les milieux de l'environnement hospitalier disséminent les micro-organismes à de longue distance, et contribuent insidieusement à leur transmission à divers supports inertes. Les infections ainsi favorisées peuvent être réduites par la maîtrise de l'environnement et la mise en place d'une bonne stratégie de désinfection.

En raison de l'augmentation à l'échelle mondiale de la résistance des bactéries aux molécules synthétiques, nous avons réalisé cette étude au sein du LRDEHM, dont les objectifs principaux étaient d'évaluer l'action antibactérienne de molécules naturelles (huiles essentielles) et d'optimiser les facteurs influençant cette activité.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de 7 huiles essentielles « *Thymus vulgaris*, *Origanum majourana*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Lavandula officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Juniperus thurifera*, *Juniperus phoenicea* » a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, sur 35 souches isolées de l'environnement d'hémodialyse (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase négatif*, *Streptococcus*, *Bacillus sp*, Bacilles Gram négatif oxydase positive, Bacilles Gram négatif oxydase négative fermentaires et non fermentaires). Elle a montré que une inhibition de la croissance bactérienne de la majorité des souches testées avec des pourcentages de sensibilités variant de : 20% à 100%. La détermination de la CMI a révélé une variation en fonction de l'huile, la CMI minimale était de 200mg/ml (pour les bacilles Gram positif oxydase positive), la CMI maximale de 0.99 mg/ml (pour les *Bacillus sp* et les bacilles Gram négatif oxydase négative non fermentaire).

L'optimisation des facteurs influençant l'activité antibactérienne des HEs, a montré que l'huile de *thymus vulgaris* diluée dans DMSO, utilisée en absence de lumière, à une température de 10°C et une humidité de 70%, permet d'obtenir la meilleure activité antibactérienne.

Il serait recommandé de : Désinfecter l'environnement hospitalier (air, surface,..) selon un protocole établi suite à des recherches scientifiques, permettant de réduire aussi bien le risque infectieux que la résistance des germes.

Mots clés : Huile essentielle, activité antibactérienne, infection nosocomiales, plans d'expérience, LRDEHM, Fès, Maroc.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail



A l'âme de mon père

Vous avez fait d'énormes sacrifices pour vos enfants et vous n'avez jamais cessé de nous prodiguer des conseils pour le droit chemin. Que votre simplicité, votre disponibilité, et votre respect pour les autres me servent d'exemples. Que ce modeste travail soit l'expression de mon amour éternel.



A ma mère et mes frères

Pour leur véritable et sincère amour. Je leur souhaite, une vie pleine de succès avec beaucoup de bonheur,



A mon fiancé et sa famille

Pour leur soutien et leur contribution à la réalisation de ce travail



A mes formateurs

Qui m'ont dirigé vers le chemin de succès par leur compréhension et leur conseil. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de mes profondes reconnaissances et ma grande estime.



A tous mes amis (e) et collègues

Pour les moments forts et agréables que nous avons passés ensemble, à tous ceux qui m'aiment et me souhaitent le bonheur et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et à l'élaboration de ce rapport.

Remerciements

Au terme de ce travail, j'ai le plaisir d'exprimer mes profonds remerciements et ma sincère gratitude à toutes les personnes qui m'ont soutenue pour réaliser ce travail et envers qui je me sens reconnaissante de m'avoir appris tant de choses et m'ayant offert les conditions optimales de travail.

J'adresse mes vifs remerciements et ma gratitude :

Au Dr AMRAOUI Allal, directeur régionale de la sante à la région Fès Boulomane.

A Mr ZOUAK le doyen de la Faculté des Sciences Techniques, ainsi qu'à tous mes enseignants.

Au Dr EL OUALI LALAMI Abdelhakim, responsable du laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de m'avoir accepté et aidé pour effectuer mon stage de fin d'études au sein du laboratoire.

A mon encadrant de stage de stage Dr BERRADA Sanae, responsable qualité du laboratoire pour la qualité de l'encadrement scientifique et méthodologique dont elle m'a bénéficié avec un suivi d'une grande rigueur intellectuelle, je ne pourrais jamais cesser de lui dire merci.

Pr LAMCHARFI Elhadi de m'avoir encadrée et accompagnée tout au long de cette expérience professionnelle avec beaucoup de patience et de pédagogie.

Au Chef de Filière Mr. M.ELHADRAMI pour sa sympathie, son soutien et son aide pour que nos stages se déroulent dans des bonnes conditions.

Au Pr M. ELHADEAMI et Pr F. OUZZANI d'avoir accepté de juger ce travail.

A Mr SABREI Hamid coordonnateur du LRDEHM, ainsi qu'à tous les membres du LRDEHM-Fès d'avoir contribué au bon déroulement de mon stage, aussi bien pour leur aide que pour leur convivialité.

A Mr EZZOUBI Yassine, pour son aide que pour sa sympathie

Je suis très reconnaissante à votre aptitude.

Merci



Sommaire

Dédicaces.....	i
Remerciements.....	ii
Liste des abréviations.....	vi
Illustrations des tableaux et figures.....	vii
Présentation du LRDEHM	ix
Introduction générale.....	1
Revue bibliographique.....	2
I. Les Infections nosocomiales.....	2
A- Définition	2
B- Généralités.....	2
C- Modes de transmission d'infection nosocomiale.....	3
D- Facteurs favorisant les infections nosocomiales.....	3
E- Germes en cause.....	4
F- Caractères généraux des bactéries de l'environnement hospitalier.....	4
1- Bactéries à Gram négatif.....	4
2- Bactéries à Gram positif	5
G- Conséquences des infections nosocomiales.....	6
H- Risque infectieux en hémodialyse.....	6
1- Causes	6
2- Epidémiologie de l'infection nosocomiale en hémodialyse.....	6
3- Prévention des infections nosocomiales en hémodialyse	8
II. Les huiles essentielles.....	9
A- Définition	9
B- Historique d'utilisation des huiles essentielles	9
C- Localisation, Fonction et Répartition	9
D- Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	10
1- Propriétés physiques.....	10
2- Composition chimique.....	10
E- Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles.....	11
1- Les facteurs intrinsèques.....	11
2- Les facteurs extrinsèques.....	11
F- Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	11
1- Hydro-distillation	11
2- Distillation à vapeur saturée	12
3- L'hydro-diffusion	12
4- <i>Expression ou pressage à froid</i>	12
5- Enfleurage	12
6- Extraction par du CO ₂ supercritique	13
7- Extraction assistée par Micro-ondes	13



G- Les différentes techniques d'analyse des huiles essentielles	14
1- La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	14
2- Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM).....	14
H- Les activités biologiques des huiles essentielles.....	15
1- <i>Activité antimicrobienne</i>	15
2- <i>Mécanisme d'action</i>	16
I- Les techniques d'études du pouvoir antibactérien des huiles essentielles	16
1- Techniques en milieu liquide.....	16
2- Techniques en milieu solide.....	17
III.Données botaniques et pharmacologiques des plantes étudiées	18
1- <i>Thymus vulgaris</i>	18
1-1 Historique	18
1-2 Origine et culture	18
1-3 Usage traditionnel et médicinal	18
1-4 Composition chimique	19
1-5 Toxicologie	19
2- <i>Lavandula officinalis</i>	19
2-1 Historique et origine	19
2-2 Usage traditionnel et médicinal.....	20
2-3 Composition chimique	20
2-4 Toxicologie	21
3- <i>Cymbopogon citratus</i>	21
3-1 Historique et origine	21
3-2 Usage traditionnel et médicinal.....	21
3-3 Composition chimique	21
3-4 Toxicologie	22
4- <i>Origanum majorana</i>	22
4-1 Historique et origine	22
4-2 Usage traditionnel et médicinal	23
4-3 Composition chimique	23
4-4 Toxicologie	23
5- <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	23
5-1 Historique et origine	23
5-2 Usage traditionnel et médicinal.....	24
5-3 Composition chimique	24
5-4 Toxicologie	24
6- <i>Juniperus phoenicea</i>	25
6-1 Historique et origine	25
6-2 Usage traditionnel et médicinal.....	25
6-3 Composition chimique	25
6-4 Toxicologie	25
7- <i>Juniperus thurifera</i>	26



7-1 Historique et origine	26
7-2 Usage traditionnel et médicinal.....	26
7-3 Composition chimique	26
7-4 Toxicologie	26
IV. Généralité sur les plans d'expérience	27
1- Définition.....	27
2- Conception	27
3- La formule du problème	27
4- La modélisation des plans d'expériences	27
5- Domaine expérimental d'intérêt	28
6- Domaine d'application.....	28
7- Les avantages de la méthode par rapport à une méthode d'expérimentation traditionnelle.....	28
8- Les différents types des plans d'expériences	29
Matériels et méthodes.....	30
1- Type et période d'étude	30
2- Lieu d'étude	30
3- Analyse des données recueillis.....	30
4- Evaluation de l'activité antibactérienne et détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles	30
4-1- Matériel	30
4-2- Méthodes.....	32
5- Optimisation des facteurs permettant de réduire les infections nosocomiales.....	33
5-1- Plan de criblage	33
5-2- Matériels	33
5-3- Démarche méthodologique	33
Résultats et discussion.....	35
A- Analyse des données recueillies.....	35
B- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	37
C- Détermination de la concentration minimale inhibitrice : CMI	44
D- Optimisation des facteurs permettant d'améliorer l'activité antibactérienne des huiles essentielles ayant prouvé une efficacité élevée	46
Conclusion et perspective.....	53
Annexes	x
Références bibliographique.....	xix
Résumé.....	



Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

BGN : Bacilles gram négatif

BGNONF : Bacilles gram négatif oxydase négative fermentaire

BGNONNF : Bacilles gram négatif oxydase négative non fermentaire

BGP : Bacilles gram positif

BGPOP : Bacilles gram positif oxydase positive

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Dimethyl sulfoxyde.

DO : Densité optique.

DRS : Direction Régionale de la Santé

FST : Faculté des sciences et technique

HEs : Huiles essentielles

IN : infection nosocomiale

LRDEHM : Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu

ml : millilitre

MS : Ministère de la Santé

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standard

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Oxydase N : oxydase négative

Oxydase P : oxydase positive

PAM : plantes aromatiques et médicinales



S. aureus: *Staphylococcus aureus*

St.A : *Staphylococcus aureus*

S. non pathogènes: *Staphylococcus non pathogènes*

S.A.R.M : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline



Liste des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : schéma des étapes de l'hydrodistillation	12
Figure 2 : Schéma du système d'extraction CO ₂ des solides	13
Figure 3 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes.	14
Figure 4 : Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri	17
Figure 5 : La formule du problème	27
Figure 6 : Emplacement des points expérimentaux dans le domaine expérimental..	28
Figure 7 : Fréquence d'utilisation des huiles essentielles.....	35
Figure 8 : Distribution des types des huiles essentielles utilisées	36
Figure 9 : Distribution du motif d'usage des huiles essentielles	36
Figure 10 : Propriétés des huiles essentielles connues par les participants	37
Figure 11 : % de sensibilité des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis des huiles essentielles testées	39
Figure 12 : % de sensibilité des souches de <i>Staphylococcus</i> coagulase négative vis-à-vis des huiles essentielles testées.....	40
Figure 13 : % de sensibilité des souches de Bacilles Gram négatif oxydase positive vis-à-vis des huiles essentielles testées.....	41
Figure 14 : % de sensibilité des souches bacilles Gram négatif oxydase négative fermentaire vis-à-vis des huiles essentielles testées.....	41
Figure 15 : % de sensibilité des souches de bacilles Gram négatif oxydase négative non fermentaire vis-à-vis les huiles essentielles testées	42
Figure 16 : % de sensibilité des souches de <i>Bacillus sp</i> vis-à-vis les huiles essentielles testées.....	43
Figure 17 : % de sensibilité des souches de <i>Streptococcus</i> non pathogènes vis-à-vis des huiles essentielles testées.....	43



Figure 18 : Etude graphique des effets de la réponse Y1- activité antibactérienne de M36.....48

Figure 19 : Etude de la réponse Y1 - Activité antibactérienne de M36.....48

Figure 20 : Etude graphique des effets de la réponse Y1 : Activité antibactérienne de G1849

Figure 21 : Etude de la réponse Y2 : activité antibactérienne G18.....50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau des souches bactériennes31

Tableau 2 : Domaine expérimentale33

Tableau 3 : Diamètres d'inhibition et sensibilité globale aux huiles essentielles vis-à-vis de toutes les bactéries testées.....38

Tableau 4: Concentration minimale inhibitrice de *Genévrier thurifère*44

Tableau 5 : Concentration minimale inhibitrice de *Lavandula officinalis*45

Tableau 6 : Concentration minimale inhibitrice d'*Origanum majorana*45

Tableau 7 : Concentration minimale inhibitrice *Thymus vulgaris*46

Tableau 8 : Domaine expérimental47

Tableau 9 : Plan d'expérience.....47

Tableau 10 : Application des résultats de l'optimisation51



L'hôpital est un lieu où l'on traite, mais c'est également un lieu où l'on peut contracter des maladies infectieuses [1]. En hémodialyse, l'immunodéficience des patients, les circonstances d'exposition au sang, l'environnement contaminé, font accroître le risque infectieux en le rendant la 2ème cause de morbidité et de mortalité après les accidents cardio-vasculaires [2].

En France, l'incidence des infections bactériennes notée en 2003, était de 5,7 infections pour 100 mois de dialyse. En outre, les bactériémies sont responsables de plus de 70 % des décès par infection. Les taux varient entre 8,4 et 16,9/100 patients /année (soit 0,7 à 1,4/100 patient-mois) et sont de l'ordre de 0,92 cas pour 1 000 séances de dialyse [3].

Vecteurs de contamination, les milieux de l'environnement hospitalier disséminent les micro-organismes à de longue distance, et contribuent insidieusement à leur transmission à divers supports inertes [4].

Si l'éradication de ces infections est impossible du fait que le risque de contracter de telles infections ne peut jamais être nul, la réduction peut se baser sur la maîtrise de l'environnement, et exige d'instaurer une démarche de prévention se basant notamment sur des aspects organisationnels et techniques, le contrôle et la désinfection rigoureux [5].

Pour assurer un statut hygiénique de l'environnement (équipements, l'air, surfaces), des traitements de désinfection se basent sur l'utilisation de procédés physiques (UV, traitement thermique...) et sur des agents chimiques. L'efficacité de ces agents varie d'une application à une autre et d'un type de produit à l'autre...[6].

L'augmentation de la résistance des bactéries à diverses molécules synthétiques et chimiques telles que les antibiotiques et les détergents, constitue une menace réelle puisque leur efficacité décroît au fil du temps et ils ne sont plus considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves.

De ce fait, les traitements à base de plantes deviennent le centre d'intérêt des chercheurs scientifiques qui tentent d'ores et déjà de trouver des alternatives efficaces et accessibles à partir de produits naturels extraits de plantes médicinales et aromatiques qui connaissent de nos jours un regain d'intérêt et jouissent d'une popularité grandissante [7].

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre sujet de recherche intitulé :

« Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur des germes isolés de l'environnement d'hémodialyse de l'hôpital Al Ghassani et criblage des facteurs influençant cette activité par les plans d'expérience »

Les objectifs de ce travail étaient de :

- Réaliser une enquête d'évaluation portant sur l'utilisation des huiles essentielles/ plantes aromatiques ;
- Evaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur des germes préalablement isolés de l'environnement d'hémodialyse ;
- Déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) ;
- Cribler les facteurs influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles ayant prouvé une efficacité élevée, par la méthodologie des plans d'expériences.



I- Les infections nosocomiales

A- Définition

L'adjectif « nosocomial » vient du grec : *nosos*=maladie, *komein*= soigner, «*nosokomeion* », signifiant « hôpital ». Il désigne selon le dictionnaire (Le Robert) ce qui se rapporte à l'hôpital, et selon le dictionnaire (Littre) ce qui est relatif aux hôpitaux.

Au sens courant, l'infection nosocomiale est une infection contractée dans un établissement de santé [8].

Selon l'OMS, une infection nosocomiale ou infection hospitalière peut être définie comme étant une infection survenant à l'hôpital ou dans un autre établissement de santé, chez un patient admis pour une raison autre que cette infection et chez qui cette infection n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission. Cette définition inclut les infections contractées à l'hôpital mais qui se déclarent après la sortie, et également les infections professionnelles parmi le personnel de l'établissement. Le délai entre l'admission et le début de l'infection doit être de 48-72 heures pour les infections bactériennes et varie selon la période d'incubation ; il peut être plus long en cas d'infections virales. Il est admis d'exclure les infections materno-foetales survenant dans les 48 premières heures de vie. [9, 10, 11].

B- Généralités

Le caractère nosocomial est basé essentiellement sur le délai écoulé entre l'admission et le début de l'infection. Ce délai doit être supérieur à la durée d'incubation de l'infection. L'infection nosocomiale survient :

- Après les 48 premières heures d'hospitalisation : le délai de 48 h correspond à la durée d'incubation minimum d'une infection aiguë liée à une bactérie à croissance rapide,

- Dans les 30 jours après intervention chirurgicale (si chirurgie),
- Dans l'année qui suit la mise en place de matériel chirurgical (implant ou prothèse...).

L'infection peut se déclarer pendant le séjour à l'hôpital ou après la sortie de l'hôpital [12].

L'infection nosocomiale peut être : bactérienne, virale, parasitaire, fongique, à prions.... et cliniquement ou microbiologiquement identifiable, contractée dans une structure de soins, pouvant concerner soit le malade, soit le personnel soignant du fait de son activité [9].

Elle peut être localisée et/ou, généralisée :

- L'infection localisée :

Elle se développe habituellement à partir de points d'appel facilement identifiables :

- Après une intervention chirurgicale ;
- A partir d'un matériel étranger, par exemple une infection urinaire sur sonde, ou une otite ou sinusite après intubation naso-trachéale ;
- Suite à une défaillance organique tardivement traitée, par exemple un trouble de la déglutition peut être responsable d'une pneumopathie s'il n'est pas prévenu par une protection des voies aériennes supérieures, ou un drainage suffisant des sécrétions trachéo-bronchiques.
- L'infection généralisée ou septicémie :



Elle est habituellement secondaire à un foyer infectieux local : cas par exemple de l'infection urinaire, et de la suppuration chirurgicale [12].

C- Modes de transmission des infections nosocomiales

Les bactéries qui provoquent des infections nosocomiales peuvent s'acquérir de plusieurs façons :

- **A partir de la flore permanente ou temporaire du patient :**

Les bactéries présentes dans la flore commensale provoquent des infections opportunistes en cas de transmission vers d'autres sites que leur habitat naturel (voies urinaires), des lésions tissulaires (plaies) ou en cas d'antibiothérapie inadéquate, ce qui favorise leur prolifération.

Ainsi, les bactéries peuvent causer des infections endogènes, comme c'est le cas par exemple de bactéries à Gram négatif présentes dans les voies digestives qui sont fréquemment à l'origine d'infections du site opératoire après une intervention abdominale ou d'infections urinaires chez les patients porteurs de sondes [13].

- **A partir de la flore d'un autre patient ou d'un membre du personnel :**

Les bactéries se transmettent d'un patient à l'autre de plusieurs façons : par contact direct entre patients (mains, gouttelettes de salive ou autres liquides biologiques) ; par l'air (gouttelettes ou poussières contaminées par les bactéries d'un patient) ; par le personnel qui contamine lors des soins les patients (mains, vêtements, nez, gorge), qui devient un porteur temporaire ou permanent et transmet ensuite les bactéries à d'autres patients par contact direct lors des soins ; par des objets contaminés par le patient (y compris le matériel médical), les mains du personnel, les visiteurs ou d'autres sources environnementales (eau, autres liquides, aliments) [13].

- **A partir de la flore présente dans l'environnement des soins de santé :**

Plusieurs types de microorganismes survivent bien dans l'environnement hospitalier :

- Dans l'eau, les milieux humides et parfois dans des produits stériles ou des désinfectants (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*) ;
- Dans des articles tels que le linge, le matériel médical et les fournitures utilisés pendant les soins. Un nettoyage approprié des locaux limite normalement le risque de survie de bactéries car la plupart d'entre-elles nécessite un environnement chaud ou humide et des éléments nutritifs pour survivre ;
- Dans les aliments ;
- Dans les poussières fines et les noyaux des gouttelettes émises en toussant ou en parlant (des bactéries de moins de 10 µm de diamètre restent en suspension dans l'air pendant plusieurs heures et peuvent être inhalées de la même façon que les poussières fines [13].

D- Facteurs favorisant les infections nosocomiales

Les facteurs favorisant l'acquisition des infections nosocomiales peuvent être liés :

➤ Aux patients :

- Ages extrêmes (nouveaux nés, prématurés et sujets âgés) ;
- Poids extrêmes (malades obèses et dénutries) ;
- Atteints de maladies générales (diabète, hémopathies...) grands brûlés ;



-
- Ayant bénéficié d'interventions chirurgicales lourds;
 - Sous traitement à base de stéroïde, de médicaments immunodépresseurs ou de radiothérapie.
 - A l'environnement :
 - Inadaptation de la conception architecturale;
 - Ergonomie au sein de l'hôpital (circuit de circulation du matériel et du personnel);
 - Inadaptation de l'équipement sanitaire.
 - Aux pratiques médicales :
 - Gestes thérapeutiques invasifs : sondage vésical, cathétérisme veineux ;
 - Périphérique ou central : prothèses vasculaires et orthopédiques [10].

E- Germes en causes

Les microorganismes présents dans l'environnement hospitalier sont extrêmement variés, ils comportent :

- Les bactéries : elles sont responsables de 2/3 des infections nosocomiales ;
- Les champignons dont la responsabilité augmente de plus en plus ;
- Les virus ;
- Les agents transmissibles non conventionnels (ATNC) : prions [10].

F- Caractères généraux des bactéries de l'environnement hospitalier

1- Bactéries à Gram négatif

a- *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un bacille Gram négatif qui mesure 1,5 à 3,5 μm . Il est non sporulé et mobile par une ciliature polaire (Sleigh et Timbury, 1998). Il pousse facilement sur milieu ordinaire (Carbonnelle et al., 1987). Il tolère des températures allant de 5 à 42°C (Sleigh et Timbury, 1998). *P. aeruginosa* se distingue des Entérobactéries par son métabolisme oxydatif (Oxydase-positive) et son incapacité à croître en anaérobiose (elle est aérobie stricte). (Carbonnelle et al. 1987).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste responsable des infections nosocomiales (Carbonnelle et al., 1987). Son habitat est le tractus gastro-intestinal des animaux et de l'Homme, l'eau et le sol (Sleigh et Timbury, 1998). Il est résistant à plusieurs antibiotiques. Toutefois, les drogues anti-pseudomonales majeures sont les amino-glycosides, certains β -lactames (pénicillines, céphalosporines) et les polymyxines (Sleigh et Timbury, 1998) [14].

b- *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii est un bacille à Gram-négatif non fermentant, présentant souvent une multi-résistance aux antibiotiques. Ce germe est considéré comme un pathogène opportuniste occasionnellement responsable d'infections nosocomiales sporadiques ou à caractère épidémique. Les infections causées le plus souvent par ce germe sont les infections pulmonaires en particulier chez les patients intubés et ventilés en réanimation (létalité globale associée de 40- 70 %), les septicémies, les infections de plaies, et les infections du tractus urinaire.

Capable de survivre de façon prolongée (> 8 j) dans un environnement sec (sols, surfaces, linge, matériel de literie), sa transmission s'effectue le plus souvent de façon manu portée par l'intermédiaire du personnel soignant ou par aérosolisation à partir de matériel contaminé



(humidificateur, matériel de ventilation,..). Cette bactérie est fréquemment retrouvée en milieu hospitalier dans des milieux aqueux et humides (lavabo, savons, eau distillée, eau des systèmes d'humidification).

A la différence d'autres espèces d'*Acinetobacter* qui sont des colonisants habituels de la peau, *A. baumannii* est rarement isolé au niveau cutané, mais il est parfois retrouvé à l'état de portage asymptomatique oro-pharyngé ou rectal chez des patients hospitalisés [15].

c- *Stenotrophomonas maltophilia*

Les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* rassemblent des bacilles à Gram négatif, d'environ 0,5 µm de diamètre sur 1,5 µm de longueur, non sporulés, aérobies, oxydase négative, catalase positive, nitrate réductase positive, mobiles grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires, possédant des fimbriae. La mobilité est constamment observée à 18 °C, mais certaines souches sont immobiles à 37°C.

Deuxième espèce de bactéries à Gram négatif aérobie stricte isolée à l'hôpital, à partir de l'eau des stériliseurs, des éviers, des machines à glace, des blocs opératoires, de divers désinfectants, des circuits de ventilation, du matériel médical et chirurgical (cathéters, bronchoscopes, spiromètres, nébulisateurs, machines à dialyse...) et parfois, des mains du personnel soignant [15]. Elle est responsable d'infections nosocomiales principalement chez les individus immunodéprimés ou traités avec des antibiotiques à large spectre ou hospitalisés durant une longue période, ou hospitalisés dans des unités de soins intensifs.

d- *Legionella pneumophila*

C'est une bactérie à Gram négatif, anaérobie stricte de la famille des *Legionellaceae*. Naturellement présente dans l'eau et dans les boues, elle est responsable d'une maladie respiratoire, la légionellose. Elle colonise fréquemment les réseaux d'eau, notamment les réseaux d'eau chaude sanitaire, les installations de climatisation, ainsi que les tours aéro-réfrigérantes [16].

2- Bactéries à Gram positif

a- *Staphylococcus*

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Le genre *Staphylococcus* regroupe 35 espèces (44 espèces et sous-espèces). En pratique médicale courante, les espèces les plus fréquentes qui causent des infections ou des colonisations sont *S. aureus*, *S. epidermitis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* et *S. warneri* [17].

b- *Streptococcus*

Les bactéries *Streptococcus faecalis* sont des cocci à Gram positif, ronds ou ovoïdes, groupées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues et dont le diamètre mesure 0,5 à 0,9 µm (Carbonnelle et al., 1987; Sleight et Timbury, 1998). Aérobies et anaérobies facultatives, ces bactéries poussent sur des milieux ordinaires et sur des milieux contenant des sels biliars. Ils sont capables de pousser à une température de 45°C avec un optimum de croissance à 37 °C (Sleight et Timbury, 1998).

Streptococcus faecalis est responsable des infections cutanéomuqueuses (plaies chirurgicales, brûlures, blessures), des infections métastatiques (Berche et al., 1989). On le retrouve au niveau de l'intestin de l'Homme et des animaux (Sleight et Timbury, 1998). Il est sensible à l'ampicilline et la pénicilline G (Berche et al., 1989) [14].



G- Conséquences des infections nosocomiales

L'aggravation de la maladie ayant motivé l'hospitalisation, la prolongation du séjour hospitalier sont les conséquences indésirables des infections nosocomiales. Il en résulte aussi des dépenses supplémentaires qui sont une charge considérable pour les patients et pour le système de santé. Aux Etats Unis, ces dépenses supplémentaires sont estimées de **4,5 à 5,7** milliards de dollars par an [10].

H- Risque infectieux en hémodialyse

1- Causes

L'hémodialyse est un acte invasif qui impose un accès vasculaire itératif (fistule artério-veineuse native ou prothétique, cathéter veineux central). Toute séance d'hémodialyse comporte le risque de transmission d'un micro-organisme pathogène à chaque niveau du processus d'épuration : eau de dialyse, solutions concentrées, générateur, lignes et accès vasculaires. Le patient hémodialysé est exposé aux risques non spécifiques d'infections liés aux soins auxquels s'ajoutent les risques associés à la spécificité des techniques d'épuration extra rénale (hémodialyse, hemo-diafiltration) et aux conditions de réalisation de ces dernières

[18].

Le risque infectieux en hémodialyse aussi est favorisé par l'altération des fonctions immunitaires causée par l'insuffisance rénale elle-même (altération directe ou indirecte des fonctions neutrophiles et lymphocytaires) ; ainsi que par l'épuration extra-rénale qui induit la libération des cytokines possédant des effets dépresseurs sur le système immunitaire [11, 12].

Ceci explique pourquoi l'insuffisance rénale dialysée est caractérisée par une fréquence élevée de complications infectieuses et une mauvaise réponse à la vaccination au sein d'une population particulièrement âgée et aux comorbidités nombreuses (diabète, affections cardiovasculaires, hémopathies, cancers ...) [18].

2- Epidémiologie de l'infection nosocomiale en hémodialyse

a- Infections bactériennes

En hémodialyse, les infections sont représentées essentiellement par les bactériémies (BAC) et par les infections sur accès vasculaires (IAV). Elles sont considérées comme des indicateurs de la qualité des soins et sont d'importance prédominante en terme de morbidité et de mortalité. Elles font l'objet prioritaire de surveillance épidémiologique.

En effet, les taux globaux d'infections sont estimés par la littérature entre 2,6 et 7,6 infections pour 100 mois de dialyse; 48 à 89 % des bactériémies chez les patients hémodialysés sont reliées à une infection des voies d'accès vasculaire. Le type d'accès est le plus important facteur prédictif de l'infection avec les fistules natives, moins à risque que les fistules prothétiques (RR 1,47), les cathéters tunnésés (RR 8,49), et non tunnésés (RR 9,87

(CLIN, 2010). Si les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi et certaines souches d'*Acinetobacter baumannii* doivent pas être négligées, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) est la principale BMR en terme de fréquence, isolée dans les établissements de soins.

Considérées au départ comme des bactéries affectant principalement les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs, les SARM sont aujourd'hui isolés dans tous les types d'établissements et tous les types de services. Leur émergence en tant que micro-organismes pathogènes a été décrite au début des années 1960 [20].

En hémodialyse, *Staphylococcus aureus* est le principal micro-organisme à l'origine des infections bactériémiques. Le taux de colonisation à SARM, ainsi que la proportion de ces



infections varient considérablement selon le contexte épidémiologique local et l'année considérée. La surmortalité des infections dues aux SARM a été démontrée.

Selon la littérature, ce taux est de 12 à 30 % en Europe (2006, 2007). Aux USA, il est de 33% (1994 à 2001), et de 65% selon des données récentes [19].

Des souches de *S. aureus* vancomycine-résistantes (SARV) ont été observées récemment aux USA chez 3 patients sur 7, relevaient de l'hémodialyse [19].

Le pourcentage de résistance des *S. aureus* à la méticilline (SARM) est de 24 % dans le réseau DIALIN (données 2008) [19].

b- Infections virales

Les risques d'infections virales sont cliniquement représentés par trois virus hématogènes que sont le virus de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Parmi 8 245 patients inclus en dialyse en 2008 (incidents), seuls 83 malades étaient infectés par le virus de l'hépatite B (1,1%) et 123 du virus de l'hépatite C (1,7%). 64 malades étaient porteurs du virus VIH, dont 35 au stade SIDA.

Pour le VHB et le VHC, les risques de contamination sont représentés par la contamination interne du générateur (notamment avant les mesures de sécurisation des capteurs de pression) mais surtout, la contamination externe du générateur et des surfaces, les injections et les manipulations de flacons multidoses avec la réutilisation de matériels, le manque de respect des précautions standard d'hygiène.

Pour le VIH, depuis la sécurisation du circuit de la transfusion sanguine, le virus étant plus fragile dans le milieu extérieur, le risque de transmission est surtout associé à un défaut d'application stricte des précautions standards d'hygiène, notamment par le biais de matériels souillés.

Par rapport à la population générale, le groupe des patients hémodialysés conserve une prévalence de l'hépatite C plus élevée, avec un gradient Nord Sud et une hétérogénéité entre les différentes unités de dialyse. Les séroconversions de novo sont particulièrement suivies et analysées.

Bien que les manifestations cliniques soient moins sévères, la survie du patient dialysé porteur du virus de l'hépatite C est diminuée même après transplantation.

Contrairement au temps passé en dialyse (propre à la technique de dialyse), les autres facteurs de risques restent comparables à ceux de la population générale en raison :

- de la sécurisation de la transfusion sanguine,
- de l'utilisation des agents stimulant l'érythropoïèse pour limiter les transfusions,
- du respect des mesures d'hygiène universelle associées aux protocoles de soins comme moyens de lutte contre les transmissions croisées
- du traitement bien qu'imparfait, des patients ayant eu une séroconversion mise en évidence suite aux dépistages systématiques recommandés.

L'hépatite B présente des mécanismes de transmission et des facteurs de risque similaires à ceux de l'hépatite C. La lutte contre ces facteurs de risque, renforcée par la vaccination des personnels de santé et des patients exposés, a également permis une diminution de l'incidence des séroconversions, mais il persiste des occurrences épidémiques.



Bien que la prévention de la séroconversion VIH repose sur les mesures d'hygiène de base, les progrès récents des thérapies antivirales permettent une nette amélioration de la survie en dialyse des patients hémodialysés VIH-positifs.

Il y a eu une augmentation de la prévalence de l'infection à VIH chez les hémodialysés entre 1997 et 2002 (0.39% versus 0.5%) avec de fortes prévalences pour l'Ile-de-France et les départements et territoires d'Outre-Mer [18].

3- Prévention des infections nosocomiales en hémodialyse

La prévention des infections nosocomiales en hémodialyse repose sur :

- L'application des précautions standards ou précautions générales d'hygiène à respecter lors de soins à tout patient, tels que le lavage des mains, le port de gants, le port de sur blouse.
- L'application des recommandations pour la prévention des AES : elles englobent la vaccination du personnel contre l'hépatite B, la formation des professionnels aux précautions standards.
- La prévention des infections lors de dialyse sur fistule se basant essentiellement sur l'hygiène des patients (bon niveau d'hygiène quotidienne, tenue propre et adaptée).
- L'application des recommandations d'organisation pour la prise en charge des patients : telles que l'accès limité, l'existence de vestiaires et de sanitaires.
- L'entretien systématique des équipements et surfaces englobant le nettoyage, la désinfection et la réfection du lit, la protection des télécommandes par une housse plastifiée lavable.
- Le respect des recommandations pour la prise en charge des patients infectés, comme la protection des patients susceptibles (cas des patients atteints du VHB,..), l'isolement dans une chambre individuelle (cas des patients atteints de tuberculose).
- Le respect des recommandations concernant la conception des locaux comprenant la surface qui doit être suffisante pour l'ensemble des composants, et permettant la circulation aisée du personnel, la qualité des matériaux facile à nettoyer et à désinfecter.
- Le respect de la désinfection et de la maintenance des générateurs d'hémodialyse : se basant sur la conception et/ou la réalisation de la chaîne de traitement d'eau et/ou de maintenance, le renouvellement des filtres, la désinfection des raccords.
- Le traitement des dispositifs médicaux : se basant sur la désinfection et les caractéristiques du désinfectant [21].

II- Les Huiles Essentielles

A- Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes composées de plusieurs constituants qui peuvent atteindre jusqu'à 300 molécules ou plus [22]. L'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques [23].



B- Historique d'utilisation des huiles essentielles

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (Baser & Buchbauer, 2010). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques. Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique [23]. En Afrique noire les feuilles de tabac malaxées dans l'eau étaient utilisées pour lutter contre les moustiques. Au Maroc, l'utilisation des plantes contre les invasions de moustiques est une pratique très courante, surtout dans les régions rurales. De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques [24].

C- Localisation, Fonction et Répartition

La synthèse des huiles essentielles et leurs cumulations sont généralement reliées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur / ou à proximité de la surface de la plante. Ce sont des cellules à huiles essentielles des *lauraceae* ou des *zingiberaceae*, des poils sécréteurs des *lamiaceae*, des poches sécrétrices des *Myrtaceae* ou *Rutaceae*, des canaux des *Apiaceae* ou des *Asteraceae* [25]. La fonction biologique des terpénoides des huiles essentielles est mal connue. Il est toutefois vraisemblable qu'ils ont un rôle écologique, on remarquera que le rôle de certains d'entre eux a été établi expérimentalement aussi bien dans le domaine des interactions végétales (agents allélopathiques, notamment inhibiteurs de germination que dans celui des interactions végétal-animal : protection contre les prédateurs (insectes, champignons) et attraction des pollinisateurs [26].

Environ 1% des espèces combinées des essences, se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles regroupent et en particulier les labiés (Thym, Menthe, Lavande, Origan, Sauge, etc.), les Ombellifères (Anis, Fenouil, Angélique, Cumin, Coriandre, Persil, etc.), les Myrtacées (Myrthe, Eucalyptus), et les Lauracées (Camphrier, Laurier-sauce, Cannelle [27].

D- Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles

1- Propriétés physiques

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles ce qui les différencie des huiles dites « fixes ». Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau à laquelle elles sont généralement peu miscibles voire non miscibles. Liposolubles, elles sont en revanche solubles dans les solvants organiques usuels [28].

2- Composition Chimique



Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent quasi exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes et, beaucoup moins fréquents, le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatiles [28].

2-1- Terpénoïdes

Dans les huiles essentielles, il s'agit essentiellement des terpènes les moins volatils, c'est-à-dire ceux de masse moléculaire peu élevée : mono- et sesquiterpènes.

Les espèces intermédiaires étant porteuses de fonctions cationiques à réactivité variable, il existe plusieurs milliers de composés décrits.

2-1-1- Monoterpènes

Les carbures sont presque toujours présents. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (Citrus, térébenthines).

2-1-2- Sesquiterpènes

Ils ont une variabilité structurale de même nature que les monoterpènes. L'allongement de la chaîne avant cyclisation lors de leur synthèse augmente le nombre de cyclisations possibles, d'où la très grande variété de structures connues.

2-2- Composés aromatiques

Beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes, ce sont des dérivés du phénylpropane (C₆-C₃) ou en C₆-C₁ (vaniline). Certaines huiles essentielles comportent également des lactones dérivées des acides cinnamiques (les coumarines)[28].

2-3- Composés d'origines diverses

Ces produits résultent de la transformation de molécules non volatiles, par dégradation des acides gras ou des terpènes. Ils sont présents dans les huiles essentielles lorsqu'ils sont entraînés dans la vapeur d'eau [28].

E- Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

- Facteurs intrinsèques, liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat, ...) et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée ;
- Facteurs extrinsèques, en lien avec ou la méthode d'extraction (Besombes, 2008) [29].

1- Facteurs intrinsèques

Les cellules productrices d'huile essentielle pouvant se situer dans différents organes, il est possible d'obtenir différentes huiles selon les parties sélectionnées d'une même plante. Ainsi les huiles essentielles extraites à partir des baies et des feuilles de piment ne sont pas identiques.

Les travaux de Maffei et Sacco (1997), ont montré des différences de composition des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles et fleurs) et de sous-espèces différentes.

Le stade végétatif au moment de la récolte est un facteur déterminant pour le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes de *Lavandula* obtenu par clonage (Fantino, 1990)[29].

2- Facteurs extrinsèques

Huang et al. (1995) ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles.

Le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. Fantino (1990) a noté des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé au congélateur, mais peu d'évolution de la composition.

Par ailleurs, le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier la composition de ces huiles. D'après Carette (2000), les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître.

D'autres travaux ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Verzelet al., 1988) [29].

F- Méthodes d'extraction des huiles essentielles

1- Hydro distillation

Cette méthode est réalisée en 2 étapes :

➤ La partie de la plante contenant la molécule à extraire est placée dans un ballon avec de l'eau et quelques morceaux de pierre ponce pour assurer le brassage de la solution. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense et tombe dans un erlenmeyer où il est possible de distinguer 2 phases bien distinctes : l'huile essentielle dessous, et, l'eau aromatique (ou hydrolat) chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée ;

➤ On récupère les 2 phases huile essentielle / eau aromatique, chargée d'espèces volatiles, dans une ampoule à décanter. Après avoir laissé reposer le contenu quelques secondes, il est possible d'éliminer totalement l'eau aromatique. Il ne reste alors plus que l'huile essentielle dans l'ampoule à décanter (Figure suivante) [30].

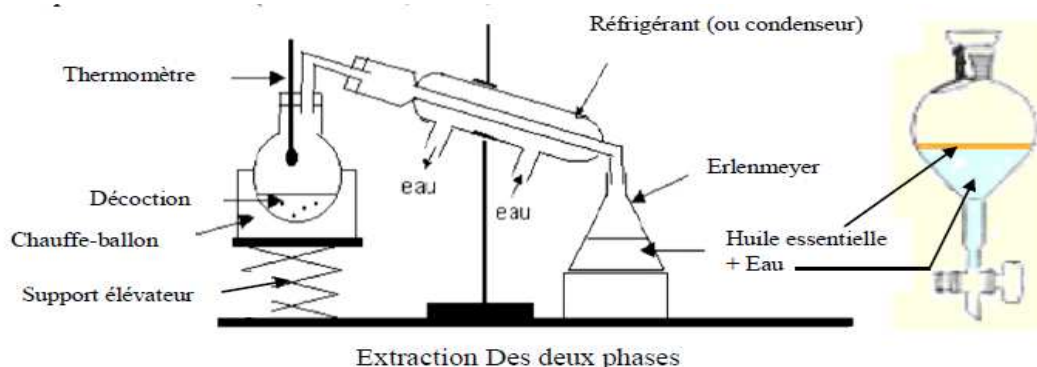


Figure n°1: schéma des étapes de l'hydrodistillation [30]

2 -Distillation à vapeur saturée

Le principe de la distillation à vapeur saturée est le même que celui à l'hydrodistillation. Le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau, il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. La vapeur d'eau traversant la structure des cellules végétales emporte avec elle les composés volatils. Le distillat est ensuite récupéré par condensation, et les phases sont séparées ensuite par décantation [31].

3- L'hydro diffusion

Cette méthode diffère de la distillation à la vapeur seulement par le fait que la vapeur entre dans l'alambic par le haut, donc au-dessus des plantes, et non par dessous. La percolation convient parfaitement aux bois ou aux matériaux fibreux, car la vapeur peut s'y infiltrer [32]. Cette technique est employée usuellement dans les industries pour la production à grande échelle.

4- Expression ou pressage à froid

Ce mode d'obtention ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes (*Citrus spp.*) par des procédés mécaniques à température ambiante. Le procédé consiste à exercer sous un courant d'eau une action abrasive sur toute la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation.

La plupart des installations industrielles permettent en fait la récupération simultanée ou séquentielle des jus de fruits et de l'huile essentielle [30].

5- Enfleurage

Cette méthode se rapproche quelque peu de l'extraction par solvants volatils, mais dans ce cas on utilise des graisses comme solvant. Ces dernières ayant elles aussi une forte affinité avec les composés odorants, cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade [30].

6- Extraction par CO_2 supercritique

Le terme supercritique signifie que le CO_2 , sous pression et à une température de $31^\circ C$, se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux. Lorsqu'il est dans cet état, il est capable de dissoudre les huiles essentielles. La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO_2 supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO_2 s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle qui est proche du naturel et sans trace de solvant.

En outre, le CO_2 est non toxique, incolore, inodore et ininflammable, ce qui permet des conditions de sécurité supérieures (Figure suivante) [33,34].

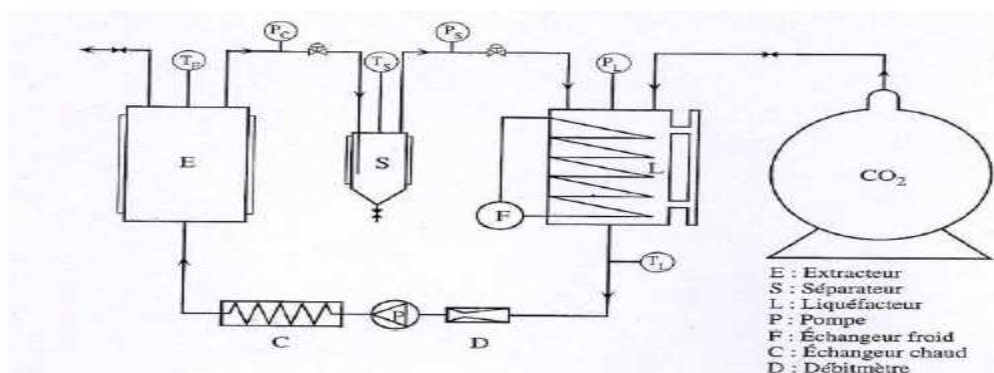


Figure n°2 : Schéma du système d'extraction CO_2 des solides [30]

7- Extraction assistée par Micro-ondes

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (Paré, 1997). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extract. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (France Ida, 1996). Ce procédé (Fig. 7), très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui est le plus souvent de qualité supérieure à celle du produit d'hydro distillation traditionnelle (Bruneton, 1999). Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode a montré selon Scheffer (1996) que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative [35].

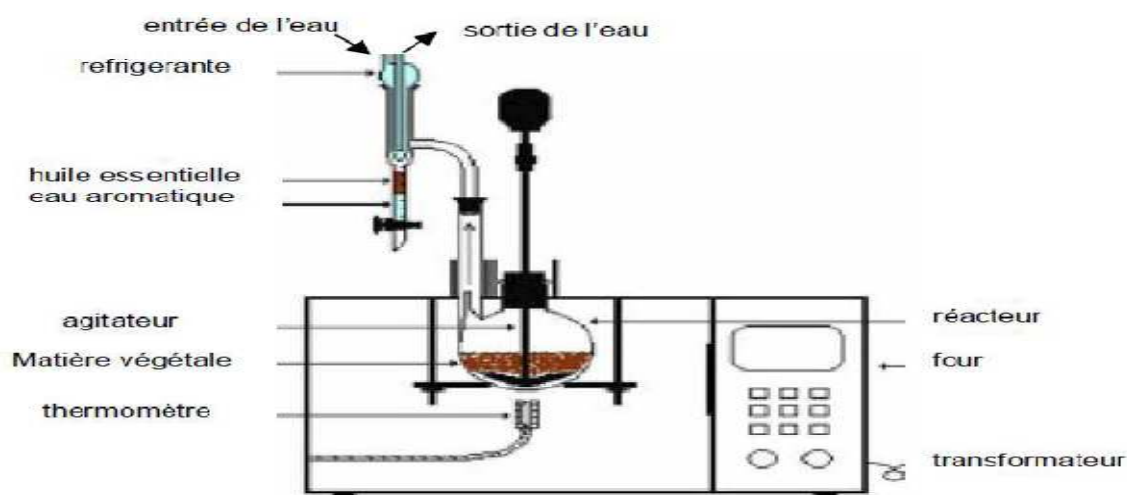


Figure3 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes[35]

G- Techniques d'analyse des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de plusieurs méthodes. Ces dernières sont utilisables dans l'industrie pour contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation.

1- La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

C'est une méthode de choix pour la séparation d'un mélange complexe de produits volatils. La séparation des constituants de l'H.E est basée sur le phénomène d'adsorption des différentes substances à l'état vapeur sur la paroi du tube [36]. Cette méthode permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Son principe est d'injecter dans le système, les mélanges à séparer et durant son passage à travers une colonne, les molécules qui le constituent sont distribuées. Cette distribution dépend des interactions sélectives selon la polarité de chaque partenaire qui en décide. Il en résulte donc un certain temps de rétention pour chacun des composants du mélange injecté. Cette valeur est mesurable, elle renseigne sur les différents pics du chromatogramme [37].



Les techniques de couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques (SM, IRTF) ont permis une approche beaucoup plus précise de l'identification.

2- Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

Si la chromatographie permet à elle seule de séparer correctement les différents constituants d'un mélange, il est néanmoins délicat de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine car les paramètres déduits de la rétention sélective des solutés au travers de la colonne sont souvent lourds à manier, et dans la plupart des cas, peu reliés aux édifices moléculaires organiques. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM (De Maack et Sablier, 1994)[35].

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et de référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques dans des conditions opératoires comparables (Desjobert et al., 1997; Bruneton, 1999)[35].

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe.

H- Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaire ou au niveau de la microflore vaginale et d'origine fongique contre les dermatophytes (HAMMOUDI, 2008) [38].

1- Activité antimicrobienne

Les vertus antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Cependant, cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles [38].

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement liée à leur composition chimique majeure et en particulier à la nature de leurs composés majoritaire [37].

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes ont montré une activité antimicrobienne.

En effet, elle est admise que l'activité antibactérienne des huiles essentielles se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leurs composés majoritaires :

Phénol>alcool>aldéhyde>cétone>oxyde>hydrocarbures>esters.

L'activité antimicrobienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale [40].

La complexité de la composition chimique des huiles essentielles, toute laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très



probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action, d'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- * Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- * Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- * Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [41].

2- Mécanisme d'action

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire.

o Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K⁺): ce mécanisme a été observé avec l'huile de l'arbre à thé sur les bactéries Gram⁺ (*Staphylococcus aureus*) et Gram⁻ (*E. coli*) et les levures (*Candida albicans*) in vitro.

o Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP. Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée.

o Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides.

o Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes: en général, les bactéries Gram⁻ sont plus résistantes que les Gram⁺ grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des bactéries Gram⁻ est plus riche en lipopolysaccharides et en protéines que celle des bactéries Gram⁺, ce qui la rend plus hydrophile ; ceci empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries (MALECKY ; 2008) [42].

I- Techniques d'études du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester aux faibles concentrations [43].

1- Techniques en milieu liquide.

1-1- Méthode de disques de Sarbach.

L'essence est déposée à différentes concentrations sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, l'ensemble est placé dans des tubes à essai. Dans chaque tube, est réparti un certain

volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation.

L'action bactéricide totale est confirmée par repiquage en milieu liquide d'une anse prélevée sur le milieu liquide de subculture. Le pouvoir bactéricide partiel est apprécié par l'évaluation du pourcentage de survivants par repiquage en milieu solide [43].

1-2- Méthode de Maruzuela

Elle permet l'étude du pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'HE dans l'éthanol. Les solutions mères sont préparées dans l'éthanol 95%, la solution alcoolique est ensuite répartie à différentes doses dans le milieu liquide préalablement ensemencé. Après la durée d'incubation, on effectue des subcultures qui permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) [43].

2- Techniques en milieu solide.

2-1- La méthode de diffusion sur les disques stériles

Elle est appelée aussi technique de l'aromatogramme. Elle consiste à utiliser des disques formés par des papiers filtre stérilisés de 6 mm de diamètres, imbibés d'huiles essentielles et déposés à la surface d'un milieu gélosé, ensemencé par inondation avec une souche bactérienne en bouillon nutritif de titre connu. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition apparaissent autour des disques stériles sont évaluées [44]. Les essais sont répétés trois fois, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition exprimée en mm (Figure suivante).

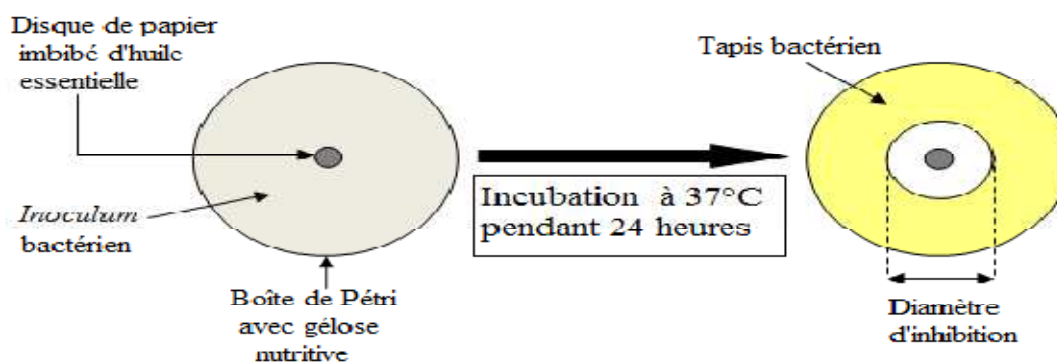


Figure n°4: Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri [44]

2-2- La méthode des puits.

Elle correspond à la technique des disques stériles mais légèrement modifiée. Elle consiste à faire des trous dans la gélose coulée et solidifiée ensemencé par inondation avec une souche bactérienne dans la boîte de pétri et à les remplir d'un volume donné d'HE qui va diffuser dans la gélose. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition apparaissent autour des disques stériles sont évaluées [45].

2-3-Méthode de micro-atmosphère

C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et



au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles. La lecture de la croissance des germes ou de leur inhibition, se fait après incubation [46].

3- Détermination de la CMI

La CMI n'est pas, pour une bactérie donnée, une constante biologique. Elle est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible.

La méthode par dilution successive en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Cette détermination exige une standardisation rigoureuse du protocole expérimental (influence de l'inoculum, du délai séparant ensemencement et observation, milieu de culture), toute modification des conditions expérimentales rendant l'interprétation difficile [46].

III. Données botaniques et pharmacologiques des plantes étudiées

Vu l'importance et l'étendu du champ de la recherche en ce qui concerne les plantes médicinales, aromatiques et alimentaires, condimentaires et toxiques, nous avons choisi quelques plantes aromatiques et évalué l'activité antibactérienne de leurs huiles essentielles.

En se basant sur divers facteurs tels que la fréquence d'apparition, le rendement, l'intérêt thérapeutique probable, la culture possible et les données bibliographiques, les plantes sélectionnées sont : *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana*, *Eucalyptus*, *Lavandula officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Juniperus thurifera* et *Juniperus phoenicea*.

Les annexes 1 et 2 Montrent respectivement les photos et la classification des plantes choisies

1- *Thymus vulgaris* (thym)

1-1- Historique

Dans ses divers pays d'origine, le thym était connu en qualité d'aromate depuis l'antiquité, bien que l'on ne sache pas avec exactitude quelles espèces de thym étaient utilisées à cette époque. Dioscoride (2^{ème} moitié du 1^{er} siècle) et Hippocrate (460 à 370 av. J.-C.) le mentionnent déjà dans leurs écrits. Ce sont les Romains qui l'ont introduit en Angleterre. Comme de nombreuses autres plantes médicinales et aromatiques, son usage s'est répandu dans toute l'Europe, dès le début du moyen âge grâce aux moines bénédictins.

Le thym entraine dans la composition de diverses préparations (alcoolature vulnéraire, baume tranquille, baume podeldoch) et faisait aussi partie des espèces vulnéraires [48].

1-2- Origine et culture

Le thym est originaire des régions méditerranéennes, à l'ouest de l'Europe jusqu'au sud de l'Italie. Il est cultivé en Europe, aux Etats-Unis et dans d'autres régions du monde.

Il pousse bien sur des endroits naturels, sur sols légers et calcaires, mais il prospère tout aussi bien sur sols fertiles argileux mais non détrempes. Il nécessite des endroits bien ensoleillés et supporte relativement bien la sécheresse.

Il développe mieux son arôme sur les sols pauvres (maquis, rocaïlle de garrigue) que dans les endroits de fortes gelées. Une protection est recommandée durant l'hiver. Sa multiplication se fait



par semis superficiel (germination à la lumière), réalisé en mi-avril ou plus rarement en août, en rangées écartées d'environ 20 à 30 cm, de préférence sur sol léger et sablonneux. Une préculture sous châssis dès la mi-mars, suivie d'une plantation définitive, est également possible [48].

1-3- Usage traditionnel et médicinal

En médecine populaire, le thym est utilisé sous forme de bains aromatiques (en respectant les restrictions d'emploi usuelles) ou en compresses préparées après infusion à 5 %, pour le traitement complémentaire des pathologies hivernales et en cas de prurit. Des extraits de thym sont utilisés par voie orale dans le traitement des dyspepsies et autres troubles gastro-intestinaux.

Des applications par voie externe d'extrait de thym sont préconisées dans le traitement de plaies superficielles, du rhume et des affections de la cavité buccale. L'huile essentielle et le thymol entrent dans la composition de pommades antiseptiques et cicatrisantes, de sirops antitussifs et de préparations pour inhalation [48].

❖ Indications actuelles

Selon l'agence du médicament (1998), la feuille et les sommités fleuries sont indiqués :

- Dans le traitement symptomatique de la toux et des troubles digestifs (ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence) ;
- Dans la médication de petites plaies après lavage abondant ;
- En cas de nez bouché et de rhume ;
- Comme antalgique dans les affections de la cavité buccale et/ou du pharynx ;
- En bain de bouche pour l'hygiène buccale.

En Allemagne, la Commission E précise que la feuille et les fleurs sont utilisées dans le traitement symptomatique des bronchites et de la coqueluche, ainsi qu'en cas d'inflammation des voies respiratoires supérieures.

L'huile essentielle et le thymol entrent dans la composition de diverses spécialités (pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour le traitement des affections des voies respiratoires, préparations pour inhalation).

L'huile essentielle est largement utilisée en aromathérapie comme antiseptique, alors que le thymol comme antiseptique externe et intestinal, entre dans la composition de spécialités destinées à l'antisepsie buccale et au traitement d'irritations cutanées.

Le thym est utilisé sous forme de bains aromatiques (avec une température comprise entre 35 et 38 °C et une durée limitée entre 10 à 20 min), ainsi qu'en traitement complémentaire en cas d'affections aiguës ou chroniques des voies respiratoires ou de prurit lié à une dermatose. On l'utilise aussi en frictions, diluée à 10 %, pour traiter les douleurs rhumatismales et les névralgies [48].

1-4- Composition chimique

D'après ELOUALI LALAMI A, EL-AKHAL F, 2013. Les résultats de l'analyse des huiles essentielles par CPG-SM montrent que les composants majeurs de *Thymus vulgaris* sont le γ -terpinène (22,25 %) et le thymol (41,39%). Nous n'avons pas pris en considération les composés ou les constituants dont les concentrations sont <0,1% [49].

1-5- Toxicologie



Le potentiel de sensibilisation du thym est faible. Quelques réactions allergiques ont été observées ponctuellement, mais il existe des réactions croisées avec d'autres *Lamiaceae*. L'huile essentielle n'est responsable d'aucune sensibilisation chez les sujets de plus de 12 ans [48].

2- *Lavandula officinalis* (Lavande)

2-1- Historique et origine

Depuis 1981, la lavande vraie fait l'objet d'une appellation d'origine contrôlée (AOC) : Lavande fine de Haute Provence, afin de lutter contre la concurrence des essences étrangères et identifier une production de haute qualité. Les plantes doivent être sur une aire géographique située à une altitude minimale de 800 m et seulement dans certains départements : Vaucluse, Drôme, Alpes de Haute Provence et Hautes Alpes. Au total, 284 communes y participent [47].

La lavande est un arbrisseau buissonnant pouvant atteindre 1 m de hauteur. Les feuilles, linéaires et de couleur gris vert, ont une longueur variant entre 3 et 5 cm. Lors de la floraison, la plante développe de longs pédoncules non ramifiés terminés par des épis dont la couleur varie du mauve pâle au violet (Lis-Bachlin, 2002).

2-2- Usage traditionnel et médicinal

L'huile essentielle de la lavande est préparée par entraînement à la vapeur d'eau à partir des sommités fleuries de *Lavandula angustifolia* (Lavande vraie ou lavande officinale, la fleur séchée contient 8 ml/kg d'huile essentielle) ou de *L. latifolia* (Lavande aspic) (1, 8).

D'après l'agence du médicament (1998), la fleur et les sommités fleuries de *L. angustifolia* Mill sont préconisés :

- Pour le traitement symptomatique des états neurotoniques de l'adulte et de l'enfant, notamment en cas de troubles mineurs du sommeil ;
- En cas de petites plaies après lavage abondant ;
- Pour le traitement de l'érythème solaire, brûlures superficielles et peu étendues, érythème fessier ;
- En cas de rhinite ou de rhume ;
- Pour l'hygiène buccale.

Selon la commission E du BfArM, l'huile essentielle de la lavande est utilisée en cas de nervosité et d'insomnie, de problèmes gastro-intestinaux d'origine nerveuse et, en bain, pour les troubles fonctionnels de la circulation (8).

La monographie de l'HMPC de Mars 2012 ne reconnaît que son indication en cas de symptômes légers de stress, de fatigue et comme aide au sommeil, ceci uniquement sur la base d'un usage ancien [28].

L'effet anxiolytique a été démontré dans de nombreuses études, comme cela est rapporté dans l'évaluation de l'HMPC d'Avril 2011.

L'étude de Woelk et Schläpke, comparant l'action de l'huile essentielle de *L. angustifolia* à l'action du lorazépam, est jugée comme ayant un bon niveau de preuves et une méthodologie satisfaisante. Cependant l'absence de groupe placebo et le faible nombre de patients ne permettent pas de conclure à une activité bien établie [28].

2-3- Composition chimique



D'après **L.Imène** (2011), 82.59% des composants de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* présentant la somme des pourcentages des composants obtenus, ont été identifiés dont 67.29% sont des dérivés monoterpéniques oxygénés et 15.3% sont des hydrocarbures monoterpéniques. Il semble que les composants de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* sont des mono terpènes. Les composants majeurs de cette huile sont : Linalyl acétate (15.26%), Linalool (10.68%), 1,8- cineole (10.25%), γ -terpinene (11.2%) et camphor (11.25%) [29].

2-4- Toxicologie

Dans son évaluation de Mars 2012, l'HMPC rapporte que suivant plusieurs études cliniques, l'huile essentielle de lavande a une très faible toxicité, y compris cutanée, et entraîne de très rares cas d'allergies.

Une étude a montré une cytotoxicité *in vitro* sur des cellules humaines de l'huile essentielle de lavande mettant en cause le linalol et l'acétate de linalyle. Une étude plus récente rapporte une activité génotoxique sur des cellules humaines disculpant le linalol et mettant en cause l'acétate de linalyle.

Chez le rat, l'administration orale de linalol à des doses croissantes jusqu'à 1000 mg/kg/jour n'a démontré aucun effet sur le développement du fœtus.

Aucune étude n'a été réalisée sur l'embryo- ou la foetotoxicité, que ce soit chez l'Homme ou l'animal.

On notera la présence de limonène tératogène à fortes doses et de camphre toxique pour la mère et le fœtus (un cas de mort fœtale) par voie orale [28].

3- *Cymbopogon citratus* (Citronnelle)

3-1- Historique et origine

Originaire d'Inde, du Sri Lanka et de tout l'espace sud-asiatique, la citronnelle a une longue tradition et est utilisée depuis des siècles, et non seulement dans la cuisine ou la médecine. Les parfums et les huiles fabriqués dans l'espace asiatique ont été importés au 17^{ème} siècle par des navigateurs anglais, français et hollandais en Europe, où ils étaient très appréciés par la noblesse européenne.

Il est intéressant de mentionner que l'on extrait d'une variété de citronnelle, le palmarosa (*Cymbopogon martinii*), également appelé «géranium des Indes», le composant principal de l'«huile essentielle de géranium des Indes» qui était même ajoutée, mélangée à de l'huile de rose, à des produits contre les insectes.

Son nom botanique «*Cymbopogon*» est dérivé des mots grecs kymbe = «nacelle» et pogon = «barbe», il se réfère à ses épis en forme de nacelle porteurs de nombreuses fleurs qui font songer à une barbe [50].

3-2- Usage traditionnel et médicinal

La citronnelle est rafraîchissante, sudorifique, désinfectante et calmante. Il n'est donc pas étonnant que son huile essentielle soit non seulement utilisée pour nettoyer une peau grasse ou en bain relaxant, mais également en soulagement rapide en cas de mycose du pied et en présence de poux.



En usage interne, elle est efficace contre les problèmes digestifs, les douleurs d'estomac et les diarrhées ainsi que le traitement de la fièvre.

En outre, l'huile essentielle de citronnelle entre dans la fabrication d'un grand nombre de produits cosmétiques, savons et parfums [28].

3-3- Composition chimique

D'après **RISCH S.J, CH.T (1997)**, les principaux constituants de citronnelle sont le citral dont la teneur varie entre 65 et 86%, renferme dans les mêmes proportions du néral et du géraniol, le myrcène traces jusqu'à 20%, le camphène traces à 10% et le géraniol 2 à 10%, ils sont accompagnés d'acétate de géranyle, de linalol, de nérol, de citronellal et de 2-méthylhept-5-èn-2-one.

Selon **MENUT.C, BESSIERE.TM**, l'étude de la composition chimique de leurs huiles essentielles a permis de décrire un seul chémotype de *cymbopogonproximus* à pipéritone(70%)[51].

3-4- Toxicologie

La toxicité des huiles essentielles du Citronnelle est liée à la présence de citral (DL50 = 460 mg/kg chez le rat). Cet aldéhyde dont la tératogénicité a été observée chez le rat, est un irritant muqueux et cutané ayant un effet sédatif à fortes doses. Ingérée dans la nourriture à des doses toxiques par des rates gravides, le citral n'a provoqué qu'une baisse minime de la taille et du poids fœtal.

En outre, l'inhalation de citral chez le rat n'a pas démontré d'activité sur le développement fœtal à part une diminution du poids fœtal et une hypoplasie osseuse.

Une réduction des follicules due à une dégénérescence des oocytes associée à des morts fœtales a été observée après administration chez le rat, de 300 mg/kg/jour de citral par voie intrapéritonéale et 460 mg/kg/jour par voie dermique. Aucun des nouveau-nés n'a survécu après 100 jours de traitement topique.

Ces résultats contradictoires donnent des conclusions différentes selon les bases de données en toxicologie, ainsi Reprotox@ classe le citral comme « n'interférant pas avec le développement embryonnaire chez le rat » alors que Reptext@ le classe comme tératogène chez l'animal [28].

Il n'existe pas de données chez l'homme.

4- *Origanum majorana* (marjolaine)

4-1- Historique et origine

La marjolaine (*Origanum majorana*) est une plante annuelle de la famille des lamiacées, cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles aromatiques. C'est une espèce, très proche de l'origan, qui possède des feuilles de 1 à 2 cm de long, opposées, d'un vert grisâtre, de forme ovale entière. Ses fleurs sont petites, blanches ou mauves, disposées en groupes serrés à l'aisselle des feuilles avec deux bractées en forme de cuillère. (Vera et Channe- Ming, 1999).

Cette herbe s'emploie sous forme de feuilles fraîches ou séchées, seule ou en mélange avec d'autres herbes, pour aromatiser de nombreuses préparations culinaires. La marjolaine est connue aussi pour ses propriétés anaphrodisiaques. C'est une plante aromatique très utilisée en cuisine, notamment dans les mets culinaires méditerranéens, son huile essentielle est connue pour sa propriété antiseptique. (Furia et Bellanca, 1971).

Au Maroc, il est rencontré dans le Rif, le pré- Rif et le Moyen Atlas. Autrefois, l'utilisation de l'origan était plus médicinale que culinaire.



Les Grecs utilisaient les feuilles pour faire des cataplasmes soulageant les muscles douloureux.

Les Romains l'employaient dans les cas de morsures de serpents et scorpions. Aujourd'hui, l'origan est utilisé en infusion en cas de rhume et pour stimuler la digestion. L'huile essentielle d'origan est un antiseptique puissant, mais il est également recommandé contre les douleurs spasmodiques, la fatigue et le stress.

Sa saveur puissante et poivrée en fait un aromate important des cuisines méditerranéennes [52].

4-2- Usage traditionnel et médicinal

Outre ses qualités aromatiques très appréciées en cuisine, la marjolaine dispense de différents bienfaits médicaux. Elle est recommandée notamment contre les spasmes intestinaux, les [flatulences](#) et les nausées. Elle a aussi des propriétés [anti-diarrhéiques](#). Cette plante permettrait encore de stimuler l'appétit, la production de suc [gastrique](#) voire de calmer les accès de la toux.

Des vertus [antiseptiques](#) et [antalgiques](#) lui sont enfin reconnues. L'[huile essentielle](#) de marjolaine est indiquée dans le traitement des douleurs articulaires ou en [bains de bouche, contre les aphtes](#). Cependant avant toute utilisation, il est préférable de demander conseil à votre médecin ou à votre pharmacien [52].

4-3- Composition chimique

D'après **Kahouli.I,(2010)**, l'analyse de l'huile essentielle de la marjolaine a permis d'identifier la présence d'une trentaine de composés, représentant un pourcentage 94,33 % du volume total de l'huile essentielle. Les composés principaux de cette huile essentielle sont le terpinèn-4-ol à raison de 38,3%, l'a-terpinène à raison de 12,5%, l' α -terpinène à raison de 8,1%, l' α -terpinéol à raison de 6,9% et l'acétatemyrcényle à raison de 4,5%. On retrouve, aussi, du p-propényle d'arsole (1%), de l'hydrate-cis-sabinène (1,1%), du spathuléol (1,13%), du p-cis-menth-2-en-1-ol (1,62%), du p-cymène (1,97%), dulinalool (2,31%), du terpinolène (2,88%), du p-phellandrène (2,18%) et de l' α -phellandrène (2,12%)[52].

4-4- Toxicologie

Déconseillée chez les femmes enceintes, la marjolaine est totalement contre-indiquée dans le cas d'asthme et de terrain épileptique ; elle peut causer des irritations cutanées [53].

5- *Eucalyptus camaldulensis* (Eucalyptus)

5-1- Historique et origine

Remède aborigène utilisé depuis des milliers d'années sur son continent d'origine, l'Australie, l'**eucalyptus** fournit la nourriture exclusive du koala, un de leurs animaux fétiches. Mais il est par ailleurs **utilisé depuis des milliers d'années**, pour de nombreux usages, dont des usages médicaux. Il s'est très rapidement développé dans le reste du monde.

L'eucalyptus était à l'origine planté dans des zones marécageuses, pour les assécher, car il joue un vrai rôle de pompe. Cet usage, très développé chez les aborigènes vivants en Tasmanie, avait pour conséquence d'éradiquer les insectes, porteurs de maladies.

Les feuilles étaient de plus utilisées par les aborigènes pour **traiter les fièvres** (notamment la malaria), d'où son nom d'arbre à la fièvre. Son usage s'est ensuite développé dans de nombreuses **médecines traditionnelles** (chinoise, indienne et grecque).



La production massive d'huile essentielle d'eucalyptus a débuté au milieu du XIX^e siècle, en Australie [28].

5-2- Usage traditionnel et médicinal

La note explicative de l'agence du médicament (1998) indique que la feuille d'eucalyptus peut être utilisée au cours des affections bronchiques aiguës et bénignes, ainsi que pour le traitement de la rhinite et du rhume.

La commission E du BfArM précise que l'huile essentielle d'eucalyptus est usée dans les inflammations des voies respiratoires.

La monographie communautaire de l'HMPC du 31 octobre 2007, rapporte deux indications d'usage traditionnel : traitement de la toux associée au rhume et traitement symptomatique des douleurs musculaires localisées, celles-ci uniquement sur la base d'un usage ancien.

De nombreuses études démontrent les activités antimicrobiennes, antifongiques et antivirales (Herpes virus) de l'huile essentielle d'eucalyptus.

Actuellement, elle entre dans la composition de nombreux médicaments dispensés en pharmacie, ainsi que dans celle de nombreux produits d'hygiène dentaire [28].

5-3- Composition

Pour être conforme à la Pharmacopée Européenne, l'huile essentielle d'eucalyptus doit contenir au moins 70%, du 1,8-cinéole, des traces jusqu'à 9% du α -pinène, moins de 1,5% du β -pinène, moins de 1,5% du α - phellandrène, des traces jusqu'à 12% du limonène et moins de 0,1%.camphre [28].

Il existe de nombreux chémotypes d'*Eucalyptus*, l' *E. radiata* Sieberex appartient aux huiles essentielles d'eucalyptus à phellandrène et cinéole (respectivement présents à 40 et 50%).

5-4- Toxicologie

Une étude de tolérance cutanée de l'huile essentielle d'eucalyptus ne rapporte aucune réaction et conclut sur son excellente tolérance cutanée.

Cependant, de nombreux cas d'intoxication à l'huile essentielle d'eucalyptus ont été publiés. Un rapport de 2002 les recense. Les quantités ingérées varient entre 1 et 220 ml. Les symptômes décrits sont des troubles gastro-intestinaux suivis d'une dépression du SNC et coma transitoire. Deux patients durent être dialysés (21 et 220 ml ingérés) et deux décès furent constatés (3,5 et 5 ml ingérés).

Un cas d'intoxication sévère a été rapporté en Pologne chez un homme de 58 ans après ingestion de 4 à 5 gouttes d'huile essentielle pure. Ont été observés des lésions aiguës des poumons et du cœur, une tachycardie et une hypotension. La plupart des symptômes et des anomalies biologiques ont disparu après traitement.

Constituant principal de l'huile essentielle d'eucalyptus, le cinéole a été rendu responsable de brûlures gastriques, nausées, vomissements, vertiges, tachycardie et suffocation chez l'enfant (de un mois à 3 ans) [28].



6- *Juniperus phoenicea*(Genévrier rouge)

6-1 Historique et origine

Le genre botanique des genévriers, également appelé poivre du pauvre, nom scientifique *Juniperus*, famille des Cupressacées, comporte un grand nombre d'espèces, des variétés « rigides » aux aiguilles piquantes et des variétés « souples » au feuillage en écailles.

D'origine américaine, asiatique, africaine et européenne, cet arbre atteint couramment 4 à 15 m de haut dans la nature, et même 25 à 30 m pour certaines espèces. Il supporte les sols pauvres, éventuellement très calcaires (il est souvent associé aux coteaux calcaires en France), sablonneux et secs, jusqu'à 4 500 m d'altitude. Certaines espèces de genévrier peuvent vivre plus de 1 000 ans.

Le genévrier était une plante appréciée des Grecs anciens et des Romains. Ces derniers utilisaient l'huile de cade, obtenue en chauffant le bois de genévrier : elle servait à la toilette des morts.

Dans l'Antiquité et au Moyen Âge, le genévrier était utilisé comme panacée, ses fumigations étaient réputées désinfectantes (notamment utilisées dans les rues pour combattre les épidémies de peste et de choléra) et le « vin de genièvre » avait des vertus diurétiques [54].

6-2 - Usage traditionnel et médicinal

Seuls le genévrier commun (*Juniperus communis*) et le genévrier cade (*Juniperus oxycedrus*) sont comestibles. Les baies, les jeunes pousses mais surtout les cônes, préparés en infusion, ont des effets diurétiques, stomachiques et digestifs. Ils auraient été utilisés contre l'asthme.

Plus qu'un traitement des digestions très difficiles et des gaz intestinaux, les baies de genièvre sont ajoutées préventivement lors de la préparation des plats un peu lourds afin de faciliter leur digestion [54].

6-3-Composition chimique

Trois constituants chimiques dominent l'huile essentielle des rameaux de *J. phoenicea* ssp. Il s'agit de l' α -pinène (34,23 %), du δ -3-carène (20,64 %) et du limonène (14,56 %) accompagnés d'autres constituants avec des pourcentages moins importants : acétate d' α -terpényle (6,80 %), β -pinène (4,65 %), terpinolène (4,12 %) et α -phellandène (2,19 %). En revanche, un seul constituant, l' α -pinène, est majoritaire dans l'huile essentielle des fruits de Mehdiya avec un pourcentage de 79,08 %. D'autres composés sont également présents dans cette essence, mais à des teneurs relativement faibles : δ -3-carène (5,72 %), β -pinène (3,10 %) et limonène (3,09 %). On note aussi que certains composés tels que le myrcène, l' α -terpinène, le myrcénol, le trans-pinocarvéol, le terpinène-4-ol, l' α -terpinéol et le citronellol sont spécifiques à l'huile essentielle des rameaux de *J. phoenicea* ssp. *lycia*. Inversement, l' α -fenchène, le camphène, le verbenène et l' α -humulène sont caractéristiques de l'essence des fruits de cette sous-espèce [54].

6-4- Toxicité

Un usage excessif du genévrier peut provoquer des troubles rénaux et ne doit pas être utilisé en cours de grossesse [54].

7- *Juniperus thurifera*(Genévrier thurifère)

7-1- Historique et origine



Le Genévrier thurifère, *Juniperus thurifera* L.(Cupressaceae), est un arbre endémique de quelques pays riverains de la méditerranée : Algérie, Maroc, Espagne, France (Corse comprise) et Italie. Mais cette essence extraordinaire est avant tout une gymnosperme. Elle appartient à l'un des Embranchements taxonomiques les plus anciens du globe, apparu au Paléozoïque, précisément au Dévonien, il y a 300 millions d'années. Néanmoins, son épanouissement évolutif s'est produit au cours du Mésozoïque, principalement au Jurassique, il y a 150 millions d'années, période où 10 000 espèces environ de gymnospermes se sont différenciées. Cette importante diversité a été plus tard affectée par les événements géologiques et changements climatiques divers jusqu'au point de perdre 90% de ses effectifs. Il ne reste plus aujourd'hui que 1 000 espèces vivantes de gymnospermes (Ruiz de la Torre 2006) et c'est à juste titre que le professeur Gaussen (1968) parlait dans ses ouvrages monographiques des « gymnospermes actuelles et fossiles ». Encore plus surprenant, aujourd'hui nous pouvons ajouter à ces deux sous-groupes celui des « fossiles vivants », l'un des derniers, découvert en 1994 aux antipodes, étant le *Wollemianobilis*, Araucariacée des Blue Mountains, près de Sydney (Australie) (Woodford 1997)[55].

7-2- Usage traditionnel et médicinal

Les feuilles de *J. thurifera* peuvent être aussi utilisées en décoction comme abortif ou en cataplasme contre les migraines, maux de tête et insulations. La drogue *sanina*, tirée de la décoction des feuilles du genévrier thurifère, de saveur amère et à forte odeur, serait un produit dangereux selon J. Nauroy (1954 : 20). Ces mêmes feuilles sont aussi employées contre les hémorroïdes.

Les usages médicinaux des produits issus des genévriers en pays berbère viennent d'avantage de la distillation de leur bois pour l'obtention d'huile et de goudron, plutôt que de l'exploitation de leurs baies comme c'est le cas en Europe en particulier pour le genévrier commun (*J. Communis*). Les baies bleues de cet arbre moins présents en Afrique du Nord que le genévrier rouge (*J. Phoenicea*), sont parfois utilisées comme condiment mais ne semblent pas avoir engendré d'emplois généralisés comme aromate ou remède stomachique, antiseptique, expectorant, sédatif, etc., si anciens sur les rives nord de la Méditerranée (voir L. Portes 1993 et J. Bellakhdar, 1997, p. 271-274) [56].

7-3- Composition chimique

Les résultats obtenus montrent que les fruits sont riches en essences monoterpéniques (60%) telles que l' α -pinène (13%) et le verbinone (6%). Les feuilles sont riches en sesquiterpènes cycliques (87%) dont les composés majoritaires identifiés sont d-cadinène(6%) et b- caryophyllène (5%), alors que le bois est aussi riche en composés sesquiterpéniques (58%) avec le cedrol (13%) comme constituant majoritaire[57].

7-4- Toxicité

C'est une plante hautement toxique. Il ne faut pas la confondre avec le [genévrier commun](#) qui peut se rencontrer dans les mêmes habitats mais dont les fruits sont comestibles. Cette toxicité est due à ses huiles essentielles qui contiennent du [thuyone](#) et du [sabinol](#). En outre, le pyrogallol bloque complètement le circuit intestinal, les animaux qui en ont consommé meurent rapidement[57].

IV. Généralité sur les plans d'expérience

1- Définition

La méthodologie des plans d'expériences correspond à une série d'essais définis à partir d'une stratégie optimale permettant la prédiction d'une réponse avec le minimum d'erreurs et un minimum d'essais sur la base d'un modèle postulé.

Selon la [Norme ISO 3534-3]: Les plans d'expériences constituent essentiellement une planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique [58].

2- Conception

La répartition des essais n'est pas une sélection au hasard ou à l'intuition; elle respecte des critères statistiques[58].

3- La formule du problème

L'étude d'un phénomène peut, le plus souvent, être schématisé de la manière suivante : on s'intéresse à une grandeur Y , que nous appellerons par la suite réponse qui dépend d'un grand nombre de variables $X_1, X_2, \dots, X_n$, que nous appellerons par la suite facteurs[58,59].

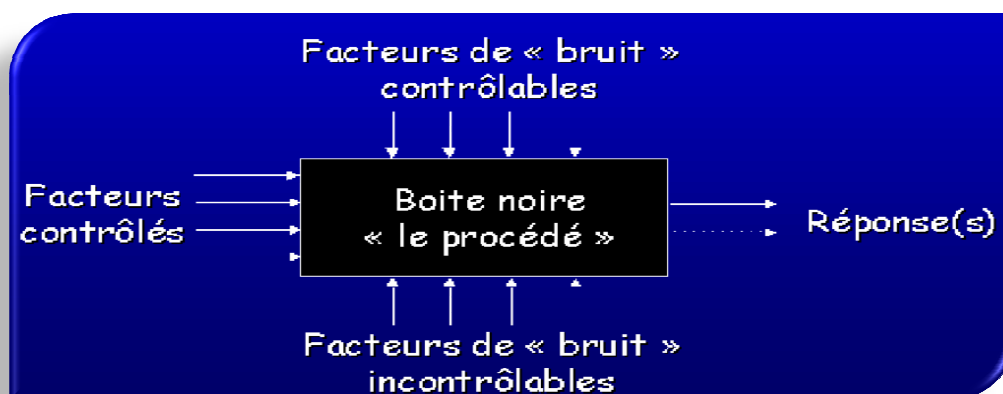


Figure n°5: La formule du problème [58,59]

4- Modélisation des plans d'expériences

La modélisation mathématique consiste à trouver une fonction f telle que : $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$. Une méthode classique d'étude consiste en la mesure de la réponse Y pour plusieurs valeurs de la variable X_i tout en laissant fixe la valeur des $(n - 1)$ autres variables. On itère alors cette méthode pour chacune des variables. Ainsi, par exemple, si nous avons 4 variables et si l'on décide de donner 5 valeurs expérimentales à chacune d'elles, nous sommes conduits à effectuer $5^4 = 625$ expériences. Ce nombre élevé dépasse les limites de faisabilité tant en temps qu'en coût. Il faut donc réduire le nombre d'expériences à effectuer sans pour autant perdre sur la qualité des résultats recherchés. L'utilisation d'un « plan d'expérience » donne alors une stratégie dans le choix des méthodes d'expérimentation. Le succès des plans d'expériences dans la recherche et l'industrie est lié au besoin de compétitivité des entreprises: ils permettent une amélioration de la qualité et une réduction des coûts [60].

5- Domaine expérimental d'intérêt

Le domaine expérimental possible (ou domaine d'opérabilité) est le sous-ensemble du domaine des facteurs contenant les expériences réalisables.

Dans la pratique, ce domaine est souvent lui-même réduit au domaine expérimental d'intérêt dans lequel nous recherchons les informations désirées [59].

Facteur 2

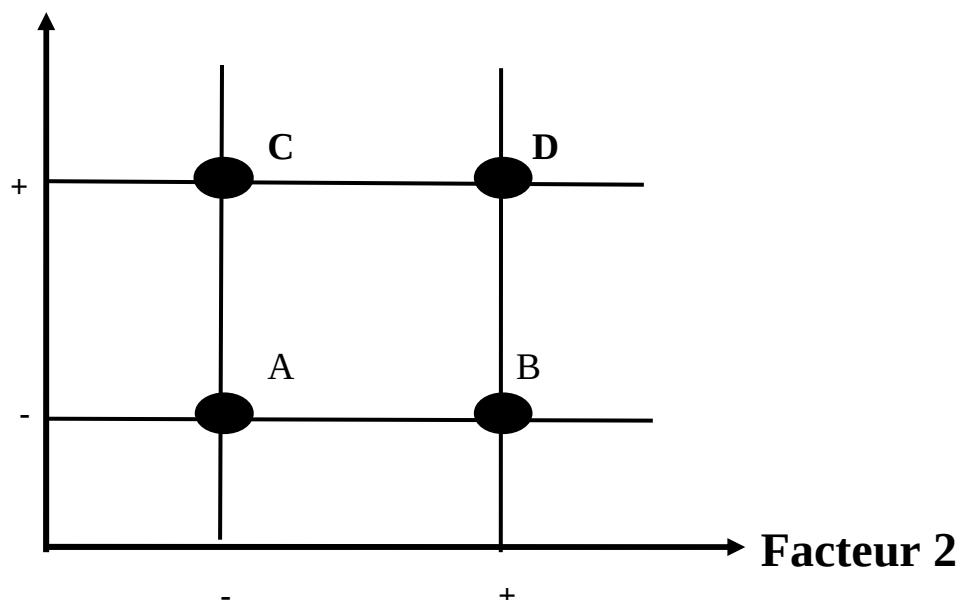


Figure n°6 : Emplacement des points expérimentaux dans le domaine expérimental

6- Domaine d'application

Il s'applique :

- Aux études techniques avec détermination des cotations et tolérances.
- A l'optimisation de processus.
- A l'étude des moyens de fabrication.
- Aux essais de mise au point.
- Aux essais d'endurance.
- Aux essais de laboratoire[59].

7- Avantages de la méthode par rapport à une méthode d'expérimentation traditionnelle

Ses avantages sont nombreux, il s'agit :

- D'effectuer moins d'essais.
- La précision et l'optimisation des résultats.
- La stratégie d'essais : essais planifiés.
- L'interprétation graphique simple.
- La révélation d'interaction entre les paramètres.
- Les conclusions fiables.
- La capitalisation du savoir-faire[59].

8- Différents types des plans d'expériences

Il existe plusieurs types des plans d'expériences, on site :

Plan de criblage :



Il est conçu pour déterminer les facteurs les plus importants affectant une variable de réponse. Les facteurs peuvent être quantitatifs ou qualitatifs à deux niveaux uniquement [60].

Plan de mélange :

Ce type de plan nous permet de connaître si une ou plusieurs propriétés dépendent de la proportion de chaque constituant dans le mélange étudié.

La démarche générale des plans de mélange consiste à traduire la variation d'une réponse en fonction des constituants du mélange par la relation $Y = f(X_i)$ avec $X_i = 1$ et i varie entre 1 et k (le nombre total de facteurs) [60].

Plans de modélisation : relation mathématique lie réponses mesurées aux variables associées aux facteurs [61]

➤ **Plans factoriels complets à deux niveaux :**

Ces plans permettent l'étude de k facteurs à raison de deux niveaux (-1, +1) par facteur. Ils renferment toutes les combinaisons possibles des k facteurs à leurs deux niveaux.

Pour étudier k facteurs, sur la base des plans factoriels à deux niveaux, il faut réaliser 2^k essais, d'où le nom de plans 2^k donné à cette famille de plans.

La matrice des essais comporte k colonnes et 2^k lignes [58].

➤ **Plans fractionnaires à deux niveaux :**

Les plans fractionnaires à deux niveaux sont des plans optimaux, permettant de réduire la charge expérimentale, proposée par un plan factoriel complet, en focalisant sur les effets les plus intéressants.

Un plan factoriel complet comporte 2^k essais et permet d'estimer, non seulement les effets des facteurs, mais aussi toutes leurs interactions possibles. De ce fait, on est toujours amenées à faire plus d'essais pour collecter moins d'informations car les interactions d'ordre supérieur ou égal à 2 sont négligeables et ne peuvent rien nous apporter.

La solution proposée par les plans fractionnaires consiste à utiliser pour l'étude de k facteurs les matrices des effets des plans complets 2^{k-p} . L'avantage de ces plans est évident : la charge expérimentale est divisée par 2^p par rapport aux premiers plans, p est le nombre de facteurs aliasés « confondus » délibérément, c'est-à-dire qui ont des niveaux de même alternance dans la matrice des expériences [59].

1- Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude prospective, réalisée sur une durée de 5 mois allant du 13 janvier au 31 mai. Elle a comporté 3 volets :

- Le 1^{er} a comporté une enquête de recueil des informations préliminaires sur l'utilisation des huiles essentielles/ plantes aromatiques et leurs efficacités.



- Le second a consisté en une évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur des germes préalablement isolés de l'environnement d'hémodialyse. Il a englobé :
 - Un aspect qualitatif : réalisé pour tester l'activité antibactérienne des huiles essentielles
 - Un aspect quantitatif : effectué pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).
- Le 3ème a consisté en un criblage des facteurs influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles ayant prouvé une efficacité élevée, par la méthodologie des plans d'expériences.

2- Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de l'hôpital Al Ghassani de la ville de Fès.

3- Analyse des données recueillies

Une grille d'évaluation comportant plusieurs volets se rapportant aux plantes aromatiques / huiles essentielles, a été élaborée, distribuée au hasard et remplies par 200 participants. Les variables étudiées sont montrées en annexe 3 et ont intéressé notamment : l'utilisation, le type des huiles essentielles, le motif d'usage, etc.

Les grilles remplies ont été traitées par le logiciel Excel, version 2007.

4- Evaluation de l'activité antibactérienne et détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles

4-1- Matériels

4-1-1- Matériel végétal : huiles essentielles

Le choix des plantes est basé sur leur disponibilité au Maroc, leur rendement, ainsi que sur la recherche bibliographique visant les plantes médicinales et aromatiques dont les huiles sont connues par leur activité antiseptique et antibactérienne,

Les plantes retenues sont :

- ❖ *Thymus vulgaris* (Thym)
- ❖ *L'origanum majourana* (Marjolaine)
- ❖ *Eucalyptus camaldulensis* (Eucalyptus)
- ❖ *Lavandula officinalis* (Lavande)
- ❖ *Cymbopogon citratus* (Citronnelle)
- ❖ *Juniperus thurifera* (Genévrier thurifère)
- ❖ *Juniperus phoenicea* (Genévrier rouge)

4-1-2- Matériel biologique : Souches bactériennes

Nous sommes intéressés à des souches bactériennes isolées de l'environnement (surface, air, ..) du centre d'hémodialyse de l'hôpital Al Ghassani. Le nombre total de souches est de 35. Leur répartition est montrée dans le tableau suivant.

Tableau n°1 : Liste des souches bactériennes testées



Identification de la souche	Type de Gram	Code des souches testées	Nombre des souches testées
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	St.A	7
<i>Staphylococcus coagulase négative</i>		St. Nc	5
<i>Streptococcus</i>		Str	3
<i>Bacillus sp</i>		Ba sp	5
Bacille à Gram négatif et oxydase positive	Négatif	BGNOP	5
Bacille à Gram négatif et oxydase négative, fermentaires		BGNONF	5
Bacille à Gram négatif et oxydase négative, non fermentaires		BGNONNF	5

4-1-3- Matériel et consommable utilisé

Le matériel et le consommable utilisé aussi bien pour l'évaluation de l'activité antibactérienne que pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice, comprend :

- Matériel de stérilisation: autoclave ($121\pm 3^{\circ}\text{C}$) et four pasteur ($175\pm 5^{\circ}\text{C}$) ;
- Etuves réglé à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Matériel pour préparation et conservation de milieux de culture : balance, bain-marie, réfrigérateur réglé à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$;
- Boîtes de pétri en verre stériles,
- Bec benzen,
- Pince,
- Micropipette réglable,
- Cônes stériles,
- Pipettes jetables,
- Disques commercialisés de diamètre 6 mm,
- Tubes eppendorfset tubes à hémolyse stériles,
- Milieux de culture : Plat count agar (PCA), Bouillon HeartInfusin (BHI), Muller Hinton, l'agar-agar 0,2%
- Solvants : Diméthyle sulfoxyde (DMSO), Ethanol, Agar 0,2%.

N.B : La composition, la préparation, et les contrôles qualités des milieux de culture sont décrits en annexe (annexe 4).

4-2- Méthodes

A-Repiquage des souches sur gélose nutritive

Les souches bactériennes testées ont été préalablement isolées et conservées au surgélateur à $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$. Elles sont ensemencées dans le milieu PCA et incubées à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h, pour obtenir des cultures fraîches.



B-Préparation de l'inoculum

A partir de la gélose nutritive (PCA), un inoculum de 10^6 UFC/ml a été préparé pour chaque souche bactérienne par un ensemencement du milieu BHI et incubation à $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 3H.

C- Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles : Aromatogramme

1. Technique

La méthode choisie est la méthode des disques d'agar.

L'ensemencement de l'inoculum préalablement préparé et homogénéisé, a été réalisé aseptiquement, par inondation du milieu Muller Hinton. Après 15 à 30min, les disques stériles ont été déposés à l'aide d'une pince stérile dans les boîtes inoculées. L'imprégnation des disques par l'huile a été ensuite effectuée à raison de 5µl / disque. L'incubation a été effectuée à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18 à 24 heures (annexe 5).

2. Lecture et expression des résultats

Après 18 à 24 H d'incubation, une mesure du diamètre des auréoles d'inhibitions en mm, à l'aide d'un pied à coulisse, a été réalisée. L'absence de la croissance microbienne se traduit par la présence d'une auréole transparente autour du disque, identique à la gélose stérile [32].

D- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Elle a été achevée pour les huiles essentielles ayant montré une efficacité élevée.

Avant le déroulement des différentes étapes suivies pour la détermination de la CMI, nous avons d'abord repiqué les souches sur gélose nutritive et ensuite préparé l'inoculum en se basant sur la technique décrite dans le paragraphe (4-2-A et 4-2-B). Nous avons par la suite dilué les huiles et enfin procédé à leur mise en contact avec les souches bactériennes.

1. Dilutions des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été dissoutes dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO). Des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 200 à 0.99mg/ml, sachant que la concentration de la solution mère de chaque huile est de 200mg/ml.

N.B : Avant chaque passage à la dilution suivante, une agitation au vortex a été effectuée.

2. Détermination des CMI

La méthode utilisée est la méthode des disques d'agar.

L'ensemencement de l'inoculum a été réalisé aseptiquement, par inondation du milieu Muller Hinton. Après 15 à 30min, les disques stériles ont été déposés à l'aide d'une pince stérile dans les boîtes inoculées. L'imprégnation des disques par les dilutions successives de l'huile, préalablement effectuées, a été réalisée après homogénéisation au vortex, à raison de 10 µl / disque. L'incubation a été effectuée à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18 à 24 heures (annexe 5).

E- Outil d'analyse

Le traitement des données est fait à l'aide de l'Excel.

5- Criblage des facteurs influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles

5.1. Plan de criblage



Le plan de criblage adopté est un plan de **plackett et Burman**. Ce choix est justifié par la rapidité et l'efficacité de la sélection des facteurs influents. Le nombre de répétition dans ce plan est un.

5.2. Matériels

Les caractéristiques du plan de criblage sont les paramètres et le domaine expérimental.

A. Paramètres retenus pour l'expérimentation

Pour réaliser le plan de criblage correspondant à l'activité antibactérienne des huiles, on retient comme facteurs :

- X1 : Type d'huile essentielle
- X2 : Température
- X3 : Lumière
- H4 : Humidité
- X5 : Dilution :

B. Domaine expérimentale

Les facteurs retenus et les niveaux étudiés sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau n°2: Domaine expérimentale

Facteurs	Unité	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Huile		Huile de thymus vulgaris	Huile d'origanum majorana	
Température	°C	10	35	
Lumière		sans	avec	
Humidité	%	50	70	
Dilution	µl	DMSO	AGAR 0. 2%	ETHANOL

5.3.Démarche méthodologique

La mise en œuvre d'un plan d'expérience pour étudier la surface de réponse d'un système expérimentale et trouver un optimum peut se résumer selon la procédure suivante :

- 1- Définir le problème à étudier ;
- 2- Sélectionner la réponse et les facteurs contrôlables ;
- 3- Définir le domaine expérimental, en fixant les niveaux des facteurs sélectionnés ;
- 4- Choisir un modèle ;
- 5- Choisir un plan d'expérience tenant compte des conditions propres au problème à traiter ;
- 6- Réaliser les essais ;
- 7- Traiter les données par un logiciel adéquat ;
- 8- Interpréter la validité du modèle postulé et la significativité des coefficients ;
- 9- Sélectionner les coefficients significatifs si le modèle est validé ;
- 10- Prédire les niveaux des facteurs à l'optimum ;
- 11- Faire un essai complémentaire en appliquant les valeurs optimales des facteurs pour valider les conclusions.



5.4. Logiciel utilisé

Pour la réalisation de ces expérimentations, on a utilisé le **logiciel NEMROD-W**

Notre étude a comporté plusieurs volets se rapportant aux plantes aromatiques / huiles essentielles. Dans le 1^{er} volet, nous avons réalisé une enquête portant sur la consommation des plantes/huiles essentielles ; dans le second volet, nous avons évalué l'activité antibactérienne et déterminé les CMI des huiles essentielles sur des germes isolés de l'environnement du centre d'hémodialyse de l'hôpital Al Ghassani ; dans le dernier volet, nous avons criblé les facteurs permettant d'améliorer l'action antibactérienne des huiles essentielles efficaces.

A- Analyse des données recueillies

Durant l'enquête, nous avons analysé et exploité 200 grilles comportant chacune 18 questions, soit 3600 questions. Cependant, nous n'allons présenter que les résultats des volets qui nous ont

paru les plus intéressants, notamment la fréquence d'utilisation, le type des huiles essentielles utilisées et le motif d'usage. Le reste de résultats est montré en annexe 6.

1- Fréquence d'utilisation des huiles essentielles

Comme le montre la figure 3, nous avons noté que la majorité des participants utilisent fréquemment les huiles essentielles, soit une fréquence de 86%.

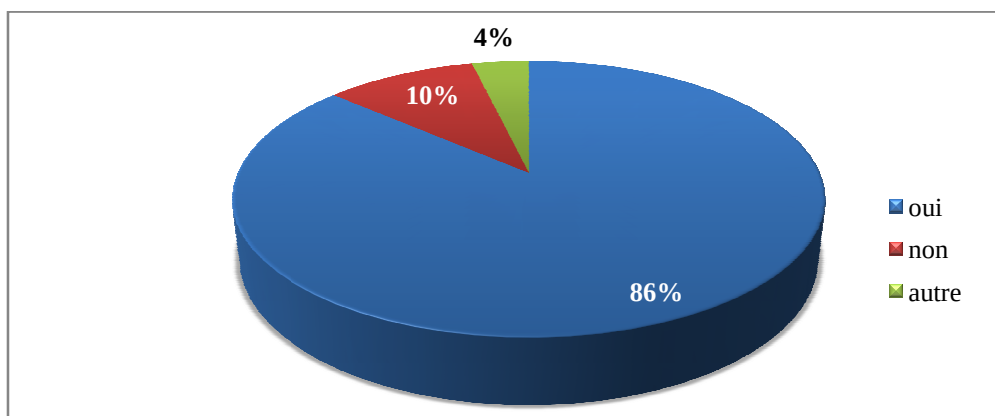


Figure n°7 : Fréquence d'utilisation des huiles essentielles

2- Type des huiles essentielles utilisées

La figure suivante représente les types des huiles essentielles utilisées. On remarque que la majorité des participants utilisent l'huile d'olive, soit un pourcentage de 23%. Les autres huiles sont aussi utilisés mais à des fréquences relativement plus faibles.

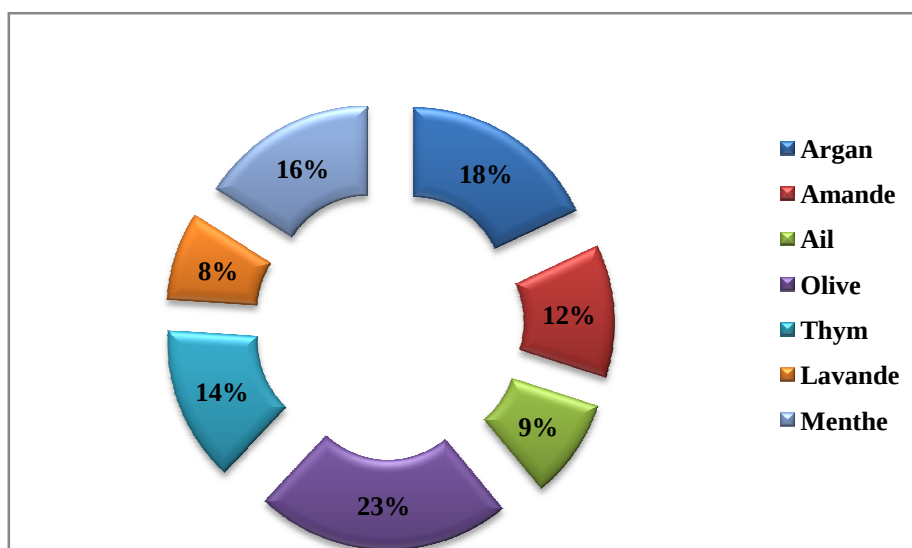


Figure n°8 : Distribution des types des huiles essentielles utilisées

3- Motif d'usage des huiles essentielles

Le motif d'usage des huiles essentielles, illustré dans la figure 5, a montré que les huiles sont plus utilisées à des fins cosmétiques, soit un taux d'utilisation de 80%

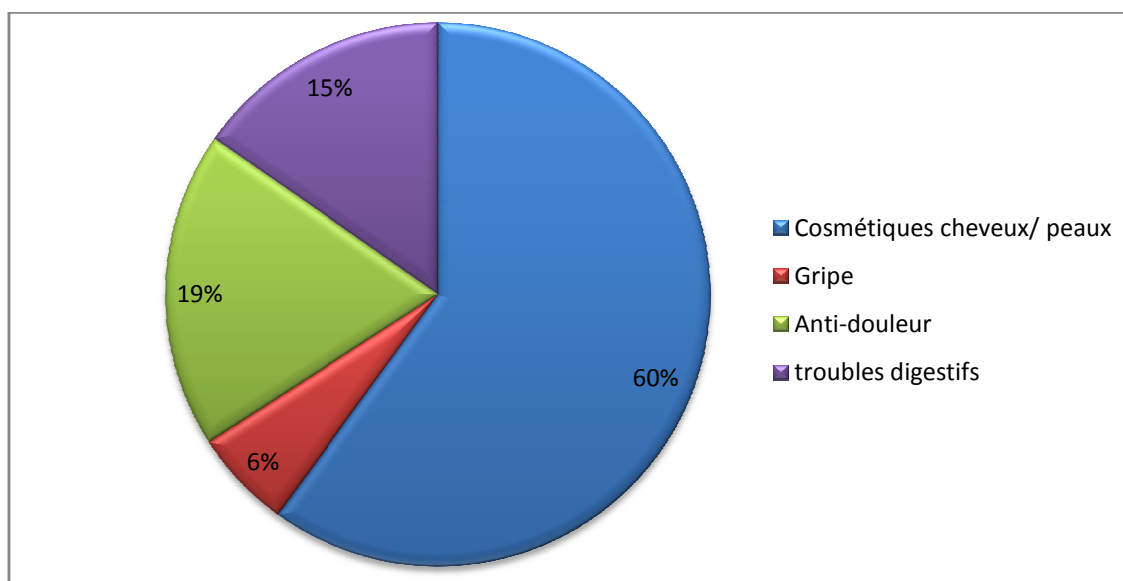


Figure n°9 : Distribution du motif d'usage des huiles essentielles

4- Connaissance des propriétés des huiles essentielles

On remarque que les propriétés des huiles essentielles connues par les participants, sont l'action antalgique et anti-diarrhéique (troubles digestifs) (24%), suivis par l'action antimicrobienne et la régulation hormonale (15%). D'autres propriétés ont été aussi notées, mais à des fréquences relativement plus faibles.

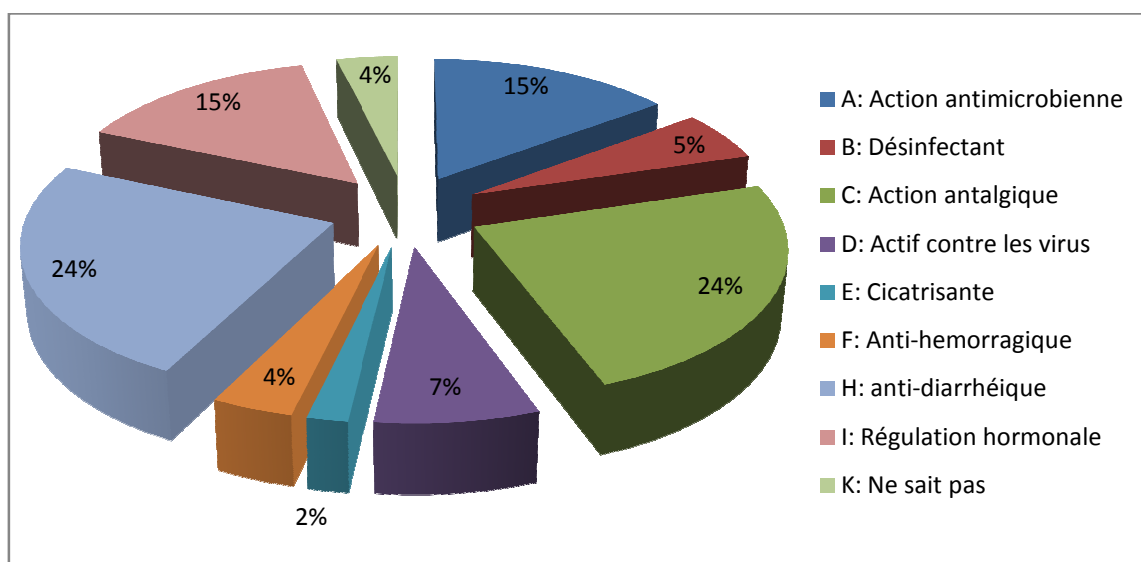


Figure n°10 : Propriétés des huiles essentielles connues par les participants

B- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

L'activité antibactérienne de 7 huiles essentielles a été évaluée sur 35 souches isolées de l'environnement d'hémodialyse (malades, air, surfaces des générateurs, des tables,...). La méthode de diffusion des disques, était la méthode choisie.

Les diamètres des auréoles d'inhibition ont été mesurés. Les souches ont été interprétées comme étant :



Souches	Identification	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Mesure du diamètre () en mm, Interprétation								
M25	<i>Staphylococcus aureus</i> pathogènes St.A	(46), S	(60), S	(9.5), I	(15), S	(10), I	(20), S	(10), I
M28b		(90), S	(90), S	(20), S	(7), R	(12), I	(38), S	(12), I
M36b		(41), S	(35), S	(15), S	(19), S	(11), I	(20), S	(11), I

- R
ésista
ntes

: si
D <
8mm

- M
odér
émen
t

sensi
bles :
si

8mm
< D
<
14m
m

- Sensibles : si $14\text{mm} < D < 20\text{mm}$
- Très sensibles : si $D > 20\text{mm}$

Les résultats de l'activité antibactérienne sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des auréoles d'inhibitions en mm.(voir photo annexe 7)

1- Détermination de la sensibilité globale des huiles vis-à-vis des souches testées

Les diamètres d'inhibition et leur interprétation en sensibilité et résistance, sont représentés dans le tableau suivant

Tableau n°3 : Diamètres d'inhibition et sensibilité globale aux huiles essentielles vis-à-vis de toutes les bactéries testées



M47b		(39), S	(41.5), S	(17.5), S	(9.5), I	(11), I	(10), I	(10), I
M51b		(37), S	(48), S	(14), S	(10), I	(9), I	(19), S	(11), I
M53		(39), S	(38), S	(22.5), S	(18), S	(9.5), I	(15), S	(12), I
M56B		(35), S	(60), S	(13), I	(14), S	(11), I	(14), S	(12), I
G12	Bacille gram négatif oxydase positive BGNOP	(36), S	(70), S	(20), S	(38), S	(10.5), I	(45), S	(13), I
G14		(37), S	(33), S	(10.5), I	(18), S	(9.5), I	(28), S	(15), S
G29		(38), S	(28), S	(12), I	(8), I	(7), R	(16), S	(10), I
G36		(29), S	(57), S	(35), S	(17), S	(11), I	(10), I	(85), S
G37		(35), S	(27), S	(10), I	(20), S	(6.5), R	(20.5), S	(15), S
G16	Bacille gram négatif oxydase négative fermentaire BGNONF	(26), S	(34), S	(10), I	(17), S	(9), I	(80), S	(13), I
G21		(26), S	(43), S	(32), S	(11), I	(10), I	(36), S	(11.5), I
A1a		(28), S	(25), S	(11), I	(26), S	(7.5), R	(10), I	(9), I
E46a		(23), S	(27), S	(30), S	(14), S	(12), I	(17), S	(15), S
E21a		(46), S	(41), S	(35), S	(7), R	(16), S	(11), I	(7), R
G18	Bacille gram négatif oxydase négatif non fermentaire BGNONNF	(38), S	(30), S	(12), I	(18), S	(10.5), I	(13), I	(9.5), I
E34		(90), S	(90), S	(27), S	(34), S	(90), S	(13), I	(40), S
E27		(90), S	(90), S	(45), S	(90), S	(90), S	(40), S	(75), S
E26		(90), S	(90), S	(90), S	(29), S	(90), S	(20), S	(35), S
E24		(90), S	(90), S	(90), S	(40), S	(90), S	(37), S	(17), S
G50	<i>Bacillus sp</i> Ba sp	(83), S	(90), S	(12), I	(81), S	(15), S	(23), S	(15), S
G52		(34), S	(75), S	(27), S	(19), S	(10), I	(16), S	(12), I
T1		(44), S	(60), S	(7), R	(10), I	(9.5), I	(22), S	(10), I
T2b		(30), S	(54), S	(24), S	(20), S	(11), I	(13), I	(11), I
E31a		(30), S	(18), S	(8.5), I	(6), R	(11), I	(6), R	(6), R
G55	<i>Staphylococcus</i> non pathogènes St. Nc	(39), S	(60), S	(20), S	(10), I	(10), I	(11), I	(12), I
G56		(29), S	(90), S	(13), I	(27), S	(21), S	(18), S	(15), S
G33		(19), S	(16), S	(8), I	(12), I	(10), I	(9), I	(7.5), R
G34		(16), S	(24), S	(10), I	(11), I	(7), R	(13), I	(15), S
G35		(24), S	(30.5), S	(10), I	(8), I	(10), I	(11), I	(7), R
G44	<i>Streptococcus</i> Str	(71), S	(48), S	(11), I	(12), I	(7.5), R	(11), I	(8), I
G45		(34), S	(28), S	(11), I	(12), I	(7), R	(10), I	(6.5), R
G47		(26), S	(27), S	(7.5), R	(7), R	(7.5), R	(11), I	(6.5), R

S :
sensi
ble ;
I :
inter
médi
aire ;
R :
résist
ante
Le
s
pourt
entag
es de
la
sensi
bilité
ainsi
que
la
résist
ance
des
 bacté
ries
testée
s aux
différ
entes
huiles
essen
tielles

sont représentés dans les figures suivantes :

2- Evaluation de la sensibilité des *Staphylococcus aureus* vis-à-vis les huiles essentielles testées

La figure suivante représenté les % de sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* testées aux huiles essentielles étudiées. Ces souches ont été isolées de prélèvements nasaux de malades hémodialysés et sont résistantes à l'oxacilline.

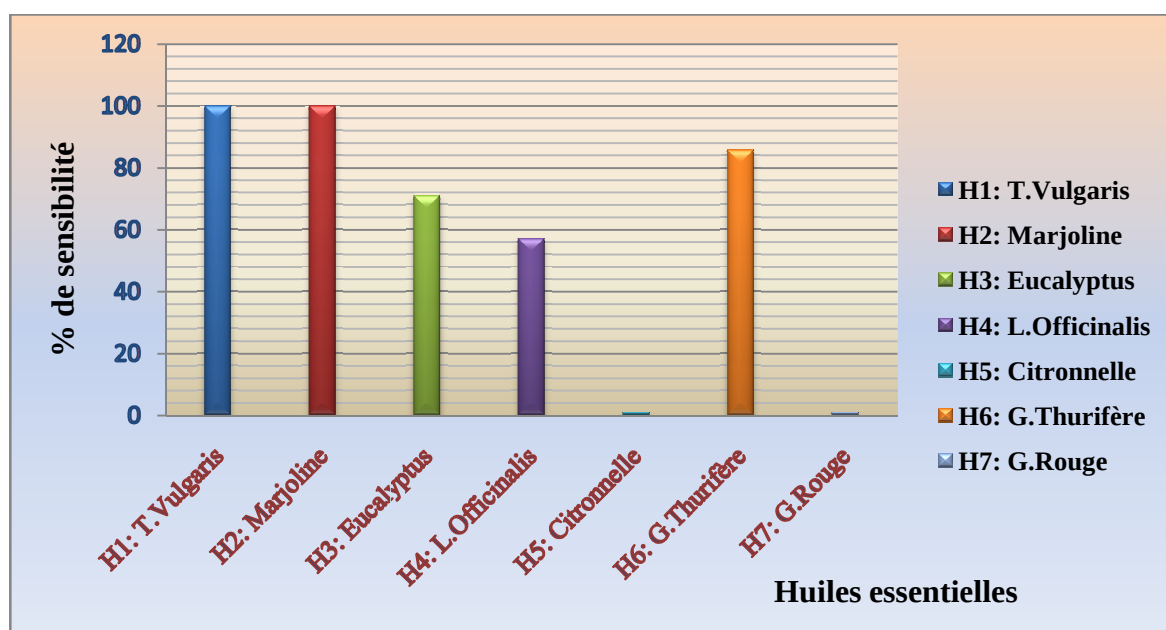


Figure n°11: % de sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis des huiles essentielles testées

On remarque que les huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, de marjoline, d'Eucalyptus et de Genévrier thurifère ont un large spectre d'action, elles ont agi contre les souches de *Staphylococcus aureus* mais avec des efficacités différentes.

Les huiles essentielles de *thymus vulgaris* et de marjoline ont exercé une activité inhibitrice maximale, soit un pourcentage d'inhibition de 100% (les diamètres d'inhibition ont varié de 35 à 90mm), alors que le Genévrier thurifère et l'Eucalyptus ont montré respectivement un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 85.7% (avec des diamètres compris entre 10 et 38 mm), et de 71% (avec des diamètres de 9.5 à 22.5 mm).

L'HE de *Lavandula officinalis* a exercé une activité inhibitrice moyenne vis-à-vis des souches de *Staphylococcus* testées, soit un pourcentage de 57% (diamètres d'inhibition de 7 à 19mm). Cependant, l'HE de Citronnelle et celle de Genévrier rouge ont exercé une activité antibactérienne intermédiaire ($D < 14$, soit compris entre de 9 à 12mm).

3- Evaluation de la sensibilité des souches de *Staphylococcus coagulase négative* vis-à-vis les huiles essentielles testées

La figure suivante représente les % de sensibilité des souches de *Staphylococcus coagulase négative* testées aux huiles essentielles étudiées. Ces souches ont été isolées de l'environnement d'hémodialyse.

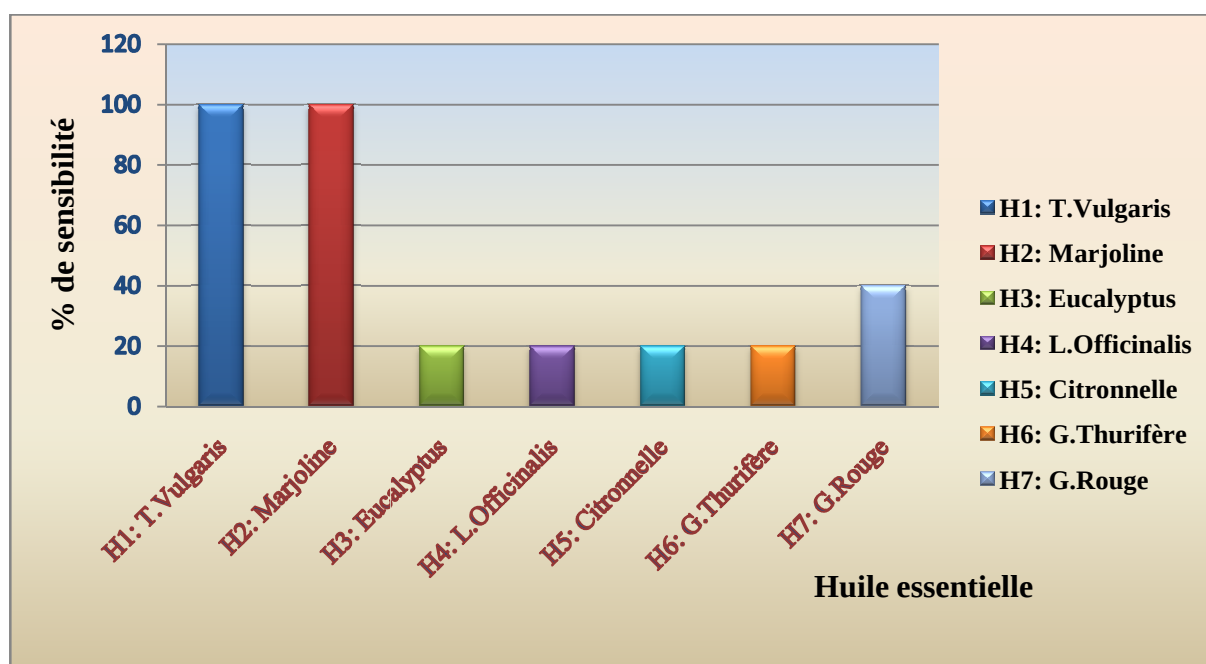


Figure n°12 : % de sensibilité des souches de *Staphylococcus coagulase négative* vis-à-vis des huiles essentielles testées

On constate une bonne action antibactérienne pour la majorité des huiles avec des pourcentages de sensibilités variant de 20% à 100% : l'huile de *thymus vulgaris* et de marjoline (100% d'inhibition et des diamètres variant de 16 à 90mm), les huiles de Genévrier rouge (40% d'inhibition et des diamètres allant de 7 à 15mm), l'huile d'eucalyptus, de lavandula officinalis, de citronnelle et de Genévrier thurifère (20% d'inhibition avec des diamètres de 7 à 27mm).

4- Evaluation de la sensibilité des Bacilles Gram négatif oxydase positive vis-à-vis des huiles essentielles testées

Comme illustré en figure 9, on constate une bonne action antibactérienne pour la majorité des huiles avec des pourcentages de sensibilités variant de 40% à 100% : l'huile de *thymus vulgaris* et de marjoline (100% d'inhibition et des diamètres variant de 27 à 70mm), les huiles de *Lavandula officinalis* et de Genévrier rouge (80% d'inhibition et des diamètres allant de 8 à 85 mm), l'huile de Genévrier thurifère (60% d'inhibition avec des diamètres de 10 à 45mm), l'huile d'eucalyptus (40% d'inhibition avec des diamètres de 10 à 35 mm).

Cependant, l'action de l'HE de Citronnelle était faible puisqu'elle a varié entre intermédiaire et résistante (diamètre d'inhibition < 14, soit compris entre 6.5 et 11mm).

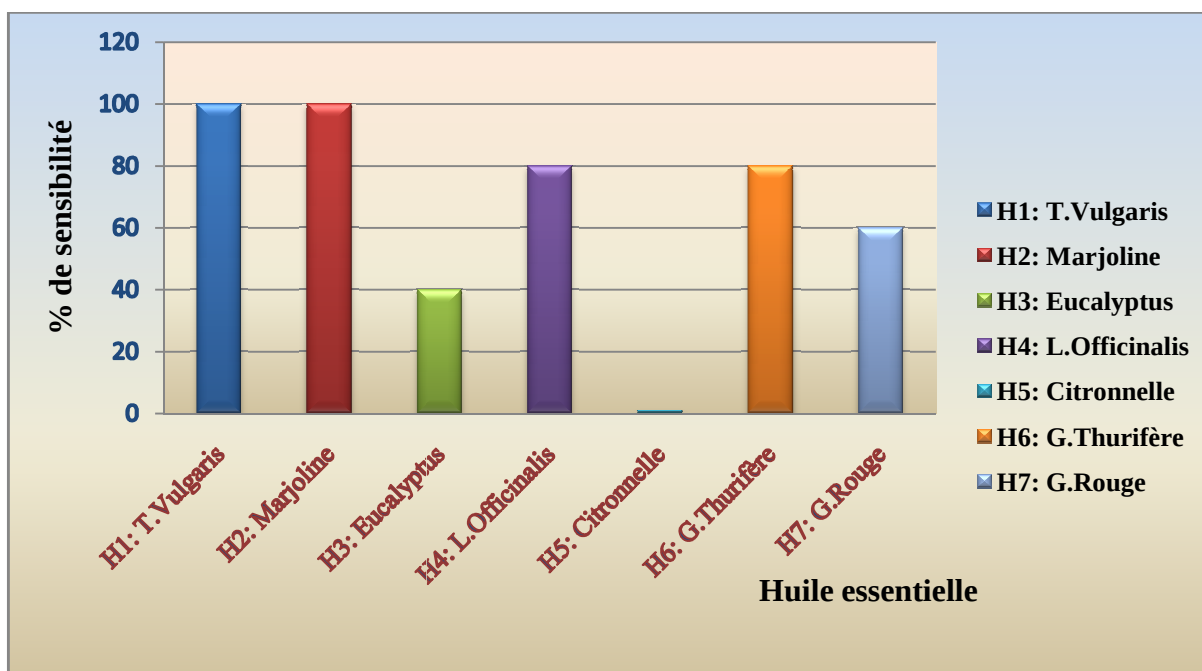


Figure n°13 : % de sensibilité des souches de Bacilles Gram négatif oxydase positive vis-à-vis des huiles essentielles testées

5- Evaluation de la sensibilité des Bacilles Gram négatif oxydase négative fermentaire (BGNONF) vis-à-vis des huiles essentielles testées

La figure suivante montre les % de sensibilité des souches de **BGNONF** aux huiles essentielles testées.

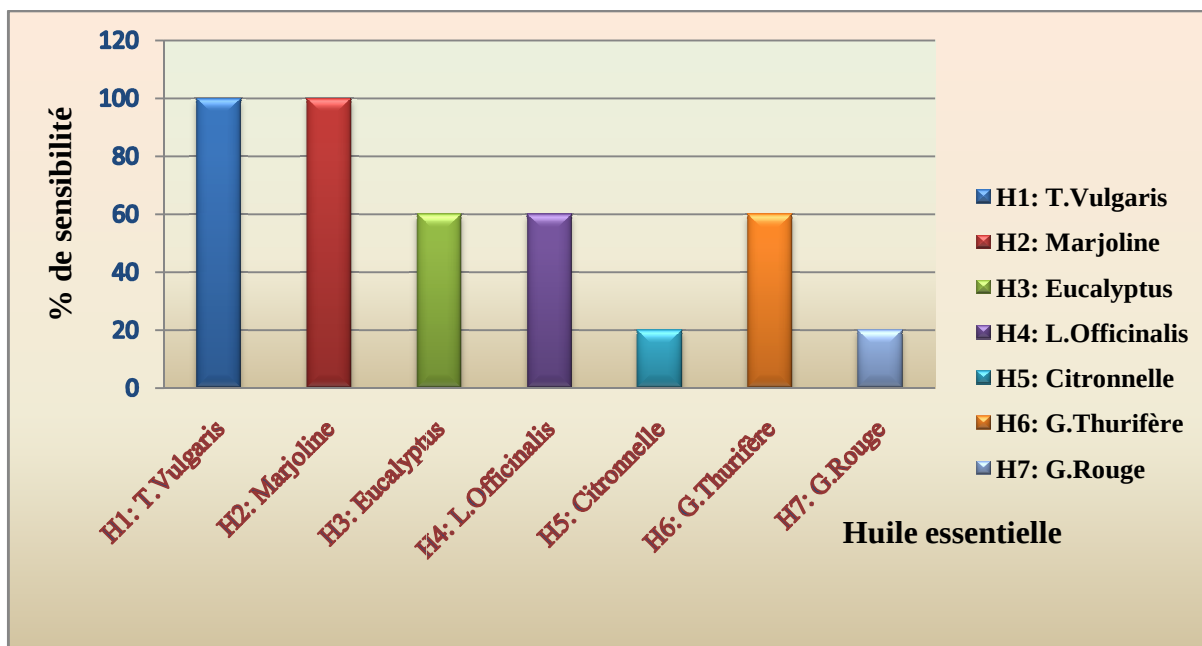


Figure n°14 : % de sensibilité des souches bacilles gram négatif oxydase négative fermentaire vis-à-vis des huiles essentielles testées

On note une activité maximale pour l'huile de *thymus vulgaris* et pour la marjolaine, modérément élevée pour l'eucalyptus, la *lavandula officinalis* et le gévrier thurifère (60%). Les huiles de citronnelle et de gévrier rouge n'ont été actives que sur 20% des souches.

6- Evaluation de la sensibilité des Bacilles Gram négatif oxydase négative non fermentaire (BGNONNF) vis-à-vis des huiles essentielles testées

La figure suivante représente les % de sensibilité des souches de **BGNONNF** testées aux huiles essentielles étudiées.

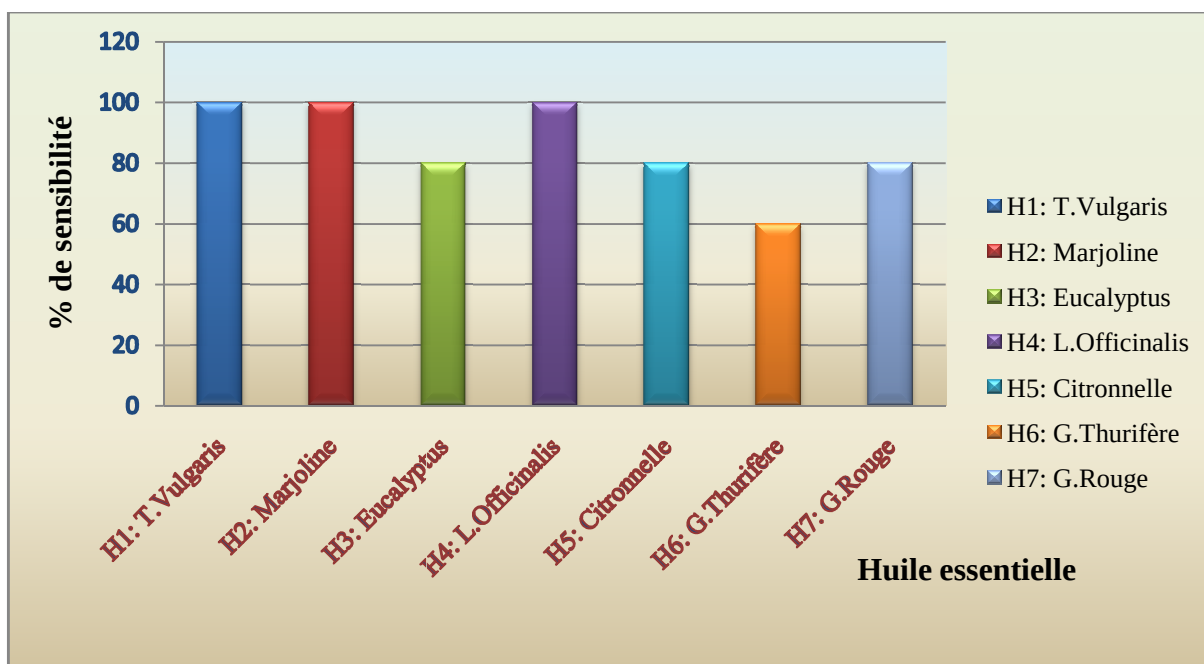


Figure n°15 : % de sensibilité des souches de bacilles gram négatif oxydase négatif non fermentaire vis-à-vis les huiles essentielles testées

On remarque que toutes les huiles essentielles ont un large spectre d'action, elles ont agi contre toutes les souches bactériennes avec des pourcentages de sensibilités variant de 60% à 100% : l'huile de *thymus vulgaris*, de marjolaine et de *lavandula officinalis* (100% d'inhibition et des diamètres variant de 18 à 90mm), les huiles d'eucalyptus, de citronnelle et de Genévrier rouge (80% d'inhibition et des diamètres allant de 9.5 à 90mm), l'huile de Genévrier thurifère (60% d'inhibition avec des diamètres de 13 à 40mm).

7- Evaluation de la sensibilité des *Bacillus sp* vis-à-vis des huiles essentielles testées

La figure suivante représente les % de sensibilité des souches de **Ba sp** testées aux huiles essentielles étudiées.

On constate que toutes les huiles essentielles ont un large spectre d'action, elles ont inhibé la croissance des souches bactériennes de *Bacillus sp*, avec des pourcentages de sensibilité variant de 20% à 100% : l'huile de *thymus vulgaris* et de marjolaine (100% d'inhibition et des diamètres variant de 18 à 90mm), les huiles de *lavandula officinalis* et de Genévrier thurifère (60% d'inhibition avec des diamètres de 10 à 81mm), l'huile d'eucalyptus (40% d'inhibition et des diamètres allant de 8.5 à 27mm), l'huile de citronnelle et de Genévrier rouge (20% d'inhibition et des diamètres allant de 9.5 à 15mm).

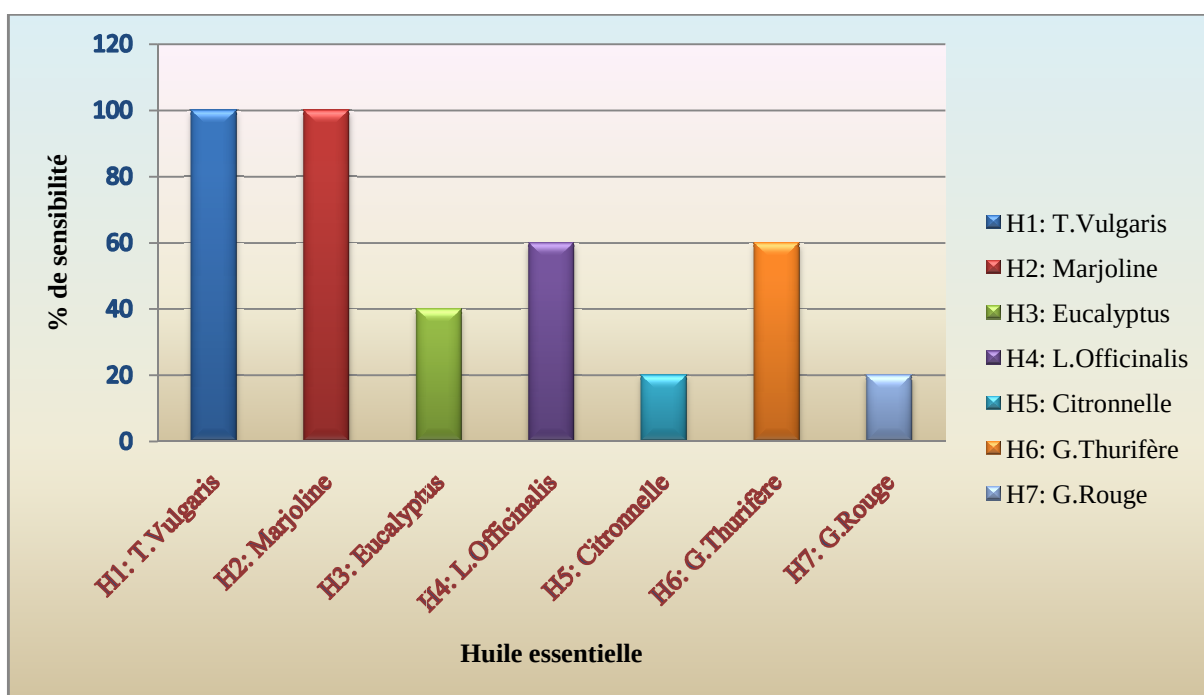


Figure n°16: % de sensibilité des souches de *Bacillus sp* vis-à-vis les huiles essentielles testées

8- Evaluation de la sensibilité des souches de *Streptococcus sp*(Str) vis-à-vis des huiles essentielles testées

La figure suivante représente les % de sensibilité des souches de *Streptococcus sp* testées aux huiles essentielles étudiées.

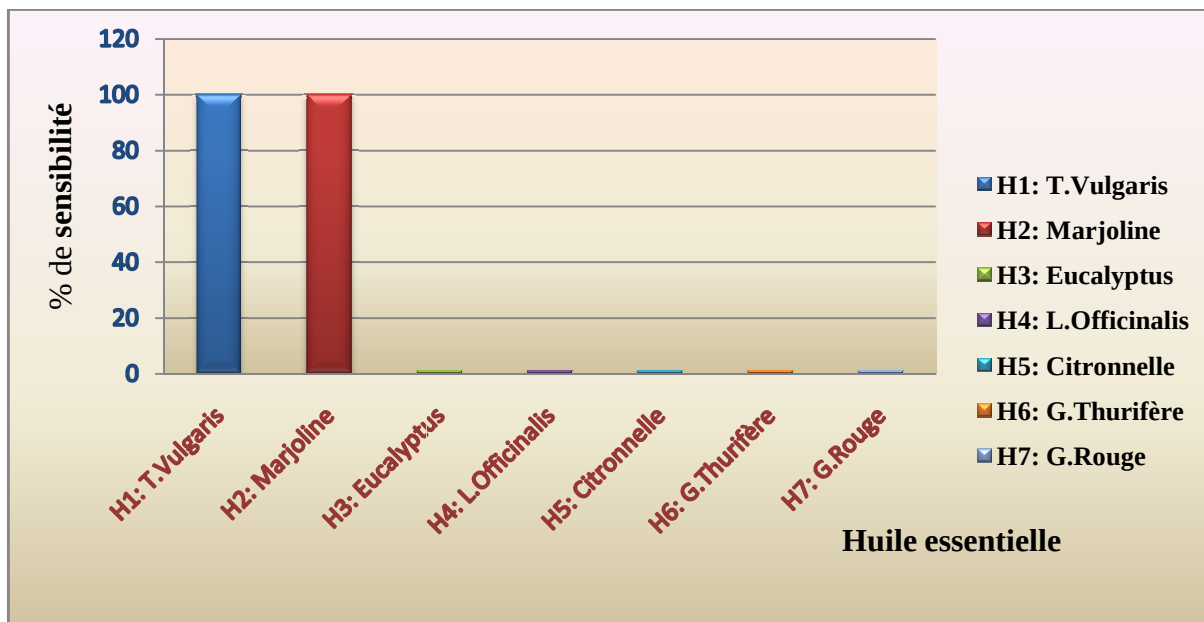


Figure n°17 : % de sensibilité des souches de *Streptococcus* vis-à-vis des huiles essentielles testées

On constate que les huiles de *thymus vulgaris* et de marjoline ont une action antibactérienne maximale et inhibé toutes les souches de *Streptococcus sp* (100% d'inhibition et des diamètres variant de 26 à 71mm).



Cependant, l'huile d'eucalyptus, de *lavandula officinalis*, de citronnelle de Genévrier thurifère et celle de Genévrier rouge ont exercé une activité antibactérienne variée entre résistante et intermédiaire ($D < 14$, soit compris entre de 6.5 à 12mm).

C- Détermination de la concentration minimale inhibitrice : CMI

A partir des résultats de l'aromatogramme et du % de la sensibilité de chaque huile vis-à-vis les souches bactériennes étudiées, nous avons déterminé les CMI des huiles en tenant compte d'une part de l'efficacité et d'autre part la sensibilité des souches. Les huiles ainsi testées sont le *Juniperus thurifera*, la *lavandula officinalis*; l'*origanum majorana* et le *thymus vulgaris*.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices des 4 huiles essentielles, sont représentés dans les tableaux suivants. (voir photos annexe 7)

1- *Juniperus thurifera*

Comme illustrée dans le tableau 4, l'huile essentielle de G. thurifère a inhibé la croissance de S.aureus (M36) à partir de 25mg/ml et de BGPOP(G37) à partir de 200mg/ml.

La concentration 6.25mg/ml permet la croissance des deux bactéries testées.

Tableau n°4 : Concentration minimale inhibitrice de Genévrier thurifère

Souches Concentration	M36 S.aureus	G37 BGPOP
200mg/ml	-	-
100mg/ml	-	+/-
50mg/ml	-	+
25mg/ml	-	+
12.5/ml	+/-	+
6.25mg/ml	+	+
3.125mg/ml	+	+
1.56mg/ml	+	+
0.78mg/ml	+	+
0.99mg/ml	+	+

(-) : inhibition ; (+) : croissance/développement ; (+/-) : activité intermédiaire

2- *Lavandula officinalis*

Comme illustrée dans le tableau 12, l'huile essentielle de L. *officinalis* a inhibé la croissance de BGNONNF (G18) à partir de 12.5mg/ml, et de BGPOP (G37) à partir de 200mg/ml.

- o La concentration 3.125mg/ml n'inhibe pas la croissance des deux bactéries

Tableau n°5 : Concentration minimale inhibitrice de *Lavandula officinalis*

Souches Concentration	G18 BGNONNF	G37 BGPOP
--------------------------	----------------	--------------



200mg/ml	-	-
100mg/ml	-	+
50mg/ml	-	+
25mg/ml	-	+
12.5/ml	-	+
6.25mg/ml	+/-	+
3.125mg/ml	+	+
1.56mg/ml	+	+
0.78mg/ml	+	+
0.99mg/ml	+	+

3-*Origanum majorana*

Comme illustrée dans le tableau 6, L'huile essentielle d'*origanum majorana* présente une importante activité antibactérienne sur toutes les souches bactériennes testées, elle a montré une inhibition totale pour toutes les bactéries.

G18 a montré la plus grande concentration inhibitrice de l'HE d'*origanum majorana* contre les souches bactériennes étudiées, elle est sensible à une concentration de 12.5mg/ml alors que les souches G37, T2b, M36, et G33 ont été sensibles à une concentration de 25mg/ml, G47 et A1a ont été inhibées à une concentration minimale de 100mg/ml.

Pour des concentrations 200 et 100mg/ml d'huile essentielle, aucune colonie ne s'est développée pour toutes les souches bactériennes testées.

Tableau n°6 : Concentration minimale inhibitrice d'*Origanum majorana*

Souches Concentration	G18 BGNONF	G37 BGPOP	T2b Ba sp	M36 St.A	G47 Str	G33 St. Nc	A1a BGNONF
200mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
100mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
50mg/ml	-	-	-	-	+/-	-	+/-
25mg/ml	-	-	-	-	+/-	-	+
12.5/ml	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+
6.25mg/ml	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+
3.125mg/ml	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+
1.56mg/ml	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+
0.78mg/ml	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+
0.99mg/ml	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+

4-*Thymus vulgaris*

Comme illustrée dans le tableau 14, L'huile essentielle de *thymus vulgaris* présente une importante activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes étudiées, elle a montré une inhibition totale sur toutes les bactéries.

G18 et T2b représente la plus grande concentration inhibitrice de l'HE *thymus vulgaris* contre les souches bactériennes étudiées, elle est sensible à une concentration de 0.99mg/ml alors que G37, M36, et G33 sont sensibles à une concentration de 25mg/ml, G47 et A1a sont inhibés à une



concentration minimale de 100mg/ml. Pour des concentrations 200 et 100mg/ml d'huile essentielle, aucune nouvelle colonie ne se développe pour toutes les souches bactériennes.

Tableau n°7 : Concentration minimale inhibitrice *Thymus vulgaris*

Souche Concentration	G37 BGPOP	T2b Ba sp	M36 St.A	G47 Str	G33 St. Nc	G18 BGNONNF	A1a BGNONF
200mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
100mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
50mg/ml	-	-	-	+	-	-	+
25mg/ml	-	-	-	+	-	-	+
12.5/ml	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+
6.25mg/ml	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+
3.125mg/ml	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+
1.56mg/ml	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+
0.78mg/ml	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+
0.99mg/ml	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+

D- Criblage des facteurs permettant d'améliorer l'activité antibactérienne des huiles essentielles ayant prouvé une efficacité élevée

D-1- Plan de criblage

1-1 Caractéristiques du plan de criblage

a- Objectifs

L'objet de ce travail a été de cribler les facteurs influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles ayant prouvé une efficacité élevée vis-vis des germes isolés de l'environnement hospitalier (malades (M36) et environnement (G18)).

b- Paramètres retenus pour l'expérimentation

Pour réaliser le plan de criblage permettant d'améliorer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, on retient comme facteurs :

X1 : Huile

X2 : Température

X3 : Lumière

H4 : Humidité

X5 : Dilution :

c- Domaine expérimentale

Le domaine expérimental du plan de criblage utilisé, est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau8 : Domaine expérimental

Facteurs	Unité	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Huile		Huile de thymus vulgaris	Huile d'origanum	



			majorana	
Température	°C	10	35	
Lumière		sans	avec	
Humidité	%	50	70	
Dilution	µl	DMSO	AGAR 0.02%	ETHANOL

d- Plan d'expérience

La matrice d'expérience obtenue pour un plan de criblage de 5 facteurs est une matrice d'Hadamard de 8 essais. Elle est représentée dans le tableau ci-dessous :

Tableau9 : Plan d'expérience

Nbre d'expériences	Huile	T°	Lumière	Humidité	Dilution
1	H1	35	Avec	50	DMSO
2	H1	10	Avec	70	AGAR 0.02%
3	H1	35	Sans	70	ETHANOL
4	H1	10	Sans	50	DMSO
5	H2	10	Sans	70	DMSO
6	H2	35	Sans	50	AGAR 0.02%
7	H2	10	Avec	70	ETHANOL
8	H2	35	avec	70	DMSO

1-2 Résultats du plan de criblage

L'analyse est développée dans ce qui suit :

1-2-1- Activité antibactérienne vis-à-vis des cocci isolés des patients (M36)

a- Etude graphique des effets de l'activité antibactérienne

L'étude graphique des effets représente l'effet de chaque facteur sur la réponse étudiée. Dans ce cas, il s'agit de l'activité antibactérienne déduite à partir du diamètre d'inhibition. Cette étude a permis de dégager les facteurs influençant sur l'activité antibactérienne.

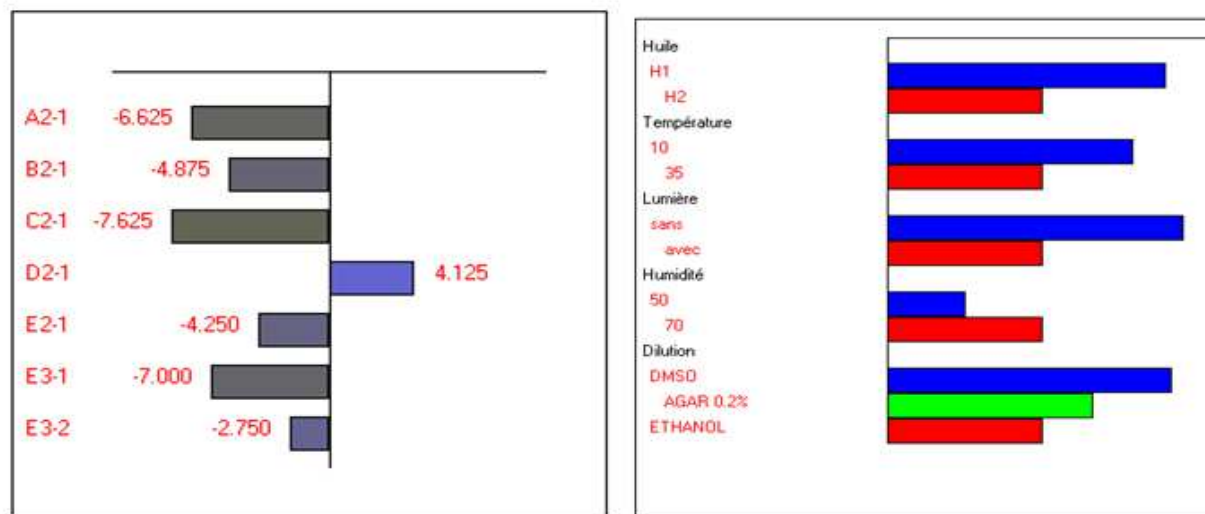


Figure n°18: Etude graphique des effets de la réponse Y1- activité antibactérienne de M36

L'étude graphique a montré que la lumière est le facteur qui influence le plus sur l'activité antibactérienne ($b_3 = -7.625$), suivie de la dilution ($b_5 = -7.000$), du type d'huile ($b_1 = -6.125$), de la température ($b_2 = -4.875$) et de l'humidité ($b_4 = 4.125$).

Ainsi, afin d'avoir une activité antibactérienne plus élevée, il faudrait travailler sans lumière et avec l'huile de thymus vulgaris diluée dans DMSO, ainsi qu'il faudrait diminuer la température (10°C) et augmenter l'humidité (70%).

b- Effets Pareto individuels et cumulés de la réponse activité antibactérienne

Le diagramme de Pareto s'appuie sur les résultats donnés par le diagramme des effets en classant les facteurs selon leur contribution dans la variation de la réponse. Il permet de dégager et de classer les facteurs les plus influents.

Effets Pareto individuels Effets Pareto cumulés

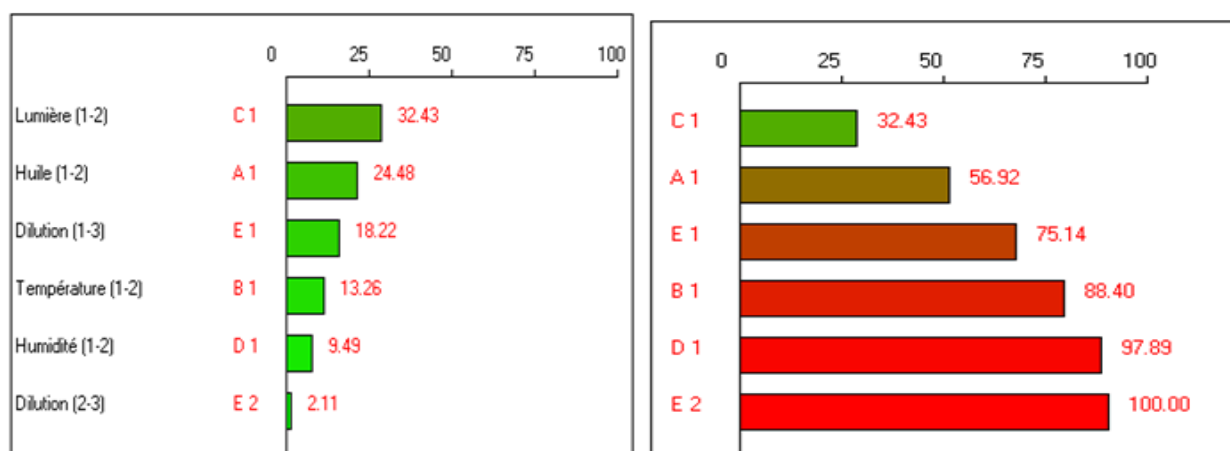


Figure n°19 : Etude de la réponse Y1 - Activité antibactérienne de M36

La loi de Pareto appliquée pour l'activité antibactérienne, a permis de déduire que quatre facteurs régissent cette réponse : la lumière, le type d'huile, la dilution et la température

En se basant sur la loi de Pareto la lumière, le type d'huile, la dilution et la température sont les facteurs qui influencent plus de 80% de l'activité antibactérienne.

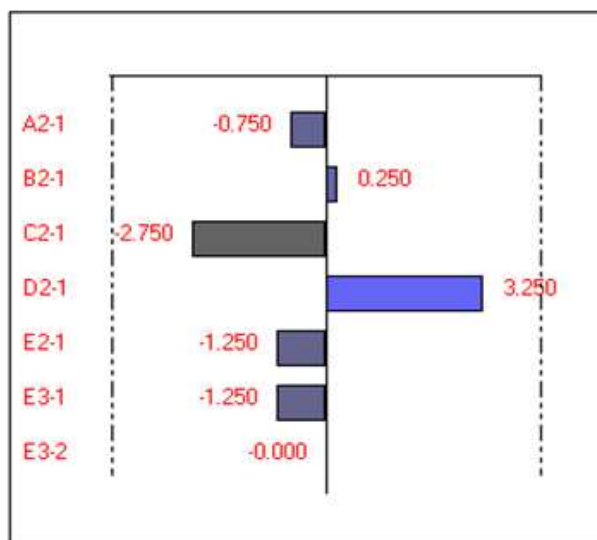
1-2-2- Activité antibactérienne vis-à-vis les Bacilles isolés de l'environnement hospitalier (G18).

a- Etude graphique des effets de l'activité antibactérienne

L'étude graphique des effets représente l'effet de chaque facteur sur la réponse étudiée, dans ce cas, il s'agit de l'activité antibactérienne déduite à partir du diamètre d'inhibition.

Elle permet de dégager les facteurs influençant sur l'activité antibactérienne.

Différences des poids des différents niveaux



Etude graphique des effets totaux

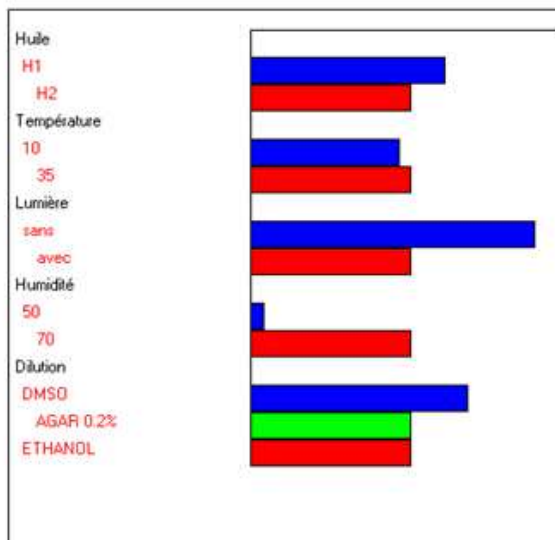


Figure n°20 : Etude graphique des effets de la réponse Y1 : Activité antibactérienne de G18

L'étude graphique a montré que l'humidité ($b_4=3.250$), la lumière ($b_3=-2.750$) sont les facteurs qui influencent le plus l'activité antibactérienne, suivis de la dilution ($b_5=-1.250$), le type d'huile ($b_1=-0.750$) et la température ($b_2=0.250$).

Ainsi, afin d'avoir une activité antibactérienne plus élevée, il faudrait augmenter l'humidité (70%) et travailler aussi en obscurité (sans lumière) et avec l'huile de thymus vulgaris diluée dans DMSO.

b- Effets Pareto individuels et cumulés de la réponse activité antibactérienne

Le diagramme de Pareto s'appuie sur les résultats donnés par le diagramme des effets en classant les facteurs selon leur contribution dans la variation de la réponse. Il a permis de dégager les facteurs les plus influençant.

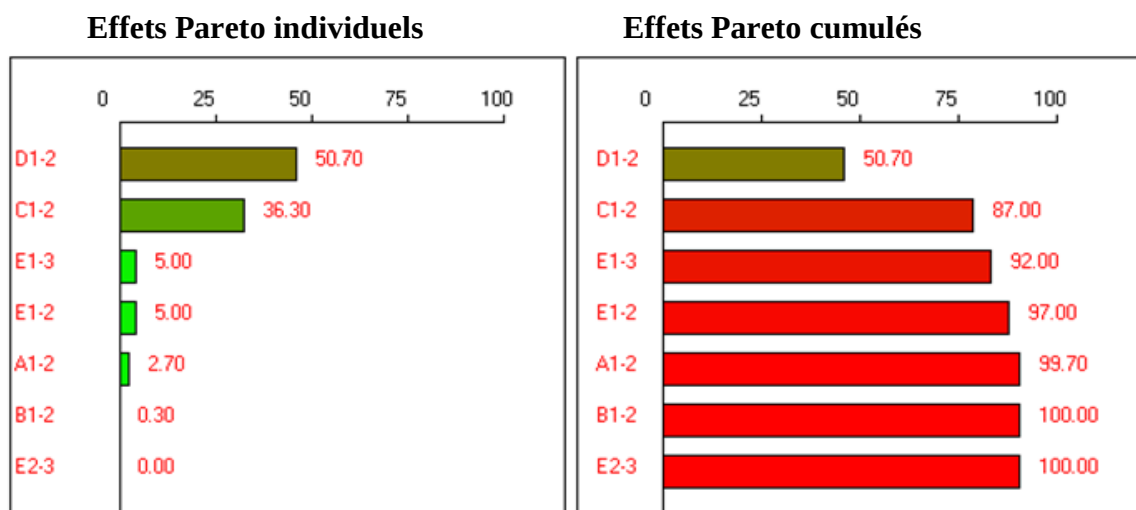


Figure n°21 : Etude de la réponse Y2 : activité antibactérienne G18

La loi de Pareto appliquée pour l'activité antibactérienne permet de déduire que trois facteurs régissent cette réponse : l'humidité, la lumière et la dilution.

En se basant sur la loi de Pareto l'humidité, la lumière et la dilution sont les facteurs qui influençant plus de 90% l'activité antibactérienne.

1-3 Application des résultats du criblage

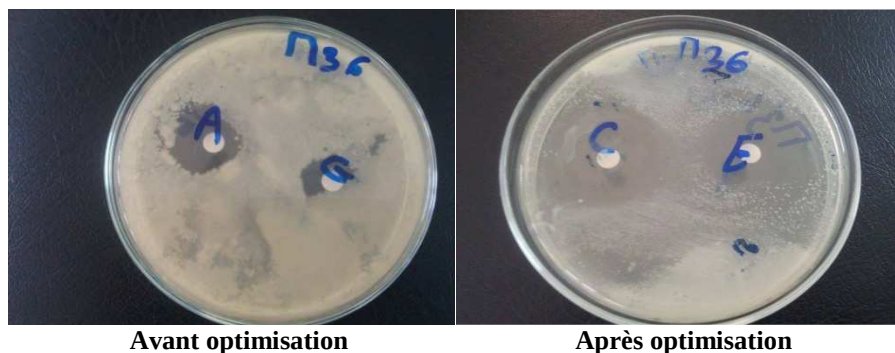
Après avoir déterminé les facteurs optimaux permettant d'améliorer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, leur application a été réalisée sur les différentes souches qu'on a déjà étudiées. L'huile testée était le thymus vulgaris, diluée dans le DMSO à une basse température (10°C) en absence de la lumière et en présence de l'humidité (70%).

Le tableau suivant montre les résultats obtenus

Tableau n°10 : Résultats de l'application des plans d'expériences

Bactéries Facteurs	M36	G18	G33	G47	T2B
Diamètre (mm)	30	18	18	14	26

En appliquant les facteurs optimums et comme le montrent les photos suivantes, nous avons noté une augmentation de l'auréole d'inhibition, le diamètre a augmenté et a varié entre 14 mm et 30 mm alors qu'il variait dans les essais antérieurs entre 12 mm et 19 mm.



Discussion

Les infections nosocomiales constituent un sérieux problème de santé publique avec des conséquences considérables tant sur le plan individuel que sur le plan économique [62].

Si leur éradication est impossible du fait que le risque de contracter de telles infections ne peut jamais être nul, la prévention quant à elle, est le créneau sur lequel il faut compter pour limiter ce fléau et freiner sa progression. Elle est au cœur des préoccupations du Ministère de la Santé [63].

En tenant compte de la résistance des bactéries vis-à-vis des produits biocides, qui ne cesse de croître au fil du temps, nous avons réalisé cette étude comportant 3 volets ;

- Dans le 1^{er} volet, nous avons effectué une enquête d'évaluation portant sur l'utilisation des huiles essentielles/ plantes aromatiques ;
- Dans le second volet, nous avons d'abord évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur des germes isolés préalablement de l'environnement d'hémodialyse ; ensuite nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) ;
- Dans le 3^{ème} volet, nous avons criblé les facteurs influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles ayant prouvé une efficacité élevée, par la méthodologie des plans d'expériences.

L'analyse des données recueillies à travers l'enquête, a montré que 86% des participants utilisent les huiles essentielles, l'huile d'olives et celle d'argan sont les plus utilisées, le motif cosmétique était d'usage le plus noté.

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose, a concerné 7 huiles essentielles : le thym, la marjolaine, l'eucalyptus, la lavande, le citronnelle, le genévrier rouge et le genévrier turifère.

35 souches ont été testées, Certaines ont été identifiées jusqu'au genre : *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*. Pour les autres, l'identification a été basée sur la coloration de Gram, la fermentation des sucres et la présence d'oxydase.

Les % de sensibilité, générées par les huiles essentielles ont montré un large spectre d'action, elles ont agi contre toutes les souches bactériennes avec des pourcentages de sensibilités variant de 20% à 100% : l'huile de *thymus vulgaris*(thym) et d'*origanum majorana* (100% d'inhibition), les huiles de *lavandula officinalis* et de Genévrier turifère(57.14% d'inhibition), les huiles d'eucalyptus (48.57% d'inhibition), l'huile de Genévrier rouge (28.57% d'inhibition), l'huile de citronnelle (20% d'inhibition).



Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que pour les 35 souches testées, les huiles essentielles (HEs) de *L. officinalis*, de *G. thurifère* et d'Eucalyptus ont présenté une activité moyenne, par opposition aux HEs d'*origanum majorana* et de thym. Des résultats semblables ont été rapportés par d'autres auteurs.

J. Pellecuer, en 1973 avait montré les propriétés pharmacologiques des huiles essentielles obtenues à partir de quelques labiées (thym, sarriette, romarin)[64,65].

En 2008, **J. Kaloustian** avait noté une activité moyenne des huiles essentielles obtenues à partir de quelques labiées (*Lavandula. angustifolia*, *Lavandula. latifolia* et *Origanum. vulgare*) et une bonne activité des HEs d'*Origanum* et de Thym, contre les souches de *Staphylococcus aureus* et d'*E coli* [66].

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), réalisée pour les huiles ayant montré une grande efficacité, par la méthode de diffusion sur gélose. Elle a permis de révéler une variation de la CMI en fonction de l'huile utilisée. La CMI était de 25mg/ml pour l'HE de Genévrier thurifère, de 12.5 pour l'HE de la Lavande et de Mrjoline, de 0.99mg/ml pour l'HE de thym. L'huile de Thym était la plus efficace, sa CMI a varié d'un genre bactérien à l'autre (CMI allant de 100mg/ml à 0.99mg/mL). Ce résultat se rapproche à ceux d'autres auteurs.

Inouye S, et all (2001) [67] avaient noté que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym est meilleure sur les souches de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* prélevés de l'air, avec une concentration de 12,5 mg/l.

J. Kaloustian avait démontré que sur la souche *Escherichia coli* testée, les huiles essentielles d'*origanum* et de thym étaient les plus efficaces (CMI = 1mg/mL) ; alors que sur les souches de *Staphylococcus aureus*, ils ont noté une moindre efficacité pour le thym (CMI = 2 mg/mL) ; l'huile essentielle d'*Origanum* est la plus active (CMI = 1mg/ml)[66].

Le criblage des facteurs influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles était réalisé pour le thym et l'*origaum majorana*, Elle a démontré que pour améliorer l'activité antibactérienne de ces HEs, il faudrait travailler dans l'obscurité (sans lumière) et avec l'huile de thymus vulgaris diluée dans DMSO, ainsi qu'il faudrait diminuer la température (10°C) et augmenter l'humidité (70%).



❖ **Au terme de ce travail, nous pouvons conclure :**

- A une bonne action antibactérienne pour toutes les huiles essentielles, avec des pourcentages de sensibilités variant de 20% à 100% ;
- Les activités antibactériennes sont importantes avec CMI minimum de 200 mg/ml (pour les bacilles Gram positif oxydase positive) et maximum de 0.99 mg/ml (pour les *Bacillus sp* et les bacilles Gram négatif oxydase positive non fermentaire) ;
- Le criblage des facteurs influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *thymus vulgaris* et *d'origanum majorana*, a montré que la lumière, le type d'huile, l'humidité, la dilution et la température sont les facteurs à grande influence sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles.
 - Pour améliorer l'activité antibactérienne des huiles essentielles il faut :
 - Travailler en absence de la lumière (obscurité) ;
 - Travailler avec l'huile de thymus vulgaris diluée dans DMSO ;
 - Minimiser la température (10°C) ;
 - Maximiser l'humidité (70%).

❖ **Il serait recommandé de :** Désinfecter l'environnement hospitalier (air, surface,...) selon un protocole établi suite à des recherches scientifiques, permettant de réduire aussi bien le risque infectieux que la résistance des germes.

❖ **A la suite de notre étude, il serait intéressant:**

- De mettre en pratique les résultats trouvés ;
- D'optimiser le rendement de l'extraction des huiles essentielles ;
- D'analyser les composées majoritaires des huiles essentielles ayant une bonne activité antibactériennes ;
- D'étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles en mélange « synergie » ;
- D'évaluer l'activité antibactérienne de chaque constituant de l'huile essentielle ;
- D'évaluer la toxicité des huiles essentielles.

ANNEXE 1



Figure1 : *Thymus vulgaris*



Figure2 : *Lavandula officinalis*



Figure3 : Citronnelle



Figure4 : *Origanum majorana*



Figure : *Eucalyptus Sp*

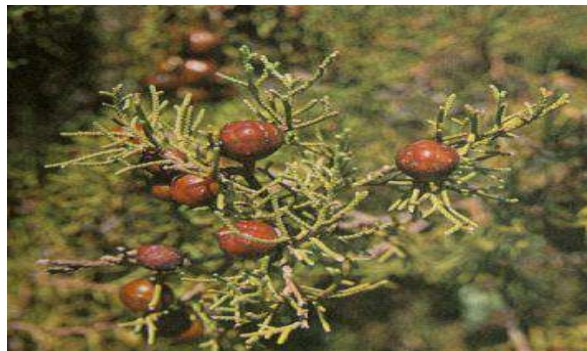


Figure : genévrier rouge



Figure : Genévrier thurifère



ANNEXE 2

Espèce	Classification
Thymus vulgaris	Règne: Plantae Sous-règne : Tracheobionta Embranchement : Magnoliophyta Classe: Magnoliopsida Ordre: Lamiales Famille: Lamiaceae Genre: Thymus Espèce: Thymus vulgaris L
Lavandula officinalis	Règne: Plantes Sous règne: Plantesvasculaires Embranchement: Spermaphytes Classe: Dicotylédones Ordre: Lamiales (Labiales) Famille: Lamiacées Genre: <i>Lavandula</i> Espèce: <i>Lavandula officinalis</i>
Citronnelle (Annexe1)	Règne : Plantae Division: Magnoliophyta Classe : Liliopsida Ordre : Cyperales Famille : Poaceae Genre : Cymbopogon
Origanum majorana	Règne : Plantae Sous-règne: Tracheobionta Division : Magnoliophyta Classe : Magnoliopsida Ordre : Lamiales Famille : Lamiacées Genre : Origanum
Eucalyptus Sp	Règne : Plantae Sous-règne: Tracheobionta Division : Magnoliophyta Classe : Magnoliopsida Sous-classe : Rosidae Ordre : Myrtales Famille : Myrtaceae Genre : Eucalyptus
Genévrier rouge	Règne : Plantae Sous-règne: Tracheobionta Division : Pinophyta Classe : Pinopsida Ordre : Pinales Famille : Cupressaceae Genre : Juniperus
Genévrier thurifère	Règne : Plantae Sous-règne : Tracheobionta Division : Pinophyta Classe : Pinopsida Ordre : Pinales Famille : Cupressaceae Genre : Juniperus



ANNEXE 3

Grille N° :

Q1 / Quel est votre sexe ?

☐ Homme

☐ Femme

Q2/ Quel est votre âge ?

☐ 15/25ans

☐ 25/35 ans

☐ 45/55 ans

☐ 35/45 ans

☐ et plus

Q3/Quelle est votre situation familiale ?

☐ Célibataire

☐ Marié

Q4/ A quelle catégorie sociale appartenez-vous ?

☐ Aisé

☐ Moyenne

☐ Populaire

Q5/ Connaissez-vous les plantes aromatiques ?

☐ Maîtrise (professionnelle)

☐ Beaucoup (Formation personnelle)

☐ Un peu

☐ Pas du tout

Q6/ Connaissez-vous les huiles essentielles ?

☐ Maîtrise (professionnelle)

☐ Beaucoup (Formation personnelle)

☐ Un peu

☐ Pas du tout

Si votre réponse est non pour Q5 et Q6, veuillez ne pas répondre aux questions suivantes.

Q7/ Utilisez-vous les plantes aromatiques/ les huiles Essentielles?

☐ Oui

☐ Non

☐ Autre :.....

Q8/ A quelle fréquence utilisez-vous des plantes aromatiques/ Huiles essentielles ?

☐ Régulièrement

☐ De temps en temps

☐ Jamais

☐ Autre:.....

Q9/ En quelle saison consommez-vous fréquemment les plantes aromatiques/ Huiles essentielles ?

☐ Hiver

☐ Printemps

☐ Automne

☐ Été

Q10/ Quels types des plantes aromatiques /d'huile essentielles utilisez-vous ?

.....
.....

Q11/ Pouvez vous préciser pour quels problèmes vous les utilisez ?

.....
.....

Q12/ Les plantes aromatiques/ Les huiles essentielles sont ils efficaces ?

☐ Oui

☐ Non



Q13/Pour vous les plantes aromatiques/ les huiles essentielles peuvent-elles être considérées comme des médicaments?

- ☐ Oui ☐ Non ☐ Autre :

Q14/Est-ce-qu'on peut dire qu'ils peuvent remplacer la thérapeutique chimique ?

- ☐ Oui ☐ Non ☐ Autre :

Q15/ Parmi ces propositions lesquelles reconnaissez-vous comme propriétés aux plantes aromatiques/ huiles essentielles? (Qualités que l'on peut donner aux huiles essentielles)

- ☐ Actif contre les infections.
☐ Désinfectant
☐ Anti-douleurs
☐ Actif contre les virus
☐ Cicatrisante
☐ Anti-hémorragique
☐ Digestives
☐ Régulateur d'hormones
☐ Autre :
☐ Ne sait pas

Q16/ Pensez-vous qu'il existe différentes qualités d'huiles essentielles?

- ☐ Oui ☐ Non

Q17 / Connaissez-vous les critères à surveiller pour différencier les bonnes des moins huiles essentielles ?

- ☐ L'emplacement où pousse la plante
☐ La technique d'extraction
☐ De stockage
☐ Le risque qu'elle soit coupée avec une huile beaucoup moins chère
☐ Ne se pose pas ce genre de questions
☐ Vérifie l'étiquette 100% naturelle
☐ Autre :

Q18/ Pour vous, où achèteriez-vous vos huiles essentielles en toute confiance ?

- ☐ Chez un pharmacien
☐ Dans une parapharmacie
☐ Dans un magasin spécialisé (type magasin bio)
☐ Chez un herboriste
☐ Autre :

ANNEXE 4

1- Composition des milieux de cultures

Les formules de chaque milieu sont données en gramme par litre d'eau distillée.

Les milieux qui sont préparés sont tous stérilisés par autoclave à 121°C.



Milieu BHI

- Infusion de cervelle de veau : 12,5
- Infusion de cœur de bœuf : 5
- Protéose-peptone : 10
- Glucose : 2
- Chlorure de sodium : 5
- Phosphate disodique : 2,5



PCA :

- Tryptone : 5.000
 - Extrait autolytique de levure : 2.500
 - Glucose : 1.000
 - Agar agar bactériologique : 12.000
- pH = 7 +/- 0.2



Gélose Mueller – Hinton (MH)-

Verser 38 grammes de poudre prête à emploi dans un litre d'eau distillée stérile. Bien homogénéiser et faire bouillir jusqu'à dissolution complète. Répartir dans les boîtes de Pétri et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

Afin d'avoir des résultats fiables, nous avons procédé à un contrôle qualité de tous les paramètres (milieux de cultures, mesure Température des étuves et des réfrigérateurs, contrôle de la qualité de la verrerie et du consommable utilisé).

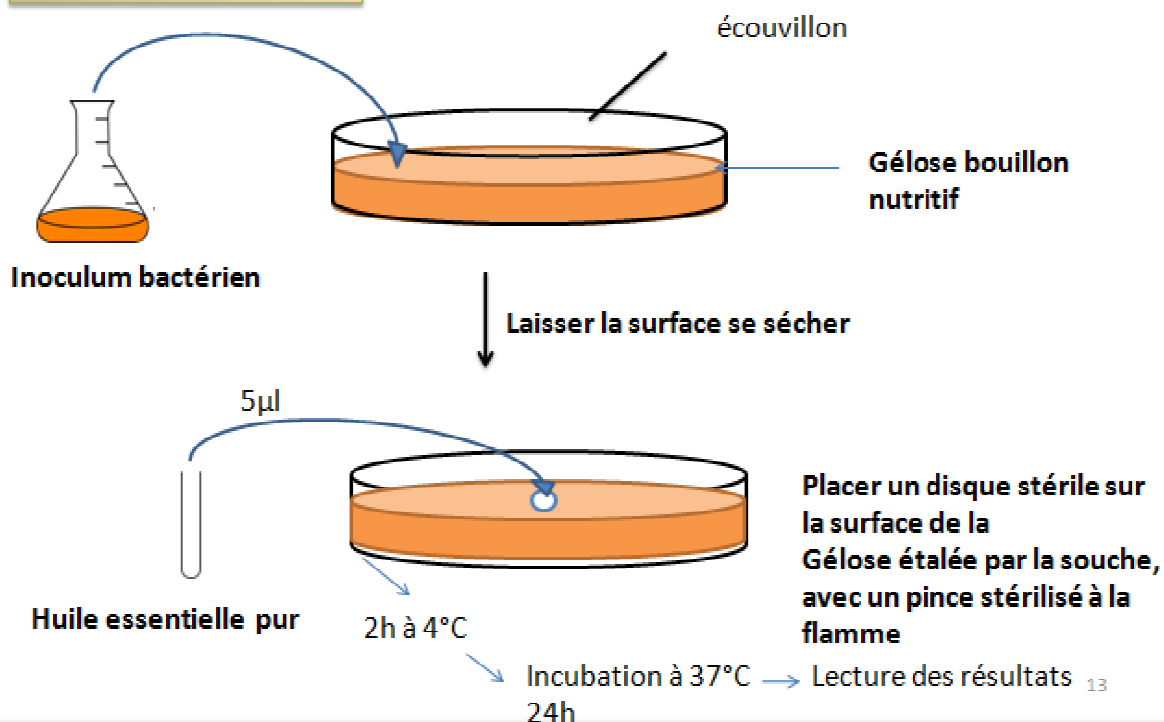
2- Contrôles qualité des milieux de cultures

Ce contrôle est basé sur les manipulations suivantes :

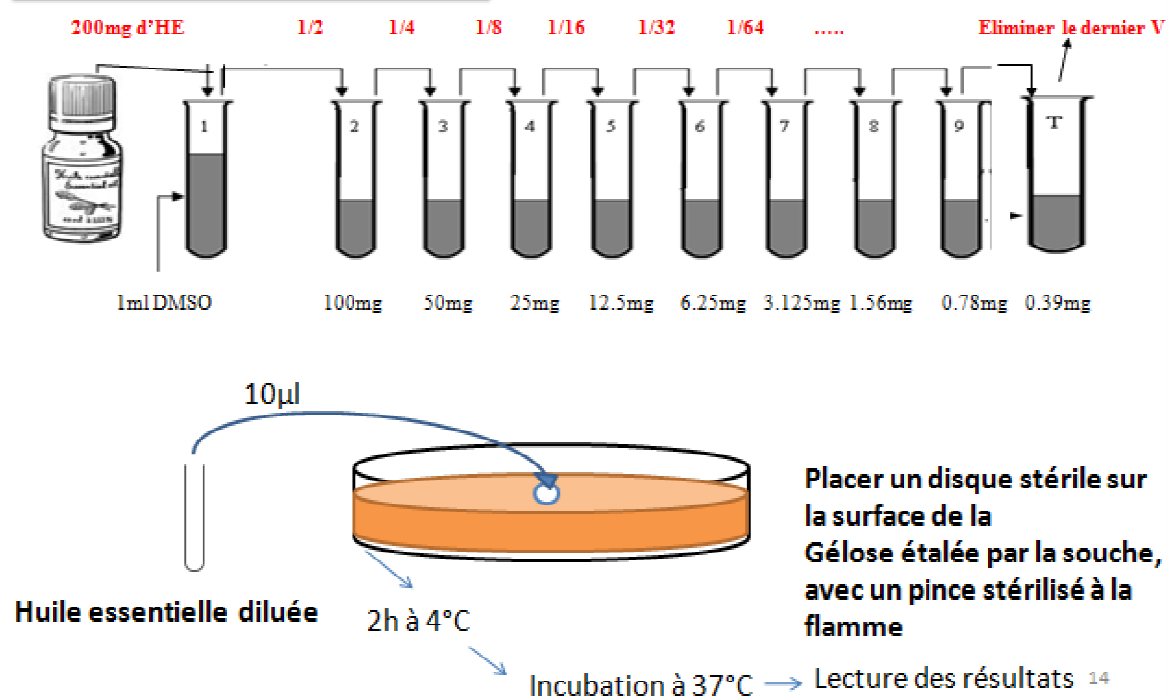
- Effectuer un calibrage de la balance,
- Utiliser une eau distillée préalablement contrôlée (pH, conductivité, ...),
- Préparer les milieux de cultures dans un champ stérile, à côté d'un bec benzène,
- Utiliser une verrerie contrôlée,
- Dissoudre complètement les composants du milieu préparé,
- Respecter la durée et le temps d'autoclavage,
- Contrôler le niveau d'eau de l'autoclave avant utilisation,
- Contrôler l'efficacité de l'autoclave à chaque stérilisation par le ruban indicateur et mensuellement par l'indicateur biologique (Stérikon),
- Couler les milieux stérilisés dans un champ stérile,
- Contrôler la stérilité du milieu préparé avant utilisation, par incubation d'une boîte si milieu solide ou d'un tube si bouillon à l'étude à $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 48H.

ANNEXE 5

❖ AROMATOGRAMME



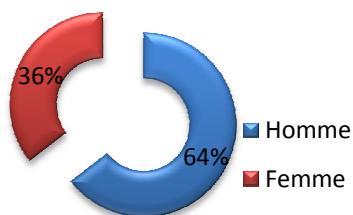
❖ DETERMINATION DE LA CMI



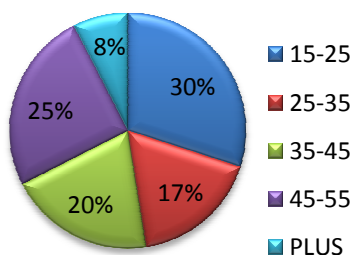
ANNEXE 6



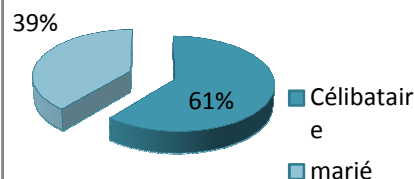
Q1: Quel est votre sexe ?



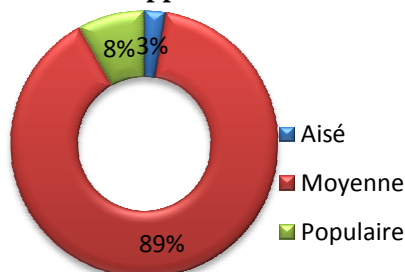
Q2: Quel est votre âge ?



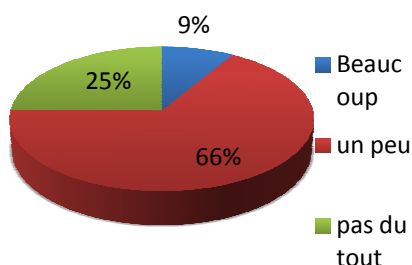
Q3: Quelle est votre situation familiale ?



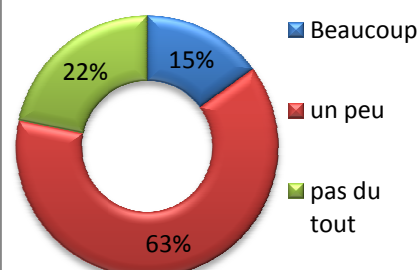
Q4: A quelle catégorie sociale appartenez-vous ?



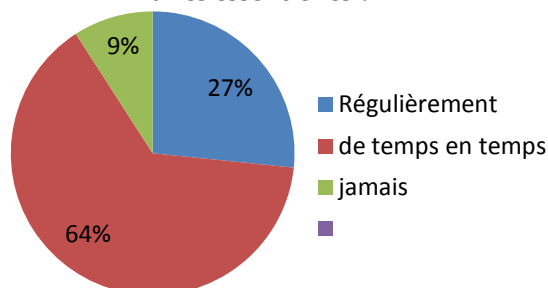
Q5: Connaissez-vous les plantes aromatiques ?



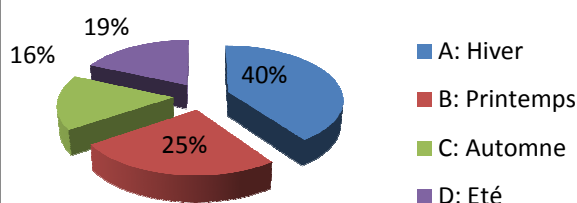
Q6: Connaissez-vous les huiles essentielles ?



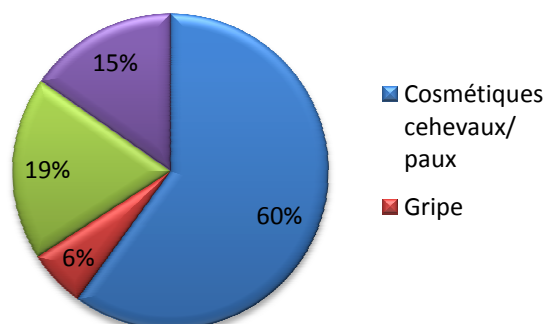
Q8: A quelle fréquence utilisez-vous des plantes aromatiques/ Huiles essentielles ?



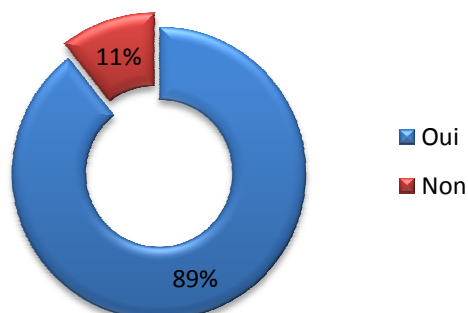
Q9: En quelle saison consommez-vous fréquemment les plantes aromatiques/ Huiles essentielles ?



Q11: Pouvez vous préciser pour quels problèmes vous les utilisez ?

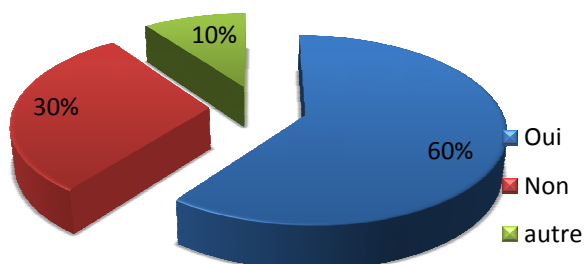


Q12: Les plantes aromatiques/ Les huiles essentielles sont ils efficaces ?

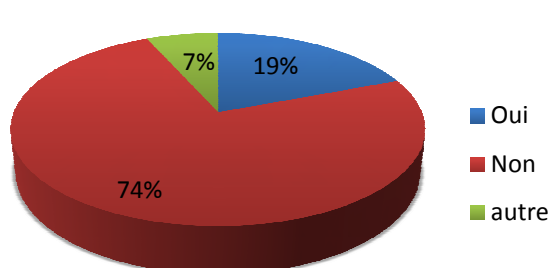




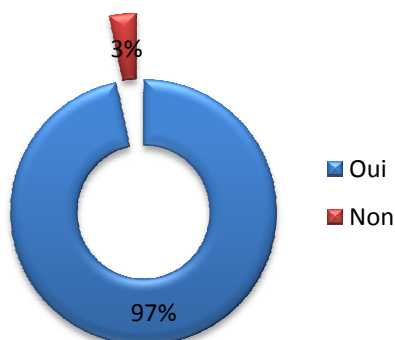
Q13: Pour vous les plantes aromatiques/ les huiles essentielles peuvent-elles être considérées comme des médicaments?



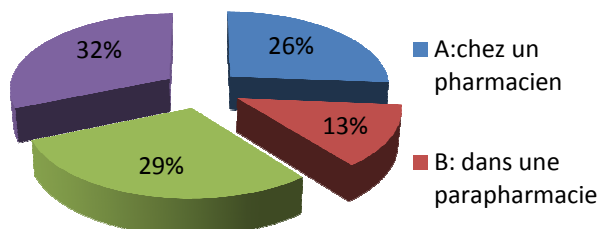
Q14: Est-ce-qu'on peut dire qu'ils peuvent remplacer la thérapeutique chimique ?



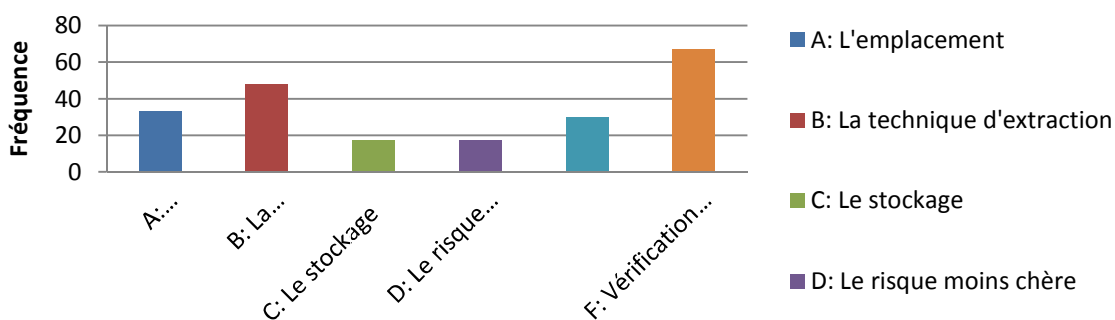
Q16: Pensez-vous qu'il existe différentes qualités d'huiles essentielles?



Q18: Pour vous, où achèteriez-vous vos huiles essentielles en toute confiance ?

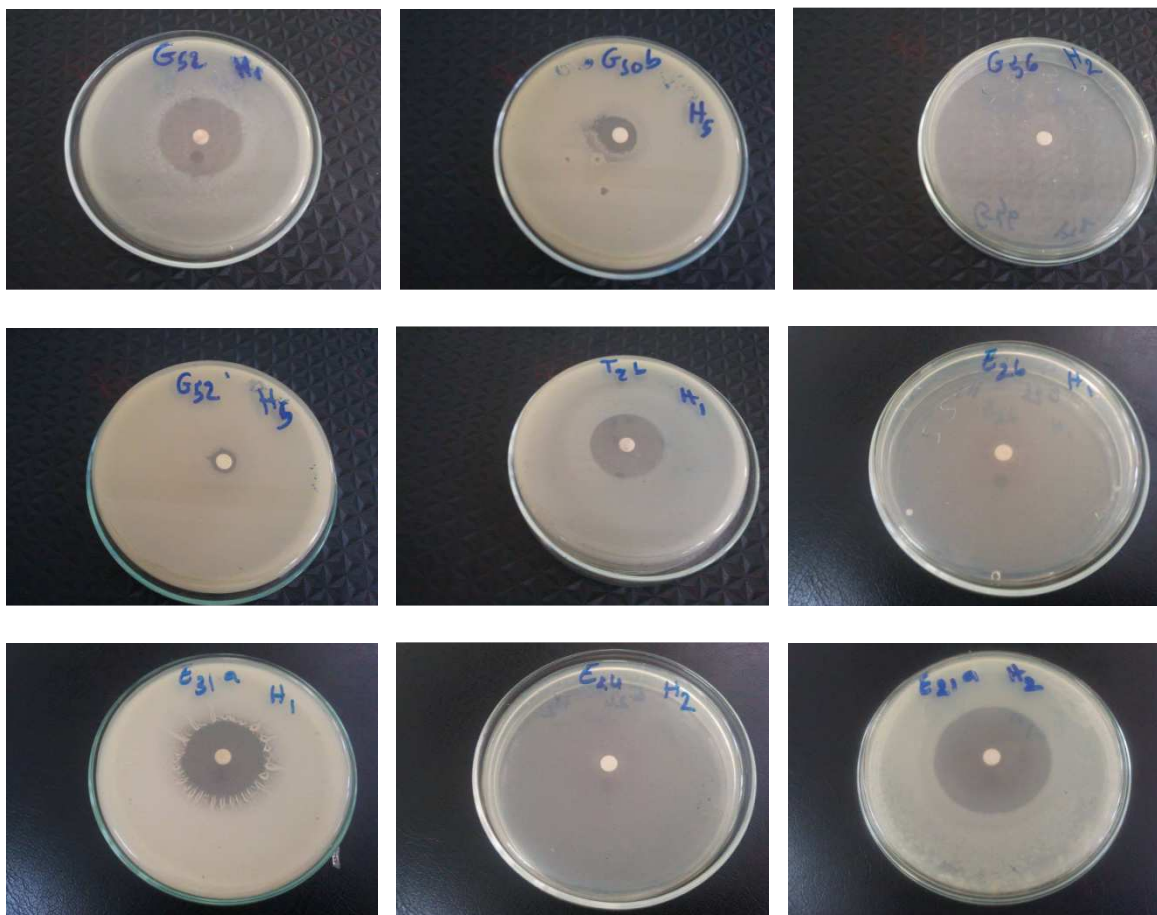


Q17: Connaissez-vous les critères à surveiller pour différencier les bonnes des moins huiles essentielles ?



ANNEXE 7

❖ AROMATOGRAMME



❖ DETERMINATION DE LA CMI





Références bibliographiques

- [1]: **A. Benslimani.** , 2008. Infection nosocomiales, Faculté de Médecine d'Alger, Algérie.www.samic-inf.com/samicpdf/enseignement/infections_nosocomiales_cours_de_residanat_2008.pdf
- [2]: **C. DUMARTIN.** , 2011. Risques infectieux en Hémodialyse. http://www.felin.re/IMG/pdf/1-HD-risque_infectieuxEpidemio2011.pdf
- [3]: **Les bonnes pratiques d'hygiène en hémodialyse** ; Revue Officielle De La Société Française D'hygiène Hospitalière volume : 13 N° 2 2005
- [4]: **F. SQUINAZI**, 10 juin 2006. Analyses en microbiologie, Environnement microbien (air, surfaces, eau).
- [5]: Maitrise des risques infectieux en laboratoires de microbiologie, 2002. Documents pour le médecin de travail N°91, 3eme trimestre, p231-245.
- [6]: **S. TOUCHE, A. LEPRINCE, D.ABITEBOUL**, 2002. Maitrise des risques infectieux en laboratoires de microbiologie. Article paru dans la revue Hygiens, volume X, n°2, pp 118-131
- [7]: **N. DJABOU**, 2006. *Sambucus Nigra* L., une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord africaine, Magistre en chimie, Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen, p1.
- [8]: **J.NATHALIE, R.CLOTILDE**, 2012. Infections nosocomiales en médecine de ville : inéquité pour les victimes. Médecine & Droit 2012 (2012) 121–125.
- [9]: **E. LACHASSINNE, E. LETAMENDIA-RICHARD, J. GAUDELUS**, 2003. Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. Archives de pédiatrie 11 (2004) 229–233.
- [10]: **POMS**, 2009. Manuel D'hygiène Hospitalière Et De Prévention Des Infections Nosocomiales. Royaume du Maroc Ministère de la Santé.
- [11]: **Services du Ministère de la Santé**, 2005. *Les infections nosocomiales*. Médecine & Droit 2005 (2005) 15–22.
- [12]: **G.DIAKARIA**, 2002. Etude de la prévalence des infections nosocomiales d'origine bactérienne dans le service de néphrologie et dans l'unité d'hémodialyse à l'Hopital du Point G, thèse de doctorat en Pharmacie, Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie.



- [13] : **WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12**. Prévention des infections nosocomiales, 2e édition. Organisation mondiale de la santé.
- [14]: **D.TCHAMADJEU Marie Flore**, 2013. Evaluation des activités antibactériennes in vitro et analyse phytochimique des extraits méthanoliques de *Smilax kraussiana* (*Smilacaceae*), Mémoire du Diplôme de Professeur de l'Enseignement Secondaire deuxième grade (DI.P.E.S. II), Université De Yaounde I.
- [15] : **J.HAJJAR. ,2010**. Environnement hospitalier et infections associées aux soins, Service d'hygiène et d'épidémiologie Centre hospitalier de Valence. Revue Hygiène Volume XVIII – N°4 page 39.
- [16] : **M. BES. ,(2002)**. Les difficulté d'interprétation des contrôles microbiologique environnementaux Revue Française des Laboratoires, (343). pp 10.
- [17] : **M. GIGNON. , S. FARCY, C. AMMIRATI, J.-L. SCHMIT, O. GANRY. ,2000 . Revue Hygiène**. volume VIII ; N°3 , page 38 .
- [18] : **Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales Inter-région Sud-Est** ; 12 mai 2010. Rapport final du groupe d'experts concernant l'hémodialyse.
- [19] : **Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales Inter-région Sud-Est** ; 12 mai 2010. Rapport final du groupe d'experts concernant l'hémodialyse
- [20] : **20-M. Eveillard, F.X. Lescure, F. Eb, J.L. Schmit ; 2002**. Portage, acquisition et transmission de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline en milieu communautaire. Conséquences en terme de politique de prévention et d'antibiothérapie. Médecine et maladies infectieuses, 32, 717–724
- [21] : **JL.Avril. , H.Dabernat. (2002)** Bactériologie clinique, pp 186-270
- [22] : **C.S. Sell, 2006**. the Chemistry of Fragance. From perfurmer to Consumer. 2nd Edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. **2006**, 329.
- [23] : **A. Bouguerra, 2012**. étude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de foeniculum vulgare mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire, Magister en Sciences Alimentaires, Université Mentouri Constantine, Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), Algérie.
- [24] : **Perfumer & flavorist**, a preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, **2009**, 34.
- [25] : **J. BUNETON, Pharmacogonise, Phytochimie, Plantes Médicinales, 1999**, 484-496.
- [26] : **Association Française de Normalisation, recueil de normes française "huile essentielle, Afnor" 1986**.
- [27] : **Z. HELLAL, 2011**. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Magister en biologie, Université Mouloud Mammeri de tizi-ouzou, Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, Tizi-Ouzou, Algérie. p4



-
- [28] : **D. COHEN, 2013.** Les huiles essentielles à l'officine : dangers pour la femme enceinte et le nouveau-né, thèse pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie, Université Joseph Fourier, Faculté de Pharmacie de Grenoble. P6,7.
- [29] : **I. LAIB, 2011.** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, Magister en Sciences Alimentaires, Université Mentouri Constantine, institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies argo-alimentaires (I.N.A.T.A.A), Algérie. P24
- [30] : **A. ATTOU, 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent, Magister en biologie, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Algérie. p21
- [31] : **M. LUCCHESI, 2005.** Extraction sans Solvant Assistée par Micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, Thèse de Doctorat en Sciences, Discipline: Chimie, Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies 2005.p17
- [32] : **J. LARDRY, V. HABERKORN, 2007.** Les huiles essentielles : principes d'utilisation, Kinesither Rev 2007;(61):18-23.
- [33] : **Z. MOHAMMEDI, 2006.** Etude de pouvoir antibactérien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Mgister en biologie, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, Faculté des sciences. p7
- [34] : **H. SUGISAWA, 1981.** Sample preparation: Isolation and Concentration. Flavor Research recent Advances, éd. par R. Teranishi, R.A Flath, H. Sugisawa New York: Marcel Dekker inc., 1981, 11-15.
- [35] : **M. LAMAMRA, 2010.** Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. et de *Filipendula hexapetala* Gibb, Magister biologie et Physiologie Végétale, Université Ferhat Abbas-Setif, Faculté des Sciences,p35
- [36] : **P. ARPINO, A. PREVOT, J. SERPINET, J. TRANCHANT, A. VERGNOL, P. WITIER,** Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse, Masson, Paris, 1995.
- [37]: **E.HOFFMANN, J.CHARETTE, V. STROOBANT, 1991.** Spectrométrie de masse, 2^{ème} édition, librairie Dunod, Paris, 1999.
- [38] : **H. MGHRI, H. HAJLAOUI, A. AKROUT, H. NAJJA, M. NEFFATI, 2009.** Antimicrobienne et antioxydante, activité antifongique de quelques plantes du sud marocain 2009.
- [39]: **A. SIPAILIENE, P.R. VENSKUTONIS, R. BARANAUSKIENE, ET A. SARKINAS, 2006.** "Antimicrobial Activity of Commercial Samples of Thyme and Marjoram oils. " *Journal of Essential oil Research*, 18: 698-703.
- [40] : **CHAKER EL KALAMOUNI, 2010.** Caractérisations Chimiques et Biologiques d'Extraits de Plantes Aromatiques oubliées de midi-pyrénées.



-
- [41] : **C. EL KALAMOUNI, 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, thèse du doctorat, Discipline ou spécialité : Sciences des Agroressources, Université de Toulouse, L'institut National Polytechnique De Toulouse, p70.
- [42] : **N. Benzeggouta, 2005.** Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments, Mgister en pharmacochimie, Université Mentouri de Constantine.
- [43] : **K. RHAYOUR, 2002.** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse du Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences Dhar Mehraz-Fès, Maroc.
- [44] : **E. GUINOISEAU, 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action, Thèse pour l'obtention du grade de Docteur, Mention : Biochimie - Biologie moléculaire, Université De Corse-Pasquale Paoli, Ecole Doctorale Environnement Et Societe UMR CNRS 6134 SPE Faculté des Sciences et Techniques.
- [45] : **S.BOUHDIDE, 2006.** Thymus Essential oil: Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antibacterial Activities.
- [46] : **N.BURNICHON, A.TEXIER, DES, 2003.** bactériologie – Semestre été 2003, L'Antibiogramme : La Determination Des Sensibilites Aux Antibiotiques.
- [47] : **M. BELMONT, 2013.** *Lavandula Angustifolia* M., *Lavandula Latifolia* M., *Lavandula X Intermedia* E.: Études Botaniques, Chimiques Et Thérapeutiques, thèse de docteur en pharmacie, Université Joseph Fourier, Faculté De Pharmacie De Grenoble.
- [48] : **P. GOETZ ET AL, 2012.** Phytothérapie anti-infectieuse, *Thymus vulgaris* L. (*Lamiaceae*) : thym, Springer-Verlag France, Paris, 2012.
- [49] : **A. EL OUALI LALAMI, F. EL-AKHAL, 2013.** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*, Les Technologies De Laboratoire - 2013, Volume 8, N°31.
- [50] : **EGK-Caisse de Santé, Juin Newsletter.** Citronnelle *Cymbopogon citratus* Citronnelle (*lemongrass*) – une graminée à l'arôme citronné envoûtant, Sainement assuré.
- [51] : **C. MENUT, J. M. BESSIERE, D. SAMATE, A. K. Djibo, G. Buchbauer c & B. Schopper c, 2013.** Aromatic Plants of Tropical West Africa. XI. Chemical Composition, Antioxidant and Antiradical Properties of the Essential Oils of Three *Cymbopogon* Species from Burkina Faso, Journal of Essential Oil Research.
- [52] : **I. KAHOUli, 2010.** Effet antioxydant d'extraits de plantes (*laurus nobilis* l, *rosmarinus officinalis*, *origanum majorana*, *oléa europea* l.) dans l'huile de canola chauffée, Mémoire du grade de Maître es sciences (M.Sc.), Faculté Des Sciences De L'agriculture Et De L'alimentation, Université Laval QUÉBEC.
- [53] : **C. BEKHECHI, F. ATIK-BEKKARA, D. E. ABDELOUAHID, 2008.** Composition et activite´ antibacte´rienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie, Phytothérapie (2008) 6: 153–159.



- [54] : **NAZIK MANSOURI, BADR SATRANI, MOHAMED GHANMI, LAHSEN EL GHADRAOUI, ABDERRAHMAN AAFI, 2010.** Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata* du Maroc, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011 **15**(3), 415-424.
- [55] : **Revue internationale d'écologie méditerranéenne international journal of Mediteranean Ecology**, Vol 39(1)-2013. Acte sur IV colloque international sur le genévrier thurifère, 5-8 octobre 2011 Mont-Dauphin et Saint-Crépin (Hautes-Alpes, France).
- [56] : **L. PORTES 1993 ET J. BELLAKHDAR, 1997**, p. 271-274.
- [57] : **S. AKKAD1, M. AKSSIRA1, A. BELGARRAB1**, Etude de la composition des huiles de *Juniperus thurifera* L. var. *africana* à l'aide du couplage GC-MS, 2ème Colloque International : Le Genévrier Thurifère et les Forêts d'altitude dans les montagnes du pourtour méditerranéen.
- [58] : **M. EL ASRI, 2013.** Cours sur les plans d'optimisation et plans de melange, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculte Des Sciences Et Techniques Fes, Maroc.
- [59] : **M. ELHADRAMI, 2013.** Cours sur le plan optimal et critères d'optimalités, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculte Des Sciences Et Techniques Fes, Maroc.
- [60] : **F. RABIER, 2007.** Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire, thèse Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale Matériaux – Structure – Mécanique.
- [61] : **A. LAMURE**, Méthodologie des plans d'expériences, plans factoriels complets.
- [62] : **K. El Rhazi., S. Elfakir., M. Berraho., N. Tachfouti., Z. Serhier., C. Kanjaa., et C. Nejjar1., 2007.** Prévalence et facteurs de risque des infections nosocomiales au CHU Hassan II de Fès (Maroc) ; La Revue de Santé de la Méditerranée orientale (Vol. 13)(1)pp 58.
- [63] : **FormationAURAR. ,2008 .**WWW.felin.re/IMG/ppt/2prevsoinsdialyseN08Vdef_site.ppt
- [64] : **Pellecuer J, Roussel JL, Andary C (1973)** Propriétés antifongiques comparatives des essences de trois Labiées méditerranéennes : romarin, sarriette et thym. *Travaux de la Société de pharmacie de Montpellier* 3: 584
- [65] : **Pellecuer J, Allegrini J, De Buochberg S (1974)** Etude in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de l'essence de *Satureia montana*. *J Pharm Belg* 2: 137-44
- [66] : **J. Kaloustian1, J. Chevalier2, C. Mikail1 , M. Martino2 , L. Abou1 , M.-F. Vergnes1, 2008.** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne, *Phytothérapie* (2008) 6: 160–164.
- [67] : **Inouye S, Takizawa T, Yamagushi H (2001)** Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 47: 565-73.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma

