

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE D'AMELIORATION GENETIQUE DES PLANTES

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En **MICROBIOLOGIE**
Option : Microbiologie Appliquée

THEME

*Sensibilité bactérienne aux extraits bio-actifs de
Pelargonium graveolens (Géranium rosat)*

Présentée par : M^{elle} Imane ATAILIA

Directeur de thèse : M. Abdelghani DJAHOUDI

Pr., Université d'Annaba

Membres de jury :

Président : M. Ali LADJAMA

Pr., Université d'Annaba

Examineur : M. Zidane BRANES

Pr., Université d'Annaba

Examineur : M. Azzedine CHEFROUR

Pr., Université de Souk-Ahras

Examineur : M. Mohamed SIFOUR

MCA., Université de Jijel

Année Universitaire : 2015/2016

Remerciements

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

*Mes sincères remerciements vont d'abord à Monsieur le **Professeur Abdelghani Djahoudi**, qui trouvera ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour avoir accepté de diriger mon travail de thèse que pour m'avoir accordé son temps et sa confiance tout au long de ces années de travail.*

*Je souhaite également exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur le **Professeur Ali Ladjama**, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury ainsi que pour son aide, sa grande gentillesse et ses nombreux conseils éclairés durant mes années de recherche.*

*Je veux exprimer ma respectueuse gratitude au **Professeur Azzedine Chefrou**, pour avoir bien voulu participer à ce jury et pour m'avoir bien aidée à choisir mon thème de recherche. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me font le **Professeur Zidane Branes** et le **Docteur Mohamed Sifour**, en acceptant d'examiner ce travail. Je suis très heureuse de bénéficier de leurs observations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.*

*Mes plus vifs remerciements vont aussi au **Professeur Djamila Kirane** et **Professeur Louhichi Brinis** tant pour leur aide matérielle que pour leur soutien moral et leurs conseils avisés.*

*A Madame **Djamila Athmani** enseignante à l'école militaire polytechnique, une vive reconnaissance pour son amitié constante, son soutien moral, sa disponibilité à mon égard, ses compétences ainsi que pour son aide technique si précieuse.*

*J'exprime toute ma gratitude au **Colonel Abdelnacer Merati**, chef de laboratoire d'électrochimie-corrosion et au **Colonel Zoheir Ihdène**, chef de laboratoire de chimie macromoléculaire de m'avoir cordialement permis d'accéder à leurs laboratoires et d'avoir tout mis à ma disposition. Leur disponibilité, gentillesse et grandes qualités scientifiques et humaines ont constitué un support permanent à ma réflexion.*

*Mes sincères remerciements au **Professeur Salima Bennadja** pour son aide précieuse dans la partie botanique de l'étude, au **Capitaine Ahmed Mekki** pour l'analyse chromatographique de notre échantillon et au **Docteur Assia Amri** pour l'analyse statistique des résultats.*

*Je remercie également **Monsieur Maamar Mekarnia**, directeur de la société Extral bio, pour nous avoir gentiment fourni le matériel végétal, ainsi que le personnel des laboratoires médicaux (Laboratoire Chiffa à Alger, laboratoire clinique les Jasmins et laboratoire Kaci à Annaba) pour leur aide dans la collecte des souches.*

Mes remerciements vont également à : Madame Hassiba Ait Saadi, Colonel Briteh, Commandant Salim Lamari, Lieutenant Mouloud Akbel, Madame Nawel Fodhil Ali, Professeur Mostafa Baccouche, Professeur Abdelkader Kettache, Monsieur Madjid Atailia, ainsi qu'au personnel des laboratoires : de métallurgie physique et propriétés des matériaux (UBMA), d'Amélioration génétique des plantes (UBMA), de Microbiologie (UBMA), d'électrochimie-corrosion (EMP) et de chimie macromoléculaire (EMP).

Il est évident que je ne peux oublier de remercier ma famille qui a toujours répondu présente et a été d'un grand soutien en toutes situations.

Je remercie mes amis qui m'ont aidée et soutenue tout au long de ces années.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Résumé

L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pelargonium graveolens*, obtenue par hydrodistillation, a permis d'identifier 96.86% de ses constituants. Les composants majeurs sont : le citronellol (19.22%), le géraniol (14.03%) et le formiate de citronellyle (10.02%). Les constituants de l'huile essentielle appartiennent essentiellement aux alcools monoterpéniques (38.85%), aux esters terpéniques (29.54%) et aux sesquiterpènes (14.97%).

L'huile essentielle (HE) de *Pelargonium graveolens* est active sur 86.66% des souches bactériennes testées. Ces souches sont caractérisées par une importante résistance aux antibiotiques, en particulier les souches *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus agalactiae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'activité de l'HE est beaucoup plus significative sur les cocci à Gram positif, du genre *Staphylococcus* aussi bien que ceux des genres *Streptococcus* et *Enterococcus*. Les diamètres des zones d'inhibition de l'HE de cette plante varient dans un intervalle assez large allant de 7.2 mm à 42.8 mm. L'activité est beaucoup plus appréciable sur les espèces des genres *Streptococcus* et *Enterococcus*.

Quand à la concentration minimale inhibitrice (CMI) moyenne, elle avoisine à peine les 0.3% vis-à-vis des bactéries à Gram positif, alors qu'elle est de 1.5% vis-à-vis des espèces à Gram négatif. Les concentrations minimales bactéricides de l'huile (CMB) sont beaucoup plus importantes et dépassent les 4% pour les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*, elles sont de 2% pour *Acinetobacter baumannii* et sont inférieures ou égales à 0.7% pour les cocci à Gram positif testés. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs des CMI et des CMB des souches résistantes aux antibiotiques et celles des souches sauvages.

L'activité de l'huile essentielle est de type bactériostatique sur les entérobactéries et *P. aeruginosa* et est bactéricide vis-à-vis d'*A. baumannii* et les cocci à Gram positif testés. Encore meilleur est ce pouvoir bactéricide sur les souches *S. aureus*, *S. agalactiae* et *E. faecalis*.

La synergie de l'HE de *P. graveolens* avec les différents antibiotiques a permis l'amélioration de l'activité antibactérienne sur les souches les plus résistantes.

L'addition de l'HE au produit alimentaire (crème pâtissière) et au savon a permis une réduction significative du nombre bactérien. De plus l'HE semble posséder une excellente rémanence.

L'HE de *Pelargonium graveolens* peut être proposée comme substitut des additifs utilisés dans la protection des denrées alimentaires et aussi comme produit antiseptique. Cette substance naturelle peut être également modélisée en industrie pharmaceutique dans la lutte contre la contamination, la colonisation et la formation de biofilms.

Mots clés : Huile essentielle- *Pelargonium graveolens*- Composition chimique- Antibactérien- Conservateur- Antiseptique - Bio-décontamination.

Summary

The analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry of the essential oil of the aerial parts of *Pelargonium graveolens*, obtained by steam distillation, identified 96.86% of its constituents. The major components are: citronellol (19.22%), geraniol (14.03%) and citronellyl formate (10.02%). The essential oil constituents mainly belong to monoterpene alcohols (38.85%), terpene esters (29.54%) and sesquiterpenes (14.97%).

The essential oil (EO) of *Pelargonium graveolens* is active on 86.66% of tested bacterial strains. These strains are characterized by high resistance to antibiotics, in particular *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus agalactiae*.

The activity of the EO is much more significant on the Gram-positive cocci, of the genus *Staphylococcus* as well as those of *Streptococcus* and *Enterococcus*. The diameters of the inhibition zones of the EO of this plant vary within a relatively wide range, from 7.2mm to 42.8mm. The activity is much more appreciated on the species of *Streptococcus* and *Enterococcus*.

Concerning the average minimum inhibitory concentration (MIC), it is barely around 0.3% for Gram-positive bacteria, while it is 1.5% for the Gram-negative species. Minimum bactericidal concentrations of oil (MBC) are much larger and exceed 4% for *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*, they are 2% for *Acinetobacter baumannii* and less than or equal to 0.7% for tested positive cocci Gram. There is no significant difference between the values of MIC and MBC of antibiotic resistant strains and those of susceptible ones.

The essential oil activity is bacteriostatic on *Enterobacteriaceae* and *P. aeruginosa*, and is bactericidal for *A. baumannii* and tested positive Gram- cocci. The best is that bactericidal power on *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. faecalis* strains.

The synergy of *P. graveolens* EO with different antibiotics has allowed the improvement of antibacterial activity on the most resistant strains.

The addition of the EO to food product (custard), and to soap has allowed a significant reduction in bacterial numbers. EO seems to have an excellent retention.

The *Pelargonium graveolens* EO can be proposed as a substitute for additives used in food protection and also as antiseptic. This natural substance can also be modeled in pharmaceutical industry to fight against contamination, colonization and biofilm formation.

Keywords: Essential oil - *Pelargonium graveolens* - Chemical composition - Antibactérien - conservator - Antiseptic - Bio-decontamination.

ملخص

قد سمح التحليل بالاستشراب الغازي المزدوج بمقياس الطيف الكتلي لمستخلص زيت الأجزاء الهوائية لنبته بيلارغونيوم جرافيونانس *Pelargonium graveolens*، التي تم الحصول عليه عن طريق التقطير بالبخار بتحديد 96.86% من مكوناته، والتي نذكر أهمها كالتالي: سترونيلول 19.22% جيرانيول 14.03% فورميات سيترونيليل 10.02%. تنتمي مكونات الزيت العطري أساسا إلى: الكحول المونوتريبينية (38.85%) والاسترات التريبينية (29.54%) والساسكيتربين (14.97%).

إنّ مستخلص زيت بيلارغونيوم جرافيونانس نشط بنسبة 86.66% على السلالات البكتيرية المختبرة وتتميز هذه الأخيرة بمقاومة عالية للمضادات الحيوية، سيما *Enterococcus faecalis* ، *Acinetobacter baumannii* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Streptococcus agalactiae*.

فنشاط مستخلص الزيت هو أكثر أهمية وبكثير بالنسبة للمكورات إيجابية الجرام، من صنف *Staphylococcus* وكذلك تلك من صنف *Streptococcus* و *Enterococcus*. تختلف أقطار مناطق تثبيط مستخلص زيت هذه النبتة ضمن مجموعة واسعة نسبيا، تتراوح ما بين 7.2 مم إلى 42.8 مم. يبدو النشاط أكثر أهمية على أنواع *Streptococcus* و *Enterococcus*.

بالنسبة لمتوسط أدنى التركيز المثبط، فيكون بحوالي 0.3% للبكتيريا إيجابية الجرام، في حين يبلغ 1.5% بالنسبة لأنواع سالبة الجرام. تكون أدنى تركيزات القاتلة للبكتيريا في الزيت والتي هي أكبر أهمية بكثير وتكون 4% بالنسبة لـ *entérobactéries* و *Pseudomonas aeruginosa* و 2% بالنسبة لـ *Acinetobacter baumannii* وأقل من أو تساوي 0.7% بالنسبة للمكورات ذات غرام ايجابي المختبرة. لا يوجد فرق كبير بين قيم أدنى تركيزات المثبطة وأدنى تركيزات القاتلة للبكتيريا للسلالات المقاومة وتلك غير المقاومة للمضادات الحيوية. إنّ نشاط مستخلص الزيت من صنف مثبط للبكتيريا بالنسبة لكل من *entérobactéries* و *P. aeruginosa* وقاتل للبكتيريا بالنسبة لـ *A. baumannii* وللمكورات إيجابية الجرام المختبرة.

ويبقى الأفضل هي تلك القدرة القاتلة للبكتيريا على سلالات *S. aureus* ، *S. agalactiae* و *E. faecalis*. سمح تآزر مستخلص زيت بيلارغونيوم جرافيونانس مع المضادات الحيوية المختلفة بتحسين النشاط المضاد للبكتيريا على السلالات الأكثر مقاومة.

سمحت إضافة مستخلص الزيت إلى أحد المنتجات الغذائية (كريمة الحلوى) والصابون، بانخفاض كبير في عدد البكتيريا. إضافة على ذلك، يبدو أنّ مستخلص الزيت يتمتع بقدرة حفظ ممتازة.

يمكن اقتراح مستخلص زيت بيلارغونيوم جرافيونانس كبديل عن المضافات المستخدمة في حماية الأغذية وكذلك كمادة مطهرة، كما قد تستعمل هذه المادة الطبيعية في ميدان صناعة الأدوية لمكافحة التلوث والعدوى وتشكل أعشبية حيوية.

الكلمات المفتاحية: مستخلص الزيت – بيلارغونيوم جرافيونانس – تركيبة كيميائية – مضاد للبكتيريا – حافظ – مطهر – تطهير حيوي.

Table des matières

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Analyse Bibliographique

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Chapitre I : Résistance aux antibiotiques : définitions, mécanismes et impacts | 1 |
| I. Généralités sur les antibiotiques | 1 |
| 1. Définition | 1 |
| 2. Mode d'action et spectre d'activité | 1 |
| II. Résistance aux antibiotiques | 3 |
| 1. Définition | 3 |
| 2. Facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance | 3 |
| 2.1. Usage inapproprié d'antibiotiques | 4 |
| 2.2. Utilisation massive d'antibiotiques dans le secteur agro-alimentaire | 4 |
| 2.3. Utilisation d'antiseptiques et de désinfectants | 5 |
| 3. Types de résistance | 5 |
| 3.1. Résistance naturelle ou intrinsèque | 5 |
| 3.2. Résistances acquises | 6 |
| 3.2.1. Résistance par mutation chromosomique | 6 |
| 3.2.2. Résistance par acquisition de matériel génétique exogène | 6 |
| III. Mécanismes de résistance | 7 |
| 1. Brouillage : production d'enzymes d'inactivation des antibiotiques | 7 |
| 2. Blindage et efflux : imperméabilité à la pénétration de l'antibiotique ou rejet | 8 |
| 3. Camouflage : modification de la structure cellulaire cible | 8 |
| 4. Esquive ou stratégie de contournement | 8 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IV. Impacts de la résistance aux antibiotiques | 9 |
| 1. Bactéries multirésistantes | 9 |
| 1.1. Bactéries à Gram positif | 9 |
| 1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline | 9 |
| 1.1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> multirésistant et <i>Enterococcus</i> résistant à la Vancomycine | 10 |
| 1.2. Bactéries à Gram négatif | 11 |
| 1.2.1. Entérobactéries productrices de <i>BLSE</i> et de β -lactamases de type <i>AmpC</i> | 11 |
| 1.2.2. Bactéries productrices de carbapénèmases | 11 |
| 1.2.3. Résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones | 12 |
| 1.3. Autres bactéries résistantes préoccupantes | 13 |
| 2. Mortalité | 13 |
| 3. Coût | 14 |
| 4. Prévention et perspectives | 14 |
| Chapitre II : Les huiles essentielles | 15 |
| I. Définitions | 15 |
| 1. Huile essentielle | 15 |
| 2. Aromathérapie | 15 |
| II. Histoire | 15 |
| III. Matière végétale | 18 |
| IV. Méthodes d'extraction des huiles essentielles | 19 |
| 1. Hydrodistillation | 19 |
| 2. Distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion | 19 |
| 3. Expression ou pressage à froid | 20 |
| 4. Enfleurage | 20 |
| V. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles | 20 |
| VI. Composition chimique des huiles essentielles | 21 |
| 1. Terpènes | 21 |
| 1.1. Monoterpènes | 21 |
| 1.2. Sesquiterpènes | 21 |
| 2. Composés aromatiques | 21 |
| 3. Notion de chémotype | 22 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| VII. Intérêts éco-biologiques, thérapeutiques et économiques des huiles essentielles | 22 |
| VIII. Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries | 23 |
| IX. Modes d'administration, absorption et excrétion | 23 |
| X. Toxicité et pouvoir allergisant des huiles essentielles | 24 |
| Chapitre III : <i>Pelargonium graveolens</i> | 25 |
| I. Histoire | 25 |
| II. Position systématique | 26 |
| III. Caractérisation botanique | 27 |
| 1. Morphologie | 27 |
| 2. Mode de culture | 27 |
| 2.1. Milieu naturel | 27 |
| 2.2. Multiplication et culture | 28 |
| 2.3. Récolte | 28 |
| IV. Maladies et ravageurs | 28 |
| V. Huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i> | 29 |
| 1. Propriétés physiques et composition chimique | 30 |
| 2. Domaines d'utilisations | 31 |
| 2.1. Parfumerie et cosmétiques | 31 |
| 2.2. Médecine traditionnelle et aromathérapie | 31 |
| 2.3. Agroalimentaire | 31 |
| 3. Toxicité et pouvoir allergisant | 32 |
| VI. Travaux récents sur <i>Pelargonium graveolens</i> | 32 |
| | |
| <u>Etude expérimentale</u> | |
| Matériels et méthodes | 35 |
| I. Enquête ethnobotanique | 36 |
| 1. Enquêtés | 36 |
| 2. Enquête | 36 |
| II. Matériel végétal | 37 |
| 1. Zone d'échantillonnage | 37 |
| 1.1. Position géographique | 37 |
| 1.2. Conditions climatiques | 38 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3. Nature du sol | 38 |
| 2. Drogue | 38 |
| 2.1. Etude de la teneur en eau | 39 |
| 2.2. Description des coupes histologiques de la feuille et de la tige | 39 |
| III. Extraction de l'huile essentielle | 40 |
| 1. Hydrodistillation | 41 |
| 2. Rendement en huile essentielle | 42 |
| 3. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle | 42 |
| IV. Etude analytique de l'huile essentielle | 43 |
| 1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle | 43 |
| 2. Mesure des indices physiques | 43 |
| 2.1. Densité relative à 20°C | 43 |
| 2.2. Indice de réfraction | 44 |
| 2.3. Miscibilité à l'éthanol | 44 |
| 3. Analyse chromatographique de l'huile essentielle | 45 |
| V. Test-objet : Souches bactériennes testées | 47 |
| 1. Collecte et identification | 47 |
| 1.1. Isolement | 47 |
| 1.2. Observations microscopiques | 47 |
| 1.2.1. Etat frais | 47 |
| 1.2.2. Coloration de Gram | 48 |
| 1.3. Recherche des enzymes respiratoires | 49 |
| 1.3.1. Test de la catalase | 49 |
| 1.3.2. Test de l'oxydase | 49 |
| 1.3.3. Test de la nitrate réductase | 50 |
| 1.4. Etude du métabolisme glucidique sur milieu TSI | 51 |
| 1.5. Galerie API | 51 |
| 2. Sélection et conservation des souches | 53 |
| 3. Antibiogramme | 54 |
| 3.1. Technique | 54 |
| 3.2. Tests complémentaires | 56 |
| 3.2.1. Recherche de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) | 56 |
| 3.2.2. Détection des souches de <i>Staphylococcus</i> résistantes à la méthiciline | 58 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| VI. Activité antibactérienne <i>in vitro</i> de l'huile essentielle extraite | 58 |
| 1. Aromatogramme | 58 |
| 2. Quantification de l'activité de l'huile essentielle | 60 |
| 2.1. Dilutions minimales inhibitrices | 61 |
| 2.2. Concentrations minimales inhibitrices | 61 |
| 3. Détermination du type d'activité : bactéricidie-bactériostase | 61 |
| 3.1. Par repiquage à partir des zones d'inhibition | 62 |
| 3.2. Par détermination des concentrations minimales bactéricides | 62 |
| VII. Recherche de synergies : Antibiotiques - Huile essentielle | 63 |
| VIII. Propositions d'usages de l'huile essentielle | 64 |
| 1. En tant qu'additif alimentaire | 64 |
| 2. En tant que produit antiseptique | 66 |
| 3. Analyse statistique des résultats | 69 |
| Résultats et discussions | 70 |
| I. Enquête ethnobotanique | 70 |
| 1. Données sur les enquêtés | 70 |
| 1.1. Sexe | 70 |
| 1.2. Age | 70 |
| 1.3. Profession | 71 |
| 2. Usage des plantes aromatiques et médicinales | 72 |
| 2.1. Utilisation de PAM | 72 |
| 2.2. Pathologies traitées par les PAM | 73 |
| 3. <i>Pelargonium graveolens</i> | 74 |
| 3.1. Connaissance de la plante | 74 |
| 3.2. Usage de la plante | 75 |
| 3.3. Source et période de récolte de la plante | 76 |
| 3.4. Parties utilisées | 77 |
| 3.5. Voies d'utilisation de la plante | 78 |
| 3.6. Pathologies traitées par la plante | 78 |
| 3.7. Utilisation de la plante seule ou en association | 80 |
| 3.8. Mode de préparation et fréquence d'utilisation de la plante | 80 |
| 3.9. Population cible | 82 |
| 3.10. Période de prise | 82 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.11. Effet de la drogue | 83 |
| 3.12. Effets indésirables | 84 |
| II. Matériel végétal | 85 |
| 1. Teneur en eau | 85 |
| 2. Caractérisation microscopique des coupes histologiques | 86 |
| 2.1. Feuille | 86 |
| 2.2. Tige | 87 |
| III. Cinétique d'extraction et rendement en huile essentielle | 89 |
| 1. Etude de la cinétique d'extraction | 89 |
| 2. Rendement en huile essentielle | 90 |
| IV. Etude analytique de l'huile essentielle | 91 |
| 1. Caractéristiques organoleptiques | 91 |
| 2. Paramètres physiques | 91 |
| 3. Profil chromatographique de l'huile essentielle | 92 |
| V. Identification des souches | 96 |
| VI. Sensibilité aux antibiotiques | 98 |
| 1. <i>Enterobacteriaceae</i> | 98 |
| 2. Bacilles à Gram négatif non fermentant | 99 |
| 3. Cocci à Gram positif | 101 |
| 3.1. <i>Staphylococcus</i> | 101 |
| 3.2. <i>Streptococcus</i> et <i>Enterococcus</i> | 102 |
| VII. Sensibilité à l'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i> | 104 |
| 1. Huile essentielle brute | 104 |
| 2. Quantification de l'activité de l'huile essentielle | 107 |
| 2.1. Dilutions minimales inhibitrices | 107 |
| 2.2. Concentrations minimales inhibitrices | 109 |
| 3. Type d'activité antibactérienne | 112 |
| 3.1. Repiquage à partir des zones d'inhibition | 112 |
| 3.2. Concentrations minimales bactéricides | 112 |
| VIII. Effet synergique antibiotique - huile essentielle | 114 |
| 1. β -lactamines | 116 |
| 2. Aminosides | 117 |
| 3. Quinolones de 1 ^{ère} génération et fluoroquinolones | 117 |
| 4. Triméthoprim + sulfaméthoxazole | 118 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| 5. Furanes et fosfomycine | 118 |
| IX. Usages de l'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i> | 119 |
| 1. En tant qu'additif alimentaire | 119 |
| 2. En tant que produit antiseptique | 127 |

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

- AAC** : Aminosides acétyl-transférases
- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- AFNOR**: Association Française de Normalisation
- AK** : Amikacine
- al.** : *et alii* (et les autres personnes)
- AM** : Ampicilline
- AMC** : Amoxicilline + acide clavulanique
- ANT** : Aminosides nucléotidyltransférases
- APH** : Aminosides phospho-transférases
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique
- ATB**: Antibiotique
- ATCC**: *American Type Culture Collection*
- ATM** : Aztréonam
- AX** : Amoxicilline
- BGN** : Bactéries à Gram négatif
- BGN-NF** : Bacille à Gram négatif non fermentant
- BLSE** : β -lactamases à spectre étendu
- C** : Chloramphénicol
- C: G** : rapport citronellol / géranol
- C.CLIN**: Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'inter-région
- C3G**: Céphalosporine de 3^{ème} Génération
- CA-SFM**: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
- CAZ**: Céftazidime
- CDC**: *Centers for Disease Control and Prevention*
- CF** : Céfalotine
- CFS** : Cefsulodine
- CGP** : Cocci à Gram positif
- CIP** : Ciprofloxacine
- CLSI** : *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- cm** : Centimètre

CM : Clindamycine

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMB_m : Concentration Minimale Bactéricide moyenne

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMI_m : Concentration Minimale Inhibitrice moyenne

CO₂ : Dioxyde de carbone

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CRO : Ceftriaxone

CT : Colistine

CTX : Céfoxitine

CZ : Céfazoline

D : Doxycycline

D²⁰ : Densité relative à 20°C

Da : Dalton

DMI : Dilution Minimale Inhibitrice

DO : Densité optique

Dr. : Docteur

DMS : Degrés, Minutes, Secondes

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E : Erythromycine

EARS : *European Antimicrobial Resistance Surveillance*

Ehrh. : Ehrhart Jakob Friedrich

EMP : Ecole Militaire Polytechnique

ERV : Entérocoque résistant à la vancomycine

etc. : *Et cetera*

EUCAST : *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*

eV : électron-volt

FA : Acide fusidique

FDA : *Food and Drug Administration*

FEMA : *Flavor and Extract Manufacturers Association*

Fig. : Figure

FOS : Fosfomycine

FOX : Céfoxitine

FQ : Fluoroquinolones
Fr: Franc français
FT: Nitrofurantoïne
g: Gramme
G x: Grossissement
GM: Gentamicine
GN: Gélose nutritive
GRAS: *Generally Recognized As Safe*
GSF: Gélose au sang frais
H : Humidité
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
H₂O: Eau
H₂S: Sulfure d'hydrogène
ha: Hectare
HE: Huile essentielle
HEs : Huiles essentielles
HD : Hydrodistillation
IgG : Immunoglobuline G
IMP: Imipénème
IPA : Institut Pasteur d'Alger
ISO: *International Organization for Standardization*
J.-C.: Jésus- Christ
K : Kanamycine
Kg : Kilogramme
km : kilomètre
l : Litre
L : Lincomycine
L'Hér. : L'Héritier de Brutelle
Lab.: Laboratoire
LEV : Lévofoxacine
LPS : Lipopolysaccharide
m : Mètre
M ± SD : moyenne plus ou moins l'écart type
M^{me} : Madame

m/z : Rapport masse sur charge
mg/ml: Milligramme par millilitre
MH: Muller Hinton
min: Minute
ml: Millilitre
ml/min: Millilitre par minute
MLS: Macrolides-Lincosamides- Streptogramines
mm : Millimètre
MMAT : Microflore Mésophile Aérobie Totale
MO: Microscopie optique
MRSA : *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
MS : Matière sèche
MSSA : *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*
N : Néomycine
NA : Acide nalidixique
NaCl : Chlorure de sodium
nd: Non détecté
n_d²⁰ : Indice de réfraction à 20°C
NET: Nétilmicine
NI: Nitroxoline
NIST: *National Institute of Standards and Technology*
nm: Nanomètre
NR : Nitrate réductase
O₂: Dioxygène
OFX : Ofloxacine
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORL: Oto-rhino-laryngologie
OX : Oxacilline
P : Pénicilline
p: Probabilité
PAM: Plante Aromatique et Médicinale
PEF : Péfloxacine
PG : Prélèvement de gorge
pH : Potentiel Hydrogène

PI : Acide pipémidique
PIP : Pipéracilline
PLP : Protéine liant la pénicilline
PM : Pristinamycine
PN : Prélèvement nasal
PV : Prélèvement vaginal
R : Rendement
R+I : Résistante + Intermédiaire
RD : Rifampicine
S : Streptomycine
SM: Spectrométrie de masse
SR : Spiramycine
st / mm² : Stomates par millimètre carré
STA : Staphylocoques
SXT : Triméthoprim + Sulfaméthoxazole
t : tonne
T : Temps
Tab. : Tableau
TCC : Ticarcilline + acide clavulanique
TE : Tétracycline
TEC : Teicoplanine
TIC : Ticarcilline
TM : A titre de marque
TR : Taux de réduction bactérienne
TSI: *Triple Sugar Iron*
TZP: Pipéracilline + Tazobactam
UBMA : Université Badji Mokhtar Annaba
UFC : Unité Formant colonie
UI: Unité Internationale
USA: *United States of America*
V: Volume
v/v : Volume par volume
VA : Vancomycine
VP : Voges Proskauer

W. : Wilaya

< : Inférieur

≥ : Supérieur ou égal

Ø : Diamètre

% : Pourcentage

° : Degré

°C : Degré Celsius

α : Alpha

β : Béta

γ : Gamma

μl : Microlitre

μg : Microgramme

μm : Micromètre

Liste des figures

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig.01: Distillation à l'époque de la Renaissance | 17 |
| Fig.02: Culture de <i>Pelargonium graveolens</i> | 27 |
| Fig.03: Géranium rosat | 36 |
| Fig.04: Zone de l'échantillonnage | 37 |
| Fig.05: Montage de l'hydrodistillation | 41 |
| Fig.06: Appareil Perkin Elmer CG Clarus 600 | 46 |
| Fig.07: Système informatique relié à l'appareil de CPG-SM | 46 |
| Fig.08: Protocole de détermination de l'effet conservateur de l'HE dans la crème pâtissière | 66 |
| Fig.09: Protocole de détermination de l'effet antiseptique de l'HE dans le savon | 69 |
| Fig.10: Répartition des enquêtés selon le sexe | 70 |
| Fig.11: Répartition des enquêtés selon l'âge | 71 |
| Fig.12: Répartition des enquêtés selon leurs professions | 71 |
| Fig.13: Répartition des enquêtés selon l'utilisation des PAM | 72 |
| Fig.14: Pathologies traitées par les PAM selon les enquêtés | 73 |
| Fig.15: Répartition des enquêtés selon la connaissance de la plante | 74 |
| Fig.16: Noms connus de la plante selon les enquêtés | 74 |
| Fig.17: Répartition des enquêtés selon l'utilisation de la plante | 75 |
| Fig.18: Domaines d'usage de la plante selon les enquêtés | 75 |
| Fig.19: Sources de la plante selon les enquêtés | 76 |
| Fig.20: Périodes de récolte de la plante par les enquêtés | 77 |
| Fig.21: Parties utilisés de la plante selon les enquêtés | 77 |
| Fig.22: Voies d'utilisation de la plante par les enquêtés | 78 |
| Fig.23: Pathologies traitées par <i>Pelargonium graveolens</i> selon les enquêtés | 79 |
| Fig.24: Utilisation de la plante seule ou en association selon les enquêtés | 80 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Fig.25: Formes d'utilisation de la plante selon les enquêtés | 81 |
| Fig.26: Fréquence d'utilisation de la plante par les enquêtés | 81 |
| Fig.27: Usagers de la plante selon les enquêtés | 82 |
| Fig.28: Moments de prise selon les enquêtés | 83 |
| Fig.29: Temps de latence avant début d'effets selon les enquêtés | 83 |
| Fig.30: Effets escomptés de l'usage de la plante selon les enquêtés | 84 |
| Fig.31: Effets indésirables de la plante selon les enquêtés | 84 |
| Fig.32: Coupe transversale de la tige de <i>P. graveolens</i> | 86 |
| Fig.33: Coupe anatomique de la feuille de <i>Pelargonium graveolens</i> (MO : G x40) | 86 |
| Fig.34: Coupe anatomique de la tige de <i>Pelargonium graveolens</i> (MO : Gx40) | 87 |
| Fig.35: Poil sécréteur (M.O. : Gx40) | 88 |
| Fig.36: Evolution du rendement en HE en fonction du temps lors de l'hydrodistillation | 89 |
| Fig.37: Profil chromatographique de l'HE de <i>Pelargonium graveolens</i> | 92 |
| Fig.38: Résistance aux antibiotiques des <i>Enterobacteriaceae</i> testées | 98 |
| Fig.39: Résistance aux antibiotiques des souches <i>Acinetobacter baumannii</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> testées | 100 |
| Fig.40: Résistance aux antibiotiques des souches <i>Staphylococcus sp.</i> testées | 101 |
| Fig.41: Résistance aux antibiotiques des souches <i>Streptococcus agalactiae</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> testées | 102 |
| Fig.42.A: Dynamique de variation de la charge bactérienne de la crème pâtissière à 4°C | 123 |
| Fig.42.B: Dynamique de variation de la charge bactérienne de la crème pâtissière à 20°C | 123 |
| Fig.43: Culture sur gélose nutritive de la crème pâtissière après une minute | 124 |
| Fig.44: Culture sur milieu Chapman de la crème pâtissière après une minute | 124 |
| Fig.45: Culture de la crème pâtissière après quatre heures de conservation à 4°C | 124 |
| Fig.46: Culture sur milieu Chapman après vingt-quatre heures de conservation à 4°C | 125 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Fig.47.A: Dynamique de variation de la charge bactérienne de la crème pâtissière du commerce à 4°C | 125 |
| Fig.47.B: Dynamique de variation de la charge bactérienne de la crème pâtissière du commerce à 20°C | 126 |
| Fig.48: Culture après une minute du lavage des mains | 128 |
| Fig.49: Culture après une heure du lavage des mains au savon ordinaire | 129 |
| Fig.50: Cultures après une heure du lavage des mains au savon proposé | 129 |
| Fig.51: Cultures après deux heures du lavage des mains | 129 |
| Fig.52: Cultures après trois heures du lavage des mains | 130 |
| Fig.53: Taux de réduction bactérienne après lavage des mains au savon testé | 130 |
| | |
| Planche : Effet conservateur de l'huile essentielle dans la crème pâtissière préparée | 122 |

Liste des tableaux

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tab.01: Modes d'action et spectres d'activité des principales familles d'antibiotiques | 2 |
| Tab.02: Classification de <i>Pelargonium graveolens</i> | 26 |
| Tab.03: Paramètres physiques de l'HE de géranium | 30 |
| Tab.04: Profil chromatographique de l'HE de géranium | 30 |
| Tab.05: Interprétation des tests de la détection de la résistance à la méthiciline | 58 |
| Tab.06: Catégories de sensibilité à l'HE selon les diamètres des zones d'inhibition | 60 |
| Tab.07: Tableau comparatif des paramètres physiques de l'HE de <i>P. graveolens</i> | 91 |
| Tab.08: Composition chimique de l'HE de <i>Pelargonium graveolens</i> | 93 |
| Tab.09: Classes biochimiques identifiées dans l'HE de Géranium rosat | 95 |
| Tab.10: Liste des souches bactériennes et de leurs origines | 97 |
| Tab.11: Valeurs moyennes des zones d'inhibition de l'HE des BGN | 104 |
| Tab.12: Valeurs moyennes des zones d'inhibition de l'HE des CGP | 105 |
| Tab.13: Diamètres d'inhibition des dilutions de l'HE vis-à-vis des <i>Enterobacteriaceae</i> testées | 107 |
| Tab.14: Diamètres d'inhibition des dilutions de l'HE vis-à-vis des BGN-NF testés | 108 |
| Tab.15: Diamètres d'inhibition des dilutions de l'HE vis-à-vis des Staphylocoques testés | 109 |
| Tab.16: Diamètres d'inhibition des dilutions de l'HE vis-à-vis de <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> testés | 109 |
| Tab.17: CMI _m de l'HE de <i>Pelargonium graveolens</i> sur les <i>Enterobacteriaceae</i> testés | 110 |
| Tab.18: CMI _m de l'HE de <i>P. graveolens</i> sur les bacilles à Gram négatif testés | 110 |
| Tab.19: CMI _m de l'HE de <i>Pelargonium graveolens</i> sur les cocci à Gram positif testées | 111 |
| Tab.20: CMB _m de l'HE de <i>P. graveolens</i> sur les souches bactériennes testées | 112 |
| Tab.21: Diamètres d'inhibition de l'association antibiotiques – HE | 114 |

« La culture biologique apparait de plus en plus comme la seule solution d'avenir, source de santé et de vie, scientifiquement étayée, et de ce fait l'une des alliées incomparables du médecin ».

Docteur Jean Valnet, 1970

Introduction

Introduction

L'un des progrès singuliers du 20^{ème} siècle dans la lutte contre les maladies infectieuses fut l'introduction des antibiotiques. Ces molécules ont contribué d'une manière importante au traitement de plusieurs infections. En dépit de l'effort consenti, ces nouvelles substances ont tout de suite montré leurs limites. Ceci résulte d'une consommation le plus souvent inadéquate, confortée par un manque de synthèse de nouvelles molécules, et ce, depuis plus d'une trentaine d'années.

On constate alors une émergence de microorganismes résistants à une large gamme d'antimicrobiens. Cette résistance n'a pas tardé à devenir un problème de santé important à l'échelle mondiale. La question est d'autant plus complexe lorsqu'il s'agit de résistances portées par des éléments mobiles, facilement transférables [1-3].

Ces derniers temps, on enregistre une inquiétante émergence de bactéries multirésistantes, notamment celles productrices de β -lactamases à spectre élargi ou celles résistantes à la méthicilline, aussi bien en milieu hospitalier que communautaire [4,5]. Le lien entre la consommation d'antibiotiques et le développement de la résistance est un fait établi et admis par l'ensemble des professionnels [6-8]. De plus, l'utilisation des antibiotiques dans le domaine agrovétérinaire contribue également à l'aggravation de cette problématique. Par ailleurs, plusieurs éléments contribuent à la propagation des résistances : les mesures d'hygiène inadéquates, la promiscuité des patients hospitalisés, etc. Les conséquences de l'amplification de ces phénomènes de résistances bactériennes sont une augmentation des séjours hospitaliers, des coûts, de la mortalité et l'émergence de souches hautement résistantes [8-10].

Face à ces résistances et à la limite de synthèse de nouvelles classes de molécules anti-infectieuses, un regain d'intérêt est porté aux plantes aromatiques et médicinales dont les propriétés antimicrobiennes sont dues principalement à une fraction d'essence : les huiles essentielles [5]. Ces dernières sont des substances odorantes concentrées dont l'usage s'est élargi à plusieurs domaines allant de l'agroalimentaire aux industries chimiques et pharmaceutiques [5,11].

Au cours de la dernière décennie, plusieurs recherches cliniques ont mis en évidence une activité antimicrobienne de multiples huiles essentielles [12-18]. Celle-ci est liée à sa composition chimique et spécialement à la nature de ses composants volatils. Certains présentent divers modes d'action et agissent sur différentes cibles, avec une faible probabilité

de développement de résistance. La composition chimique des huiles essentielles est aussi variable, en fonction du climat, de l'altitude, de la nature du sol et son pH, de la période de récolte et de la technique de séchage et d'extraction. [5,15,16].

L'Algérie recèle d'importantes potentialités en matière de plantes aromatiques et médicinales, et ce, en raison de son vaste territoire, de la diversité de son climat et de la nature de ses sols [19]. Les gains que peut procurer la valorisation de ces plantes sont énormes mais leur exploitation n'a pas été entreprise de façon sérieuse jusqu'à présent et pourtant, l'industrie pharmaceutique est à la recherche de composés bioactifs intéressants, qui pourraient compléter ou remplacer les produits chimiques déjà utilisés.

Parmi les plantes aromatiques largement répondues et facilement cultivables en Algérie : *Pelargonium graveolens* L'Hér. Cette plante annuelle et spontanée est originaire de l'Afrique australe et cultivée dans de nombreuses régions méditerranéennes et subtropicales [20,21]. L'huile essentielle de ce pélagonium, classée « Généralement reconnue comme saine » (*GRAS*) et approuvée pour usage alimentaire par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration*), est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, spasmolytiques, hémostatiques et cicatrisantes [14,22,23]. Cependant, peu de travaux ont été consacrés à ses qualités antibactériennes, notamment en Algérie.

Dans la perspective d'utilisation de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (HE) en pratique médicale, en hygiène et en agroalimentaire, nous nous sommes proposés de faire son screening chimique et de rechercher d'éventuelles aptitudes à inhiber la croissance bactérienne.

Le présent travail est composé de deux parties : une synthèse bibliographique subdivisée en trois chapitres portant sur la résistance aux antibiotiques, les huiles essentielles et le *Pelargonium graveolens*.

Dans la seconde partie, nous détaillerons les outils méthodologiques appliqués avant d'exposer les résultats obtenus. Cette étude expérimentale touche essentiellement quatre axes principaux :

- Enquête ethnobotanique sur la plante étudiée auprès de la population locale.

- Récolte et caractérisation du matériel végétal, extraction de l'HE et son analyse physico-chimique.
- Essais bactériologiques : collecte, caractérisation et sélection des souches bactériennes. Etude qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne de l'HE et tests sur les effets synergiques de l'HE avec les antibiotiques.
- Incorporation de l'HE dans deux produits différents pour apprécier ses effets : conservateur (produit alimentaire) et antiseptique (produit d'hygiène).

PARTIE I

Analyse bibliographique

*Chapitre I : Résistance aux
antibiotiques: définitions, mécanismes
et impacts*

Chapitre I : Résistance aux antibiotiques: définitions, mécanismes et impacts

I. Généralités sur les antibiotiques

1. Définition

Un antibiotique (ATB) est une substance naturelle d'origine biologique, chimique ou semi synthétique, ayant une activité antibactérienne en milieu organique, une bonne absorption et une bonne diffusion dans l'organisme [24]. Son action étant spécifique et dirigée contre les bactéries, il est relativement peu toxique pour les cellules eucaryotes [25].

Les antibiotiques naturels sont produits essentiellement par des microorganismes du sol tels que les moisissures et les bactéries, particulièrement les espèces des genres *Streptomyces* et *Bacillus*, ainsi que de nombreuses bactéries marines. Ce sont des métabolites secondaires, qui ne servent pas à la construction cellulaire de l'organisme producteur, mais apparaissent quand il n'y a plus de croissance [26]. Ils ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des microorganismes à des concentrations tolérées par l'hôte [24].

Les antibiotiques chimiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de molécules de base naturelle produites par des microorganismes [25].

2. Mode d'action et spectre d'activité

Les antibiotiques agissent à l'échelle moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. Leur action s'exprime soit par toxicité sélective au niveau de la synthèse de la paroi bactérienne, de la membrane cytoplasmique, des protéines ou des acides nucléiques, soit par inhibition compétitive. Dans ce dernier cas, l'antibiotique est un analogue structural d'un substrat d'enzymes jouant un rôle important dans les principales synthèses. L'enzyme se fixe à l'antibiotique et la synthèse est stoppée. Il arrive aussi que l'antibiotique trouve un site de fixation sur l'enzyme, provoquant sa déformation, le rendant inefficace. L'antibiotique interfère avec une fonction essentielle à la bactérie [24,26].

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Un antibiotique à large spectre est actif sur une gamme importante de bactéries ; à spectre étroit, il n'agit que sur des bactéries qui appartiennent à un groupe bien défini [26].

Il existe actuellement plusieurs familles d'antibiotiques qui se distinguent par des propriétés physico-chimiques communes des molécules qu'elles renferment. Chaque molécule dispose d'un mode d'action et d'un spectre bien à elle [27], résumés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tab.01. Modes d'action et spectres d'activité des principales familles d'antibiotiques [28]

| Famille | Mode d'action | Principaux groupes ou antibiotiques | Spectre |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| β-lactamines | Inhibition de la synthèse du peptidoglycane | Pénicilline G, Amidinopénicillines, Monobactames Céphalosporines de 1 ^{re} génération | Étroit |
| | | Aminopénicillines, Carboxypénicillines, Uréidopénicillines, Pénèmes, Céphèmes, Carbapénèmes, Oxacéphèmes, Céphalosporines de 2 ^e , de 3 ^e et de 4 ^e génération | Large |
| Aminosides | Inhibition de la synthèse des protéines | Amikacine, Streptomycine Tobramycine, Gentamicine | Large |
| Fosfomycine | Inhibition de la synthèse du peptidoglycane | Fosfomycine | Large |
| Glycopeptides | Inhibition de la synthèse du peptidoglycane | Teicoplanine, Vancomycine | Étroit |
| Macrolides Lincosamides Streptogramines | Inhibition de la synthèse des protéines | Clindamycine, Lincomycine, Erythromycine, Azithromycine, Pristinamycine | Étroit |
| Nitrofuranes | Inhibition de la synthèse de l'ADN | Furaltadone, Furazolidone | Large |
| Phénicolés | Inhibition de la synthèse des protéines | Chloramphénicol | Large |
| Polypeptides | Action sur la membrane externe des Gram- | Polymyxine B, Colistine, Bacitracine, | Étroit |
| Quinolones et fluoroquinolones | Inhibition de la synthèse de l'ADN | Acide nalidixique, | Étroit |
| | | Ciprofloxacine, Pefloxacine, | Large |
| Sulfamides | Blocage de la synthèse de l'acide dihydrofolique | Sulfaméthoxydiazine Sulfaméthoxazole | Large |
| Tétracyclines | Inhibition de la synthèse des protéines | Tétracycline, Doxycycline, | Large |
| Rifamycines | Blocage de la synthèse des ARN messagers | Rifamycine | Étroit |
| | | Rifampicine | Large |
| Acide fusidique | Inhibition de la synthèse des protéines | Acide fusidique | Étroit |

Ainsi, les cibles bactériennes des antibiotiques varient d'une famille à une autre. L'ADN pour les quinolones et les nitrofuranes. La paroi pour les β-lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine, les membranes pour les polypeptides et le ribosome pour les aminosides, les MLS, les tétracyclines, les phénicolés et l'acide fusidique.

II. Résistance aux antibiotiques

L'apparition de la résistance bactérienne aux antibiotiques a rapidement constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale [2].

La résistance à la pénicilline s'est développée dans les années 1950, aux céphalosporines de première génération dans les années 1970 et aux céphalosporines de troisième génération dans les années 1990. Au cours des dernières années, la fréquence et l'ampleur des infections causées par des bactéries résistantes ont augmenté autant en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire [4]. On peut maintenant observer de la résistance chez presque toutes les bactéries potentiellement pathogènes. Les personnes hospitalisées sont particulièrement vulnérables à la transmission des bactéries résistantes ; on estime que 60% des infections nosocomiales sur le plan mondial sont provoquées par des bactéries résistantes [2].

1. Définition

Un microorganisme est considéré résistant lorsqu'il peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce [2].

Les seuils pour une sensibilité, une sensibilité intermédiaire ou une résistance microbiologique pour chaque espèce de bactéries et pour chacun des antibiotiques sont déterminés par un laboratoire indépendant, le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) et mis à jour régulièrement. Il existe d'autres organes tels le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM), ou encore l'*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (EUCAST) qui régissent les interprétations de l'antibiogramme à l'échelle européenne.

Parfois, la résistance à un antibiotique confère de la résistance à un ou plusieurs autres antibiotiques et c'est ce que l'on appelle la résistance croisée [1, 29-31].

2. Facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la transmission d'éléments de résistance, même entre espèces bactériennes différentes [1,26,30].

Les principaux facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance bactérienne sont :

2.1. Usage inapproprié d'antibiotiques

L'exposition abusive ou inadéquate aux antibiotiques augmente non seulement le risque de toxicité, les effets indésirables, les interactions médicamenteuses, les surinfections, la prolongation des maladies, mais aussi et surtout l'émergence de la résistance. Un des exemples probants c'est l'antibioprophylaxie dont la consommation varie de 40 à 75% des cas selon les diverses études [1,32].

En milieu hospitalier, le nombre croissant de patients immunodéprimés, les interventions chirurgicales complexes, l'utilisation accrue de procédures invasives et les systèmes de soutien des fonctions vitales plus avancés appellent souvent à une utilisation accrue d'antibiotiques à large spectre d'activité [30,33].

En milieu communautaire, l'automédication a également contribué fortement au développement de la résistance. Paradoxalement, la sous-utilisation par manque d'accès, posologie insuffisante, mauvaise observance ou antibiotique non convenable semble jouer un rôle aussi important dans l'accroissement de la résistance [1,2,30,33].

2.2. Utilisation d'antibiotiques dans le secteur agroalimentaire

L'utilisation d'antimicrobiens dans le secteur agroalimentaire est alarmante et contribue de manière significative à l'apparition et la propagation de la résistance en milieu environnemental.

Les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance. Un animal qui consomme ces antibiotiques à faible dose, aura à manger moins pour produire autant. L'animal grandira aussi plus vite. Il semblerait que les antibiotiques inhibent le métabolisme de la microflore intestinale des animaux. Les bactéries consomment donc moins de nutriments et produisent moins de toxines. C'est pour ces raisons que l'animal aura une meilleure croissance. Cependant, étant soumises régulièrement à la présence d'antibiotiques, les bactéries de la micro-biocénose développent des résistances à ces molécules.

Ainsi des populations bactériennes comportant de nombreuses souches résistantes aux antibiotiques sont libérées dans les excréments. Le transfert d'agents résistants des animaux aux êtres humains peut aussi se faire par voie de contact direct ou au moyen d'eau ou de nourriture contaminés et permettre le transfert de gènes de résistance aux bactéries chez

l'homme. Les principaux antibiotiques utilisés dans le secteur agroalimentaire sont la tétracycline, les glycopeptides, les quinolones, les streptogramines, les aminosides, les céphalosporines et la streptomycine [1,34-38].

2.3. Utilisation d'antiseptiques et de désinfectants

Les antibactériens, présents dans les savons et les dentifrices et incorporés dans de nombreux produits d'entretien ménager, accroissent la pression sélective de souches bactériennes résistantes à ces agents. Une fois présent, le mécanisme conférant la résistance peut entraîner une résistance croisée à l'égard d'autres antimicrobiens [1,39].

3. Types de résistance

On connaît deux types de résistance, l'une naturelle et l'autre acquise.

3.1. Résistance naturelle ou intrinsèque

La résistance naturelle, également appelée intrinsèque est vérifiée lorsqu'il y a insensibilité de toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien face à un (ou plusieurs) antibiotique(s). Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible.

La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. Il s'agit donc en fait d'une insensibilité naturelle qui ne résulte pas d'une évolution de l'espèce depuis l'apparition des antibiotiques. Elle est stable et est transmise lors de la division cellulaire (transmission verticale), mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) [1,40-42].

Exemples de résistances naturelles :

- *Klebsiella sp.* produit naturellement des β -lactamases. Cette enzyme est alors présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques tels que les pénicillines A avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne.
- Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies [43].

3.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique alors qu'elles étaient sensibles, ce qui implique des changements génétiques. Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est souvent instable et résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie. Ces changements peuvent être de deux types : soit une mutation spontanée, soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme [1].

Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques d'où l'intérêt et la nécessité de réaliser des antibiogrammes [43].

3.2.1. Résistance par mutation chromosomique

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20% des bactéries. Ce phénomène n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte qu'un caractère et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action. C'est un phénomène indépendant ; en effet, l'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques. La probabilité de deux mutations simultanées est donc très faible. L'utilisation d'une association de deux ou de plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. Par exemple, la résistance à la rifampicine et aux quinolones résulte d'une mutation [1,40-43].

3.2.2. Résistance par acquisition de matériel génétique exogène

La résistance bactérienne par acquisition de matériel génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien situé à l'extérieur et sur certains éléments mobiles du chromosome, tels les plasmides. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes. Le transfert d'un seul plasmide augmente aussi le risque d'une résistance à plusieurs antibiotiques. Par exemple, le genre *Shigella* peut transférer un plasmide avec résistance à quatre ou cinq antibiotiques différents.

Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, transduction ou conjugaison [1].

La transformation se passe pendant la croissance de la colonie (phase de compétence) [26]. Elle permet l'acquisition et l'intégration d'ADN libre de l'environnement provenant généralement de cellules lysées. Cet ADN, une fois incorporé à celui de la bactérie, pourra être transmis par la suite. Si des gènes de résistance y sont présents, ils pourront eux aussi être transmis. Ce mécanisme est peu répandu mais il permet un brassage génétique entre des bactéries très différentes [27]. On peut citer à titre d'exemple le gonocoque résistant à la pénicilline [1].

La transduction est un mécanisme de transfert de gènes dont le vecteur est un virus bactérien appelé bactériophage. En se répliquant, le virus intègre son ADN à celui de la bactérie. Lorsqu'il quitte cette dernière, il emporte avec lui cet ADN contenant parfois quelques gènes de résistance. Ce mécanisme permet le transfert d'information génétique entre bactéries appartenant essentiellement à la même espèce [1,27].

La conjugaison est un processus au cours duquel l'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par simple contact de la membrane cellulaire. À l'issue de cette interaction, les deux bactéries possèdent le gène de résistance. Ce mécanisme est le plus fréquent et c'est le principal responsable des transferts horizontaux notamment chez les bactéries pathogènes [1,27].

III. Mécanismes de résistance

Pour s'opposer à l'action des antibiotiques, les bactéries ont développé plusieurs types de mécanismes [44] :

1. Brouillage : production d'enzymes d'inactivation des antibiotiques

Ce mécanisme est basé sur la destruction d'un antibiotique avant même que celui-ci pénètre la cellule. Il se produit via la sécrétion par la bactérie d'une enzyme capable de détruire des liens chimiques nécessaires à l'intégrité fonctionnelle de l'antibiotique. C'est donc une stratégie offensive par laquelle la bactérie inactive l'antibiotique.

Les β -lactamases sont un exemple d'enzymes produites par les bactéries qui inactivent les β -lactamines telles que les pénicillines et les céphalosporines. D'autres catégories

d'enzymes inactivent les aminosides ou d'autres antibiotiques, tels que le chloramphénicol et la fosfomycine [27].

2. Blindage et efflux : imperméabilité à la pénétration de l'antibiotique ou rejet

Le mécanisme de résistance appelé « blindage » consiste pour la bactérie à Gram négatif à modifier le nombre de ses porines existant sur la membrane externe et/ou leur spécificité. Si le nombre de porines diminue, l'antibiotique aura plus de difficultés à entrer dans la cellule. Si les porines deviennent imperméables à certaines substances, cela aura comme effet d'en réduire la pénétration intracellulaire. Il s'agit d'un mécanisme de résistance spécifique aux bactéries à Gram négatif puisque chez les bactéries à Gram positif, l'antibiotique peut circuler librement à travers la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique.

S'il appert que l'antibiotique pénètre une cellule, il existe également un mécanisme qui amène la bactérie à rejeter ce dernier à l'extérieur, l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible. La concentration d'antibiotique demeure insuffisante pour être toxique. On appelle ce mécanisme « efflux actif ». La bactérie réussit cet exploit à l'aide de pompes moléculaires. La tétracycline est un exemple d'antibiotique contrôlé de cette façon [27].

3. Camouflage : modification la structure cellulaire cible

Pour être efficace, un antibiotique doit se fixer à une cible cellulaire. Si la bactérie remplace ou modifie cette cible, l'action de l'antibiotique sera réduite puisqu'il ne pourra plus s'y fixer. Ce type de résistance est retrouvé entre autres vis-à-vis des macrolides [27].

4. Esquive ou stratégie de contournement

Dans cette situation, l'antibiotique atteint sa cible, cependant, la bactérie est capable d'utiliser d'autres voies métaboliques pour exécuter le même travail. Les activités inhibées par l'antibiotique sont donc remplacées. Les bactéries utilisent cette stratégie à l'encontre des sulfamides et des glycopeptides [27].

IV. Impacts de la résistance aux antibiotiques

Les conséquences de la résistance aux antibiotiques peuvent se résumer par l'apparition de souches multirésistantes qui engendrent des complications médicales graves, une augmentation de la durée d'hospitalisation et de la mortalité, et un traitement plus coûteux que celui utilisé en première intention [45].

1. Bactéries multirésistantes

C'est au début des années 1980 qu'on a commencé à évoquer le phénomène de la multirésistance, et ce n'est que quelques années plus tard, qu'une conscience collective s'est installée.

Une bactérie multirésistante est définie comme "*une bactérie qui, du fait de l'accumulation de résistances naturelles ou acquises, n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique*" ou "*une bactérie sensible à moins de 3 familles d'antibiotiques*". La multirésistance peut donc être acquise, mais aussi naturelle, c'est le cas de *Burkholderia cepacia*, ou à un moindre degré *Acinetobacter sp.* [43].

On retrouve maintenant des bactéries qui sont insensibles à plus de 10 antibiotiques différents. Parmi ces microorganismes, on compte *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* et *Escherichia coli* [27].

Ce phénomène ne concernait au début qu'un groupe physiologique limité, ces derniers temps, aucun n'est épargné par ce fléau.

1.1. Bactéries à Gram positif

1.1.1. Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (*MRSA*) est une bactérie capable de causer des infections nosocomiales graves. Il fut isolé pour la première fois en Europe, en 1960. *S. aureus* devient résistant à la méthicilline par l'acquisition d'un gène produisant une modification de la protéine liant la pénicilline (PLP2a). Cette protéine est encodée par le gène *mecA* localisé sur un élément génétique mobile. Elle agit comme transpeptidase, reliant les peptidoglycanes essentiels à la structure membranaire de la cellule bactérienne. Les PLP2a sont différentes des PLP ordinaires par leur très faible affinité pour les antibiotiques possédant un anneau β -lactame. Pour cette raison, les pénicillines, les céphalosporines et autres

β -lactamines ne sont pas actives contre le *MRSA* et une résistance croisée se produit avec la clindamycine, les carbapénèmes, les macrolides et les tétracyclines. La vancomycine devient une alternative possible de première intention. Au cours des dernières années, de nouvelles molécules plus coûteuses et toxiques ont été synthétisées pour la lutte contre le *MRSA*, tels le linézolide, la tigécycline, la daptomycine, le ceftobiprole et la dalbavancine [46,47].

Depuis quelques années, de nouvelles souches de *MRSA* apparaissent en milieu communautaire. Elles se propagent dans la population en bonne santé, où les individus sont en contact physique étroit. Le premier cas a été décrit aux Etats-Unis en 1982 avec une souche peu invasive, résistante aux β -lactamines, mais sensible à d'autres antibiotiques, comme la doxycycline et la clindamycine. Depuis, la fréquence et la gravité de ces infections est en augmentation constante [48,49].

1.1.2. *Streptococcus pneumoniae* multirésistant et *Enterococcus* résistant à la vancomycine

Les infections à *Streptococcus pneumoniae* sont relativement fréquentes et affectent aussi bien l'enfant que l'adulte. Les pneumocoques sont responsables d'infections invasives, principalement la pneumonie bactérienne, la méningite et la septicémie et sont la principale cause d'otite moyenne aigue chez l'enfant [50]. Ce type d'infection représente un enjeu de santé publique important.

La résistance de *S. pneumoniae* à la pénicilline ainsi qu'aux macrolides et aux fluoroquinolones s'accroît de façon significative. Cette bactérie à Gram positif possède, contrairement aux autres streptocoques, une capsule qui est responsable de sa grande virulence. Cette capsule résiste à l'attaque des antibiotiques. Les pneumocoques ont également un grand pouvoir de multiplication [27].

L'entérocoque résistant à la vancomycine (ERV) a fait son apparition dans les années 1990. Les infections à ERV peuvent être dangereuses chez les hôtes fragiles et sont difficiles à traiter en raison des options thérapeutiques limitées. De plus, le potentiel réel de transfert des gènes de résistance de l'ERV vers des espèces virulentes, tel le *Staphylococcus aureus*, en est inquiétant. L'utilisation abusive de la vancomycine est le principal facteur responsable de l'émergence de cette résistance [51].

1.2. Bactéries à Gram négatif

1.2.1. Entérobactéries productrices de BLSE et de β -lactamases de type AmpC

L'un des mécanismes de résistance des bactéries à Gram négatif (BGN) est la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), enzymes qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines ou céphalosporines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes [52]. Le premier isolat producteur de BLSE à transmission plasmidique a été observé en Allemagne en 1983 et rapidement après en Amérique [53]. Les β -lactamases ont tout d'abord été identifiées chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* responsables d'infections nosocomiales puis elles se sont rapidement et facilement transmises aux autres BGN, dont *Escherichia coli* [54,55].

Leur impact est très important, surtout dans les services de réanimation [56]. A la fin des années 1990, la majorité de ces BLSE était dérivée des spectres TEM-1, TEM-2 et SHV-1 par substitution d'un acide aminé. Les TEM et SHV ont été retrouvées dans toutes les espèces d'entérobactéries [57,58]. Des nouvelles familles de BLSE ont depuis été décrites: CTX-M, VEB, GES, etc. [59].

Les résistances de type BLSE se retrouvent souvent associées à des co-résistances aux aminoglycosides, aux tétracyclines, au triméthoprim-sulfaméthoxazole et à la ciprofloxacine [60,61].

Initialement, les céphalosporinases étaient connues comme des enzymes chromosomiques retrouvées chez le *Pseudomonas aeruginosa* et pouvaient être induites par des antibiotiques, comme la céfoxitine, la cefotaxime et la ceftazidime. L'hyperproduction de ces enzymes est associée à une diminution du nombre de porines dans la membrane externe des bactéries. La transmission plasmidique et la promiscuité dans la famille des entérobactéries entraînent des taux très élevés de céphalosporinases chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* mais aussi chez les souches d'*Enterobacter* et de *Citrobacter*.

L'expression de cette céphalosporinase est médiée par le gène *Amp-C*. Plus de 20 lactamases de type *Amp-C* différentes ont été retrouvées. Ceci entraîne une résistance de haut niveau aux lactamines. Seule la sensibilité à la céfépime et aux carbapénèmes est maintenue [62,63].

1.2.2. Bactéries productrices de carbapénèmases

Jusqu'à la fin des années 1990, les carbapénèmases décrites étaient spécifiques d'espèce et de déterminisme chromosomique [64]. La prévalence des souches productrices,

responsables d'infections sporadiques et de quelques petites épidémies, restait alors limitée [65]. De façon plus préoccupante, des carbapénèmases de support plasmidique ont ensuite été décrites : *IMP-1* chez *Pseudomonas aeruginosa*, *OXA-23* chez *Acinetobacter baumannii*, ou *KPC-1* chez *Klebsiella pneumoniae* [66-68]. Ce qui était considéré comme un problème de diffusion clonale est donc devenu un problème plus global de diffusion inter-espèces. En parallèle, le répertoire des carbapénèmases acquises est devenu de plus en plus complexe, du fait des nombreux types de *MBL* (*IMP*, *VIM*, *SPM*, *GIM*, *SIM* et *NDM*), de sérine carbapénèmases de classe A (*KPC*, *GES*, *NMC/IMI* et *SME*) et d'oxacillinases de classe D (*OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-48* et *OXA-58*) décrits. Certaines enzymes se sont diffusées à une vitesse alarmante dans certaines régions, où elles ont atteint de hauts niveaux d'endémicité [65,69].

Des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* producteurs de carbapénèmases peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales graves et difficiles à traiter [70].

1.2.3. Résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones

Parallèlement à la résistance aux β -lactamines, la résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones (FQ) s'est également développée. Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique jusqu'en 1998 où, Martinez et *al.* ont décrit la première souche *Klebsiella pneumoniae* dont le support de la résistance est un plasmide transférable (pMG252). Le déterminant génétique de cette résistance est le gène *qnr* dont la caractéristique est d'être porté par différents types d'intégrons. L'importance de ce support est sa transférabilité et sa capacité à accélérer la diffusion de la résistance aux quinolones. Les gènes *qnr* ont été identifiés chez différentes espèces d'entérobactéries et souvent associés à la production de *BLSE* [71,72].

Durant les dix dernières années, deux nouveaux mécanismes plasmidiques de résistance aux fluoroquinolones ont été décrits. Le premier est apparu chez *Escherichia coli*, il s'agit d'un variant du gène *aac(6')-Ib* qui code, à l'origine, pour une aminoglycoside acétyl-transférase, dénommé AAC(6')-Ib-cr et qui confère une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine et à la norfloxacine par acétylation enzymatique. Pour le second mécanisme, il s'agit du gène *qepA* agissant comme pompe à efflux (*quinolone efflux pump*). Décrit dans un premier temps chez une souche d'*E. coli* isolée au Japon, ce gène a aussi été observé chez une souche de la même espèce en Belgique. Le gène *qepA* augmente jusque à 0.25 $\mu\text{g/ml}$ la CMI

vis-à-vis des fluoroquinolones hydrophiles, dont la norfloxacine et la ciprofloxacine sans modifier les CMI par rapport à d'autres classes d'antibiotiques [73].

Cette résistance est principalement due à une augmentation significative de leur utilisation dans le traitement des pneumonies, des infections urinaires et des infections de la peau [72].

1.3. Autres bactéries résistantes préoccupantes

La recrudescence de la tuberculose causée par des souches de *Mycobacterium* multirésistantes peut retarder le début d'un traitement adéquat et mener le patient à une détérioration rapide de sa condition, à une hospitalisation et parfois à la mort. En 2012, on dénombrait 450 000 nouveaux cas de tuberculose multirésistante, identifiés dans 92 pays, dans toutes les régions du monde.

Des échecs thérapeutiques dus à la résistance aux traitements de dernière intention (céphalosporines de troisième génération) de la gonorrhée (due à *Neisseria gonorrhoeae*) ont été signalés désormais dans 10 pays. Cette résistance est en augmentation partout dans le monde. Les gonococcies non traitables entraîneront des taux accrus de morbidité et de mortalité [1,74,75].

La ciprofloxacine est le seul antibiotique actuellement recommandé par l'OMS (Organisation Mondiale de Santé) pour le traitement de la diarrhée sanglante due à *Shigella* maintenant qu'une résistance généralisée est apparue aux autres antibiotiques précédemment efficaces. Cependant, l'augmentation rapide de la prévalence de la résistance à la ciprofloxacine réduit les options pour un traitement sûr et efficace de la shigellose, en particulier chez l'enfant [26,75].

2. Mortalité

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques représentent un problème majeur de santé publique et conduisent à l'augmentation de la mortalité, de la morbidité et continuent à mettre en danger la vie des patients, surtout en cas d'immunodépression. Dans l'Union européenne, il est estimé que 25 000 patients décèdent chaque année d'infections causées par des germes multirésistants [76]. Aux États-Unis, le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) a estimé à 23 000 le nombre minimum de

décès attribuables à la résistance aux antibiotiques et les infections nosocomiales représentent une des dix causes les plus fréquentes de mortalité dans ce pays [45,77].

3. Coût

Une grosse part du budget de santé alloué par les états est réservée aux antibiotiques. Dans l'Union européenne, il est estimé que le coût annuel que représentent les soins de santé supplémentaires liés à des bactéries résistantes est d'environ 0.9 milliard d'euros [76]. Au Canada, le surcoût annuel engendré par l'hospitalisation des patients infectés par les bactéries résistantes est estimé entre 14 et 26 millions de dollars [45].

4. Prévention et perspectives

La progression des résistances risque de conduire à une augmentation de la létalité due à certaines infections bactériennes et représente donc une menace réelle pour l'avenir. Ce problème est d'autant plus alarmant lorsque qu'on sait qu'aucune nouvelle classe d'antibiotique n'a été commercialisée depuis longtemps. Ceci constitue le point faible de l'antibiothérapie puisque malgré la variété de produits existants, le nombre restreint de cibles cellulaires rend ces molécules vulnérables lorsque des bactéries parviennent à modifier ces cibles pour se protéger [27].

De ce fait, la maîtrise de la résistance bactérienne aux antibiotiques apparaît bien comme un enjeu majeur de santé. Il convient donc d'agir en faisant bon usage des antibiotiques en limitant au maximum leur utilisation, en appliquant des règles d'hygiène rigoureuses et en recherchant de nouvelles molécules douces ayant des propriétés antibactériennes [43].

Chapitre II : Les huiles essentielles

Chapitre II : Les huiles essentielles

Utilisées à toutes époques et par toutes les civilisations, les plantes ont apporté aide et réconfort aux maux les plus divers. Les huiles essentielles extraites de certaines plantes odoriférantes ont prouvé, à ce même titre, leur valeur inestimable pour la santé tant dans le traitement et la prévention des maladies que dans l'aromatisation des aliments et la préservation de l'hygiène générale de la société.

Ces dernières années, on enregistre un regain d'intérêt à ces substances d'origine végétale, poussé par une demande de plus en plus pressante, cosmopolite et généralisée.

I. Définitions

1. Huile essentielle

Une huile essentielle est une essence végétale, volatile et odoriférante, définie comme « *un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques* » [78,79].

Les huiles essentielles se forment chez un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire [80]. Ce sont des mélanges liquides très complexes ayant des propriétés et des modes d'utilisation particuliers [78].

2. Aromathérapie

L'aromathérapie (du latin *aroma* : arôme, et du grec *therapia* : traitement) peut se définir comme une thérapeutique naturelle utilisant les extraits de plantes aromatiques, par voie interne ou externe, pour soigner ou prévenir les maladies [81].

Elle s'intègre dans le cadre de la « phytothérapie » qui, elle, fait appel à toutes les plantes dotées de vertus médicinales [82-84].

II. Histoire

Reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, les huiles essentielles et les plantes aromatiques dont elles dérivent ont été utilisées depuis des millénaires, tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient et par la suite au Nord de l'Afrique et en Europe [85].

Ainsi, en Inde, il y a plus de 7 000 ans, les eaux aromatiques y étaient utilisées pour traiter le corps et l'esprit. Il y a 3 000 ans, le *Rig-Véda* et le *Sushruta Samhita* proposait de nombreuses formules de bains et de massages où figuraient la cannelle, la myrrhe, la cardamome, la coriandre, le gingembre et plusieurs autres plantes aromatiques. En Chine, ces dernières figurent dans un traité publié par Shen Nung il y a environ 4 500 ans. Vers 3 500 ans avant J.-C., le long du fleuve jaune, les bois aromatiques étaient utilisés comme encens. En Mésopotamie, une inscription remontant à plus de 4 000 ans fait mention de l'utilisation d'huiles aromatiques dans le cadre de rites religieux et à Babylone, on faisait brûler du cyprès pour lutter contre les épidémies [86].

C'est en Egypte, entre 3 000 et 2 000 ans avant J.-C. que l'aromathérapie a connu son plus grand développement. A cette époque, on sait qu'une méthode rudimentaire de distillation était utilisée et que les médecins recouraient aux huiles essentielles disponibles pour soigner diverses maladies. Des vins aromatiques étaient également utilisés pour leurs vertus anesthésiques. Les égyptiens ont aussi fait un grand usage des huiles essentielles dans l'embaumement des défunts, particulièrement les huiles de cèdre et de basilic [85,87].

C'est aux perses qu'on attribue l'invention de la distillation proprement dite. Vers l'an 1 000 après J.-C., Avicenne affina la technique et produisit la première huile essentielle pure de rose (*Rosa centifolia*) [85].

Par la suite, les hébreux, les grecs, les romains et les arabes enrichiront l'aromathérapie par leurs contributions respectives comme en font foi les nombreux traités de phytothérapies, livres d'histoire et écrits sacrés. Parmi cette littérature nous pouvons citer : «Histoire naturelle» de Pline, «Les Aphorismes» d'Hippocrate, «Traité des odeurs» de Théophraste et Pédanius. Entre autres, rappelons qu'Hippocrate lutta avec succès contre une épidémie de peste à Athènes en faisant brûler de la lavande, du romarin, de l'hysopé et de la sarriette [85].

Au Moyen-âge et à l'époque des croisades, on rapportait en Europe l'art de la distillation et la tradition alchimique. Par la suite, l'utilisation des huiles essentielles s'étendit aux domaines de la parfumerie et des cosmétiques [87, 88] (Fig.1).



Fig.01. Distillation à l'époque de la Renaissance [89]

Vers la fin du 16^{ème} siècle, plus d'une centaine d'huiles essentielles sont utilisées pour traiter des maux précis. Cependant, ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle qu'on a commencé à étudier sérieusement leurs composantes et leurs activités pharmacologiques [83].

C'est un chimiste français, R.M. Gattefossé qui, en 1928, créa le terme « aromathérapie », pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles, et ce, après que ce pionnier de la parfumerie moderne s'est brûlé les mains lors d'une explosion dans son laboratoire. Il a eu alors, à ce moment, le réflexe de plonger ses mains dans un récipient rempli d'huile essentielle de lavande. Soulagé instantanément, sa plaie se guérit avec une rapidité déconcertante. Etonné par ce résultat, il décide d'étudier les huiles essentielles et leurs propriétés. Il est à juste titre reconnu comme le père de l'aromathérapie moderne. En 1937, il publia son ouvrage « Aromathérapie », dans lequel il décrit ses expériences et ses découvertes en la matière [90].

A la suite de Gattefossé, M^{me} Maury, donna naissance à un courant plus orienté vers la beauté, le bien-être et le prolongement de la jeunesse qui s'implanta fortement en Grande-Bretagne et dans le monde anglo-saxon [91].

Ensuite, Dr. J. Valnet, contribua grandement à populariser l'usage des huiles essentielles dans le milieu médical. Son ouvrage « Aromathérapie », publié dans les années 60, est à l'origine du grand intérêt du public pour les huiles essentielles [92]. Par la suite, les médecins J.C. Lapraz, C. Duraffourd, P. Belaich et de nombreux autres ont mené des travaux approfondis, principalement sur l'activité anti-infectieuse des huiles essentielles [91].

Dans les années 80, une équipe avant-gardiste de médecins, pharmaciens et biologistes, sous l'influence de P. Franchomme, chercheur et du Dr. D. Pénoël, médecin, réalise des études et suscite des recherches de pointe en aromathérapie. La synthèse de ces travaux mènera à la création de la médecine aromatique et à la publication, en 1990, de

« L'aromathérapie exactement », la source de référence par excellence sur l'utilisation médicinale des huiles essentielles [85,91].

Aujourd'hui, nous reconnaissons que les huiles essentielles ont des effets pharmacologiques, psychologiques et physiologiques sur l'homme [93].

III. Matière végétale

La plante doit être une espèce botanique certifiée, conforme aux pharmacopées, saine et de race chimique définie [19].

Les huiles essentielles ne sont pas synthétisées par tous les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales, seulement 10% sont des plantes dites «aromatiques» [94,95]. Celles-ci appartiennent essentiellement aux familles de la classe des conifères de la sous-division des Gymnospermes et aux familles des classes des Monocotyles et des Dicotyles de la sous-division des Angiospermes (annexes 1) [85].

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées. Ces structures peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs : les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rose), les sommités fleuries (tagète, lavande), les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier), les racines (vétiver), les rhizomes (gingembre, curcuma), les fruits (anis, badiane), le bois (bois de rose, santal) ou les graines (ambrette, muscade) [94,96]. Elles peuvent être présentes à la fois dans plusieurs organes [97].

Il existe trois types de structures sécrétrices dans les plantes:

- Les poils glandulaires épidermiques : les plantes possédant ces poils font partie des familles des Lamiacées, des Géraniacées, des Verbénacées, etc.
- Les poches sphériques schizogènes : les glandes de type poche se retrouvent chez des plantes des familles des Astéracées, Hypéricacées, Rosacées, Rubiacées, Rutacées, etc.
- Les canaux glandulaires lysigènes : on retrouve des canaux glandulaires dans tous les bois résineux et en particulier chez les Abiétacées et les Cupressacées; on les retrouve également chez les Apiacées (les fruits), les Dipterocarpacees, les Burséracées et les Anacardiacees [93].

IV. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les techniques d'extraction des huiles essentielles les plus souvent utilisées sont : l'hydrodistillation, la distillation à la vapeur saturée, l'hydrodiffusion, l'expression à froid et l'enfleurage.

1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation (HD) est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une huile essentielle [98]. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau ; l'ensemble est ensuite porté à ébullition et à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées sous forme d'un mélange azéotropique. Bien que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation. Ainsi, l'eau et les molécules volatiles sont séparées par leurs différences de densité, dans l'essencier en une phase aqueuse (hydrolat) et une phase organique surnageante (huile essentielle). La durée d'hydrodistillation varie en fonction de la matière végétale à traiter et peut avoir une influence sur le rendement en huile essentielle et sur sa composition chimique [99].

2. Distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion

Le principe de la distillation à vapeur saturée est analogue à l'hydrodistillation. Toutefois, 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. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau qui traverse le végétal ; ils sont ensuite séparés par décantation du distillat refroidi.

L'hydrodiffusion consiste à faire passer un flux généralement descendant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. Ces techniques sont usuellement employées par les industriels pour la production d'huiles essentielles et d'hydrolats à grande échelle. Les compositions chimiques des produits peuvent être sensiblement différentes en fonction des méthodes utilisées [99,100].

3. Expression ou pressage à froid

Le procédé est utilisé uniquement pour l'obtention des huiles essentielles contenues dans les zestes d'agrumes [101]. Il s'agit d'un processus physique dans lequel les glandes à huile essentielle de la peau du fruit sont percées, broyées ou concassées mécaniquement afin de libérer l'essence. Le procédé classique utilise un courant d'eau et l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation. Cette méthode est économiquement plus rentable que l'hydrodistillation et permet d'éviter d'éventuelles dégradations thermiques [99].

4. Enfleurage

Cette méthode est réservée aux huiles essentielles à forte valeur ajoutée ; elle est notamment utilisée avec les fleurs telles le jasmin ou la tubéreuse qui continuent à produire des métabolites secondaires après la cueillette. Le procédé à froid consiste à absorber le parfum de ces fleurs en utilisant un corps gras à haut pouvoir d'absorption. Pendant la période de récolte (qui dure plusieurs semaines), les pétales de fleurs fraîchement cueillis sont étalés sur de la graisse et remplacés toutes les 24 heures par les pétales de fleurs nouvellement cueillies. Le corps gras, non renouvelé au cours du processus, est saturé en essence florale et l'huile essentielle est ensuite extraite de la graisse par de l'éthanol [99,102].

V. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges variés de composants aromatiques ayant des propriétés communes.

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles ce qui les différencie des huiles fixes. Elles sont très odorantes et ne sont que rarement colorées, la gamme de couleur s'étalant le plus souvent du jaune au vert. Elles sont sensibles à l'oxydation et change de couleur.

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée.

Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles. Bien qu'entraînable par la vapeur, elles sont très peu solubles dans l'eau. Toutefois elles le sont suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette, on parle alors d'eau aromatique [78].

VI. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpènes, prépondérant dans la plupart des essences et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, moins fréquent [103,104].

1. Terpènes

Le terme terpène est attribué à A. Kékule, chimiste allemand qui l'inventa pour décrire les hydrocarbures présents dans les huiles essentielles de distillation (*turpentin* en allemand). Ce terme a acquis, au long des années, une signification générique et est utilisé pour désigner les produits secondaires de condensation des unités isoprènes.

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, notamment les mono et les sesquiterpènes [94].

1.1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes, ils sont largement distribués dans les règnes animal et végétal. Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle notamment chez les *citrus* [105]. Ils comportent 10 atomes de carbones soit de 2 unités isoprènes. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales : alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers et peroxydes [94].

1.2. Sesquiterpènes

Ce sont des molécules en C₁₅ constituées de 3 unités isoprènes. Les variations structurales dans ce groupe sont de même nature que celles dans le cas précédent ; carbures, alcools, cétones étant les plus fréquents. Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divise en plusieurs catégories structurelles ; acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques, ainsi une centaine de squelettes ont été décrits [94].

2. Composés aromatiques

Ce sont des dérivés du phénylpropane qui eux aussi existent sous différentes formes moléculaires fonctionnalisées. Cette classe comporte des composés odorants bien connus

comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'*Apiaceae* (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc. [94,104].

3. Notion de chémotype

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce ; ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes, mot dérivé de chimiotype ou chimiovariété [93]. Ces chémotypes trouvent leur origine dans de légères différences des voies de biosynthèse, aboutissant à l'accumulation de métabolites secondaires différents [106]. Cette variation peut être due à des facteurs exogènes comme l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, l'altitude, etc. ou à des facteurs endogènes, telle que la composition génétique des spécimens [93].

VII. Intérêts éco-biologique, thérapeutique et économique des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. Elles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales, végétale-animales et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs [94,107]. En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les prédateurs tels que les insectes, les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, allopathiques dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles [108-112].

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées contre les maladies infectieuses d'origines bactérienne, fongique et virale [113-115]. Elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre [116].

Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phyto-pathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires [117]. Traditionnellement, les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de nombreux produits finis destinés aux consommateurs pour aromatiser la

nourriture (gâteaux, biscuits, soupes, sauces, chewing-gums, chocolats, bonbons, etc.). Elles sont également utilisées dans l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. On les utilise aussi dans la fabrication des adhésifs (colle, scotch, etc.), celle de la nourriture pour animaux et dans la préparation des sprays insecticides, etc. [118-121].

VIII. Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique et souvent de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais 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 [5].

IX. Modes d'administration, absorption et excrétion des huiles essentielles

Il existe différents modes d'administration des huiles essentielles : l'usage interne regroupant l'ingestion, l'inhalation et la voie rectale, l'usage externe par application cutanée ou dans les bains et la diffusion atmosphérique.

La majorité des huiles essentielles sont absorbées par les muqueuses et au travers des différentes couches cutanées, ensuite elles diffusent dans la microcirculation périphérique avant de se retrouver dans la circulation sanguine générale pour exercer leur action thérapeutique.

Elles sont excrétées soit sans modification chimique soit sous forme de métabolites hépatiques. Les voies d'excrétions des huiles essentielles sont les poumons, la peau, les urines et les selles [122].

X. Toxicité et pouvoir allergisant des huiles essentielles

Les précautions d'emploi concernant l'utilisation et la posologie des huiles essentielles suivant l'âge et le poids ne sont bien souvent pas précisées. On dispose de peu de publications concernant la toxicité des huiles et leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérogènes. Les effets indésirables connus portent sur les systèmes ophtalmologique, cutané, muqueux, digestif, cardiovasculaire, pulmonaire, rénal et neurologique.

On connaît mieux le risque de toxicité aigüe lié à une ingestion, se manifestant par une sensation de brûlure, cependant à fortes doses, des symptômes de type pyrosis, nausées, vomissements, diarrhées, brûlures épigastriques et même une réactivation d'ulcère gastroduodéal ont été rapportés [94].

Par ailleurs, on rapporte une sensibilisation pour toutes les huiles essentielles plus ou moins prononcée en fonction de l'espèce et plus particulièrement pour l'eugénol, la camomille, la cannelle, la menthe poivrée, la baie de girofle et l'essence de térébenthine

Les premiers travaux sur les allergies aux terpènes ont été entrepris dans les années 1950 pour essayer de comprendre l'origine des allergies à l'essence de térébenthine, largement employée à l'époque comme solvant dans les peintures et vernis. Ces études ont permis de mettre en évidence le fait que les molécules allergisantes n'étaient pas les terpènes eux-mêmes mais des produits d'oxydation à l'air [123]. En effet, comme beaucoup de molécules, les terpènes réagissent lentement avec l'oxygène de l'air pour former de nouveaux composés : les hydroperoxydes. Ce processus d'oxydation encore appelé « autoxydation » conduit à la formation d'hydroperoxydes en positions allyliques et les terpènes comportant beaucoup de doubles liaisons, on comprend aisément qu'ils soient particulièrement sensibles à ce type de réaction. Ainsi dans le cas de l'essence de térébenthine, plusieurs hydroperoxydes dérivés du D3-carène par autoxydation ont été mis en évidence. Ces hydroperoxydes allyliques peuvent ensuite donner lieu à des réarrangements radicalaires avec les doubles liaisons pour former des espèces très réactives qui peuvent interagir avec les acides aminés des protéines. Depuis ces études, le rôle des hydroperoxydes et produits d'oxydation dans le potentiel allergisant des terpènes a pu être confirmé par différents groupes.

Ainsi, A.T. Karlberg *et al.* ont montré que le limonène, molécule présente dans pratiquement tous les extraits végétaux et donc dans les parfums, formait par oxydation à l'air plusieurs produits d'oxydation sensibilisants capables d'éliciter une réaction épicutanée positive chez 3% des sujets testés [108, 124,125].

Chapitre III : Pelargonium graveolens

Chapitre III : *Pelargonium graveolens*

Pelargonium graveolens L'Hér. appartient à la famille des *Geraniaceae*. Cette plante vivace porte différentes dénominations dont Géranium rosat, Géranium odorant, *Pelargonium x asperum* Ehrh. Ex Willd, *Pelargonium roseum* Ehrh.

Son nom vient du grec *Pelargos*, qui signifie cigogne pour la ressemblance de son fruit à un bec de cigogne [21,126,127].

I. Histoire

Le *Pelargonium graveolens* provient du Cap de Bonne Esperance en Afrique du Sud. Il a été introduit en Europe à la fin du 17^{ème} siècle dans les jardins botaniques [128].

Au milieu du 19^{ème} siècle, la véritable Rose du Levant (*Rosa damascena* Mill.) devenant rare et le prix de son huile essentielle très élevé, contraignit les parfumeurs de l'époque de rechercher de nouvelles sources d'essences à odeur de rose, d'où les essais de culture de Géranium rosat par Demerson et les premières plantations dans la région de Grasse en France pour la production d'huile essentielle. Cependant, la culture s'accommodait mal aux contraintes climatiques et économiques du Sud de la France. Très rapidement, de nouvelles plantations furent développées en Algérie et à la Réunion [129].

Dès le début du 20^{ème} siècle, la culture du Géranium rosat est apparue dans d'autres régions : Corse (France), Italie, Espagne, Portugal, Maroc, Tunisie, Egypte, Russie, Comores, Afrique du Sud, Congo, Inde, Brésil, Chine [130].

- ***Pelargonium graveolens* en Algérie**

L'introduction de *Pelargonium graveolens* en Algérie remonte aux années 1850, les premiers plants végétaux proviennent de France. Des essais ont d'abord été entrepris à Chéraga, dans la Wilaya d'Alger et donnèrent tout de suite des résultats encourageants. A cette époque, le prix des essences était fort élevé. L'essence de Géranium se vendait à 250 francs le kilogramme [126].

En 1880 A. Chiris fonde à Blida et Boufarik, de très grandes plantations et une usine (à Boufarik) sous la direction de Gros et Monk [130,131].

Les cultures se développèrent un peu partout en Algérie (1964ha rien qu'à Alger) jusqu'au jour où de nouvelles découvertes scientifiques permirent de fabriquer artificiellement

et à des prix extrêmement bas tous les parfums. Par suite de cette nouvelle concurrence, le prix de l'essence de Géranium était descendu en 1908 à 18 francs le kilogramme. A ce moment, une crise se fit sentir et de nombreuses plantations furent abandonnées. Cependant, une dizaine d'années plus tard il n'en était plus de même ; il a été constaté que les essences artificielles ne pouvaient pas remplacer les essences naturelles et la grande vogue est revenue aux produits naturels. Les cours atteints par l'essence de Géranium rosat valaient 300 francs à cette époque [126].

Dans les années 1960, beaucoup de ces plantations ont été abandonnées suite à la guerre de l'indépendance. Néanmoins, la région de Blida est restée et jusqu'à ce jour, un site résiduel de production de *Pelargonium graveolens*. On retrouve également cette plante dans les jardins, les balcons et les cimetières.

II. Position systématique

Différentes tentatives de classification furent faites : Dillenius (1721), Burmann (1738-1759), Linné (1753). Jusqu'en 1778, Louis l'Héritier de Brutelle a séparé définitivement les genres *Geranium* et *Pelargonium* [130].

Les principaux genres de la famille des *Geraniaceae* sont résumés dans tableau 2 ci-dessous.

Tab.02. Classification de *Pelargonium graveolens* [129]

| Famille | Genre | Espèce |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>Geraniaceae</i> | <i>Erodium</i> | - |
| | <i>Geranium</i> | - |
| | <i>Monsonia</i> | - |
| | <i>Sarcocaulon</i> | - |
| | <i>Pelargonium</i> | <i>P. graveolens</i> |
| | | <i>P. capitatum</i> |
| | <i>P. radens</i> | |
| | <i>P. vitifolium</i> | |

- **Position systématique :**

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Geraniales*

Famille : *Geraniaceae*

Genre : *Pelargonium*

Espèce : *Pelargonium graveolens* L'Hér. [127]

III. Caractérisation botanique

1. Morphologie

Sous arbrisseau à port érigé, très ramifiant formant une touffe arrondie. Il peut atteindre jusqu'à 1m30 de hauteur et 1 mètre de diamètre [127, 130,132]. Les tiges sont vertes et tendres, elles se lignifient et deviennent plus foncées avec l'âge. Les feuilles sont opposées, persistantes, odorantes, douces et découpées en 5 à 7 lobes (Fig.02). L'inflorescence est terminale et constituée de 3 à 10 semi-ombelles de couleur rose. Ses fleurs roses, à cinq pétales sont souvent veinées d'une coloration plus foncée [133-135].



Fig.02. Culture de *Pelargonium graveolens* (Blida, 2011)

2. Mode de culture

2.1. Milieu naturel

Les conditions climatiques ont une forte influence sur le développement du G éranium rosat qui demande un climat chaud, sec et sans vent nuisible [130]. La température doit rester supérieure ou égale à 3/5°C. Des précipitations de l'ordre de 1 000 à 1 500 mm d'eau par an sont recommandées. Les faibles gelées sont à craindre d'autant que les plants sont plus jeunes. Idéalement, le G éranium croît dans des conditions climatiques et édaphiques ni trop humides, ni trop sèches. En effet, des conditions trop humides sont favorables au développement de la rouille capable de détruire une plantation en quelques jours. En revanche, des conditions trop sèches entraînent un retard de croissance [136].

Le Géranium rosat n'est guère exigeant au point de vue du sol ; toutefois, il prospère particulièrement bien dans les terres légères, fertiles, fraîches, saines, silico-argileuses, perméables, présentant une certaine richesse en calcaire et bien pourvues en humus [130,137].

2.2. Multiplication et culture

Pelargonium graveolens est propagé par bouturage, soit au printemps, ou en fin d'été [130]. Les boutures sont prélevées sur les tiges, elles mesurent 25 à 30 cm de longueur, elles sont coupées avec un greffoir bien tranchant, de manière à avoir des sections bien nettes favorisant l'enracinement. Le repiquage se fait à 0 cm de distance sur plate-bande fertile, ombragée et arrosée journallement. Un bon mois après le bouturage on peut procéder à la mise en place des boutures qui se fait en lignes distantes de 60 à 80 cm, suivant la richesse du sol et à 25 à 40 cm, sur les lignes [137].

2.3. Récolte

En Algérie, les plantations durent plusieurs années et donnent trois coupes par an, la première au mois de Mai, lorsque les tiges portent trois ou quatre fleurs. Les autres à un ou deux mois d'intervalle.

Les tiges subissent le minimum de manipulations pour éviter un détachement des feuilles qui contiennent la plus grande quantité de l'huile essentielle ; elles sont coupées soit au sécateur, soit à la faucille et transportées dans des chariots au lieu de distillation [126].

Il résulte des essais qui ont été pratiqués, que la coupe de 200 kg de Géranium exempt de racine fournit 78.9 kg de feuilles et 113.3 kg de tiges et pétioles [126].

Les rendements annuels en feuillage de *Pelargonium graveolens* à l'Ile de la Réunion sont de 15 à 30 t/ha, la moyenne étant de 18 t/ha. En Inde le rendement moyen est de 6 à 10 t/ha et peut parfois atteindre 20 t/ha [138].

Les prix de revient sont très variables selon la richesse du sol, le mode de culture, les engrais, l'irrigation et selon la taille des tiges coupées [130].

IV. Maladies et ravageurs

Chez *Pelargonium graveolens*, les maladies causent en général plus de dégâts que les ravageurs. Les plus dommageables sont les maladies foliaires comme l'antracnose (*Glomerella*, *Gloeosporium* et *Colletotrichum sp.*), les taches foliaires (*Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium sp.*) et la rouille (*Puccinia pelargonii-zonalis*). Les

pourritures de racines et de tiges peuvent engendrer des dégâts sévères dans de nouvelles plantations, mais peuvent être contrôlées par l'immersion des boutures dans une solution fongicide avant la plantation. Des plantes établies peuvent être infectées lorsque l'humidité du sol est importante ou pendant des périodes de forte humidité de l'air. Des agents causaux fréquemment cités comprennent *Xanthomonas pelargonii* qui entraîne la pourriture noire, *Pythium sp.* qui entraîne la pourriture des racines et *Sclerotinia sp.* qui engendre la pourriture des tiges et des racines. L'application d'un fongicide sur la ligne de plantation après la récolte peut souvent prévenir une attaque. La résistance à certaines maladies a été mise en évidence dans des sélections indiennes et chez certains cultivars ornementaux. Plusieurs virus pathogènes ont été isolés chez *Pelargonium*, seules donc des boutures indemnes de virus doivent être utilisées pour la multiplication. Des dégâts dus aux nématodes ont été observés mais ceux-ci ne semblent provoquer que peu de dégâts, probablement en raison des propriétés nématicides de l'huile de Géranium. Les plantes de *Pelargonium* cultivées pour leur huile essentielle sont beaucoup moins affectées par les insectes que les cultivars ornementaux.

Un grand nombre d'insectes ont été répertoriés, y compris des pucerons, chenilles, myridés, cochenilles, mouches blanches, mais l'emploi d'insecticides est rarement justifié, notamment à cause du fait que les résidus d'un grand nombre de ces produits peuvent dégrader la qualité de l'huile [138].

V. Huile essentielle de *Pelargonium graveolens*

Lors de la première année de la cueillette de Géranium rosat, son rendement en HE n'est souvent que de 10kg d'essence/ha, mais pouvant s'élever jusqu'à 25 ou 30kg les années suivantes si la plantation est bien entretenue [126].

Pendant longtemps, le principal producteur d'huile de Géranium était la Réunion et son HE fixe toujours le standard face auquel les huiles d'autres origines sont appréciées. La Chine est devenue aujourd'hui le principal producteur. Les autres grands producteurs sont l'Egypte, le Maroc, la Réunion, l'Inde et l'ex Union Soviétique.

La production annuelle mondiale est d'environ 300 t, alors que la demande est estimée à 500 t. Les principaux importateurs sont les Etats-Unis, l'Europe et le Japon. La production de l'Inde et des pays de l'ex Union Soviétique est utilisée entièrement sur place [138].

1. Propriétés physiques et composition chimique

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* est liquide à température et à pression ambiantes. Elle est de couleur allant du jaune clair au vert jaunâtre et elle est vert brunâtre pour celle de type Bourbon. Son odeur est rosée citronnée, caractéristique de la plante [139].

Les paramètres physiques de cette HE selon la norme ISO 4731 sont résumés sur le tableau 3 ci-dessous :

Tab.03. Paramètres physiques de l'HE de Géranium [139]

| | Afrique du Nord | Bourbon | Chine | Madagascar |
|-----------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| Densité | 0.885-0.905 | 0.885-0.897 | 0.882-0.899 | 0.887-0.897 |
| Indice de réfraction | 1.461-1.475 | 1.460-1.470 | 1.460-1.472 | 1.462-1.471 |
| Pouvoir rotatoire | -14°/ -8° | -17°/ -9° | -14°/ -7° | -17°/ -9° |

Elle est miscible à l'éthanol. Il n'est pas nécessaire d'utiliser plus de 3 volumes de cet alcool à 70° avec un volume d'HE pour obtenir une solution claire [139].

La composition chimique de l'huile essentielle du Géranium rosat est complexe. Parmi ses composants les plus importants on trouve le géranol et le citronellol dont la synergie confère une fragrance aromatique unique [140,141].

Le profil chromatographique des HEs de Géranium de différentes origines (Afrique du Nord, la Réunion, de Chine et Madagascar), cité par la norme ISO 4731, est détaillé dans le tableau 4 ci-dessous avec un intervalle en pourcentage de quantité de chaque composé.

Tab.04. Profil chromatographique de l'HE de Géranium [139]

| | Afrique du Nord | Bourbon | Chine | Madagascar |
|--------------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| cis-Oxyde de rose | 0.7 – 1.5 | 0.3 – 1.1 | 1.3 – 3.5 | 0.4 – 1.4 |
| trans-Oxyde de rose | 0.3 – 0.6 | 0.1 – 0.5 | 0.5 – 1.5 | 0.1 – 0.6 |
| Menthone | < 2.1 | < 2.0 | < 2.5 | < 2.0 |
| Isomenthone | 4.0 – 8.0 | 5.0 – 10.0 | 4.0 – 7.0 | 5.0 – 10.0 |
| Linalol | 4.0 – 8.5 | 8.0 – 11.0 | 2.0 – 4.5 | 4.0- 10.0 |
| Guaiadiène-6,9 | < 0.5 | 5.0 – 8.5 | 4.0 – 7.0 | 5.0 - 9.0 |
| Formiate de citronellyle | 5.0 – 8.0 | 6.5 – 11.0 | 7.0 – 12.0 | 6.5 – 11.0 |
| α-Terpinéol | 0.3 – 0.6 | 0.3 – 1.2 | 0.1 – 0.5 | 0.3 – 1.0 |
| Formiate de géranyle | 2.0 – 7.0 | 4.0 – 8.0 | 1.0 – 3.0 | 3.8 – 7.0 |
| Citronellol | 25.0 – 36.0 | 18.0 – 26.0 | 32.0 – 43.0 | 18.0 – 26.0 |
| Géranol | 10.0 – 18.0 | 12.0 – 20.0 | 5.0 – 12.0 | 10.0 – 20.0 |
| Butyrate de géranyle | 0.7 – 2.0 | 0.7- 2.0 | 0.4 – 1.0 | 0.7 – 1.7 |
| 10-épi-γ-Eudesmol | 3.0 – 6.0 | nd | nd | nd |
| Tiglate de géranyle | 0.9 – 2.0 | 0.7 – 2.0 | 1.0 – 1.6 | 0.7 – 2.0 |
| Tiglate de phénylethyle | 0.5 – 1.2 | 0.4 – 1.0 | 0.4 – 1.0 | 0.4 – 1.0 |

nd: non détecté

La relative instabilité des molécules constituant l'huile essentielle de Géranium rend sa conservation difficile. Les possibilités de dégradations sont nombreuses par photodégradation, thermolyse ou encore par oxydation.

2. Domaines d'utilisations

2.1. Parfumerie et cosmétiques

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* est depuis la moitié du 19^{ème} siècle une importante matière première de qualité pour l'industrie de la parfumerie. Ses propriétés cutanées ainsi que son odeur suave, puissante et rappelant la rose lui valent une place non négligeable dans nombre de parfums, crèmes et produits cosmétiques [140].

Les notes olfactives sont influencées par l'origine géographique de la plante. Le Géranium de Grasse possède une odeur rosée, particulièrement fine, tenace, suave et forte, très voisine de celle de l'huile essentielle de rose. L'odeur du Géranium de la Réunion est rosée de feuille, aux accents de menthe poivrée, tandis que celle d'Afrique est plus légère, un peu moins menthée avec une puissante note de rose.

Quelques parfums connus renferment du Géranium rosat, on cite : Brut (Fabergé), Déclaration (Cartier), Miss Dior (Dior), Calèche (Hermès) et Habit rouge (Guerlain) [130].

2.2. Médecine traditionnelle et aromathérapie

L'huile essentielle de Géranium rosat est utilisée en aromathérapie par voie interne et externe ou encore par diffusion et vaporisation [23].

De nombreuses études ont démontré que grâce à sa composition chimique variée et sa richesse en alcools terpéniques, l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* possède une multitude de propriétés thérapeutiques. On cite ses effets antioxydants, antifongiques antibactériens spécialement contre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Proteus vulgaris* et *Bacillus cereus*, antiparasitaires, répulsive vis à vis des insectes, spasmolytiques, hémostatiques, cicatrisants et anti-inflammatoires [13,23, 127,142-146].

2.3. Agroalimentaire

Les HEs de Géranium de Bourbon, d'Algérie et du Maroc ont été reconnues GRAS par la FEMA (*Flavor and Extract Manufacturers Association*) et approuvées par la FDA pour l'usage alimentaire.

Cette HE est également enregistrée par le Conseil de l'Europe dans la liste des épices et des condiments jugés acceptables pour usage alimentaire avec une éventuelle limitation du principe actif dans le produit final [22, 138].

3. Toxicité et pouvoir allergisant

Le *Pelargonium graveolens* n'est pas classé comme plante toxique. Une sensibilisation évoluant vers une véritable allergie est possible. Les réactions allergiques à cette plante sont néanmoins rares. Une étude danoise réalisée sur 253 jardiniers et travailleurs exposés à la plante n'a retrouvé que 7 tests cutanés positifs témoignant de phénomènes allergiques soit moins de 3% sur une population non représentative de la population générale puisqu'exposés à la plante régulièrement dans le cadre de leurs activités professionnelles [147].

On dispose de peu d'informations concernant la toxicité de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*. Aucune étude publiée ne rapporte de cas d'intoxication par ingestion de ce produit [148]. Les cas répertoriés concernent exclusivement des affections bénignes de nature dermatologique : Une irritation cutanée, fissuration et assèchement [149,150].

Néanmoins, deux cas d'empoisonnement ont été répertoriés chez des enfants après ingestion d'huile essentielle de citronnelle (*Cymbopogon winterianus*) dont la composition chimique est proche de celle de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* avec la présence de citronellol (10 à 35%) et de géraniol (18 à 21%) [151].

VI. Travaux récents sur *Pelargonium graveolens*

A.M. Džamić et *al.* ont étudié la composition chimique, l'activité antifongique et antioxydante de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*. Le profil de cette HE a été déterminé par chromatographie gazeuse et chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les principaux composés sont le citronellol (24.54%), le géraniol (15.33%), le formiate de citronellyle (10.66%) et le linalol (9.80%). Les résultats de cette étude montrent que l'huile essentielle possède une bonne activité antifongique avec des concentrations minimales fongicides allant de 0.25 à 2.5 mg/ml. Les champignons les plus résistants sont *Mucor mucedo* et *Aspergillus*. L'huile essentielle possède une activité antioxydante dose-dépendante. Les auteurs ont conclu que les propriétés de l'HE de Géranium justifient son utilisation contre de nombreux problèmes de santé et valident son exploitation commerciale dans de nombreuses branches de l'industrie [152].

M. Boukhris et *al.* ont étudié les caractéristiques biologiques et anatomiques de *Géranium rosat* cultivé dans le Sud de la Tunisie. Ils ont rapporté que le *Géranium* fait partie des plantes les plus cultivées dans les jardins tunisiens comme espèces ornementales. Mais même s'il est bien connu pour ses arômes et son huile essentielle aux vertus exceptionnelles, il est encore inconnu à l'échelle de ses caractéristiques biologiques et anatomiques. Les examens anatomiques ont montré que malgré une densité des stomates particulièrement élevée sur la face inférieure des feuilles (42.13 st/mm²), elle était beaucoup plus faible au niveau du pétiole (6.36 st/mm²). En outre, les observations microscopiques ont montré que la plante est recouverte de deux types de poils avec une supériorité remarquable au niveau des tiges. Les résultats de l'analyse de la feuille ont également montré que la teneur en chlorophylle a est supérieure à celle de la chlorophylle b.

Les auteurs soulignent que comme cette espèce s'est bien développée dans la zone polluée de Sfax (Tunisie), une étude plus détaillée visant à déterminer ses mécanismes physiologiques, biochimiques et anatomiques de résistance aux conditions de l'environnement rude devrait être menée à l'avenir [153].

S. Omar S. Hassane et *al.* ont étudié l'activité antifongique contre la pourriture du bois de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* des îles Comores dont les principaux composés sont le citronellol (29.98%) et le géraniol (14.12%). Les résultats ont montré que l'essence étudiée présente une très forte activité fongicide contre les champignons testés (*Gloeophyllum trabeum*, *Coriolus Versicolor*, *Poria placenta* et *Coniophora puteana*), à des concentrations très faibles. Il a alors été proposé que cette HE puisse être un très bon produit naturel contre les champignons lignivores dont le rôle est très important dans la détérioration du bois et très redoutés par les industries du bois [13].

A. Ben Hsouna et N. Hamdi ont étudié la composition chimique et les activités antimicrobiennes de l'huile essentielle et des extraits organiques de *Pelargonium graveolens* originaire de Tunisie. Ainsi, 42 composants chimiques ont été identifiés, parmi ceux majoritaires, il y a : le citronellol (27.53%), le géraniol (25.85%), le formiate de citronellyle (8.75%) et le linalol (6.54%). L'huile essentielle et les extraits organiques présentent un effet antimicrobien prometteur contre les bactéries et les champignons testés avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 12 à 34 mm et les valeurs des concentrations minimales inhibitrices de 0.039 à 10 mg/ml. Les auteurs ont conclu que cette HE peut être utilisée comme produit antimicrobien naturel pour le traitement de nombreuses maladies infectieuses [154].

M.N. Boukhatem *et al.* ont axé leur étude sur l'extraction, la composition et les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium rosat cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). L'extraction par hydrodistillation réalisée juste après la floraison a donné un rendement de 0.2%. Les résultats des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle sont en accord avec ceux des normes AFNOR. L'analyse de sa composition chimique par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis de classer cette huile en « chémotype citronellol cultivar Chine » reconnue pour sa richesse en citronellol, formate de citronellyle et géraniol avec, respectivement, des taux de 33.2, 10.5 et 5.4%. Les auteurs ont conclu que de part son profil chromatographique, cette huile essentielle possède des propriétés organoleptiques très appréciées en parfumerie, tendant à la rendre convoitée en aromathérapie [155].

R.S. Verma *et al.* ont étudié les variations de la composition de l'huile essentielle de Géranium rosat en fonction de la date de la plantation de cette espèce dans l'Uttarakhand en Inde. Les cultures ont été plantées en différents mois : Décembre, Janvier, Février, Mars et Avril. L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation et analysée par chromatographie en phase gazeuse. Les composants principaux de l'huile sont le citronellol (21.3-28.7%), le géraniol (23.1-38.4%), le linalol (4.7-5.6%), l'isomenthone (6.5-7.9%), le formiate de citronellyle (6.3-8.3%), 10-épi- γ -eudesmol (4.7-5.6%) et géranyle formate (3.3 à 4.3%). Les résultats indiquent que les composants d'huile essentielle ont été affectés de manière significative par la période de plantation. Le rapport citronellol / géraniol (C:G), qui représente le facteur de qualité de l'HE varie de 0.55 à 1.16 ce qui est bien dans la limite souhaitée. Néanmoins, l'huile ayant le meilleur ratio C:G est celle obtenue à partir de cultures plantées en Janvier (0.99) et en Février (0.92), ce qui prouve l'effet de la période de plantation sur la qualité de l'HE.

Il a été conclu que cette étude pourrait être étendue sur d'autres cultures de Géranium afin de standardiser le temps de plantation / la durée de culture comme un indicateur de rapport C:G et donc d'améliorer la qualité de l'huile de Géranium [156].

PARTIE II

Etude expérimentale

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

L'efficacité de plus en plus prouvée des huiles essentielles comme biocides vis-à-vis des bactéries et la carence en nouvelles molécules antibactériennes nous a encouragé à proposer une étude sur une plante médicinale et aromatique, abondante, mais très peu étudiée et par conséquent non valorisée en Algérie : *Pelargonium graveolens* L'Hér., communément appelée le Géranium rosat.

La présente étude se propose de déterminer *in vitro* qualitativement et quantitativement l'effet antibactérien de l'huile essentielle de la plante sus-citée sur 150 souches bactériennes isolées de prélèvements effectués chez l'homme et responsables d'infections.

Les souches ont été collectées auprès de laboratoires d'analyses médicales à Annaba et à Alger sur une durée de quatorze mois (Mars 2011-Avril 2012). On y trouve 80 *Enterobacteriaceae*, 10 *Acinetobacter baumannii*, 10 *Pseudomonas aeruginosa*, 30 *Staphylococcus sp.* 10 *Streptococcus agalactiae* et 10 *Enterococcus faecalis*. Elles sont résistantes à au moins trois antibiotiques et par conséquent considérées comme multirésistantes.

La plante a été cueillie à Blida. Les travaux de la partie botanique ont été réalisés au niveau du Laboratoire de biologie végétale du Département de pharmacie de la Faculté de médecine- Université Badji Mokhtar- Annaba (UBMA).

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* a été extraite au laboratoire d'électrochimie-corrosion à l'Ecole Militaire Polytechnique (EMP) d'Alger et sa composition chimique a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au laboratoire de chimie macromoléculaire de la même école.

L'activité antibactérienne ainsi que tous les examens bactériologiques ont été réalisés au niveau du Laboratoire de microbiologie du Département de pharmacie de la Faculté de médecine- UBMA.

Durant notre étude, deux aspects de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* nous ont parus intéressants à explorer. Le premier étant son pouvoir conservateur en l'utilisant comme additif alimentaire dans un produit à haut risque de contamination bactérienne et de large consommation et le second étant son effet antiseptique en l'utilisant comme produit d'hygiène par son incorporation dans un savon.

Ce travail s'inscrit dans la perspective de la valorisation des huiles essentielles de l'Algérie en vue de leur utilisation en agroalimentaire, en médecine et dans l'hygiène du quotidien.

I. Enquête ethnobotanique

La fiche d'enquête (annexes 2) a été établie sous forme de questionnaire dans le but de déterminer la place de *Pelargonium graveolens* dans notre patrimoine culturel et en vue de rassembler le maximum d'informations sur son utilisation populaire.

L'enquête a été réalisée durant une période de deux ans et demi, du 20 Janvier 2011 au 19 Juin 2013. Lors de l'enquête, le questionnaire a été accompagné par une photo de la plante (Fig.03).



Fig.03. *Géranium rosat* (Photo; Blida, 2011)

1. Enquêtés

L'enquête a été menée auprès de 536 personnes de plus de 18 ans, appartenant aux deux sexes au niveau de deux grandes villes du nord algérien : Annaba et Alger. Les enquêtés ont été choisis de manière aléatoire. Ils appartiennent à quatre catégories d'âge et à différentes couches socio-économiques et intellectuelles.

2. Enquête

Le questionnaire a porté sur les utilisations thérapeutiques du Géranium rosat, le nom local, la ou les parties utilisée(s), les méthodes de récolte, les recettes, les modes d'administration, les effets secondaires, etc.

II. Matériel végétal

Notre étude porte sur l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat). Cette plante odorante, annuelle et qui s'adapte très bien au climat méditerranéen, est facilement cultivable. Cependant, elle est peu connue et très mal exploitée en Algérie, et ce, en dépit de son abondance et de toutes ses vertus culinaires, médicinales et aromatiques.

1. Zone d'échantillonnage

La plaine de Mitidja a été choisie comme zone d'échantillonnage pour l'abondance de la plante dans cette région. En effet, cette plante originaire du Cap (Afrique du Sud) fut introduite en Algérie et plus précisément dans cette zone au 19^{ème} siècle pour la fertilité de son sol, son climat favorable et sa situation stratégique (proximité du marché potentiel que représentent la capitale et les autres villes avoisinantes, facilité de transport de la marchandise grâce au réseau routier qui l'entoure, etc.). Elle a acquis des proportions très importantes durant cette période [126]. Aujourd'hui, sa culture pratiquée sur de petites parcelles dans des conditions de production difficiles est menacée d'abandon malgré les immenses opportunités qu'elle offrait autrefois, à savoir, sa notoriété sur le marché mondial, son cycle de production rapide, etc. [155].

1.1. Position géographique

Les échantillons de *Pelargonium graveolens* ont été récoltés dans la région Nord algérienne, à Blida, à la commune de *Chiffa* (Daïra de Mouzaïa) (Fig.04)

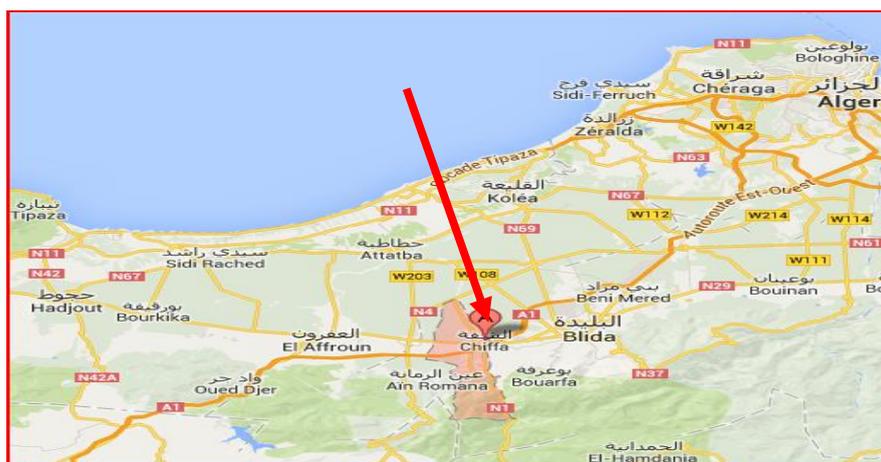


Fig.04. Zone de l'échantillonnage [Google Maps, 2014]

Située à environ 55 km au Sud Ouest d'Alger, à 36°24'00'' de latitude Nord et de 2°46'00'' de longitude Est en DMS (degrés, minutes, secondes) ou de 36.4 de latitude et de 2.76667 de longitude en degrés décimaux [Google Maps, 2014].

Elle est limitée au Nord par les wilayas d'Alger et Tipaza, à l'Ouest par la Wilaya de Ain Defla, au Sud par la Wilaya de Médéa et à l'Est par les Wilayas de Bouira et de Boumerdés.

1.2. Conditions climatiques

Le climat est de type méditerranéen avec une influence continentale, surtout en été (vent du Sud : sirocco). C'est un climat de latitude moyenne tempérée humide, avec des hivers pluvieux et moyennement doux et des étés chauds et secs. Le régime thermique est modéré dans l'ensemble, avec des moyennes qui varient de 12.5°C en Janvier à 25.5°C en Août. Néanmoins, des pics de température de 37°C peuvent être enregistrés en été et les gelées sont observées en hiver. L'hygrométrie de l'air oscille entre 60 et 78% [157].

La pluviométrie est irrégulière avec une moyenne d'environ 600mm de pluie par an. Fréquemment, de très fortes averses sont enregistrées [157]. Les précipitations atteignent leur apogée en Décembre, Janvier et Février, mois qui donnent environ 30 à 40% des précipitations annuelles. Inversement, les mois d'été (Juin-Août) sont presque toujours secs [158].

1.3. Nature du sol

Dans la plaine de la Mitidja, les sols sont de type peu évolué avec des dépôts alluviaux récents et profonds. La texture est hétérogène, de grossière à fine. Certaines zones sont caractérisées par des sols calcimagnésiques à teneur en fer élevée, de texture argilo-limoneuse [158]. Ils sont rouges, profonds sur encroûtement calcaire et faciles à travailler, potentiellement fertiles et en général, le taux de matière organique est faible [157].

2. Drogue

La cueillette s'est faite dans la culture biologique de plantes appartenant au domaine privé « Extral bio » durant le mois de Juin 2011.

La drogue a été obtenue à partir de tiges et de feuilles récoltées en période de floraison. Les bouquets ont été coupés à leur partie inférieure à l'aide d'un sécateur, très tôt le matin, afin d'éviter l'évaporation des huiles essentielles.

La position systématique de la plante a été confirmée en se basant sur les caractères botaniques macroscopiques des différentes parties.

La cueillette ainsi obtenue a été séchée pendant cinq jours dans un endroit aéré et ombragé [159].

2.1. Etude de la teneur en eau

La teneur en eau de la drogue est mesurée directement après l'échantillonnage par la méthode gravimétrique [160].

Principe :

La technique consiste à sécher complètement la drogue et à calculer son taux d'humidité.

Technique :

- Peser 10g de feuilles de *Pelargonium graveolens*.
- Mettre l'échantillon à l'étuve pendant 24 heures à 105°C
- Peser à nouveau l'échantillon
- Déterminer la teneur en eau de la plante par le calcul de la différence de poids selon la formule suivante :

$$H (\%) = ((M_1 - M_2) / M_1) \times 100$$

- (H%) = Taux d'humidité exprimé en pourcentage ;
- (M₁) = Poids de l'échantillon en gramme après la récolte (plante fraîche) ;
- (M₂) = poids de l'échantillon en gramme après le séchage (plante sèche).

- La teneur en matière sèche est calculée selon la relation suivante :

$$MS (\%) = 100 - H (\%)$$

- (MS) = Matière sèche exprimée en pourcentage ;
- (H%) = Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

2.2. Description des coupes histologiques de la feuille et de la tige

Afin de localiser les structures anatomiques sécrétrices de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, des coupes histologiques au niveau des feuilles et des tiges ont été réalisées et colorées par la technique de la double coloration [161].

Principe:

Sur une coupe aussi fine que possible, on fait agir une solution d'hypochlorite de sodium. Les contenus cellulaires sont libérés tout en gardant les parois squelettiques intactes.

En faisant agir successivement le vert de méthyle et le rouge Congo, les parois lignifiées ou sclérifiées se colorent en vert et les parois cellulodiques se colorent en rose.

Technique :

- Réaliser des coupes transversales minces sur l'échantillon végétal à l'aide d'une lame à rasoir.
- Mettre les coupes dans un tamis ; placer les successivement :
 - Pendant 15 à 20 minutes dans l'hypochlorite de sodium dilué au ½.
 - Laver une fois à l'eau distillée.
 - Laver une fois dans un bain d'eau additionné de quelques gouttes d'acide acétique.
 - Traiter au vert de méthyle pendant 10 minutes.
 - Laver rapidement à l'eau.
 - Traiter par le rouge Congo pendant 15 minutes.
 - Laver rapidement à l'eau.
- Introduire la coupe entre lame et lamelle additionnée d'une goutte d'eau distillée.
- Observer au microscope optique (grossissement x10 puis x40).

III. Extraction de l'huile essentielle

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des HEs végétales, telles l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation, l'expression à froid, l'enfleurage, l'extraction par Soxhlet, l'extraction en mode batch, l'extraction assistée par sonication, ou assistée par microondes, l'extraction accélérée par solvants et l'extraction avec des fluides supercritiques [162-165].

Néanmoins, selon les normes AFNOR et ISO, seules les trois premières techniques sont admises pour l'extraction des huiles essentielles [78,79].

Le choix du procédé d'obtention de l'HE est en général limité par les normes liées à son utilisation. En effet, le mode technologique d'exploitation du matériel végétal peut avoir une influence importante sur la composition finale de l'essence [166].

1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la technique la plus répandue pour l'obtention des essences aromatiques [98]. Ce procédé d'extraction admis par la pharmacopée française ainsi que les normes AFNOR et ISO, est choisi pour les avantages qu'il offre, à savoir :

- Obtention de meilleurs rendements
- Eviter l'altération des huiles essentielles par des températures élevées car les composés sont entraînés à des températures plus basses que celles d'ébullition.
- Opération rapide et peu onéreuse.

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* a été extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de Clevenger [167], représenté sur le montage ci-dessous (Fig.05).



Fig.05. Montage de l'hydrodistillation (Lab. Electrochimie-corrosion, EMP Alger, 2011)

Principe :

Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un ballon d'eau distillée, placé sur une source de chaleur et porté à ébullition.

Sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité [168].

Technique :

- Mettre 100 grammes de la matière végétale (tiges + feuilles) coupée en morceaux de 1 cm de long dans un ballon de 2 litres à fond rond, rempli d'eau distillée.
- Placer le ballon avec son contenu dans un chauffe-ballon et le raccorder avec le reste de l'appareillage d'extraction.

- Allumer le chauffe-ballon et régler la température à 100°C.

Les vapeurs d'eau riches en huiles sont entraînées le long de la colonne, puis condensées dans le réfrigérant.

- Récupérer l'eau contenant de l'huile dans une ampoule à décanter.
- Séparer l'huile essentielle de la partie aqueuse et conserver l'huile dans un flacon en verre ambré, stérile et hermétiquement fermé, à basse température (4°C).
- Répéter l'opération plusieurs fois afin de récupérer une quantité suffisante d'huile essentielle à tester.

2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est fonction de plusieurs facteurs. La température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles comme les pélargoniums odorants [169].

Principe :

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé [170].

Technique :

Le rendement en huile essentielle est exprimé par la quantité d'huile obtenue pour 100g de matière végétale sèche. Il est calculé à partir de trois extractions qui sont estimés selon la formule suivante :

$$\mathbf{Rs (\%) = \frac{me}{mv} * 100} \quad [159]$$

- (R_s) : rendement de la plante sèche exprimée en pourcentage (%) ;
- (m_e) : masse de l'huile essentielle extraite exprimée en gramme ;
- (m_v) : masse de la plante humide exprimée en gramme.

3. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle

Dans le but de déterminer la durée d'extraction maximale de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, nous avons étudié la cinétique d'extraction.

Technique :

- Récupérer les huiles essentielles correspondantes à des intervalles de temps comme suit : à 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 90, 120, 150, 180 et 240 minutes
- Calculer le rendement à chaque intervalle de temps.
- Tracer la courbe de la cinétique d'extraction de l'HE.

IV. Etude analytique de l'huile essentielle**1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle**

Les caractéristiques organoleptiques représentées par l'aspect, la couleur et l'odeur de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* ont été notées.

2. Mesure des indices physiques

La détermination des indices physiques de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* a été effectuée selon les normes ISO et AFNOR [78,79].

2.1. Densité relative à 20°C

La densité relative à 20°C d'une huile essentielle est définie comme étant le rapport de masse d'un volume d'huile essentielle à 20°C, à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C.

- Si la densité est inférieure à 0.9, les essences des plantes végétales sont riches en terpènes.
- Dans le cas où elle est supérieure à 1, les essences des plantes végétales contiennent des composés aromatiques, des sulfures et des nitrites.
- Enfin si la densité est comprise entre 0.9 et 1, les essences ont une composition encore plus complexe [171].

Technique :

- A l'aide d'un pycnomètre, peser successivement un même volume d'eau distillée et d'huile essentielle.
- Peser le pycnomètre vide.
- Entre chaque mesure, le pycnomètre doit être soigneusement nettoyé avec de l'eau et de l'acétone puis séché.
- La densité relative est donnée par l'expression :

$$D_{20}^{20} = \frac{m_e - m_0}{m_1 - m_0}$$

[AFNOR NF T75-111 / ISO279]

- (m_e): masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle ;
- (m_0): masse du pycnomètre vide ;
- (m_1): masse du pycnomètre rempli d'eau distillée.

2.2. Indice de réfraction

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante. L'indice de réfraction est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considérés comme acceptable.

Technique :

- Placer quelques gouttes d'huile essentielle sur le prisme de manière à ce qu'elle le recouvre complètement.
- Observer par l'oculaire, une ligne de séparation entre la partie claire et la partie sombre apparaît dans le champ de vision.
- Lire la mesure.
- Calculer l'indice de réfraction n_d^{20} à la température de référence selon la relation :

$$n_d^{20} = n_d^{t'} + 0.0004 (t' - t)$$

[AFNOR NF T75-112 / ISO280]

- $n_d^{t'}$: Valeur obtenue à la température t'
- t' : Température ambiante ou de mesure
- t : Température de référence égale à 20°C

2.3. Miscibilité à l'éthanol

La miscibilité de l'huile essentielle a été déterminée dans de l'éthanol à 70°. C'est un moyen rapide d'évaluation de la qualité de l'huile essentielle dénaturée par des produits relativement insolubles affectant la solubilité. Une huile essentielle est dite miscible à l'éthanol quand le mélange d'un volume d'huile essentielle avec V volume d'éthanol donne une solution limpide [AFNOR NF T 75-101 / ISO 875].

3. Analyse chromatographique de l'huile essentielle

L'identification de la composition chimique de l'essence étudiée a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

Principe :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui consiste à vaporiser et injecter un échantillon à l'entrée d'une colonne qui renferme une substance active appelée phase stationnaire. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules [172].

La spectrométrie de masse (SM) est une méthode qui permet de séparer les différents ions présents dans l'échantillon à analyser et d'évaluer leur abondance respective. En effet, après ionisation, elle donne des renseignements sur la présence et la quantité relative des éléments (molécules, atomes, radicaux, etc.) [173].

Le couplage CPG/SM permet de connaître la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation [173,174]. Dans la source d'ionisation, les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil : le quadripôle. Ce dernier utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge (m/z) par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis seront collectés par un détecteur [173,175,176].

L'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs des masses et des intensités des pics et en courant ionique total. Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation (spectres de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc.).

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles [177].

Conditions opératoires :

L'analyse de l'huile essentielle a été conduite à l'aide d'un appareil de type Perkin Elmer (CG Clarus 600) représenté sur la figure 6 ci-dessous.

La colonne utilisée est une colonne capillaire RTX-VMS (60m x 0.25mm) et l'épaisseur du film est de 0.25 μ m. La température de la colonne est programmée à 60°C pendant 1min, puis elle monte crescendo, à raison de 4°C/min, jusqu'à 240°C où elle se stabilisera pendant 03 minutes.

L'injection se fait lorsque la température atteint les 250°C par mode splitless (rapport de fuite : 1/200). Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1ml/min. La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70eV.



Fig.06. Appareil Perkin Elmer CG Clarus 600 (Lab. Chimie Macromoléculaire- EMP, 2012)

La quantité d'HE injectée est de 0.3 μ l. Le balayage se fait pendant une heure pour avoir tous les composés. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 (*National Institute of Standards and Technology*) (Fig.07).



Fig.07. Système informatique relié à l'appareil de CPG-SM (Lab. Chimie Macromoléculaire- EMP, 2012)

L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse à ceux de la banque de données informatisée (NIST 98).

V. Test-objet : Souches bactériennes testées

1. Collecte et identification

Près de 500 souches bactériennes de différents genres, incriminées dans des infections communautaires ont été collectées aléatoirement au niveau de laboratoires d'analyses médicales à Annaba et à Alger sur une période de quatorze mois.

Nous avons reconduit l'identification de ces bactéries par des examens microscopiques, la recherche des enzymes respiratoires, l'étude du métabolisme glucidique et finalement par usage de galeries biochimiques miniaturisées (systèmes API).

1.1. Isolement

L'isolement a été effectuée sur gélose nutritive, gélose Chapman et gélose au sang frais (GSF) pré-coulées (annexes 3) par technique d'épuisement [178].

Les boites ainsiensemencées ont été incubées à l'étuve à 35°C pendant 24 heures. Pour les cultures sur GSF, l'incubation se fait en anaérobiose dans une jarre hermétiquement fermée, elle peut être prolongée jusqu'à 48 heures.

Après incubation, les colonies ont été soumises aux examens microscopiques.

1.2. Observations microscopiques

Les examens microscopiques peuvent fournir des informations très précieuses, c'est le premier critère d'identification bactérienne.

1.2.1. Etat frais

Principe :

L'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme et la sporulation.

Technique :

- Déposer une petite goutte d'eau physiologique stérile (annexes 3) sur une lame stérile.
- Prélever une fraction de colonie sur gélose.
- Préparer une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et en remuant très délicatement.
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air. Le liquide ne doit pas déborder.

- Observer rapidement à l'objectif 40 en mettant la lumière au maximum et en fermant le diaphragme.

Lecture :

- Les bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés.
- Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux dits mouvements browniens, qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité [179].

1.2.2. Coloration de Gram

Principe :

La coloration de Gram permet de distinguer d'une part la morphologie et la disposition des bactéries et d'autre part de les classer en bactéries à Gram positif et à Gram négatif [179].

Technique :

- Préparer un frottis et le fixer à la flamme du bec bunsen.
- Couvrir le frottis avec le violet de gentiane et laisser agir une minute.
- Rejeter le colorant. Laver à l'eau.
- Recouvrir la préparation avec le lugol (annexes 3). Laisser 30 secondes.
- Rejeter le lugol. Laver à l'eau.
- Décolorer à l'alcool 90° jusqu'à ce que les dernières gouttes d'alcool qui s'écoulent deviennent incolores.
- Rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée. Laisser agir 30 secondes.
- Rejeter la fuchsine. Laver abondamment avec l'eau.
- Egoutter et sécher la lame entre deux feuilles de papier buvard propres.
- Recouvrir la lame d'huile de Cèdre et l'examiner au grossissement x100, lentille frontale du condenseur escamoté, diaphragme légèrement ouvert.

Lecture :

- Coloration violâtre : bactérie à Gram positif.
- Coloration rose : bactérie à Gram négatif [179].

1.3. Recherche des enzymes respiratoires

1.3.1. Test de la Catalase

Les souches isolées ont été soumises au test de la catalase qui est un caractère quasi-constant chez les staphylocoques. La mise en évidence de la catalase permet de distinguer parmi les cocci à Gram positif les staphylocoques des streptocoques [180].

Cet examen ne peut être réalisé sur gélose au sang frais car les hématies possèdent leur propre catalase ce qui implique une source de fausse positivité [179].

Principe :

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est un produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en eau et oxygène gazeux.

Technique :

- Sur une lame propre et sèche, déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever quelques colonies bactériennes à partir d'un milieu solide et les déposer dans l' H_2O_2 .

Lecture :

- Un dégagement de bulles de gaz : catalase positive.
- Pas de dégagement de bulles : catalase négative.

1.3.2. Test de l'oxydase

Les souches isolées ont été soumises au test de l'oxydase.

Principe :

Ce test permet de mettre en évidence la cytochrome oxydase chez les bactéries qui peuvent oxyder la tétraméthyl paraphénylène-diamine, l'indicateur employé est la N-diméthyl-phénylène-diamine qui oxydée, donne une semi-quinone colorée en rose violacé.

Technique :

- Placer un disque d'oxydase sur une lame porte-objet et l'imbiber avec une goutte d'eau.
- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, prélever une colonie à partir d'une culture jeune et la déposer sur le disque.

Lecture :

- Apparition immédiate d'une coloration rose violacée dans les soixante secondes : oxydase positive.
- Pas de coloration : oxydase négative [179].

1.3.3. Test de la nitrate réductasePrincipe :

Certaines bactéries possèdent une nitrate réductase (NR), enzyme qui catalyse la réduction des nitrates en nitrites. Ces dernières en milieu acétique ou sulfurique donnent une coloration rosé-rouge en présence d'acide para-sulfanilique et d'alpha-naphtylamine (c'est la réaction de diazotation de Griess).

Toutefois, certaines bactéries réduisent les nitrates au-delà du stade nitrites, la réaction doit être complétée par l'épreuve de Zobell, qui consiste à rajouter un peu de poudre de zinc au milieu [180].

Technique :

- Dans un bouillon nitraté (annexes 3), mettre quelques gouttes de la suspension bactérienne dense.
- Incuber pendant 24 heures à 35°C.
- Ajouter au milieu 05 gouttes de réactif NIT1 (annexes 3) et 05 gouttes de réactif NIT2 (annexes 3). Agiter.

Lecture :

- Coloration rose ou rouge: les nitrates sont réduits en nitrites : NR positive.

Si la suspension est incolore, rajouter la poudre de zinc, agiter, incliner le tube de culture en position presque horizontale et attendre 05 minutes [181].

- Coloration rose : nitrate réduit par le zinc → NR négative.
- Coloration inchangée : la bactérie possède une nitrate réductase très active → NR positive.

1.4. Etude du métabolisme glucidique sur milieu TSI

Principe :

C'est un milieu combiné, il permet de mettre en évidence la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz et d'orienter l'identification de la bactérie par l'étude de la fermentation du glucose, lactose, saccharose et production d'H₂S.

Le milieu TSI (annexes 3) est présenté sous forme d'une gélose inclinée avec culot, dont l'indicateur du pH est le rouge de phénol.

Technique :

- Ensemencer d'abord la pente par stries serrées, puis le culot par pique centrale.
- Dévisser en partie le tube pour permettre une incubation en aérobiose.
- Incuber à 35°C pendant 24 heures.

Lecture :

- Culot de couleur jaune : Glucose positif.
- Culot inchangé (rouge) : Glucose négatif.
- Pente virant au jaune : Lactose-saccharose positif.
- Pente inchangée : Lactose-saccharose négatif.
- Noircissement de la zone séparant le culot de la pente : H₂S positif.
- Formation de bulles dans la masse du milieu repoussant parfois la totalité du milieu vers le haut du tube ou éclatement de la gélose: production de gaz [180].

1.5. Galerie API

L'identification des souches collectées a été réalisée par galerie API (BioMérieux, France). Ce système standardisé se base sur des tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Quatre types de galeries ont été utilisées dans l'étude (annexes 5-8).

Principe :

La galerie API comporte des microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un logiciel d'identification.

Technique :✓ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

✓ Préparation de l'inoculum

- Réaliser une suspension bactérienne à partir de cultures jeunes de 18 à 24 heures de la souche à étudier, en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu (ampoule d'API Suspension Medium, eau physiologique stérile, etc.).
 - La suspension doit avoir une densité suffisante :
 - 1 colonie dans 5 ml : API 20 E
 - Trouble correspondant au tube 0.5 de l'échelle McFarland (annexes 3) : API 20 NE et API Staph.
 - Trouble correspondant au tube 4 de l'échelle McFarland : API Strep.
 - La suspension bactérienne doit être utilisée extemporanément.

✓ Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette. Afin d'éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant :
 - Cupules simples : remplir uniquement les tubes.
 - Cupules encadrées : remplir tube et cupule.
 - Cupules soulignées : remplir la partie inférieure puis compléter avec de l'huile de vaseline.
- Refermer la boîte d'incubation.

✓ Incubation

- Incuber pendant 18 à 24 heures, à :
 - 37°C pour API 20 E, API Staph. et API Strep.
 - 30°C pour API 20 NE.

✓ **Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture spécifique pour chaque type de galerie API (annexes 5-8).
- Certains tests nécessitent l'addition de réactifs avant la lecture.

✓ **Interprétation**

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

• **Détermination du profil numérique :**

Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

- Pour la galerie API 20 NE, la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ième} test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.
- Pour la galerie API Strep., la réaction hémolytique constitue le 21^{ième} test ; la β-hémolyse est considérée comme positive et sa valeur numérique est 4. Toute autre réaction hémolytique est considérée comme négative et sa valeur numérique est 0. Toutefois, ces caractères ont une valeur indicative pour l'identification de certaines espèces.

• **Identification :**

Elle est réalisée à partir d'une base de données à l'aide du logiciel d'identification *apiweb*™, en entrant manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres [182-185].

2. Sélection et conservation des souches

Après l'identification, dix souches de 15 espèces les plus incriminées dans les infections communautaires ont été retenues dans notre étude (nombre totale =150) afin que les résultats soient statistiquement vérifiables.

Ces souches appartiennent aux *Enterobacteriaceae* (n=80/53.33%), aux bacilles à Gram négatif non fermentant (n=20/13.34%) et aux cocci à Gram positif (n=50/33.33%). Elles proviennent en majorité des urines (n= 110/73.33%), mais aussi, de pus (n=23/15.34%),

du sperme (n=6/4%), de prélèvements vaginaux (n=8/5.33%), nasaux (n=1/0.67%) et de prélèvements de gorge (n= 2/1.33%).

De plus, quatre souches sensibles aux antibiotiques de la collection américaine de cultures types (*American Type Culture Collection* : ATCC), gracieusement fournies par l'institut Pasteur d'Alger ont également été testées : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Toutes les souches bactériennes ont été entretenues dans un milieu de conservation (annexes 3) et à une basse température de 4°C.

3. Antibiogramme

L'antibiogramme est un moyen de diagnostic et de caractérisation des souches bactériennes. En effet, cet examen qui consiste à tester la sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes, permet de classer ces dernières en résistantes, intermédiaires ou sensibles à ces molécules.

Nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu solide de Mueller-Hinton (MH) (annexe 3) préconisée par le CLSI, comparable à celle décrite par la CA-SFM et l'EUCAST et recommandée par l'OMS [186,187].

3.1. Technique

3.1.1. Préparation de l'inoculum

- Racler à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, à l'aide d'une anse de platine, 2 à 3 colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% et bien homogénéiser la suspension bactérienne jusqu'à obtenir une opacité équivalente à 0.5 McFarland (10^6 – 10^8 UFC/ml) (Unité Formant Colonie), ou à une densité optique de 0.08 à 0.10 à 625nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop dense.
- Ensemencer l'inoculum dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

3.1.2. Ensemencement

- Préparer les boîtes de Pétri : le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé en boîtes de Pétri à une épaisseur de 4 mm pour la solidification. Il est additionné de 5% de sang de cheval défibriné (BioMérieux) pour la culture des streptocoques et des entérocoques.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube sans oublier de le faire pivoter, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux à trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois et en tournant l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Recharger l'écouvillon à chaque fois dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri.

Les souches de référence sont aussi ensemencées pour tester la fiabilité des antibiotiques utilisés.

3.1.3. Application des disques d'antibiotiques

L'application des disques d'antibiotiques est réalisée à l'aide d'un distributeur Pasteur automatique ou d'une pince stérile.

Les souches ont été testées vis-à-vis de différents antibiotiques (annexes 4) qui varient selon le groupe physiologique bactérien. Ces antibiotiques appartiennent aux β -lactamines, aminosides, macrolides-lincosamines-streptogramines (MLS), glycopeptides, tétracyclines, quinolones de 1^{ère} génération, fluoroquinolones, cotrimoxazole, colistine, rifampicine, fosfomycine, chloramphénicol, nitrofuranes, nitroxoline et acide fusidique.

Au maximum six disques d'antibiotiques sont appliqués sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques sont espacés d'au moins 24 mm, centre à centre [187].

3.1.4. Incubation

L'incubation s'est faite à 35°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries non exigeantes et jusqu'à 48 heures et en anaérobiose pour les streptocoques et les entérocoques testés.

3.1.5. Lecture

Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques, lorsqu'ils existent, sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. L'opération est répétée deux fois. La souche est classée dans l'une des trois catégories (Résistante, Intermédiaire, Sensible) selon le tableau des valeurs critiques [188].

3.2. *Tests complémentaires*

Certaines bactéries développent des mécanismes spécifiques de résistances, ainsi nous avons recherché la production de β -lactamases à spectre élargi et les *Staphylococcus sp.* résistants à la méthiciline.

3.2.1. Recherche de β -lactamases à spectre élargi (BLSE)

- *Test de synergie*

Nous avons recherché la production de β -lactamases à spectre élargi par le test de synergie pour les souches d'entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, présentant une sensibilité réduite aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) [188].

➤ *Pour les entérobactéries :*

Technique :

- Disposer un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) à 30 mm centre à centre d'un disque de C3G.
- Incuber à 35°C pendant 18 à 24 heures.

Lecture :

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou « bouchon de champagne » entre les disques de céftazidime (CAZ) et d'amoxicilline + acide clavulanique ou ces derniers et le disque de cefotaxime (CTX).

➤ *Pour Acinetobacter et Pseudomonas*

Technique :

- Disposer un disque de ticarcilline + acide clavulanique (TCC) à 30 mm, centre à centre, d'un disque de C3G.

- Incuber 18 heures à 35°C.

Lecture :

Le test est positif s'il y a apparition d'une image de synergie ou « bouchon de champagne » entre les disques de ceftazidime et ticarcilline + acide clavulanique ou ces derniers et le disque d'aztréonam (ATM).

En l'absence d'une image de synergie, la production de *BLSE* sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G [188].

- **Test de confirmation ou technique du double disque**

Ce test est réalisé devant :

- L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G.
- La présence d'une résistance aux molécules suivantes : ampicilline, ticarcilline, céfazoline avec un diamètre inférieur à 6 mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition.

Technique :

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme.

- Disposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) à une distance de 30 mm (centre à centre) pour les entérobactéries.
- Disposer un disque de TCC avec un disque de C3G (CAZ) ou monobactame (ATM) à une distance de 25 mm pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.
- Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure à température ambiante, la boîte est déposée, couvercle vers le haut.
- Après une heure d'incubation, ôter le disque d'AMC (ou de TCC) et le remplacer par un disque de CTX ou CRO (ou CAZ).
- Incuber la boîte 18 heures à 35°C.

Lecture :

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G, appliqué après diffusion du disque AMC ou TCC est ≥ 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G [188].

3.2.2. Détection des souches de *Staphylococcus* résistantes à la méthiciline

Nous avons recherché une résistance à la méthiciline pour toutes les souches *Staphylococcus sp.*

Technique :

- Tester la sensibilité à l'oxacilline (1µg) et à la céfoxitine (30µg) au niveau de l'antibiogramme standard.
- Incuber 18 à 24 heures à 35°C.

Lecture :

L'interprétation des résultats s'est faite suivant le tableau 5 de l'interprétation de la résistance à la méthiciline [188].

Tab.05. Interprétation des tests de la détection de la résistance à la méthiciline [188]

| | Oxacilline | Céfoxitine | Interprétation |
|------------------|------------|------------|----------------|
| <i>S. aureus</i> | ≥ 13mm | ≥ 22mm | MSSA |
| | ≤ 12mm | ≤ 21mm | MRSA |
| SCN | < 20 | ≥ 25mm | méthy S |
| | | ≤ 24mm | méthy R |

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline

MSSA : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthiciline

SCN : Staphylocoques à coagulase négative

méthy S : Sensible à la méthiciline

méthy R : Résistant à la méthiciline

VI. Activité antibactérienne *in vitro* de l'huile essentielle extraite

1. Aromatogramme

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne *in vitro* des huiles essentielles. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HEs dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations. Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le microorganisme. Les techniques les plus fréquemment utilisées sont : la technique en milieu solide (méthode de diffusion), la technique en milieu liquide (méthode de dilution) et la dispersion en micro-atmosphères.

Nous avons adopté la première méthode, appelée encore aromatogramme par méthode de M.C. Vincent [189]. C'est une technique qui se fait à l'image de l'antibiogramme par

diffusion en milieu gélosé, où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques. Le principe de cette méthode repose sur la migration des produits testés par diffusion dans la gélose. La qualification de l'activité est inversement proportionnelle à leur concentration.

C'est la technique la plus utilisée dans la littérature car elle présente beaucoup d'avantages, à savoir, la simplicité, la rapidité, l'économie, etc.

1.1. Réactivation des souches

Les souches bactériennes sont réactivées par repiquage à partir du milieu de conservation sur milieu de culture sélectif pour chaque type de souche (gélose nutritive pour les bacilles à Gram négatif non exigeants, milieu Chapman pour les staphylocoques et gélose au sang cuit pour les streptocoques et les entérocoques).

1.2. Préparation de l'inoculum

La méthode de préparation de l'inoculum est celle préconisée par le CLSI et recommandée par l'OMS, décrite précédemment et qui consiste à préparer à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures, une suspension en eau physiologique stérile équivalente au standard 0.5 McFarland [186,187].

1.3. Ensemencement

- Réaliser l'ensemencement à la surface du milieu solide MH. Il est additionné de 5% de sang de cheval pour la culture des streptocoques et des entérocoques.
- Imbiber un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et l'essorer contre la paroi interne du tube.
- Ensemencer par des stries serrées de haut en bas.
- Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois et en tournant l'écouvillon sur lui même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

1.4. Application des disques

- Imprégner des disques de papier buvard stériles, de 10 µl d'huile brute [190].
- Déposer les disques à la surface de la gélose.

Il ne faut pas mettre plus de quatre disques imbibés d'HE dans une boîte de 90 mm de diamètre.

Un disque sec est utilisé comme témoin.

1.5. Incubation

L'incubation se fait pendant 18 à 24 heures à 35°C. Elle est prolongée jusqu'à 48 heures et se fait en anaérobiose pour les streptocoques et les entérocoques testés.

1.6. Lecture

Les zones d'inhibitions éventuelles autour des disques sont mesurées deux fois à l'aide d'un pied à coulisse. La souche est classée dans l'une des catégories suivantes : non sensible ; sensible ; très sensible ; extrêmement sensible, selon le tableau 6 des valeurs critiques ci-dessous [191].

Tab.06. Catégories de sensibilité à l'HE selon les diamètres des zones d'inhibition [191]

| Catégorie | Zone d'inhibition (Ø en mm) |
|-----------------------------|--------------------------------|
| Non sensible | ≤ 8 |
| Sensible | 9 – 14 |
| Très sensible | 15 – 19 |
| Extrêmement Sensible | ≥ 20 |

Ø : Diamètre

2. Quantification de l'activité de l'huile essentielle

Les huiles essentielles sont des extraits concentrés. En raison de leur toxicité à forte dose, de leur faible rendement dans les plantes et de leur coût élevé [192,193]; nous avons voulu déterminer jusqu'à quelle dilution notre essence reste active sur les souches testées sensibles.

Deux méthodes de quantification ont été utilisées, la première méthode est celle des dilutions sur disques et la seconde est la méthode d'incorporation sur milieu gélosé.

2.1. Dilutions minimales inhibitrices (DMI)

Technique :

- A partir de 2 ml d'huile essentielle, préparer une gamme de dilutions selon une suite géométrique décroissante de raison 2 dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).
- Réactiver les souches comme décrit précédemment.
- Préparer les suspensions bactériennes.

- Ensemencer les suspensions bactériennes sur milieu MH (MH additionné de 5% de sang de cheval pour les streptocoques et les entérocoques).
- Déposer des disques stériles et imbibés des différentes concentrations de l'huile essentielle.
- Incuber 24 heures à 35°C (incubation en anaérobiose et prolongée pour les streptocoques).
- Mesurer, deux fois, la zone d'inhibition autour des disques lorsqu'elle existe.

Des disques témoins imprégnés de DMSO brute et un disque sec sont aussi testés.

L'interprétation des résultats se fait de la même manière que pour l'aromatogramme.

2.2. Concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle ont été déterminées vis-à-vis des souches bactériennes sensibles à l'HE brute par méthode de dilution en milieu gélosé, recommandée par le CLSI. La gamme de concentrations est choisie à partir des résultats des DMI.

Technique :

- Préparer dans des tubes en verre stériles les différentes dilutions d'HE dans du DMSO.
- Verser immédiatement le contenu de chaque tube dans une boîte de Pétri stérile dans laquelle on rajoute une quantité déterminée de milieu MH fondu et refroidi à 45°C (MH au sang pour les streptocoques et les entérocoques) et bien agiter de façon à avoir la gamme de concentrations d'HE suivante: 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.85, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4%.
- Après solidification des milieux, déposer des spots de 2 µl d'un inoculum standardisé à 10^6 - 10^8 UFC/ml.
- Incuber 24 à 48 heures à 35°C (en anaérobiose pour les streptocoques et les entérocoques).

Déduire les CMI de l'HE à partir de la première boîte de la gamme dépourvue de croissance bactérienne visible [25,194].

3. Détermination du type d'activité : bactéricidie-bactériostase

Il existe deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes ; une activité létale (bactéricidie) et une inhibition de la croissance (bactériostase) [195]. Il est impératif de connaître le type d'activité de l'HE afin de déterminer son champ d'action (asepsie ou stérilisation) ainsi que les doses exactes nécessaires à son activité.

3.1. Par repiquage à partir des zones d'inhibition

La détermination du type d'activité de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* est basée sur la méthode de M.C. Pibiri [195].

Technique :

- Racler à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et obturée les zones d'inhibition translucides entourant les disques, utilisés pour déterminer les DMI.
- Procéder à un repiquage par stries sur un milieu adéquat.
- Incuber les boîtes à 35°C pendant 18 à 24 heures (48 heures et en anaérobiose pour les streptocoques et les entérocoques).

L'absence de développement bactérien témoigne d'un effet bactéricide, tandis que la réapparition de colonies bactériennes nous renseigne sur un effet bactériostatique de l'huile essentielle.

3.2. Par détermination des concentrations minimales bactéricides

Les concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle ont été déterminées vis-à-vis des souches bactériennes sensibles à l'HE testée par la méthode d'ensemencement par stries en milieu nutritif gélosé.

Technique :

- Racler à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et obturée les zones des différents spots utilisés pour déterminer les CMI et qui sont dépourvus de croissance bactérienne.
- Ensemencer par stries une gélose nutritive pour toutes les entérobactéries, les bacilles à Gram négatif non fermentant et les souches *Staphylococcus sp.* et sur gélose au sang cuit pour *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis*.
- Incuber 24 à 48 heures à 35°C (en anaérobiose pour les streptocoques et les entérocoques).

Les CMB de l'HE sont déduites à partir de la première boîte sans croissance bactérienne visible [25].

Le type d'activité de l'huile essentielle est défini en calculant le rapport CMB/CMI.

VII. Recherche de synergies : Antibiotiques - Huile essentielle

Une approche récente consiste à combiner l'utilisation des huiles essentielles et des antibiotiques. C'est là une nouvelle stratégie pour surmonter les problèmes grandissants de résistances et des effets secondaires associés aux médicaments.

Jusqu'à lors, l'activité de synergie entre l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* n'a été rapportée qu'avec les éléments du groupe des fluoroquinolones. Les associations de la ciprofloxacine et de la norfloxacine avec l'huile ont donné de bons résultats sur des bactéries de différents groupes physiologiques [196,197].

Dans ce contexte d'idées, nous nous sommes proposés de tester les associations de l'HE de notre plante avec les antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine, mais auxquels les bactéries ont développé des résistances. La méthode utilisée est calquée sur la technique du double disque [188].

Technique :

- Préparer des suspensions bactériennes équivalentes au standard 0.5 McFarland.
- Ensemencer par stries deux boîtes de MH pour chaque suspension bactérienne.
- Appliquer les disques d'antibiotiques dans la première boîte et laisser diffuser pendant une heure à 35°C.
- Appliquer les disques de papier buvard imprégnés de 10µl d'huile essentielle dans la deuxième boîte et laisser diffuser pendant une heure à 35°C.
- Substituer les disques d'antibiotiques de la première boîte par des disques imprégnés de 10µl d'huile essentielle.
- Substituer les disques imprégnés d'huile essentielle de la deuxième boîte par des disques d'antibiotiques.
- Incuber 24 heures à 35°C.
- Mesurer les zones d'inhibition autour des disques en millimètres à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus avec ceux de l'antibiogramme et de l'aromatogramme.

VIII. Propositions d'usages de l'huile essentielle

1. En tant qu'additif alimentaire

La détérioration des denrées alimentaires est un problème sérieux de santé, de valeur nutritive et de pertes économiques conséquentes pour l'industrie agroalimentaire. Depuis l'antiquité, les aliments ont toujours été préservés par chauffage, séchage, fumage, salaison, refroidissement ou fermentation [198].

Depuis quelques années, les conservateurs alimentaires synthétiques sont devenus largement utilisés et des techniques ont été développées pour prolonger la durée de vie des produits. Cependant, ces conservateurs synthétiques posent de plus en plus de problèmes en termes de sécurité sanitaire dus à leurs effets secondaires cancérigènes, tératogènes, etc. La recherche de nouveaux agents conservateurs s'oriente alors vers le retour aux extraits végétaux et particulièrement les huiles essentielles par la meilleure exploitation de ces molécules bioactives.

Les plantes restent la source la plus commune d'agents antimicrobiens. Leur utilisation comme remèdes traditionnels est la plus populaire pour 80% de la population mondiale [199]. De plus, l'effet inhibiteur de certaines huiles essentielles sur le développement des bactéries d'origine alimentaire laisse entrevoir des perspectives d'applications dans ce domaine [200].

Le *Pelargonium graveolens* est classé comme une plante non toxique. Son huile essentielle est accordée GRAS et jusqu'au présent travail, aucun rapport de cas d'intoxication par ingestion de cette HE n'a été publié dans la littérature médicale [22,148]. De plus, cette plante possède une agréable saveur citronnée. En cuisine, elle est utilisée dans les salades, ses feuilles finement hachées peuvent servir pour assaisonner des sauces, des flans et pour confectionner des confitures et du sirop, mais aussi pour aromatiser les biscuits, gâteaux, pains et chocolat [201,202].

Nous avons recherché l'effet conservateur de l'HE de *Pelargonium graveolens* d'un aliment de large consommation et facilement périssable : la crème pâtissière ; par étude de sa qualité microbiologique comparée à des échantillons confectionnés par procédés habituelles. Les résultats des expérimentations permettront de calculer la capacité de réduction bactérienne dans cette crème pâtissière et d'étudier son activité dans le temps et en fonction de la température de conservation.

La crème pâtissière a été préparée au niveau du laboratoire de Microbiologie UBMA, en respectant les règles d'hygiène et d'asepsie. Nous avons respecté la recette standard, utilisée habituellement [203]. A la fin de la préparation, la crème pâtissière a été partagée en deux parties, à la première, nous avons additionné 0.5% d'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*. La seconde nous a servi de témoin. Cette concentration en HE a été choisie en fonction des résultats des CMI de l'HE.

Une crème pâtissière du commerce a été soumise aux mêmes tests après addition d'HE.

Le protocole expérimental s'est déroulé en plusieurs étapes, représentées sur le schéma ci-dessous (Fig.08). Des prélèvements ont été effectués sur les crèmes pâtissières à des intervalles de temps réguliers et après conservation à 4° et à 20°C.

Pour chaque prélèvement, des dilutions ont été obtenues en utilisant de l'eau physiologique stérile. Les ensemencements ont été réalisés sur des boîtes de gélose nutritive et de gélose Chapman pré-coulées.

Chaque ensemencement a été réalisé en triplicat.

Technique :

- Prélever après préparation, 1g de chaque crème pâtissière et le diluer dans 9 ml d'eau physiologique stérile. Agiter.
- Ensemencer 0.1 ml de chaque dilution sur gélose nutritive et sur milieu gélose Chapman par la technique du râteau [204].
- Incuber les boîtes à 35°C pendant 48 heures.
- Conserver le reste des différentes crèmes pâtissières à 4°C et à 20°C.
- Après quatre heures, ensemencer 0.1 ml de dilution de chacune des crèmes pâtisseries conservées aux différentes températures puis incuber de la même manière précédente.
- Répéter la même opération après 24 et 48 heures.

Lecture : Dénombrer les colonies bactériennes visibles dans chaque boîte.

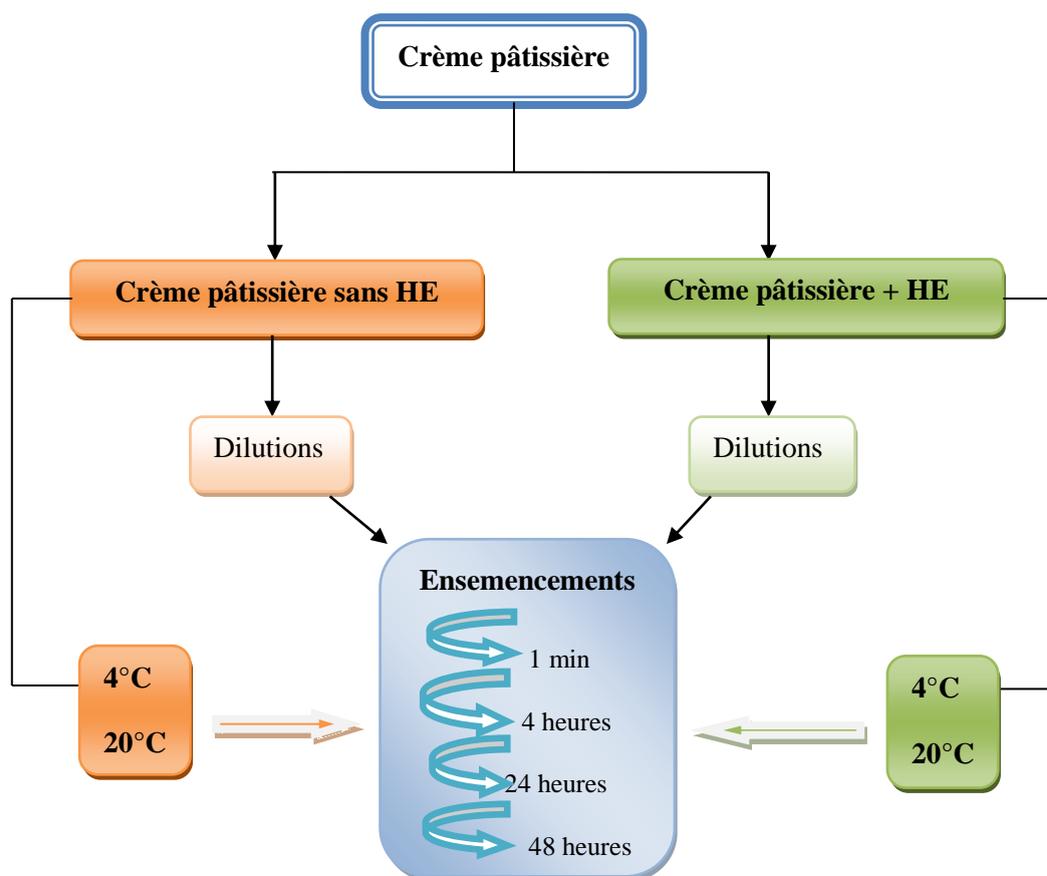


Fig.08. Protocole de détermination de l'effet conservateur de l'HE dans la crème pâtissière

2. En tant que produit antiseptique

La main est le principal support de microorganismes surtout dans les cas des infections croisées. Une large proportion d'infections notamment nosocomiales serait d'origine manuportée. Ces infections peuvent être réduites par l'application de règles d'hygiène telles que le lavage et/ou la désinfection des mains. Ce sont les travaux de Semmelweiss (1847) qui ont montré que le lavage des mains était une mesure efficace de prévention des infections. Puis Pasteur (1878) a mis en évidence le manu-portage dans les actes de chirurgie [205].

Selon le Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris-Nord (C.CLIN Paris-Nord), l'hygiène des mains est définie comme suit « *Il s'agit d'un traitement des mains par un savon liquide non médicamenteux ou par un produit (savon, gel ou solution) ayant un spectre d'activité antimicrobien ciblé sur les microorganismes de la flore cutanée afin de prévenir l'infection* » [205].

L'écosystème cutané comprend deux microflore : résidente et transitoire [206].

La microflore résidente regroupe les microorganismes commensaux, elle se situe au niveau des couches superficielles ou profondes et elle est composée de bactéries aérobies principalement de cocci à Gram positif présents dans les follicules pilo-sébacés (*Staphylococcus epidermidis*), de corynébactéries, *Propionibacterium acnes*, *Micrococcus luteus*, etc. Cette microflore bactérienne varie qualitativement et quantitativement d'un site à un autre et d'un individu à un autre. Elle se renouvelle régulièrement. Elle a une faible virulence, mais un geste invasif peut la modifier et induire un processus infectieux [206].

La microflore transitoire ou superficielle est composée le plus souvent de microorganismes saprophytes issus de l'environnement; de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, etc. et parfois de bactéries pathogènes ou commensales issus de la microflore commensale des patients soignés : entérobactéries, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Candida albicans*, etc. Elle varie au cours de la journée et selon les activités exercées [206].

Ces microflore seront diminuées et/ou éliminées par des techniques d'hygiène des mains [205].

L'efficacité des savons ou encore des solutions hydro-alcooliques est variable en fonction de leur composition et du mode de leur préparation. Certains présentent des inconvénients, à savoir, l'odeur, la texture, l'effet fixateur de microorganismes pour l'alcool, les effets désagréables pour certaines personnes, etc.

Nous avons testé le pouvoir antiseptique d'un savon fabriqué à base de l'HE de *Pelargonium graveolens*. Il a été préparé en se référant à une recette de base [207]. A la fin de la préparation, on a partagé le savon en deux parties, à la première on a rajouté 1% de l'extrait; concentration utilisée habituellement pour les HEs peu toxiques dans les produits d'hygiène [208]. La seconde nous a servi de témoin.

Le protocole expérimental a été élaboré en s'inspirant d'autres études réalisées dans le but d'apprécier l'efficacité de différents désinfectants [209 - 212].

Les prélèvements ont été recueillis au niveau de l'université Badji Mokhtar Annaba. On a effectué des prélèvements sur 60 étudiants âgés entre 18 et 28 ans par la technique de l'empreinte des phalanges déposés sur des boîtes de gélose nutritive et de gélose Chapman pré-coulées [212]. Technique étant la plus simple à mettre en œuvre et ne présentant presque pas de risque de contaminations.

Les volontaires étaient tenus de ne pas utiliser de substances antibactériennes (antibiotiques, antiseptiques) dans la semaine précédant l'étude. Seuls les prélèvements des mains ne comportant ni lésions, ni bijoux, ni vernis à ongles ont été retenus dans notre étude.

Le protocole expérimental s'est déroulé en plusieurs étapes, représentés sur le schéma ci-dessous (Fig.09). Des prélèvements bactériologiques ont été effectués sur les mains avant et après lavage, puis à différents laps de temps après la désinfection des mains.

Chaque prélèvement a été pratiqué en triplicat.

Les résultats des expérimentations ont permis de calculer la capacité de réduction bactérienne du savon après lavage des mains et d'étudier son activité dans le temps.

Technique :

- Un premier prélèvement bactériologique a été réalisé sur les mains non lavées afin de dénombrer la microflore cutanée de départ. Ce prélèvement a servi de valeur de base pour évaluer une éventuelle réduction bactérienne.

Les extrémités distales des phalanges des doigts 2, 3 et 4 (index, majeur et annulaire) de la main dominante ont été apposées pendant 10 secondes sur la surface de la gélose en appuyant assez rigoureusement. Les boîtes de prélèvement ont ensuite été incubées.

- Un second prélèvement a été effectué sur les mains des expérimentés une minute après lavage soigneux : avec le savon à tester pour la moitié des sujets et le savon non additionné d'HE pour l'autre moitié.
- Après que les étudiants aient repris leurs activités habituelles, des prélèvements similaires ont été réalisés ; une, deux et trois heures après le lavage.
- Les boîtes de gélose obtenues ont été incubées à 35°C pendant 48 heures.

Lecture : on dénombre les colonies bactériennes visibles apparues dans chaque boîte.

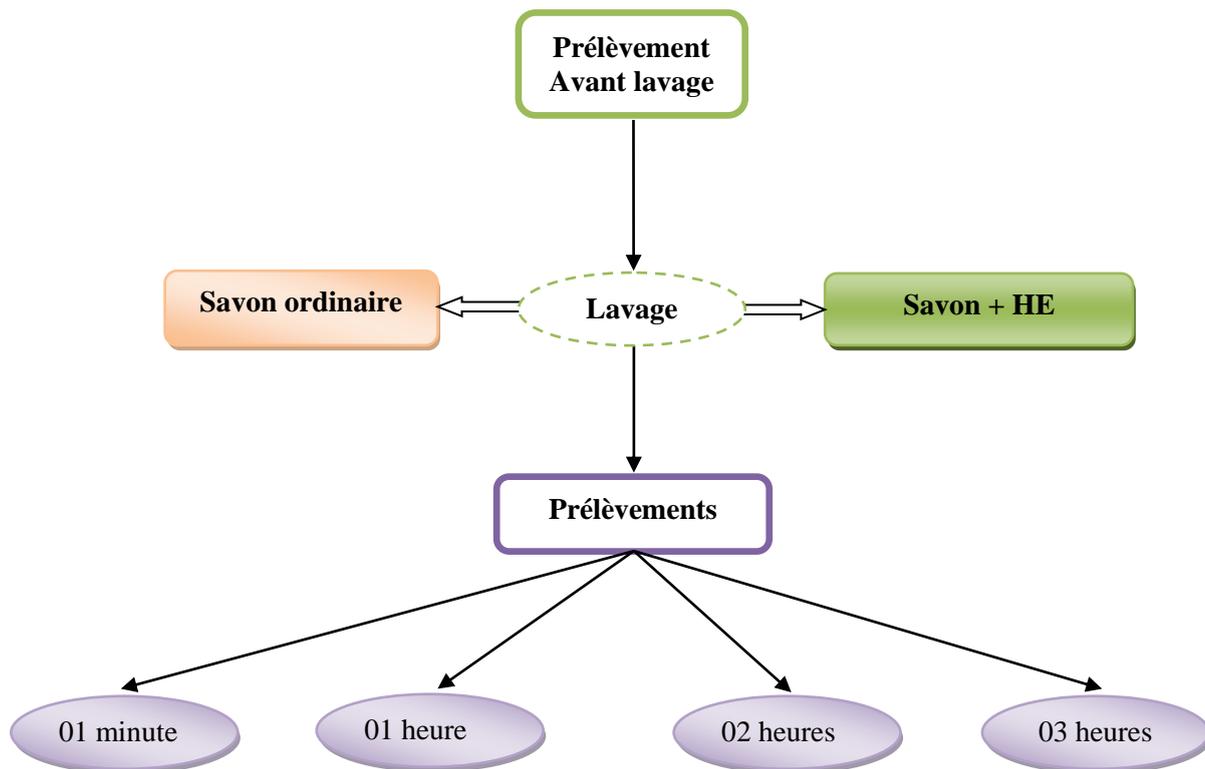


Fig.09. Protocole de détermination de l'effet antiseptique de l'HE dans le savon

3. Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été validés par calcul des moyennes et comparés au témoin par le test t de Student, en utilisant le logiciel *STATISTICA 8* par calcul du seuil de signification (p). Les différences sont considérées comme :

- Significatives ($p < 0.05$).
- Hautement significative ($p < 0.01$).
- Très hautement significative ($p < 0.001$).

Résultats et discussions

Résultats et discussions

I. Enquête ethnobotanique

Cette étude nous a permis d'avoir une idée générale sur la place qu'occupe le Géranium rosat dans la phytothérapie dans les régions d'Annaba et d'Alger. Bien que l'enquête n'a été menée que dans ces deux wilayas, les personnes interrogées sont originaire de différentes régions d'Algérie: Alger, Annaba (Centre ville, Berrahal et Sidi Amar), El-Taref (Centre ville, Besbes, Bouhadjar, Asfour, Dréan, El-Kala, Ben M'hidi, Bouteldja et Righia), les hauts plateaux (Sétif, Oum-El-Bouaghi, Tébessa et M'Sila) et le Sud algérien (Biskra et El-Oued).

Finalement, l'enquête touche une grande partie du territoire et par ailleurs, le plus peuplé, à savoir l'algérois, une partie du Sud et le Nord Est. De plus, un nombre assez conséquent d'enquêtés (536 personnes), plus élevé que ceux rapportés par d'autres études [213-215].

1. Données sur les enquêtés

1.1. Sexe

Nous avons veillé à ce qu'il y ait autant de femmes (50.56% /n=271) que d'hommes (49.44 % /n=265) (Fig.10). Il ressort un sexe ratio égal à 0.98.

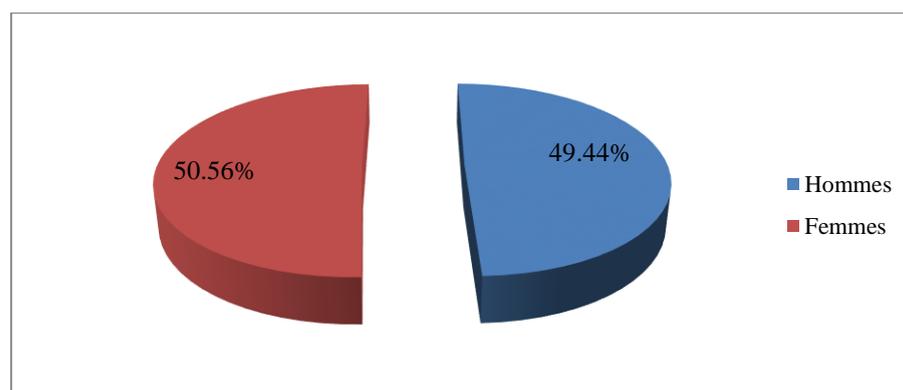


Fig.10. Répartition des enquêtés selon le sexe

1.2. Age

Les interrogés sont des adultes appartenant à différentes générations, âgés de 18 à 70 ans (Fig.11). Quatre tranches d'âges sont représentées, la plus sollicitée est celle des 18-25 ans, avec un taux de 40.11% (n= 215), c'est la tranche la plus jeune et cela peut être expliqué

par le fait que ces individus étaient disponibles essentiellement au niveau des universités où, une grande partie de l'enquête a été menée. Les enquêtés de la seconde tranche sont âgés de 26 à 35 ans, avec 30.78% (n= 165). La troisième catégorie est celle des personnes âgées de 36 à 54 ans, avec 21.65% (n=116). La quatrième tranche d'âge (plus de 55 ans) est la moins représentée dans ce questionnaire avec un taux de 7.46% (n=40), cela s'explique par l'indisponibilité de cette catégorie au moment de l'enquête.

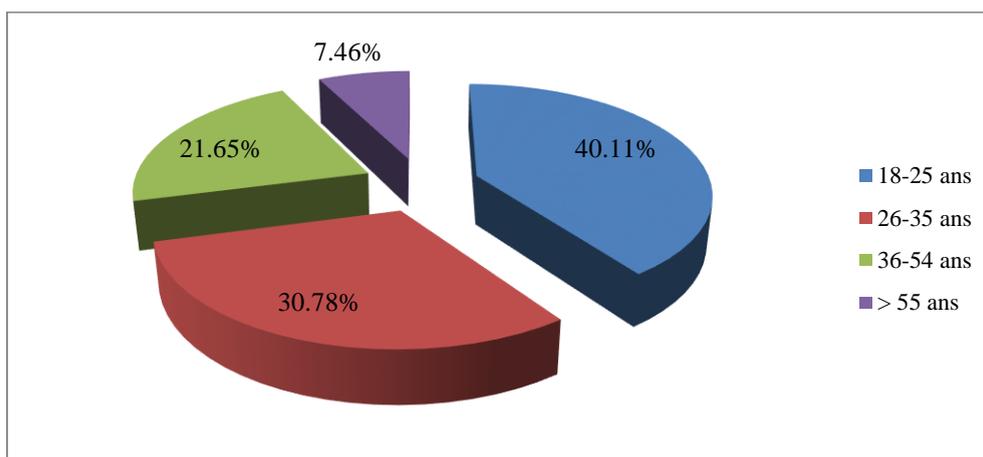


Fig.11. Répartition des enquêtés selon l'âge

1.3. Profession

Les interrogés sont en grande majorité des étudiants (51.49% / n=276) et des fonctionnaires d'état (31.34% / n=168). Viennent ensuite les sujets sans profession (8.96% / n=48) et les travailleurs internationaux (2.24% / n=12). Les travailleurs libéraux, les fonctionnaires exécutifs et les artistes sont à des taux égaux de 1.49%, soit un nombre de 8 personnes par catégorie de travail (Fig.12). Enfin, les commerçants et les retraités sont à des taux assez faibles de 0.75% (n=04 chacun).

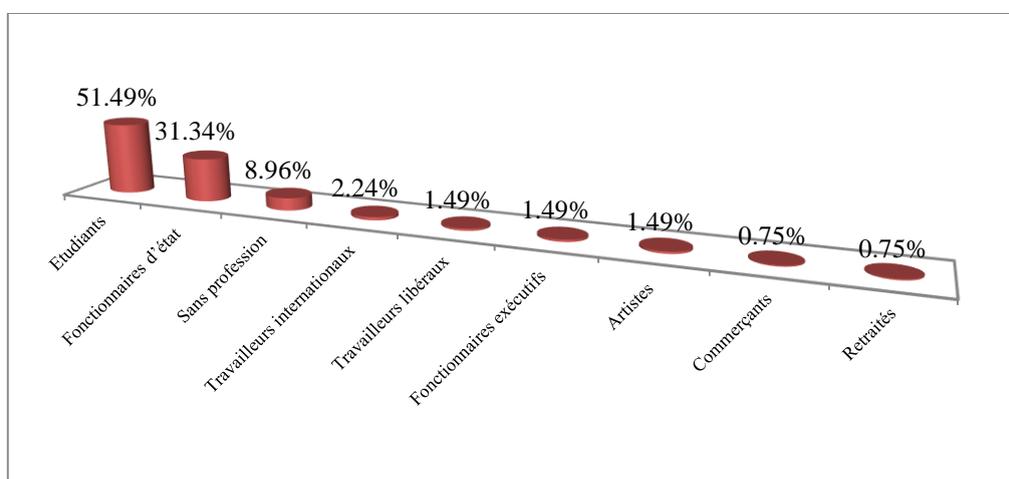


Fig.12. Répartition des enquêtés selon leurs professions

2. Usage des plantes aromatiques et médicinales (PAM) par les enquêtés

2.1. Utilisation de PAM

Parmi les interrogés, 76.12% (n=408) utilisent les plantes aromatiques et médicinales (Fig.13). Ce degré d'usage explique le regain de confiance dans les produits naturels, en accord avec les données de l'organisation mondiale de la santé qui estime que 80% de la population mondiale fait appel aux PAM [216].

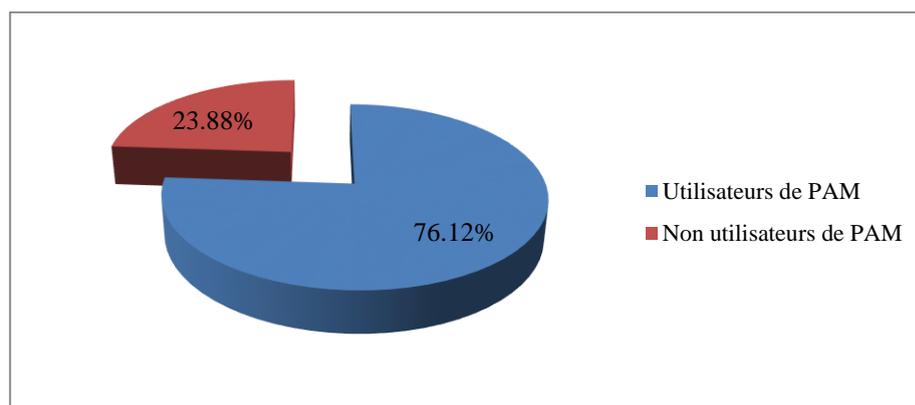


Fig.13. Répartition des enquêtés selon l'utilisation des PAM

L'utilisation des plantes médicinales est répandue chez toutes les tranches d'âge, avec une répartition plus ou moins équitable. La connaissance des propriétés et usages des PAM sont généralement acquises suite à une longue expérience accumulée et transmise d'une génération à l'autre. Elles peuvent aussi être acquises en se référant aux herboristes ou en consultant les livres et les revues de la médecine traditionnelle ou encore, en suivant certains programmes télévisés ou sites internet [217].

Parmi les utilisateurs des plantes médicinales, les femmes sont majoritaires. En effet, 63.73% des questionnés utilisateurs de la médecine traditionnelle sont des femmes (n=260) contre 36.27% d'hommes (n=148).

On constate que les femmes montrent plus d'intérêt vis-à-vis des remèdes naturels étant plus en contact avec leurs mères et grand mères qui leur préconisent l'utilisation des plantes et elles sont aussi à l'écoute de tout ce qui peut toucher la santé des enfants et emploient des remèdes à base de plantes, contrairement aux hommes qui préfèrent les médicaments faciles à utiliser. Les femmes utilisent également les plantes pour tout ce qui touche à la cosmétologie et au bien être. De ce fait, elles connaissent beaucoup de plantes médicinales et aromatiques, ce qui fait que les informations recueillies auprès d'elles reflètent plus la réalité de la connaissance des PAM par la population algérienne. Ces résultats

confirment d'autres travaux ethnobotaniques réalisés au Maroc qui démontrent que les femmes sont plus détentrices du savoir phytothérapeutique traditionnel que les hommes [217,218].

2.2. Pathologies traitées par les PAM

L'éventail de maladies traitées par les PAM est très large où la grippe occupe la première place avec un taux de 28.79% (Fig.14). Suivent, les douleurs abdominales (10.10%), la toux et les maux de gorge (8.08%), les maux d'estomac (6.57%), les douleurs du cycle menstruel (5.56%), diarrhées (5.05%), maux de tête (5.05%), inflammation du gros intestin (4.55%), rhume (4.05%), fièvre (3.54%), constipation (2.53%), stress (2.53%), indigestion (2.02%), aérophagie (2.52%), problèmes respiratoires (1.52%), douleurs (1.02%), problèmes urinaires (1.02%), angine (0.5%), bronchite (0.5%), otite (0.5%), problèmes de tension artérielle (0.5%), rhumatisme (0.5%), problèmes dermatologiques (0.5%), hémorroïdes (0.5%), maux de dents (0.5%), aphtes (0.5%) et insomnies (0.5%).

Nos enquêtés n'évoquent pas d'autres pathologies et maux rapportés par la littérature traités par les PAM, tels que l'acné, l'agressivité, l'angoisse, l'anxiété, les bleus (hématome, bosse, contusion), la colite, les troubles de la concentration, les démangeaisons (prurits), la déprime, les douleurs musculaires, la fatigue nerveuse, la fatigue physique, la gastrite, la gastro-entérite, l'hyperactivité, les jambes lourdes, le mal de dos (lumbago, sciatique), le mal des transports, les troubles de la ménopause, les nausées, la sensation d'oppression, les piqures et morsures (insectes et méduses), les poux de tête (pédiculose), la rhino-pharyngite, la sinusite, le surmenage intellectuel, le syndrome prémenstruel, la tendinite, etc. [219].

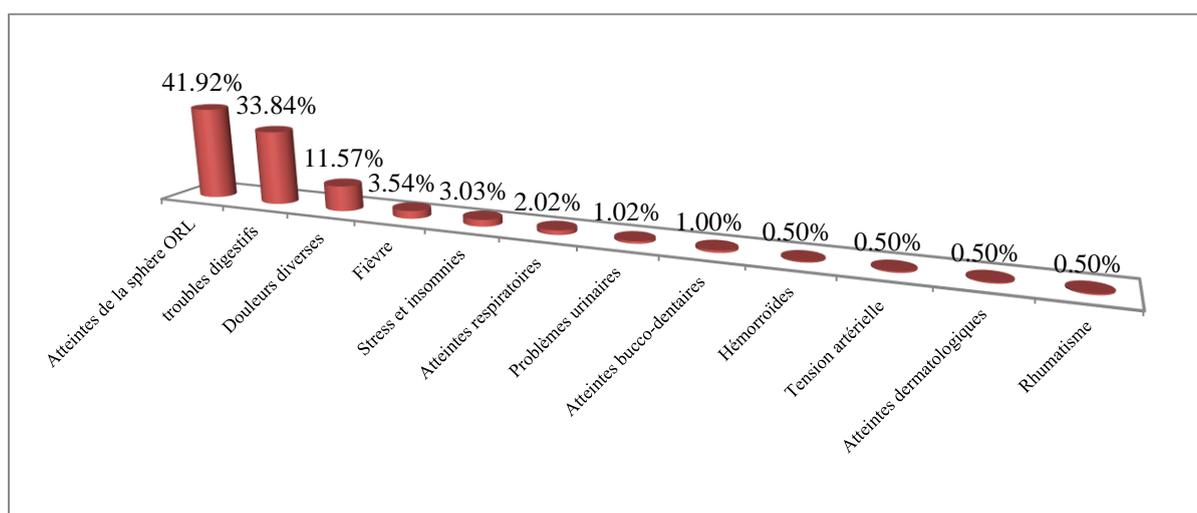


Fig.14. Pathologies traitées par les PAM selon les enquêtés

3. *Pelargonium graveolens*

3.1. Connaissance de la plante

On s'attendait à une meilleure connaissance de la plante vu son abondance et sa large répartition géographique. Il ressort de notre enquête que seul 64.18% (n= 344) des sujets interrogés connaissent la plante (Fig.15).

Les enquêtés de la troisième tranche d'âge (de 36 à 54 ans) et surtout de sexe féminin (n= 216/ 62.79%), semblent mieux connaître et utiliser le *Pelargonium graveolens*.

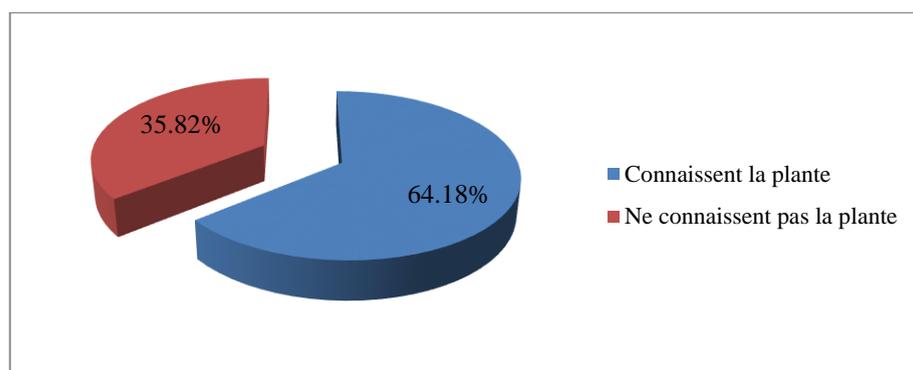


Fig.15. Répartition des enquêtés selon la connaissance de la plante

La majorité des personnes interrogées connaissent la plante sous le nom dialectal de « Attercha : عطرشة » avec un pourcentage de 85.96% (Fig.16). D'autres noms sont utilisés : « Atterchia : عطرشية » (5.26%), « khdioudja : خديوجة » (5.26%), « Géranium Bourbon » (1.76%) et « citronnelle » (1.76%).

Le nom Géranium Bourbon est donné à l'espèce originaire de l'Ile de la Réunion dont la composition chimique varie sensiblement de notre plante. La citronnelle (*Cymbopogon citratus*) est le nom d'une autre plante, les enquêtés ont confondu entre les deux sous arbrisseaux.

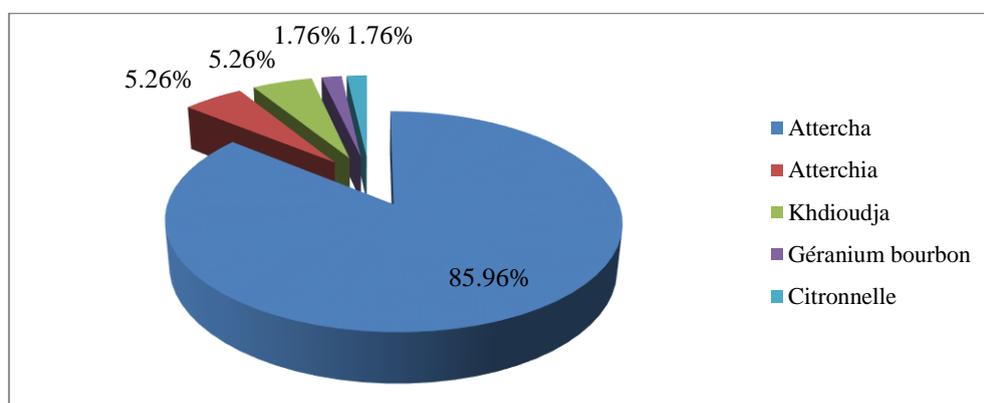


Fig.16. Noms connus de la plante selon les enquêtés

3.2. Usage de la plante

Au total, 220 enquêtés (41.04%) utilisent le *Pelargonium graveolens*. Néanmoins, parmi les sujets qui connaissent la plante 63.95% l'ont déjà utilisé (Fig.17). Ceci est peut être dû au fait que la plante soit appréciée principalement pour son aspect décoratif.

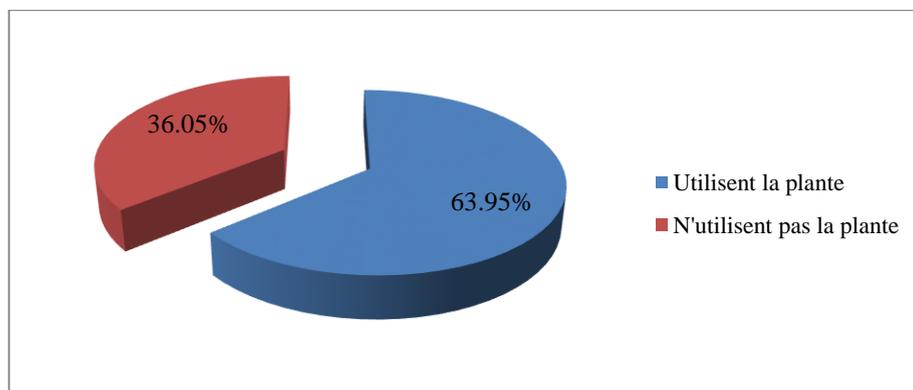


Fig.17. Répartition des enquêtés selon l'utilisation de la plante

L'usage de *Pelargonium graveolens* est principalement décoratif avec un pourcentage de 36.36% (Fig.18). Il est également apprécié pour son aspect thérapeutique (9.09%) et cosmétologique (7.27%). Les enquêtés évoquent l'usage multiple surtout thérapeutique-décoratif (14.55%), thérapeutique-cosmétologique-décoratif (9.09%), culinaire-décoratif (9.09%), cosmétologique-décoratif (7.27%), thérapeutique-culinaire-cosmétologique-décoratif (1.82%), thérapeutique-culinaire-décoratif (1.82%), thérapeutique-cosmétologique (1.82%), thérapeutique-culinaire (1.82%).

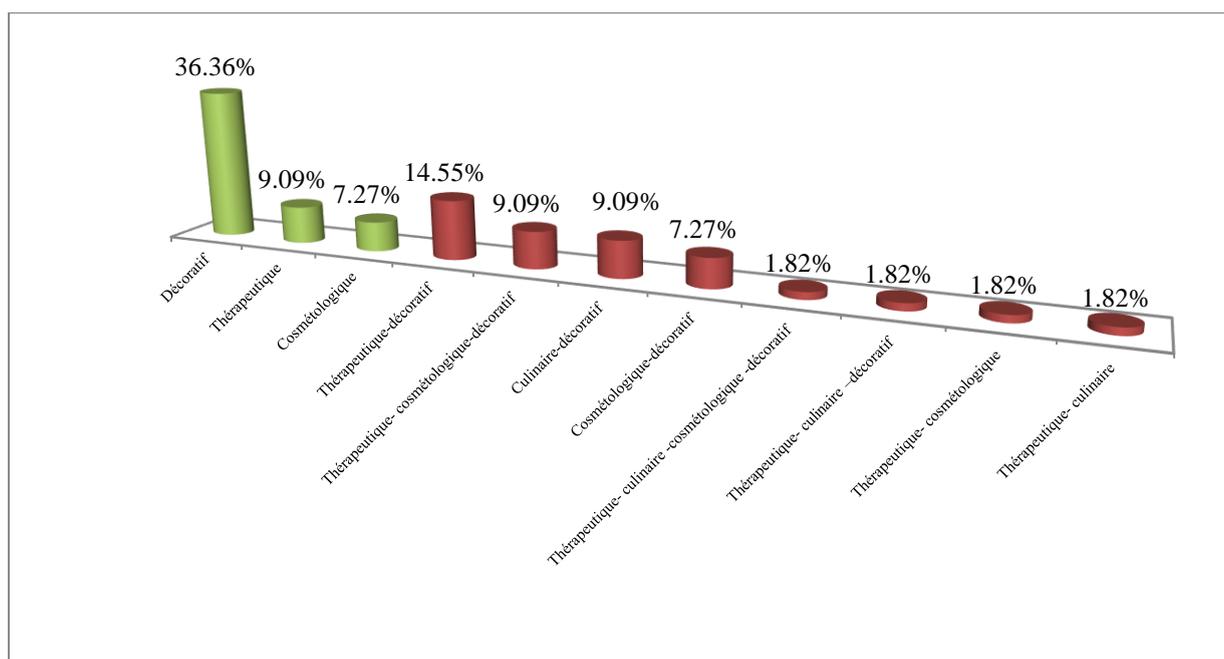


Fig.18. Domaines d'usage de la plante selon les enquêtés

On constate que l'usage culinaire de *Pelargonium graveolens* présente un faible intérêt, en raison de l'absence de cette plante dans les recettes des plats traditionnels locaux. Ce n'est pas le cas chez nos voisins en Tunisie ou encore en Europe et aux Iles Comores. Pour ces derniers, le Géranium rosat est consommé dans certains plats tels que les salades mais aussi dans les confitures [13,154,202].

3.3. Source et période de récolte de la plante

On se procure la plante dans la nature où on la trouve (43.64%/ n=96) et il n'y a pas de parcelles vouées à des cultures importantes en Algérie, à l'exception de la région de la Mitidja. Cette plante est cultivée par 30.91% des enquêtés (n=68). Un peu plus du quart des interrogés (25.45%/n=56) se procurent le Géranium rosat chez les herboristes (Fig.19).

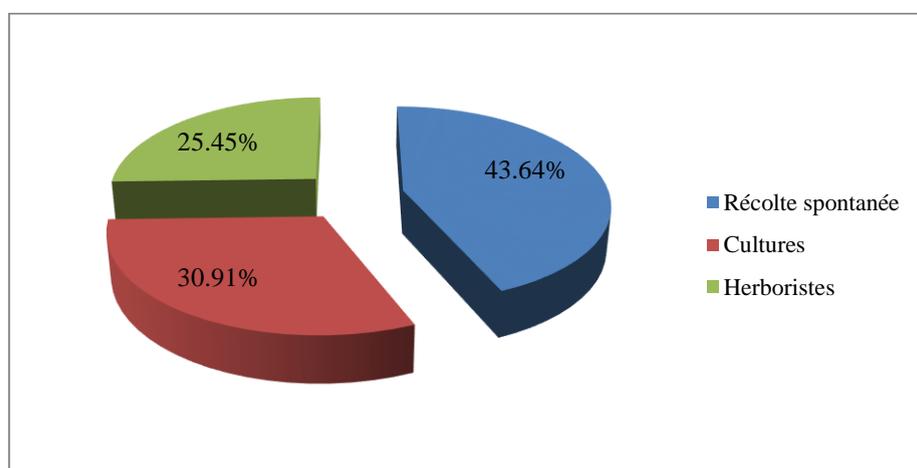


Fig.19. Sources de la plante par les enquêtés

La récolte est étalée sur toute l'année pour 38.18% des personnes qui utilisent la plante (n=84), ceci est dû au fait que c'est une plante vivace dont les feuilles sont persistantes. Pour les autres, elle est récoltée au printemps (27.27%/n=60), peu souvent en hiver (3.64%/n=8) et en été (3.64%/n=8). Reste une frange importante des enquêtés (27.27% /n=60) qui n'ont donné aucune réponse, probablement par méconnaissance de la plante (Fig.20).

Si cette dernière est utilisée pour ses huiles essentielles, la récolte doit se faire en fin de printemps ou en été (entre Mai et Juillet), car c'est à cette période de l'année que la plante est riche en principes actifs [126].

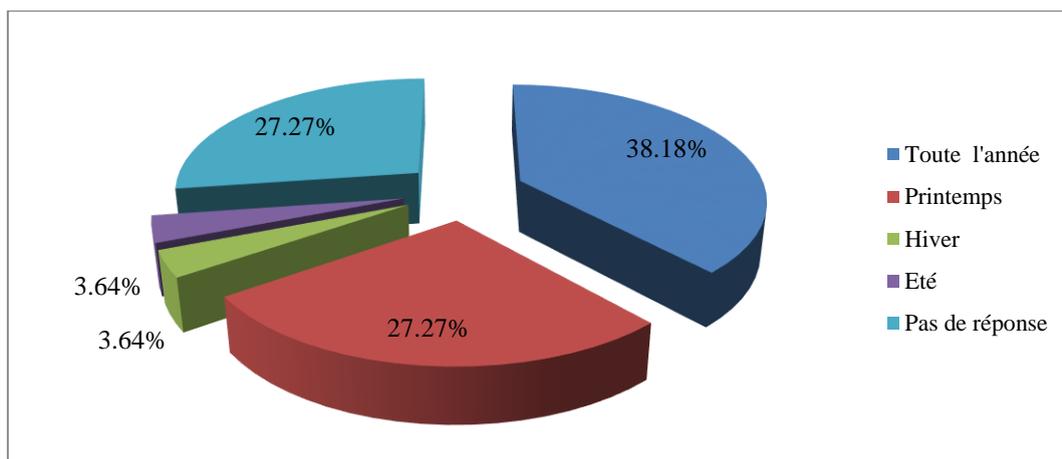


Fig.20. Périodes de récolte de la plante par les enquêtés

3.4. Parties utilisées

Parmi les différentes parties de la plante, les feuilles sont les plus utilisées avec un taux de 32.73% (n=72), suivis des fleurs (3.64% /n=8) et seulement 1.82% des interrogés utilisent les racines (n=4).

Plus de 27% (27.27%/ n=60) des sujets interrogés font un usage combiné : feuilles et fleurs (20%) ou feuilles et tiges (5.45%) et enfin feuilles et racine (1.82%).

Personne n'évoque l'usage de la plante entière comme c'est le cas en phytothérapie [23]. Plus de 16% des sujets (n=36) utilisent le Géranium rosat pour décorer leurs balcons et leurs jardins. Enfin, 40 interrogés (18.18%) n'ont pas mentionné la partie utilisée de la plante (Fig.21).

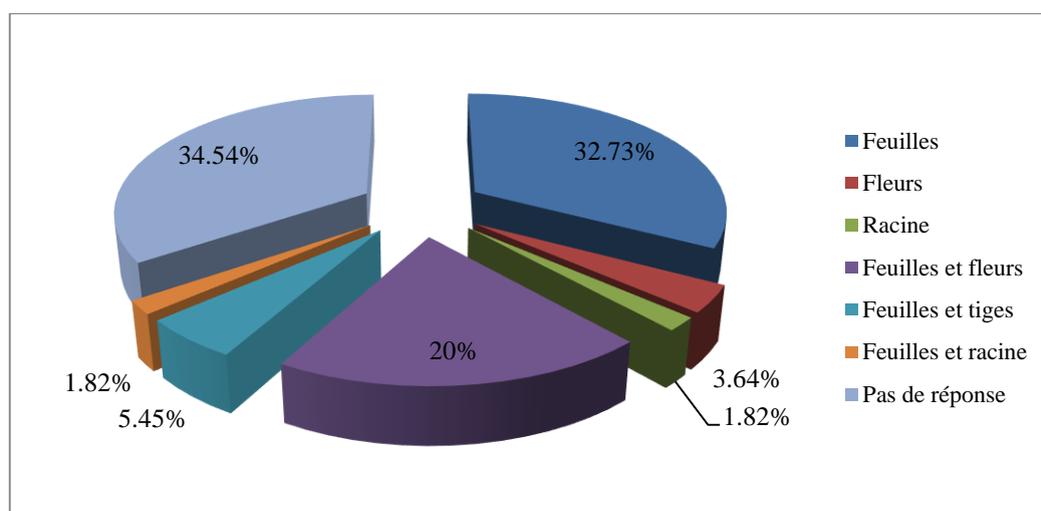


Fig.21. Parties utilisés de la plante selon les enquêtés

3.5. Voies d'utilisation de la plante

Le *Pelargonium graveolens* est pour plus d'un enquêté sur trois, utilisé à l'état frais (40%/ n=88) et 12.73% (n=28) l'utilisent après séchage. Pour peu (9.09%/n=20), la plante est aussi utilisée sous forme fraîche ou séchée selon la disponibilité. Une large frange d'interrogés (38.18%/ n=84) reste sans avis.

La durée de séchage, la température, l'humidité et autres conditions devront être déterminées en fonction de la partie concernée de la plante (racine, feuille, tige, fleur, etc.) et de l'existence de constituants volatils tels que les huiles essentielles [220].

L'usage de *Pelargonium graveolens* par voie interne est plus répandu que par voie externe avec un pourcentage de 34.54% contre 10.92% (Fig.22). Néanmoins, 20% des interrogés utilisent les deux voies, ce qui démontre la variabilité et la diversité des propriétés thérapeutiques de cette plante. En effet, cette dernière peut être utilisée par voie orale comme infusion ou additif alimentaire de même qu'elle peut être utilisée comme cataplasme [85,92,135,221,222].

Plus de 34% des enquêtés utilisant la plante (34.54%) n'ont pas répondu à cette question.

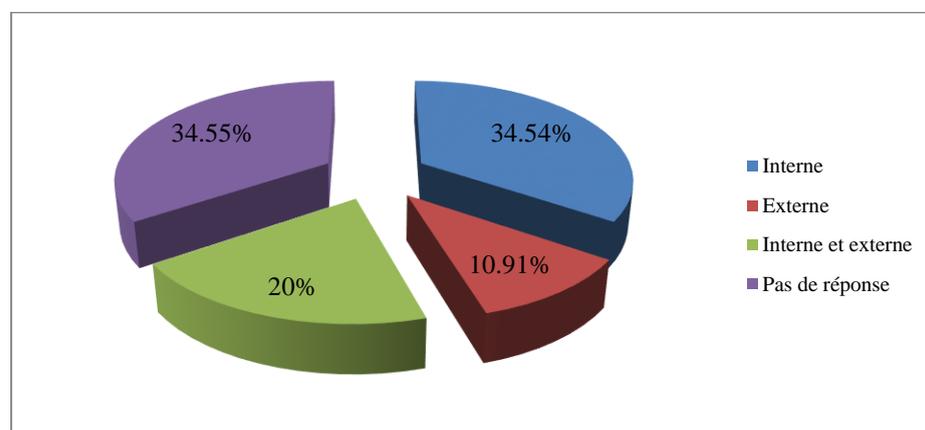


Fig.22. Voies d'utilisation de la plante par les enquêtés

3.6. Pathologies traitées par la plante

Pour les interrogés, la médecine traditionnelle utilise *Pelargonium graveolens* pour traiter plusieurs pathologies (Fig.23). On cite : le vertige (9.53%), les maux de tête (9.53%), les maux d'estomac (9.53%), le traitement des cheveux (7.14%), l'asthme (7.14%), la grippe (7.14%), les douleurs menstruelles (4.76%), les problèmes dermatologiques (4.76%), la tension artérielle (2.38%), le stress (2.38%), le diabète (4.76%), les douleurs abdominales

(2.38%), les maux de gorge (2.38%), les flatulences (2.38%), la mauvaise circulation sanguine (2.38%), le rhumatisme (2.38%) et les douleurs musculaires (2.38%).

Près de 17% des interrogés utilisent cette plante pour le bien être, dans les bains ou comme huile de massage.

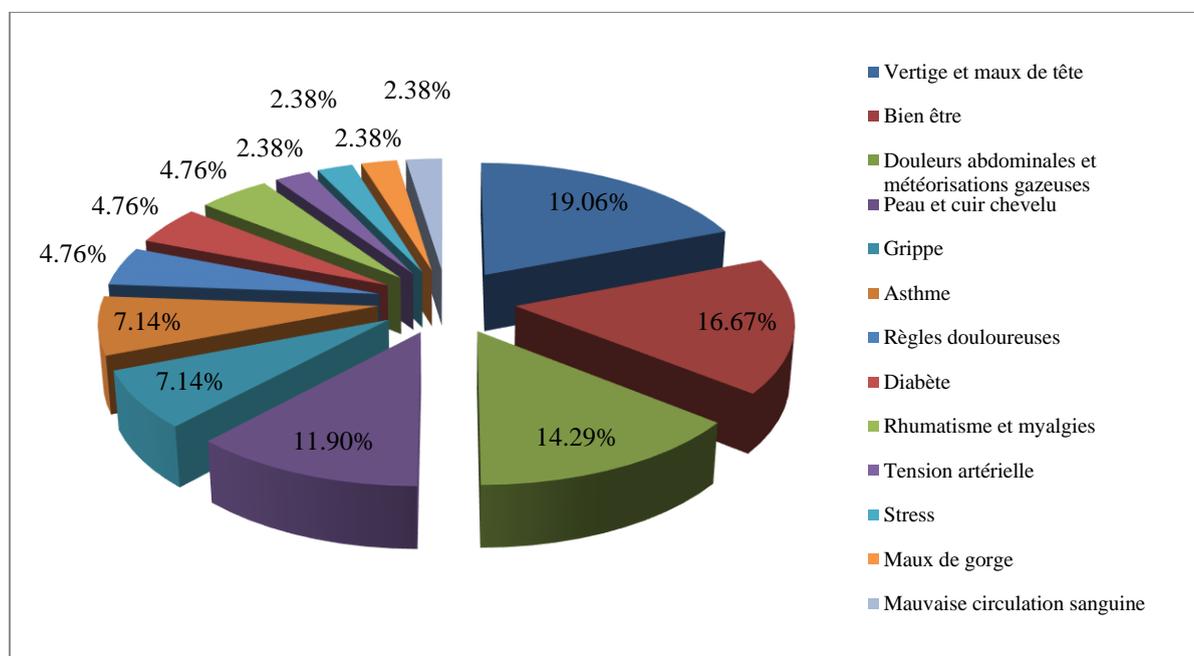


Fig.23. Pathologies traitées par *Pelargonium graveolens* selon les enquêtés

Ces résultats ne constituent en rien une surprise vu que le *Pelargonium graveolens* possède une action anti-inflammatoire et antiseptique de premier ordre. Il est utilisé pour combattre toutes les inflammations, en particulier celles de la bouche et de la gorge. On l'utilise en applications locales, en bains de bouche, dans le dentifrice ou en gargarismes pour combattre les aphtes, les maux de gorge, l'angine, les stomatites et les glossites ou pour soulager les gencives douloureuses.

Grace à son action équilibrante sur le système nerveux, il stimule les glandes surrénales ; aussi, il soulage les personnes souffrant de stress ou d'état dépressif, aide à se détendre et atténue la fatigue.

Il stimule la régénération des cellules au niveau cutané en rendant la peau plus lumineuse et en prévenant le vieillissement et la formation des rides. Il est efficace sur les peaux grasses comme sur les peaux sèches car il régule la production de sébum. Il soigne les mycoses, le zona, les brûlures, les engelures, le prurit et autres pédiculoses [23].

Grâce à son action au niveau hormonal, le Géranium apaise les troubles liés à la ménopause et au cycle féminin. Ses propriétés diurétiques et stimulantes sur le système lymphatique lui permettent de combattre la rétention d'eau et la cellulite, en éliminant en même temps les toxines présentes dans le corps [23].

Pelargonium graveolens est également utilisé dans le traitement des troubles digestifs, des ulcères d'estomac, du diabète, des lithiases urinaires, des hémorroïdes, des infections génitales et des inflammations des seins. Cette plante est aussi connue pour son action vermifuge, antigrippale et antirhumatismale [85,92,135,221,222].

En diffusion ou en application directe sur la peau, sur les vêtements ou sur le lit, le Géranium éloigne les insectes, surtout quand il est associé à la citronnelle [23].

3.7. Utilisation de la plante seule ou en association

Le Géranium rosat peut être utilisé seul ou en association [135]. Dans notre étude, l'usage seul semble être le plus répandu (34.55%) et 29.09% l'utilisent mélangée, alors que 10.91% des sujets l'utilisent dans les deux cas selon le besoin et la disponibilité.

On compte 25.45% des interrogés qui n'ont pas donné leur avis concernant cette question (Fig.24).

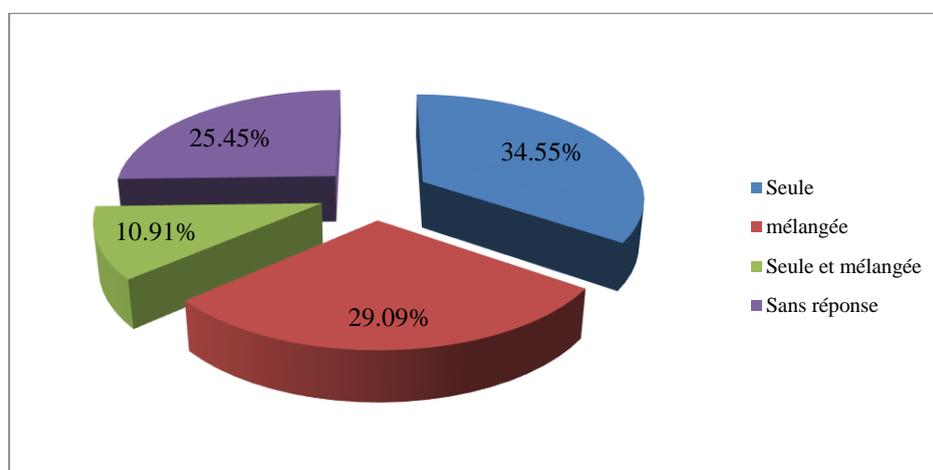


Fig.24. Utilisation de la plante seule ou en association selon les enquêtés

3.8. Mode de préparation et fréquence d'utilisation de la plante

Afin de faciliter l'administration du principe actif, plusieurs modes de préparations sont employés, à savoir la décoction, l'infusion, la fumigation, le cataplasme, etc. [135].

D'après les résultats obtenus on constate que 40% des utilisateurs de la plante n'ont pas répondu à cette question. Les 60% restant déclarent utiliser le Géranium rosat en le

préparant de différentes manières en fonction de son utilisation (Fig.25). Il est utilisé principalement en infusion, mais aussi en cataplasme, en huile essentielle ou comme arôme.

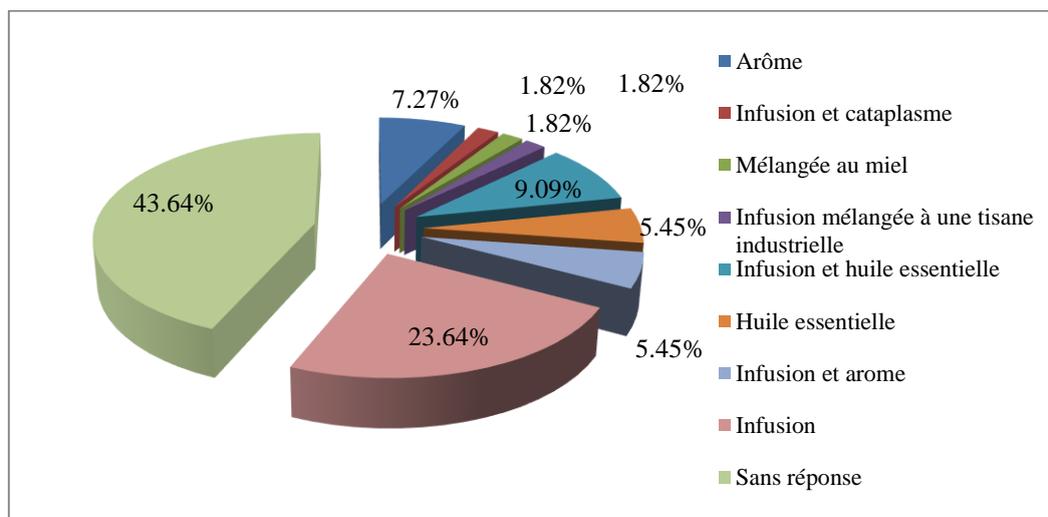


Fig.25. Formes d'utilisation de la plante selon les enquêtés

Compte tenu de la fréquence d'utilisation de la plante, plus de 58% des enquêtés n'ont pas répondu à la question. Les 41.82% restant évoquent une fréquence variable (Fig.26). En effet, on note que la plante est utilisée rarement (56.50%), mais aussi, de temps en temps (21.74%), deux à trois fois par semaine (13.06%) et plus de 8% des usagers (8.70%) l'utilisent une fois par jour.

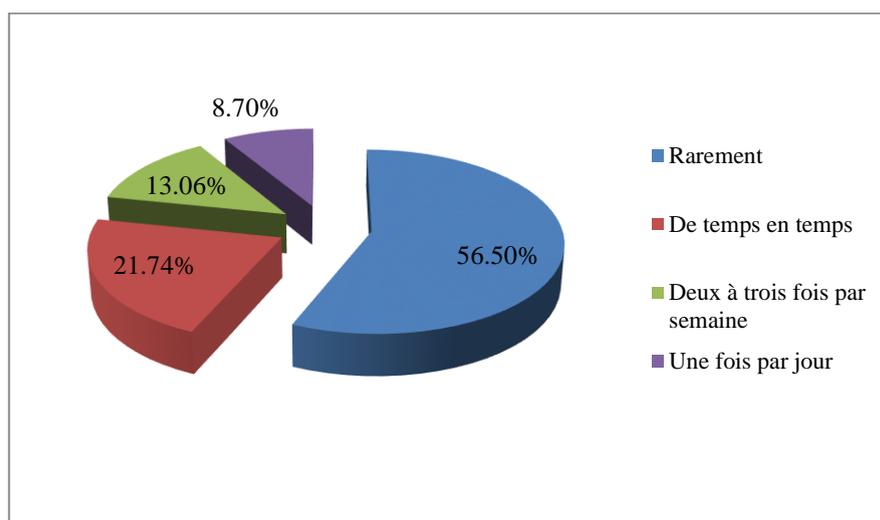


Fig.26. Fréquence d'utilisation de la plante par les enquêtés

Le Géranium rosat est une plante à huile essentielle, la dose recommandée de cette dernière est de 0.2 g par jour au maximum [223].

3.9. Population cible

La plante peut être utilisée par toutes personnes pour 41.82% des interrogés. Alors qu'on rapporte que sans avis médical et devant le manque d'informations sur les conséquences toxiques et potentiellement tératogènes de ses constituants, le Géranium rosat est déconseillé aux femmes enceintes et allaitantes. Par ailleurs, il est proscrit pour les enfants en bas âge et personnes ayant la peau sensible. En effet, de part l'immaturation de leur peau, ces personnes possèdent une perméabilité cutanée largement plus importante et donc un risque d'absorption et d'action systémique toxique important par simple usage externe [23,223].

On remarque aussi qu'elle n'est utilisée que par les adultes pour 14.55% des interrogés et uniquement par les femmes pour 9.09% des sujets. A noter que 34.54% des enquêtés n'ont pas donné de réponse (Fig.27).

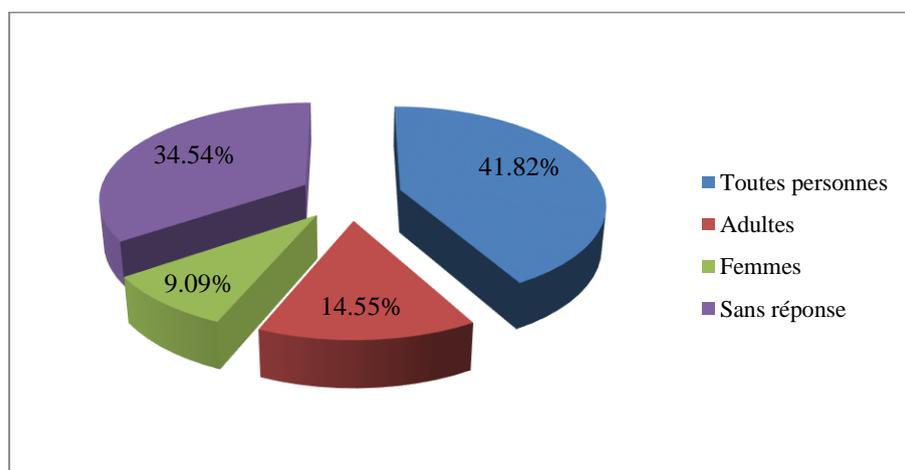


Fig.27. Usagers de la plante selon les enquêtés

3.10. Période de prise

L'usage de *Pelargonium graveolens*, sous toutes formes confondues pour les sujets considérés dans notre enquête se fait le soir (30.95%) ; le matin (11.9%) ; matin et soir (4.77%).

Cette prise se fait généralement après les repas (84.60%). Cependant, pour 15.40% des interrogés, elle se fait avant les repas.

On compte que 52.38% des utilisateurs n'ont pas répondu à cette question (Fig.28).

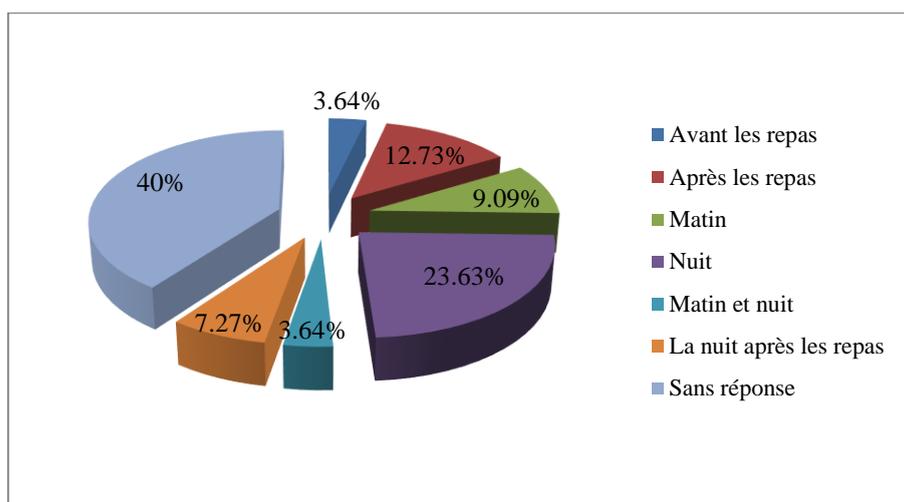


Fig.28. Moments de prise selon les enquêtés

3.11. Effet de la drogue

Pour plus de 38% des interrogés, l'effet prend du temps avant d'apparaître contre 18.18% qui pensent qu'il suit immédiatement l'utilisation de la plante (Fig.29).

Les autres enquêtés n'ont pas donné de réponse (43.64%).

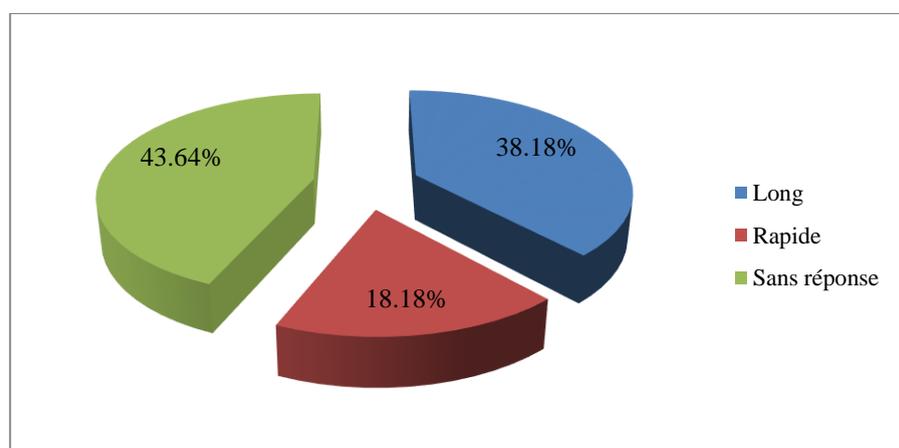


Fig.29. Temps de latence avant début d'effets selon les enquêtés

L'usage de Géranium rosat à des fins curatives est enregistré pour 27.28% d'individus interrogés. Non moins importante est la proportion des usagers à des fins curatives et préventives à la fois (16.36%) et seul 9.09% des cas, l'utilisent dans un but préventif (Fig.30).

Environ la moitié (47.27%) des interrogés n'ont pas répondu, ces derniers l'utiliseraient à des fins autres que thérapeutiques.

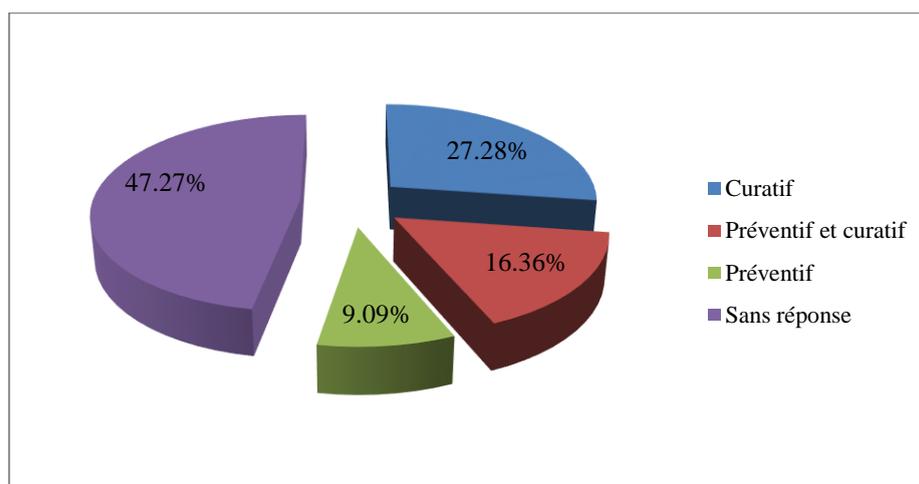


Fig.30. Effets escomptés de l'usage de la plante selon les enquêtés

3.12. Effets indésirables

Aucun désagrément lié à l'utilisation de cette plante n'est évoqué par les sujets interrogés à l'exception de deux personnes ; la première a mentionné l'irritation (0.45%) et la seconde, sa saveur amère (0.45%) (Fig.31).

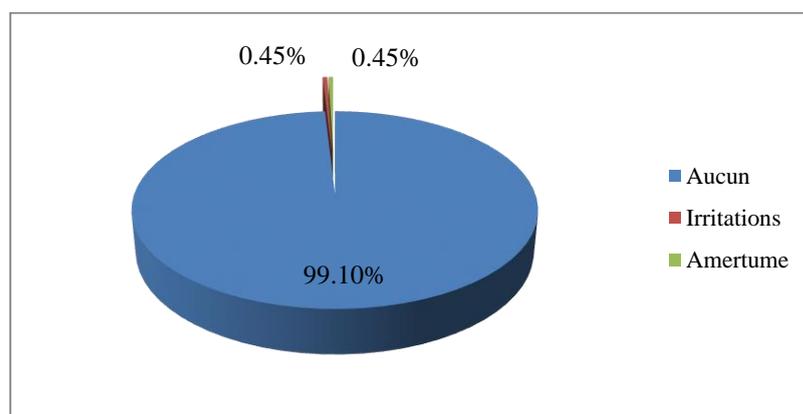


Fig.31. Effets indésirables de la plante selon les enquêtés

Les effets secondaires liés à l'utilisation de Géranium rosat sont rares. Certains ouvrages mentionnent la possibilité d'allergie et d'irritation cutanée imposant l'arrêt immédiat de l'utilisation de la drogue [223].

En résumé de l'enquête ethnobotanique, il ressort qu'une grande proportion de la population utilise les PAM essentiellement lors d'atteintes de la sphère ORL et du système digestif. Les femmes et les hommes ont un savoir médicinal partagé, avec un avantage pour les femmes.

Le *Pelargonium graveolens*, connu surtout sous le nom dialectal de « *Attercha* » est peu utilisé en Algérie. Il est surtout connu pour son aspect décoratif bien qu'il possède de grandes vertus aromatiques et médicinales grâce à ses effets antibactérien, antifongique, insecticide, antiseptique, cicatrisant, anti-inflammatoire, hémostatique, antioxydant, analgique, relaxant, antidiabétique, tonifiant, parasiticide, régénérateur des tissus cutanés et stimulant [13,23,115,118,224-232].

Les résultats de l'enquête montrent également que le feuillage constitue la partie la plus utilisée de la plante et en majorité sous sa forme fraîche et en d'infusion. *P. graveolens* est préconisé pour divers maux, essentiellement, le vertige, les maux de tête, d'estomac, etc.

II. Matériel végétal

1. Teneur en eau

L'eau contribue au maintien de la structure cellulaire et permet le déroulement des réactions métaboliques. Localisée surtout dans les vacuoles qui occupent la plus grande partie des cellules végétales, elle y est sous pression (turgescence) et contribue au port érigé des plantes herbacées.

Le système circulatoire des végétaux est ouvert sur l'atmosphère et la transpiration entraîne des pertes d'eau abondantes que l'absorption compense. Des mécanismes régulateurs et des adaptations morphologiques ou physiologiques maintiennent l'équilibre hydrique, que des pratiques culturales permettent de conserver et d'améliorer dans des conditions climatiques défavorables.

Le taux d'humidité calculé de cette plante est de 70.16%. Ce pourcentage entre dans la moyenne de teneur en eau des végétaux qui se situe entre 60 et près de 90% de leur poids frais, contrairement aux graines et spores pour lesquelles elle n'est que de 5 à 15% [233]. Cette valeur précise de la teneur en eau dépend des conditions ambiantes, car le volume des cavités intra-tissulaires et surtout des vacuoles varient réversiblement grâce à l'élasticité des parois.

La teneur en matière sèche est alors de 29.84%. Le séchage des plantes médicinales se fait généralement à l'air libre. Il permet la stabilisation des produits hydratés, par la réduction de la teneur en eau et l'abaissement subséquent de l'activité de l'eau de ces produits. Le développement microbien et l'activité enzymatique sont alors inhibés [234].

2. Caractérisation microscopique des coupes histologiques

La technique de la double coloration pratiquée sur des coupes histologiques de feuilles et tiges de *Pelargonium graveolens* (Fig.32) nous a permis de différencier plusieurs tissus identifiables au microscope optique aux grossissements x10 puis x40.

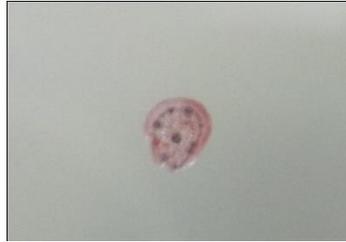


Fig.32. Coupe transversale de la tige de *P. graveolens*
(Lab. Biologie végétale-UBMA, 2011)

2.1. Feuille

L'observation au microscope optique de la coupe transversale de la feuille de *Pelargonium graveolens* montre la présence de tous les caractères d'une feuille de Dicotylédones comme le montre si bien la figure 33 ci-dessous.

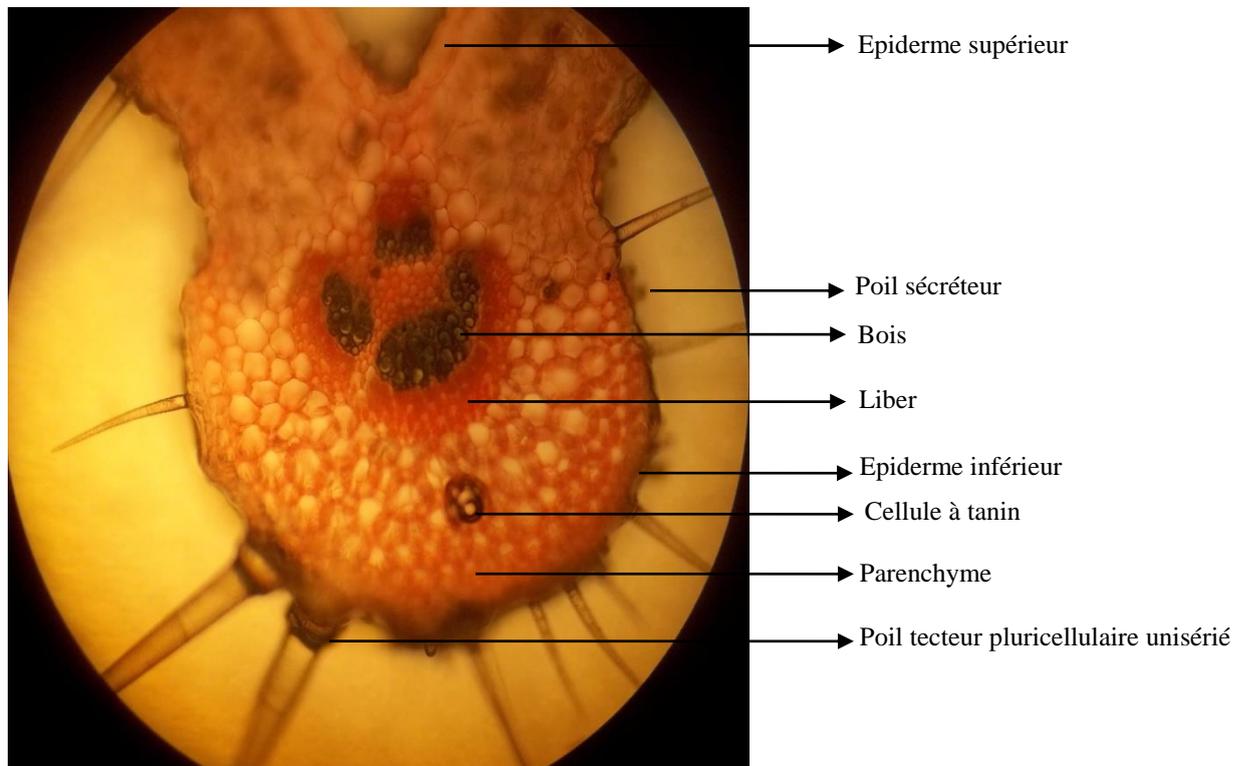


Fig.33. Coupe anatomique de la feuille de *P. graveolens* (MO : G x40)

On distingue une assise superficielle constituée par une seule couche de cellules, l'épiderme supérieur et l'épiderme inférieur. Ces deux derniers sont pourvus de

prolongements épidermiques sous forme de poils : poils tecteurs, pluricellulaires unisériés avec un nombre très élevé et des poils sécréteurs glandulaires.

Au centre de la coupe, on distingue le liber qui est sur la face inférieure et le bois sur la face supérieure. On constate la présence de cellules à tanins.

2.2. Tige

La coupe transversale réalisée au niveau de la tige de *Pelargonium graveolens* (Fig.34), possède les mêmes caractères des tiges des Dicotylédones avec la présence des poils tecteurs et sécréteurs mais avec un nombre réduit par rapport à celui des feuilles.

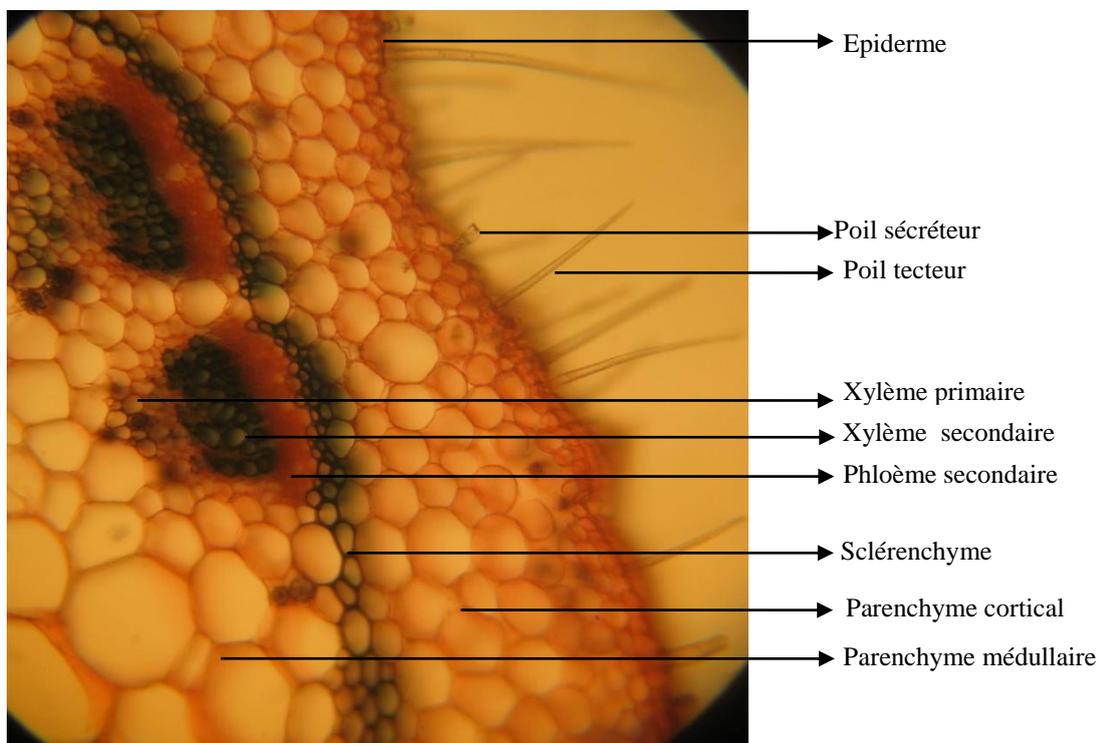


Fig.34. Coupe anatomique de la tige de *Pelargonium graveolens* (MO : Gx40)

De plus, on de distingue également:

- Epiderme : représenté par une seule assise de petites cellules cellulosiques allongées.
- Parenchyme cortical : formé par plusieurs couches de cellules à paroi mince et pecto-cellulosiques allongées.
- Le sclérenchyme : tissu de soutien des végétaux âgés, formé de petites cellules à paroi épaisses.

- Le phloème : occupe la partie externe, ces cellules sont vivantes mais sont sans noyau, à paroi cellulosique et sont représentées par des tubes criblés qui permettent la conduction de la sève élaborée.
- Xylème : situées vers l'intérieur, ces cellules sont mortes, leur paroi est partiellement lignifiée, elles sont superposées par rapport au phloème, comportant des vaisseaux de différents types. Leur rôle principal est la conduction de la sève brute.
- Une structure secondaire : xylème et phloème secondaires.
- Parenchyme médullaire formé de cellules à paroi mince et de forme très variable. Il est situé profondément dans l'organe.

❖ Structures sécrétrices

Chez *Pelargonium graveolens*, l'huile essentielle est stockée dans des poils sécréteurs (Fig.35) aussi bien au niveau de la feuille que de la tige. Comme tous les poils sécréteurs, on note une tête arrondie dans laquelle s'accumule l'essence et un pied qui la relie à l'épiderme.

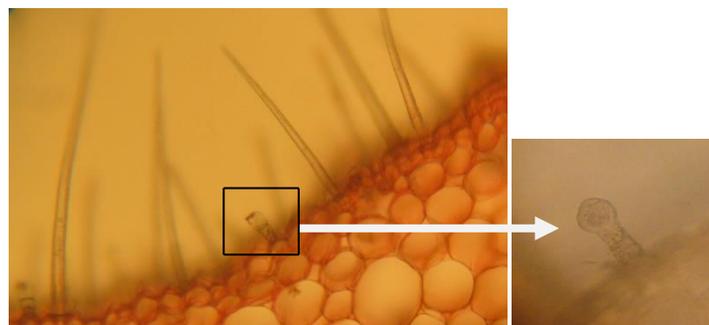


Fig.35. Poil sécréteur (M.O. : Gx40)

L'observation microscopique révèle également la présence de longs poils tecteurs très dispersés et de tailles variables. Ils sont constitués de cellules mortes, remplies d'air. Ils assurent la protection de la plante contre la sécheresse en diminuant la transpiration [130].

III. Cinétique d'extraction et rendement en huile essentielle

1. Etude de la cinétique d'extraction

Les résultats du rendement périodique ou différentiel représentant la variation de la quantité de l'HE recueillie pendant des intervalles de temps bien définis, allant de 30 minutes à 4 heures sont portés sur la courbe du rendement cumulé R(%) en fonction de la durée d'extraction, ci-dessous (Fig.36).

Les résultats montrent que le rendement en huile essentielle est maximal pour une durée d'extraction voisine de 2 heures. Cette dernière assure certainement le meilleur contact entre la vapeur et la matière végétale. En effet, au delà de cette durée, le rendement de l'huile essentielle devient négligeable.

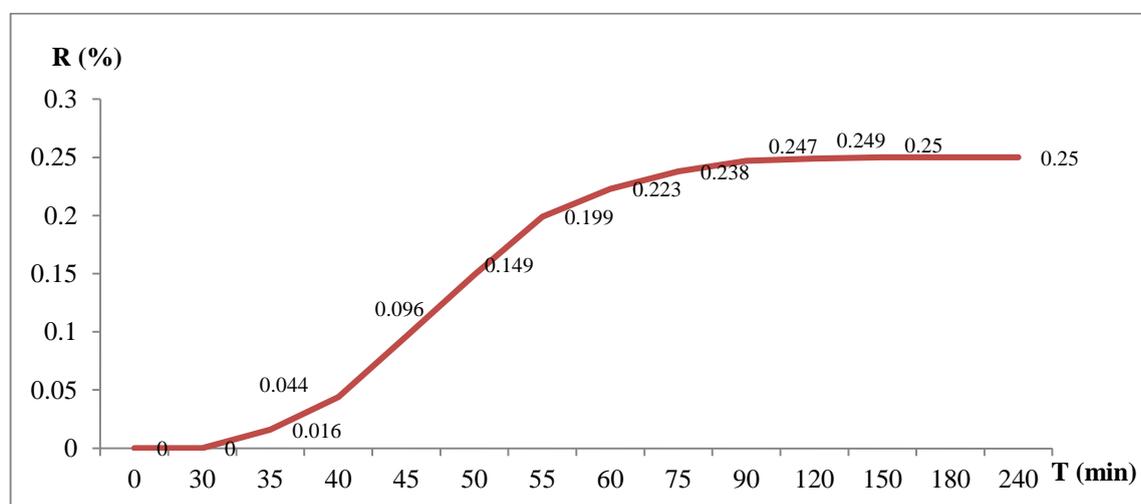


Fig.36. Evolution du rendement en HE en fonction du temps lors de l'hydrodistillation

La cinétique se divise en quatre étapes :

1. *Première étape* [0 - 30min] : nous observons un palier pour un rendement nul, correspondant à la phase de chauffage de la matrice.
2. *Seconde étape* [30 - 60min] : correspond à un saut marqué de la quantité d'HE récupérée où elle atteint son maximum. Cette étape représente l'entraînement des huiles essentielles de la surface de la matière végétale (des sites exogènes) qui sont facilement accessible, ensuite le contact vapeur-huile est établi rapidement.
3. *Troisième étape* [60 - 120min] : correspond à une phase de déclin. Le transfert de l'huile essentielle se fait par diffusion en entrainement de celle-ci vers la surface, depuis les sites endogènes.

4. *Quatrième étape* [120-240min] : la quantité d'HE récupérée devient négligeable jusqu'à l'épuisement total.

Chez les pélagoniums odorants, les structures sécrétrices sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule qui constitue la seule barrière à la libération de l'HE, est rompue à ébullition. Les composés volatils sont aussitôt évaporés d'où la courte durée pour atteindre le pic cumulatif lors de l'extraction. Lorsque les essences sont sous-cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur. Elles seront alors lentement évaporées en comparaison avec les structures sécrétrices superficielles [155,235].

2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle obtenu pendant la période de floraison avoisine les 0.25%. Cette saison est caractérisée par une photopériode optimale propice à la biosynthèse des HEs [126].

Ce rendement est légèrement plus élevé que celui des normes AFNOR (0.2%) ainsi que ceux rapportés par d'autres pays, tels que le Maroc (0.1%), la France (0.15%), l'Ile de la Réunion (0.15), les USA (0.18%) et le Portugal (0.2%). Les variations en teneur d'HEs dépendent de la nature du sol, de l'altitude, de l'exposition à la lumière, de l'âge de la plante, et autres [155].

Le séchage de la plante, avant sa mise en distillation, est un traitement qui a des effets très nets sur le rendement en huile essentielle. Plusieurs travaux ont été menés sur cette question et ont confirmé un phénomène général. Le rendement en huile essentielle, exprimé par rapport à la matière sèche, évolue durant le séchage du matériel végétal avant sa distillation. Il commence dans une première phase, par augmenter très nettement atteignant un maximum en 5 à 6 jours. Puis dans une deuxième phase, il baisse de manière régulière. La durée de la première phase et le niveau du rendement optimal dépendent de l'espèce végétale concernée et des conditions de séchage mises en œuvre.

S. Zrira et B. Benjlali ont cherché à comprendre l'origine de ce phénomène. Après avoir vérifié plusieurs hypothèses, ils ont conclu qu'il s'agit d'un phénomène biologique. La plante et après sa récolte, continue à vivre et son activité de biosynthèse des terpènes et dérivés s'accroît. Il paraît s'agir pour la plante d'un moyen de défense contre le stress

hydrique. C'est ce qui expliquerait l'augmentation des rendements en huiles essentielles pendant la première semaine de la récolte. Après la mort définitive de la plante, toute l'activité de biosynthèse s'arrête et les pertes d'huiles essentielles par évaporation ne sont plus compensées, d'où les baisses des rendements de distillation [236,237].

IV. Etude analytique de l'huile essentielle

Les plus anciens procédés d'évaluation de la qualité de l'huile essentielle sont le nez et le palais, qui permettent de porter un jugement relatif aux usages de l'essence. Mais pour éliminer toute subjectivité, une caractérisation plus précise s'est imposée par la suite, d'où la mise en place de techniques permettant des études précises du produit et par la suite sa caractérisation en référence à des normes internationales.

L'évaluation de la qualité est alors reliée à la détermination des caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques et du profil chromatographique de l'essence.

1. Caractéristiques organoleptiques

- Apparence : liquide et limpide.
- Couleur : jaune à vert clair
- Odeur : rosée et citronnée, caractéristique de la plante.

Les paramètres organoleptiques de notre HE sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR et ISO 4731 [78,139].

2. Paramètres physiques

L'étude comparative des résultats des paramètres physiques déterminés de notre huile essentielle (Tab.07) montrent qu'elle est de qualité qui répond aux normes AFNOR et ISO [78,139].

Tab.07. Tableau comparatif des paramètres physiques de l'HE de *P. graveolens*

| Paramètres | Comores [155] | France [169] | Echantillon Etudié | Référence [AFNOR] |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|
| Densité | 0.892 | 0.905 | 0.890 | de 0.884 à 0.892 |
| Indice de réfraction | 1.466 | 1.4470 | 1.464 | de 1.461 à 1.470 |
| Miscibilité à l'éthanol (v/v) | 3 | 2-3 | 3 | 3-5 |

AFNOR : Association Française de Normalisation

La densité relative constitue un point de repère important, sa valeur permet d'avoir une idée sur la composition chimique de l'huile essentielle [171]. Dans notre étude, la densité de l'HE de *Pelargonium graveolens* est de 0.890, ce qui signifie que les essences de cette plante sont riches en terpènes. C'est aussi le cas pour l'HE originaire des Comores, contrairement à celle de France dont la composition chimique est beaucoup plus complexe.

L'indice de réfraction équivalent à 1.464 se situe dans la moyenne des normes AFNOR. Ceci démontre le degré de pureté de notre produit extrait. Pour certains auteurs, le faible indice de réfraction de la lumière de l'huile favorise son utilisation dans les produits cosmétiques [238]. Elle est soluble dans l'éthanol à 70° (1/3 v/v).

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure insuffisante et seule la connaissance de sa composition chimique est critère de valorisation de l'huile en question. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

3. Profil chromatographique de l'huile essentielle

Après injection de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* dans la colonne de l'appareil, nous avons obtenu le chromatographe suivant (Fig.37), dont chaque pic représente un composé chimique.

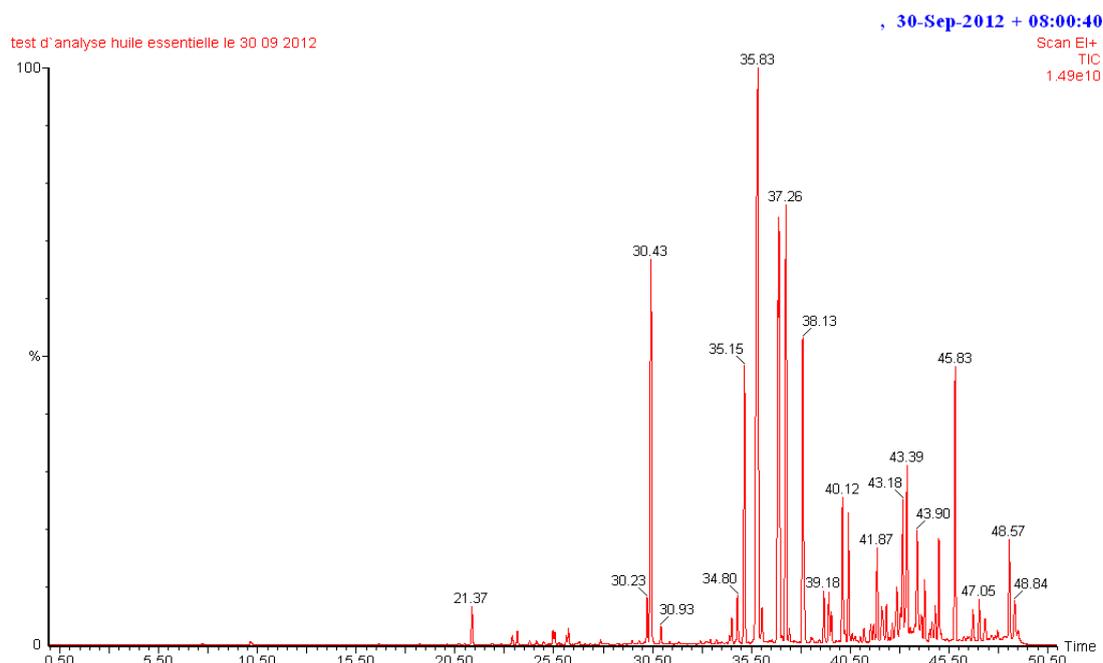


Fig.37. Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*

Les résultats de l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de la composition chimique de l'HE sont listés suivant l'ordre de prédominance dans le tableau 8.

Au total, 40 composés ont été identifiés correspondant à 96.86% par rapport à l'ensemble des constituants isolés. L'huile essentielle est composée principalement de citronellol, de géranol et de formiate de citronellyle, dont la synergie confère une fragrance aromatique unique, rappelant celle de la rose [140,141].

Les autres composants majeurs sont le 10- γ -épi-eudesmol, suivi de l'acétate de géranyle, du linalol, du butyrate de géranyle, du longifolène et de l'isomenthone. Les concentrations des autres constituants sont inférieures à 3%.

Tab.08. Composition chimique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*

| Composés | % | Composés | % |
|----------------------------|-------|----------------------------|------|
| Citronellol | 19.22 | Cis Oxyde de rose | 0.74 |
| Géranol | 14.03 | Isobutyrate de géranyle | 0.73 |
| Formiate de citronellyle | 10.02 | α -Pinène | 0.69 |
| 10- γ -épi-eudesmol | 7.15 | Alloaromadendrène | 0.62 |
| Acétate de géranyle | 6.45 | Propionate de citronellyle | 0.56 |
| Linalol | 5.6 | Menthone | 0.39 |
| Butyrate de géranyle | 4.65 | Trans Oxyde de rose | 0.31 |
| Longifolène | 3.25 | α -Caryophyllène | 0.3 |
| Isomenthone | 3.08 | Acétate de citronellyle | 0.3 |
| β -Bourbonène | 2.75 | Tiglate de citronellyle | 0.29 |
| D-Germacrène | 2.23 | α -Copaène | 0.27 |
| Formiate de géranyle | 2 | Cis- β -Ocimène | 0.26 |
| Tiglate de phénylethyle | 1.89 | Myrcène | 0.23 |
| β -Caryophyllène | 1.71 | Limonène | 0.2 |
| Butyrate de citronellyle | 1.68 | Guaiadiène-6,9 | 0.18 |
| β -Germacrène | 1.03 | Spathulénol | 0.16 |
| Hexanoate de géranyle | 0.97 | Trans- β -Ocimène | 0.14 |
| β -Cubébène | 0.92 | α -Phellandrène | 0.06 |
| α -Cadinène | 0.9 | Cis Oxyde de linalol | 0.06 |
| α -Cubébène | 0.81 | Trans Oxyde de linalol | 0.03 |
| Total | | 96.86% | |

% : Pourcentage

De par le nombre et la diversité de ses constituants, cette huile est complexe et variée. Ces résultats sont proches de ceux trouvés dans les huiles essentielles de *Pelargonium graveolens* d’Egypte, des Comores et de l’Inde dont les principaux composés sont le citronellol, le géraniol et le formiate de citronellyle [13,156,239]. Cependant, une différence quantitative existe pour les constituants majeurs. L’huile essentielle de Géranium d’Algérie est moins riche en citronellol (19.22%) que celle des Comores, d’Egypte et de l’Inde, dont les concentrations atteignent respectivement 29.98%, 27.23% et 21.3%. La teneur en géraniol de l’essence étudiée est de 14.03% contre 38.4% pour celle d’origine indienne, 14.12% pour celle d’origine comorienne et 13.83% pour celle d’origine égyptienne. La quantité en formiate de citronellyle (10.02%) de notre échantillon est plus riche que celle des Comores (9.09%), d’Egypte (7.10 %) et de l’Inde (6.3%).

Le taux de 10- γ -épi-eudesmol est plus important pour l’essence de Géranium étudiée où il est de 7.15%. Il est de 6.47% pour celle de l’Egypte, de 4.9% pour celle de l’Inde et de 0.07% pour celle des Comores. L’acétate de géranyle est un constituant majeur de l’HE algérienne avec un taux de 6.45%, contrairement aux huiles en provenance des autres pays, où son pourcentage n’est que de 0.54% pour l’HE égyptienne, existe sous forme de traces dans l’HE indienne et est totalement absent dans l’HE comorienne. Les différences de concentrations en linalol ne sont pas significatives pour les quatre HEs en provenance de l’Inde, des Comores, d’Algérie et d’Egypte avec des taux de 6.5%, 5.97%, 5.6% et 5.26% respectivement. Le butyrate de géranyle et le longifolène n’ont été identifiés que dans les HEs de Géranium rosat originaire d’Algérie et d’Egypte avec des taux de 4.65% et 1.53% pour le premier composant et de 3.25% et 0.09% pour le second, respectivement. L’huile essentielle étudiée est moins riche en isomenthone (3.08%) par rapport aux HEs des Comores (7.80%), de l’Inde (5.9%) et d’Egypte (5.55%).

Le profil chromatographique de l’essence de la plante étudiée permet de l’associer au chémotype « citronellol » et au cultivar « Egypte ». En effet, cette HE est marquée par un taux important de 10- γ -épi-eudesmol par rapport aux autres cultivars, ainsi que par la présence du guaia-6,9-diène sous forme de traces contrairement aux autres cultivars où son taux est assez important.

Le Rhodinol, fraction composée de citronellol, géraniol et linalol, constitue un taux de 38.85%. L’huile étudiée en est relativement moins riche que celle de la même espèce en provenance de l’Inde (66.2%), des Comores (50.07%) ou d’Egypte (46.32%).

Sur le plan biochimique, cette HE est composée essentiellement d'alcools monoterpéniques, d'esters terpéniques et de sesquiterpènes (Tab.09).

Les alcools sesquiterpéniques, eux-aussi, sont à un taux relativement important, constitués à 98% de 10- γ -épi-eudesmol. Les composés minoritaires appartiennent à la famille des cétones (menthone et isomenthone), des monoterpènes et des oxydes monoterpéniques.

Le taux d'alcools monoterpéniques est de 38.85% pour l'essence de *Géranium* d'Algérie. Ce taux est faible en comparaison à ceux de l'Inde (68.1%), des Comores (53%) et d'Egypte (47%). Les esters terpéniques sont présents à un taux assez important (29.54%) (Comores=18.17%, Egypte=17.4%, Inde=13.7%).

Tab.09. Classes biochimiques identifiées dans l'huile essentielle de *Géranium rosat*

| Classe biochimique | % |
|-----------------------------|--------------|
| Alcools monoterpéniques | 38.85 |
| Esters terpéniques | 29.54 |
| Sesquiterpènes | 14.97 |
| Alcools sesquiterpéniques | 7.31 |
| Cétones monoterpéniques | 3.47 |
| Monoterpènes | 1.58 |
| Etheroxydes monoterpéniques | 1.14 |
| Total | 96.86 |

% : Pourcentage

Les concentrations en sesquiterpènes (14.97%) et en alcools sesquiterpéniques (7.31%) de l'huile de *Pelargonium graveolens* algérienne sont plus importantes que celles des autres pays où elles sont, respectivement, de 11.13% et 6.8% pour l'huile égyptienne, de 8.8% et de 1.26% pour l'HE comorienne et de 1% et 4.9% pour l'essence indienne. Cependant, le taux de cétones monoterpéniques de l'huile étudiée (3.47%) est plus faible (Comores=10.79%, Egypte=7.1%, Inde =5.9%). L'essence étudiée contient une petite quantité de monoterpènes (1.58%) et d'oxydes monoterpéniques (1.14%) au même titre que les huiles obtenues dans les autres pays, avec des pourcentages, respectivement, de 2.08% et 1.72% pour l'huile comorienne, de 1.25% et 2.21% pour l'HE égyptienne et 0.5% et 0.2% pour l'HE indienne. On note l'absence totale d'aldéhydes terpéniques contrairement aux autres HES (Egypte=1.4%, Inde=1.3%, Comores=1.06%), ce qui pourrait être dû à l'identification incomplète de tous les constituants de l'essence.

Les conditions de sol et de climat en Algérie, sont différentes par rapport à celles rencontrées en Egypte, aux Comores et en Inde, lesquelles influencent le profil chimique de cette huile. En effet, la composition chimique des huiles essentielles est affectée par les conditions climatiques et édaphiques, les températures maximales et minimales, la durée d'ensoleillement et le pic des radiations solaires, la pluviométrie, l'altitude, la nature du sol et son pH [240-244]. La composition varie également suivant les organes de la plante concernés, les techniques de séchage et d'extraction, ainsi que les conditions culturelles telles que la date de semis, date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais et les techniques de récolte [20,96,245-247]. Ainsi, la composition chimique dépend de tous ces facteurs qui peuvent orienter la biosynthèse en faveur de certaines molécules terpéniques au dépend d'autres constituants dont la synthèse peut être arrêtée [13,240,241,248-250].

V. Identification des souches

Notre choix s'est porté sur 150 souches bactériennes dont l'identification a permis de les associer aux :

- *Enterobacteriaceae* (n=80/53.33%) : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*.
- Bacilles à Gram négatif non fermentant (n=20/13.34%) : *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*
- Cocci à Gram positif (n=50/33.33%) : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis*.

Le tableau 10 ci-dessous récapitule toutes les souches sélectionnées pour l'étude ainsi que leurs origines de prélèvements.

Tab.10. Liste des souches bactériennes et de leurs origines

| N° souche | Origine du prélèvement | Espèce | N° souche | Origine du prélèvement | Espèce | N° souche | Origine du prélèvement | Espèce |
|-----------|------------------------|-------------------------------|-----------|------------------------|--------------------------------|-----------|------------------------|-------------------------------------|
| 1 | Urine | <i>Escherichia coli</i> | 51 | Urine | <i>Enterobacter cloacae</i> | 101 | Pus | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 2 | Urine | | 52 | Urine | | 102 | Pus | |
| 3 | Urine | | 53 | Urine | | 103 | P.V | |
| 4 | Urine | | 54 | Urine | | 104 | Pus | |
| 5 | Urine | | 55 | Urine | | 105 | Pus | |
| 6 | Urine | | 56 | Urine | | 106 | Pus | |
| 7 | Urine | | 57 | Urine | | 107 | Urine | |
| 8 | Urine | | 58 | Urine | | 108 | Urine | |
| 9 | Urine | | 59 | Urine | | 109 | P.N | |
| 10 | Urine | | 60 | Urine | | 110 | Pus | |
| 11 | Urine | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 61 | Urine | <i>Citrobacter koseri</i> | 111 | P.V | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| 12 | Urine | | 62 | Urine | | 112 | Urine | |
| 13 | Urine | | 63 | Urine | | 113 | Urine | |
| 14 | Urine | | 64 | Urine | | 114 | P.V | |
| 15 | Urine | | 65 | Urine | | 115 | Urine | |
| 16 | Pus | | 66 | Urine | | 116 | Urine | |
| 17 | Urine | | 67 | Urine | | 117 | Sperme | |
| 18 | Urine | | 68 | Urine | | 118 | Urine | |
| 19 | Urine | | 69 | Urine | | 119 | Urine | |
| 20 | Urine | | 70 | Urine | | 120 | Urine | |
| 21 | Sperme | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 71 | Urine | <i>Citrobacter freundii</i> | 121 | Urine | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |
| 22 | Urine | | 72 | Urine | | 122 | Sperme | |
| 23 | Urine | | 73 | Urine | | 123 | Sperme | |
| 24 | P.V | | 74 | Urine | | 124 | Sperme | |
| 25 | Pus | | 75 | Urine | | 125 | Urine | |
| 26 | Urine | | 76 | Urine | | 126 | Urine | |
| 27 | Urine | | 77 | Urine | | 127 | Sperme | |
| 28 | Urine | | 78 | Urine | | 128 | Urine | |
| 29 | Urine | | 79 | Urine | | 129 | Urine | |
| 30 | Pus | | 80 | Urine | | 130 | Urine | |
| 31 | Urine | <i>Proteus mirabilis</i> | 81 | Pus | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 131 | P.V | <i>Streptococcus agalactiae</i> |
| 32 | Pus | | 82 | Pus | | 132 | P.V | |
| 33 | Urine | | 83 | Pus | | 133 | P.G | |
| 34 | Urine | | 84 | Pus | | 134 | Urine | |
| 35 | Urine | | 85 | Pus | | 135 | Urine | |
| 36 | Urine | | 86 | Urine | | 136 | Urine | |
| 37 | Pus | | 87 | Pus | | 137 | P.G | |
| 38 | P.V | | 88 | Pus | | 138 | Urine | |
| 39 | Urine | | 89 | Pus | | 139 | Urine | |
| 40 | Urine | | 90 | Urine | | 140 | P.V | |
| 41 | Urine | <i>Enterobacter sakazakii</i> | 91 | Pus | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 141 | Urine | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 42 | Urine | | 92 | Urine | | 142 | Urine | |
| 43 | Urine | | 93 | Urine | | 143 | Urine | |
| 44 | Urine | | 94 | Urine | | 144 | Urine | |
| 45 | Urine | | 95 | Pus | | 145 | Pus | |
| 46 | Urine | | 96 | Urine | | 146 | Urine | |
| 47 | Urine | | 97 | Urine | | 147 | Urine | |
| 48 | Urine | | 98 | Urine | | 148 | Pus | |
| 49 | Urine | | 99 | Urine | | 149 | Urine | |
| 50 | Urine | | 100 | Urine | | 150 | Urine | |

PV : prélèvement vaginal ; PN : prélèvement nasal ; PG : prélèvement de gorge

VI. Sensibilité aux antibiotiques

Différents seuils de sensibilité des souches bactériennes testées ressortent des résultats l'antibiogramme. Nous avons retenu 10 souches de chaque espèce, résistantes à au moins trois antibiotiques de familles différentes. Il s'agit donc de souches multirésistantes aux antibiotiques.

1. *Enterobacteriaceae*

Parmi les 80 souches d'entérobactéries testées, 90% proviennent d'infections urinaires. Ces infections sont souvent traitées par C3G seules ou associées aux aminosides, par les fluoroquinolones, la fosfomycine ou encore la nitroxoline [251].

Le taux de résistance des souches testées aux antibiotiques est assez élevé (Fig.38), avoisinant au moins les 20%. Il dépasse 62% pour les β -lactamines, 66 % pour la fosfomycine et 82% pour la nitroxoline. Résultats attendus vu que ces antibiotiques sont très utilisés dans les infections urinaires [251]. Il reste assez élevé dépassant 40% pour les quinolones et les nitrofuranes. Cependant, le taux de résistance est plus ou moins faible pour les aminosides testés.

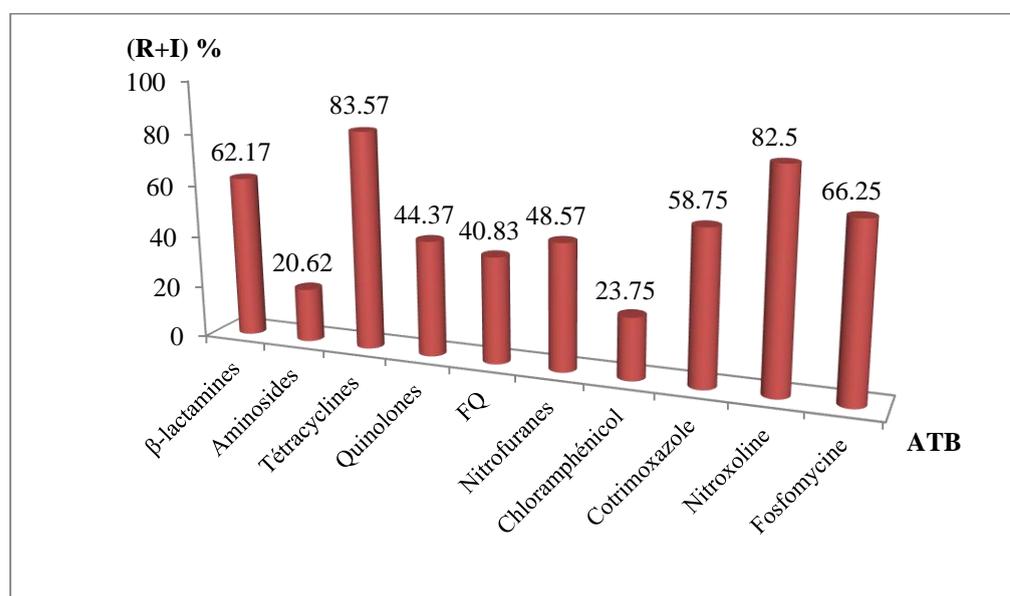


Fig.38. Résistance aux antibiotiques des *Enterobacteriaceae* testées

Près de 25% des entérobactéries testées sont productrices de β -lactamases à spectre élargi. Le réseau national de la surveillance de l'antibiorésistance rapporte un taux de 30.28% de ces souches en milieu hospitalier [252]. Ce taux, assez élevé, peut être expliqué par le fait

que la majorité des souches sont isolées des urines de patients souffrants d'infections, connues comme trainantes et donc les bactéries responsables seraient résistantes aux antibiotiques.

Ces souches *BLSE*⁺ sont associées à différents genres de cette famille : *Escherichia coli* (10%/n=02), *Klebsiella pneumoniae* (25%/n=05), *Proteus mirabilis* (05%/n=01), *Enterobacter sakazakii* (10%/n=2), *Enterobacter cloacae* (20%/n=04), *Citrobacter koseri* (10%/n= 02) et *Citrobacter freundii* (20%/n=04).

La fréquence d'isolement à l'hôpital, des souches *BLSE*⁺ est de 17.31% pour *E. coli*, 57.66% pour *K. pneumoniae*, 39.87% pour *Enterobacter sp.* et 13.02% pour *Proteus sp.* [252].

La majorité des études montrent que *E. coli* est la bactérie la plus impliquée en pathologie infectieuse aussi bien en milieu hospitalier qu'en pratique de ville. Suivant les études, elle est responsable de 40% à 70% des infections urinaires en milieu hospitalier et environ 70% en ville [253-256]. Malgré cette prédominance, la production de *BLSE* n'est pas très importante pour cette bactérie comparée à *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* et *Citrobacter*.

En une dizaine d'années, en Europe, le taux de souches *E. coli* productrices de *BLSE* est passé de 18.5% à 60%. Le même constat, est enregistré avec les céphalosporines de 3^{ème} génération [257].

Autre la production de *BLSE*, de l'étude des phénotypes de résistance, il en ressort que 15% des souches possèdent une céphalosporinase, 27.5% une pénicillinase de haut niveau, 16.25% une pénicillinase de bas niveau, 12.5% ayant une pénicillinase résistante aux inhibiteurs de β -lactamases et 3.75% sont dépourvus de β -lactamases.

2. Bacilles à Gram négatif non fermentant

Acinetobacter baumannii présente plusieurs résistances naturelles aux antibiotiques et peut acquérir de multiples résistances qui sont particulièrement préoccupantes et pouvant être à l'origine d'un enjeu thérapeutique [258]. Les spécimens testés sont résistants aux antibiotiques et 80% producteurs de *BLSE* (Fig.39). Le réseau national de surveillance de l'antibiorésistance ne rapporte que 14.18% de production de *BLSE* [252]. Cependant, ces données n'ont été fournies que par 8 laboratoires participants. La même source révèle que 45.32% des isolats d'*Acinetobacter* sont résistants à l'imipénème, alors qu'on note une absence totale de résistance à cet antibiotique dans notre étude.

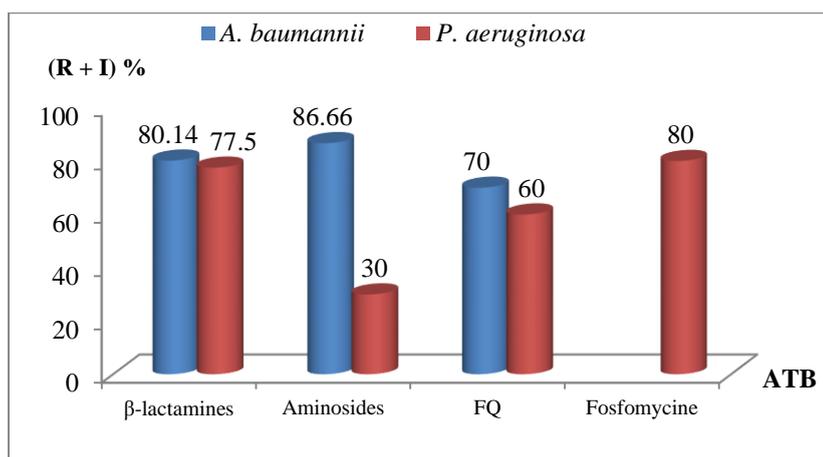


Fig.39. Résistance aux antibiotiques des souches *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* testées

Non moins importante est la résistance aux aminocyclitols et à la ciprofloxacine. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Touati et *al.*, où la résistance de ces souches isolées en milieu hospitalier est de 97.78 % pour les β-lactamines, 55% aux aminocyclitols et de 100% à la ciprofloxacine [259].

Selon les données de l'année 2011 du réseau national déjà cité, la résistance de *Acinetobacter baumannii* est aujourd'hui alarmante, pour les principales familles d'antibiotiques utilisées en thérapeutique telles : les β-lactamines avec 75.4% à la ticarcilline ; 77.1% à la piperacilline ; 74% à la ceftazidime, les aminocyclitols avec 54.3% à la gentamicine ; 50.6% à la tobramycine ; 53.1% à l'amikacine et les fluoroquinolones avec 65.2% à la ciprofloxacine. Alors qu'en l'an 2000 la résistance n'était qu'à 61% pour la ceftazidime, 10.1% pour l'imipénème et 21% pour les fluoroquinolones. De plus, plusieurs mécanismes de résistance sont décrits chez cette bactérie avec une distribution cosmopolite. L'émergence de la résistance aux carbapénèmes ces dernières années est particulièrement préoccupante [258].

La résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* testées est relativement moins importante et même la production de *BLSE* reste voisine de 30% des souches. Par ailleurs, on enregistre un taux de résistance de 90% à la ceftazidime et 60% à la ciprofloxacine. En milieu hospitalier, le réseau national de la surveillance de l'antibiorésistance et le service de réanimations de la ville d'Annaba enregistrent des taux de résistance de *Pelargonium aeruginosa* à la ceftazidime de 15.05% et 16.6% et à la ciprofloxacine de 8.57% et 20% respectivement [252,260].

La résistance aux aminosides est relativement moins importante. Elle est majoritairement liée à l'acquisition de gènes d'enzymes inactivatrices. Il existe trois grandes classes d'enzymes, les aminosides phospho-transférases (APH), les nucléotidyltransférases (ANT), et les acétyl-transférases (AAC).

Chez les bactéries à Gram négatif, différents gènes de résistance peuvent être hébergés par la même bactérie. Les AAC(6')-I inactivent la nétilmicine, la tobramycine et l'amikacine mais non la gentamicine, alors que les AAC(6')-II inactivent la gentamicine mais pas l'amikacine [261].

3. Cocci à Gram positif

La sensibilité des cocci à Gram positif aux antibiotiques est variable. En effet, les souches de *Staphylococcus* sont moins résistantes que celles de *Streptococcus* et *Enterococcus*.

3.1. *Staphylococcus*

Les souches de *Staphylococcus* présentent un taux élevé de résistance aux β -lactamines et 40% sont de type *MRSA* (Fig.40). Le réseau national de la surveillance de l'antibiorésistance enregistre un taux similaire en milieu hospitalier et inférieur chez les patients externes (24.76%) [252].

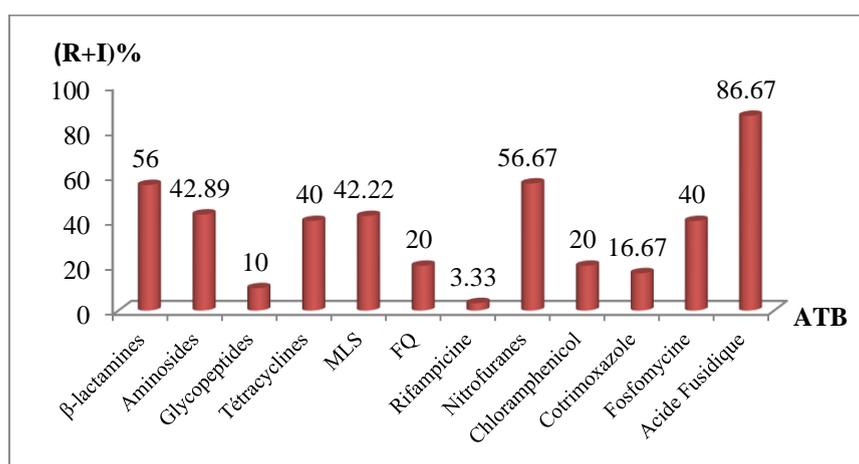


Fig.40. Résistance aux antibiotiques des souches *Staphylococcus sp.* testées

Le réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne *EARS* (*European Antimicrobial Resistance Surveillance*) rapporte une diminution de souches résistantes à la méthiciline entre 2001 à 2013 (de 33.2% à 18%) [257,262].

Les souches *MRSA* isolées et considérées dans notre étude sont aussi multirésistantes aux antibiotiques avec 100% de résistance à l'acide fusidique, 75% à la gentamicine et à l'érythromycine et 25% à la ciprofloxacine et au cotrimoxazole.

Les staphylocoques à coagulase négative résistants à la méthiciline représentent 30% des souches. Le réseau national algérien ne rapporte rien à ce sujet, cependant, en Europe, la résistance à la méthiciline a atteint un niveau très élevé chez ces bactéries (de 65 à 80%), même dans les pays nordiques (30 à 40%). Il ressort une différence non significative concernant le caractère de résistance à la méthiciline. C'est une preuve d'une transmission horizontale de la résistance entre les staphylocoques à coagulase négative et les souches de *Staphylococcus aureus* déjà rapporté précédemment [261].

Les souches testées présentent également un taux élevé de résistance à l'acide fusidique et aux nitrofuranes. Il avoisine les 40% pour les aminosides, tétracyclines, MLS et la fosfomycine.

Pour les fluoroquinolones, le chloramphénicol et le cotrimoxazole, le taux de résistance est compris entre 10 et 20% des staphylocoques testés. Il est inférieur à 10% pour les autres antibiotiques, à savoir, les glycopeptides et la rifampicine. En milieu hospitalier, le bilan de l'année 2011 ne rapporte aucune souche résistante ou intermédiaire à la vancomycine [252].

3.2. *Streptococcus* et *Enterococcus*

Streptococcus agalactiae montre une importante résistance aux β -lactamines, aminosides, glycopeptides, tétracyclines, rifampicine et sulfamides testés, mais reste sensible à la fosfomycine (Fig.41).

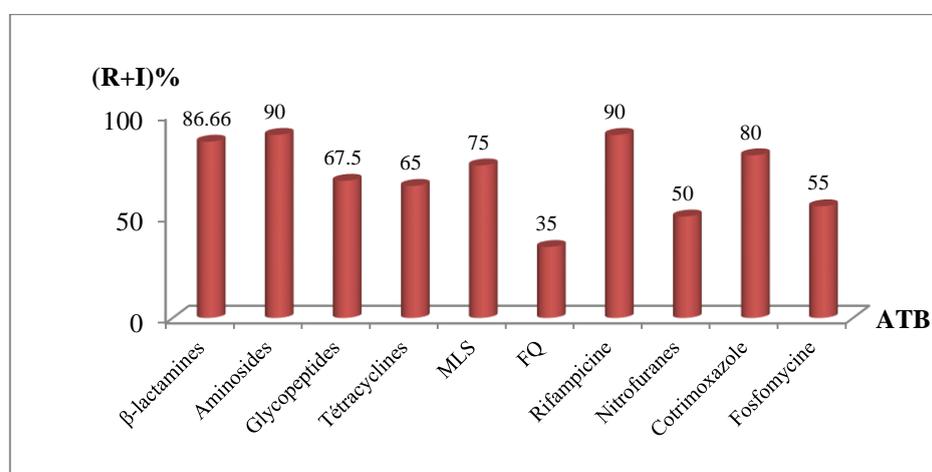


Fig.41. Résistance aux antibiotiques de *S. agalactiae* et *E. faecalis* testées

L'érythromycine n'est efficace que sur 50% des souches de *Streptococcus agalactiae* testées. La résistance à la tétracycline est de 70%, résultat constaté dans d'autres études [263].

Par ailleurs, la résistance à la rifampicine est très élevée, elle concerne 80% des souches testées. Cependant, toutes les souches sont sensibles aux fluoroquinolones testés.

En ce qui concerne *Enterococcus faecalis*, qui représente 80 à 90% des isolats cliniques d'entérocoques [261], on constate une grande résistance à la plupart des antibiotiques avec un taux de 100% de résistance aux β -lactamines, aminosides, MLS, à la fosfomycine, à la rifampicine et plus de 50% de résistance aux autres antibiotiques testés.

L'émergence des entérocoques résistants est attribuée à l'existence chez cette bactérie de résistances naturelles multiples aux antibiotiques dont les aminosides (à bas niveau), les céphalosporines (à haut niveau) et la clindamycine. A coté de la résistance naturelle, l'apparition de résistance acquise aux trois grandes classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement des infections à entérocoques que sont les pénicillines, les glycopeptides et les aminosides, pose de réels problèmes en thérapeutique et nécessite la recherche d'alternatives thérapeutiques [261].

On n'est pas à l'abri de la résistance à la vancomycine, en effet, 8 souches d'entérocoques résistants à cette molécule, dont 5 à l'hôpital et 3 en externe, ont été signalées par certains laboratoires en Algérie. Ces souches confirmées à l'IPA (Institut Pasteur d'Alger), sont porteuses de gène *Van A* exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine [252].

Les souches bactériennes retenues présentent un taux élevé de résistance aux différents antibiotiques testés, situation préoccupante. Afin de mieux développer le bon usage des antibiotiques, des enquêtes doivent être entreprises systématiquement concernant la sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes responsables d'infections communautaires. Il est indispensable de renforcer la surveillance des bactéries résistantes aux antibiotiques d'origine hospitalière, notamment les staphylocoques résistants à la méthiciline et les bacilles à Gram négatif résistants aux β -lactamines.

VII. Sensibilité à l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*

Toutes les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm l'écart type de dix mesures.

1. Huile essentielle brute

Les valeurs absolues des diamètres des zones d'inhibition montrent de larges écarts allant de 7.20 mm à 42.80 mm. Cet intervalle large reflète un comportement variable selon le groupe physiologique bactérien. Par contre, les différences ne sont pas très importantes entre les souches d'une même espèce.

En référence à la classification de Ponce et ses collaborateurs, il ressort que plus de 86% des souches (n= 130) sont sensibles [191]. Seules les souches d'*Escherichia coli* et de *Proteus mirabilis* sont résistantes, alors que la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 sensible aux antibiotiques est aussi sensible à l'huile essentielle (Tab.11).

Tab.11. Valeurs moyennes des zones d' inhibition de l' HE des BGN

| Groupe bactérien | Souche | Ø moyen (mm) | Intervalle (mm) |
|---------------------------|---------------------------------|------------------|-----------------|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Escherichia coli</i> | 8.07 \pm 0.58 | [7.20 - 8.90] |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 9.99 \pm 0.78 | [09 - 11.10] |
| | <i>K. oxytoca</i> | 9.44 \pm 0.43 | [09 - 10.10] |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 8.29 \pm 0.33 | [7.70 - 8.75] |
| | <i>Enterobacter sakazakii</i> | 10.85 \pm 1.47 | [9.20 - 13] |
| | <i>E. cloacae</i> | 9.56 \pm 1.03 | [9 - 11.40] |
| | <i>Citrobacter koseri</i> | 9.72 \pm 0.85 | [9.20 - 11] |
| | <i>C. freundii</i> | 9.66 \pm 0.42 | [9.10 -10.20] |
| | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 13.9 | - |
| BGN-NF | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 11.92 \pm 2.84 | [9.40 - 16.95] |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9.24 \pm 0.28 | [9 - 9.70] |
| | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | 11.7 | - |

BGN-NF= Bacilles à Gram négatif non fermentant

Ø : Diamètre

mm : millimètre

Les diamètres des zones d'inhibition des autres entérobactéries testées (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. sakazakii*, *E. cloacae*, *C. koseri* et *C. freundii*) varient dans un intervalle compris entre 9 mm et 13 mm. C'est un intervalle relativement étroit reflétant un comportement similaire des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*. La majorité de ces souches sont réparties du côté de la limite inférieur de cet intervalle. Ce qui explique leur faible sensibilité. Parmi eux, les souches *Enterobacter sakazakii* sont les plus sensibles à

l'huile. Ce résultat est encourageant, vu l'incrimination grandissante de cette bactérie dans les infections nosocomiales, urinaires et sur sites opératoires [264].

Les souches *Pseudomonas aeruginosa* ont un diamètre moyen 9.24 mm. Ce résultat n'est pas surprenant car ces dernières possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides (antibiotiques en particulier), associée à la nature de leur membrane externe [12].

Relativement meilleur est le diamètre moyen des zones d'inhibition pour les souches *Acinetobacter baumannii* (11.92 mm), cependant leur comportement est variable vis-à-vis de l'HE, exprimé par un écart type de 2.84.

L'huile essentielle *Pelargonium graveolens* est beaucoup plus active sur les cocci à Gram positif, ce que rapportent plusieurs études [12, 265-270]. En effet, les souches de *Staphylococcus* testées sont très sensibles à l'HE (Tab.12), surtout *S. aureus* avec des diamètres moyens de 19.27 mm. Notons qu'à moindre degrés mais toujours très sensibles, on trouve les staphylocoques à coagulase négative testés *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*, avec des diamètres moyens de 15.32 mm et 16.02 mm respectivement. D'autres études ont rapportés l'efficacité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* vis-à-vis des souches *S. aureus* et *S. epidermidis* [144].

Tab.12. Valeurs moyennes des zones d' inhibition de l' HE des CGP

| Groupe bactérien | Souche | Diamètre moyen (mm) | Intervalle (mm) |
|------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------|
| CGP | <i>S. aureus</i> | 19.27 ± 3.11 | [13.7 - 24.3] |
| | <i>S. epidermidis</i> | 15.32 ± 3.81 | [11 - 23.55] |
| | <i>S. saprophyticus</i> | 16.02 ± 3.62 | [10.10 - 21.3] |
| | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 19.3 | - |
| | <i>S. agalactiae</i> | 35.29 ± 4.41 | [29.7 - 42.80] |
| | <i>E. faecalis</i> | 27.75 ± 5.40 | [21 - 38.75] |
| | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | 21.9 | - |

CGP = Cocci à Gram Positif

mm : millimètre

Les souches *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis* testées sont extrêmement sensibles à l'HE (Tab.12), avec respectivement des diamètres moyens des zones d'inhibitions de 35.29 mm et de 27.75 mm.

Ces résultats sont très prometteurs car *S. agalactiae* est une des principales sources d'infections et de mortalité chez le nouveau-né. Il est retrouvé avec une fréquence variant de 10 à 30% dans le tractus génital de la femme, où il ne donne lieu à aucune symptomatologie.

Chez la femme enceinte, cette bactérie peut au moment de l'accouchement infecter l'enfant et provoquer une méningite, une septicémie ou une broncho-pneumonie mortelle. *Streptococcus agalactiae* peut également provoquer d'autres infections : surinfections des plaies postopératoires, infections urinaires, arthrites et péritonites [264].

Par ailleurs, *Enterococcus faecalis* qui est souvent associé à des infections urinaires, des infections de plaies, des endocardites bactériennes et des infections nosocomiales, peut aussi devenir résistant aux aminoglycosides. Depuis une dizaine d'années des souches résistantes aux glycopeptides (vancomycine, teicoplanine) ont été isolées. La résistance est liée à la présence d'un gène plasmidique dont il existe plusieurs variantes (*van A, B, C ou D*) [264].

Une étude conduite par Boukhatem et ses collaborateurs a évalué l'activité antibactérienne de souches microbiennes de référence (ATCC). Les résultats ont montré que ce soit en aromatogramme (diffusion en milieu solide) ou en microatmosphère (phase volatile), l'huile essentielle possède une excellente activité sur la majorité des microorganismes testés (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*) avec des diamètres d'inhibition supérieurs à 25 mm [271].

Le même constat a été fait en Tunisie par A. Ben Hsouna et N. Hamdi, où les souches de références sensibles aux antibiotiques testées ont donné de très bons résultats : *S. aureus* (ATCC 25923) 24 ± 0.3 mm, *S. epidermidis* (ATCC 12228) 14 ± 0.4 mm, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) 20 ± 0.3 mm et *K. pneumoniae* (ATCC 10031) 13 ± 0.3 mm [154].

Les huiles essentielles ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Leur mode d'action contre les bactéries se déroule en trois étapes [5].

Dans un premier temps, elles attaquent la perméabilité de la membrane de la bactérie, ce qui a comme effet de provoquer la perte des constituants cellulaires. Deuxièmement, les huiles essentielles provoquent une acidification de l'intérieur de la cellule, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire. Enfin, elles détruisent le matériel génétique de la bactérie, ce qui cause sa mort [5].

La différence du comportement des bactéries vis-à-vis des huiles essentielles peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif possèdent une paroi formée majoritairement de

peptidoglycanes (10 à 80 nm d'épaisseur). C'est une seule molécule, hétéropolymère réticulée représentant plus de 30% du poids sec de la bactérie.

Les bactéries à Gram négatif quant à elles, contiennent moins de peptidoglycane (inférieur à 15% du poids sec) de 2 à 6 nm d'épaisseur, cependant, de structure beaucoup plus complexe. Ces bactéries, indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle, la membrane externe, qui se compose de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides. Cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram négatif a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déstabiliser l'intégrité cellulaire et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et concentrations accrues en NaCl [272].

La présence de la paroi externe présenterai a priori une cible pour l'huile en question, cependant, on se pose la question si les concentrations nécessaires parviennent à cette membrane. Sachant que la présence de couches plus externes (glycocalyx) contribue à la dilution de l'huile et par conséquent l'annulation de son effet.

2. Quantification de l'activité de l'huile essentielle

2.1. Dilutions minimales inhibitrices (DMI)

2.1.1. Entérobactéries

Aucune zone d'inhibition au-delà des dilutions de l'huile au 1/4 n'est décelable (Tab.13).

Tab.13. Diamètres d'inhibition des dilutions de l'HE vis-à-vis des *Enterobacteriaceae* testées

| | <i>K. pneumoniae</i> | <i>K. oxytoca</i> | <i>E. sakazakii</i> | <i>E. cloacae</i> | <i>C. koseri</i> | <i>C. freundii</i> | <i>E. coli</i> * |
|--------------|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| 1/2 | 7.99 ± 1.42 | 7.6 ± 0.64 | 9.46 ± 1.88 | 8.42 ± 0.6 | 7.8 ± 0.74 | 7.82 ± 0.51 | 13.5 |
| 1/4 | 6.99 ± 0.9 | 6.19 ± 0.6 | 7.04 ± 1.48 | 6.26 ± 0.58 | 6.37 ± 0.75 | 6.54 ± 0.8 | 12.2 |
| 1/8 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | 11.9 |
| 1/16 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 |
| 1/32 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 |
| 1/64 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 |
| 1/128 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 |

(*) : *E. coli* ATCC 25922

Pour les concentrations au 1/2 et au 1/4, les valeurs absolues des zones d'inhibition inférieures à 9 mm ne permettent pas de qualifier les souches comme sensibles.

Seules les souches *Enterobacter sakazakii* sont sensibles à la dilution au 1/2 avec des zones d'inhibition en moyenne de 9.46 ± 1.88 mm. Ce résultat était prévisible, vu que ces souches soient les plus sensibles à l'HE parmi les entérobactéries testées. La souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 a aussi montré une sensibilité jusqu'à une dilution au 1/8.

2.1.2. Bacilles à Gram négatif non fermentant

Acinetobacter baumannii est sensible à l'HE même diluée au 1/2. Résultat prometteur pour lutter contre cette bactérie pathogène opportuniste et souvent multirésistante impliquée dans diverses infections. Celles-ci sont d'autant plus graves qu'elles surviennent le plus souvent chez des sujets fragilisés et hospitalisés dans des services de soins intensifs [258].

De son côté, *Pseudomonas aeruginosa* est résistant à toutes les dilutions utilisées dans ce test (Tab.14). Ce comportement n'est pas étonnant parce que cette bactérie connue pour sa grande résistance aux agents antibactériens, possède une capacité de former des agrégats dans de la matière inerte (biofilms) [273].

Tab.14. Diamètres d'inhibition des dilutions de l'HE vis-à-vis des BGN-NF

| | <i>A. baumannii</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 |
|--------------|------------------------|----------------------|---------------------------------|
| 1/2 | 9.34 \pm 1.83 | 7.66 \pm 0.75 | <6 |
| 1/4 | 8.18 \pm 1.67 | <6 | <6 |
| 1/8 | 6.87 \pm 1.54 | <6 | <6 |
| 1/16 | <6 | <6 | <6 |
| 1/32 | <6 | <6 | <6 |
| 1/64 | <6 | <6 | <6 |
| 1/128 | <6 | <6 | <6 |

BGN-NF= Bacilles à Gram négatif non fermentant

2.1.3. Cocci à Gram positif

Dans la présente étude, les bactéries à Gram positif testées s'avèrent les plus sensibles. Résultat confirmé par d'autres études [274-280]. Ce constat peut être dû à l'action de certains composés volatiles de l'huile essentielle étudiée d'une part et à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries à Gram négatif qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule entrant d'autre part [281,282].

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* est active sur *Staphylococcus aureus* diluée au 1/2, 1/4 et 1/8 et n'est active qu'avec la première dilution sur les staphylocoques à coagulase négative testés (Tab.15).

Tab.15. Diamètres d'inhibition des dilutions de l'HE vis-à-vis des Staphylocoques

| | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |
|-------|------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 1/2 | 14.5 ± 3.33 | 11.35 ± 2.52 | 11.2 ± 2.02 | 15.9 |
| 1/4 | 10.96 ± 1.92 | 8.36 ± 1.33 | 8.98 ± 1.09 | 11.5 |
| 1/8 | 9.03 ± 1.59 | 6.5 ± 0.41 | 7 ± 1.04 | 10.9 |
| 1/16 | 6.77 ± 0.8 | <6 | <6 | 9.9 |
| 1/32 | <6 | <6 | <6 | 8.2 |
| 1/64 | <6 | <6 | <6 | <6 |
| 1/128 | <6 | <6 | <6 | <6 |

Streptococcus agalactiae et *Enterococcus faecalis* sont sensibles à l'huile diluée jusqu'au 1/32 (Tab.16).

Tab.16. Diamètres d'inhibition des dilutions de l'HE vis-à-vis de *S. agalactiae* et *E. faecalis*

| | <i>S. agalactiae</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 |
|-------|----------------------|--------------------|-------------------------------|
| 1/2 | 22.52 ± 7.59 | 17.48 ± 2.93 | 19.3 |
| 1/4 | 16.28 ± 5.4 | 14.03 ± 2.01 | 15.2 |
| 1/8 | 13.51 ± 3.21 | 12.01 ± 1.88 | 13.6 |
| 1/16 | 11.32 ± 2.63 | 10.73 ± 1.22 | 10.8 |
| 1/32 | 9.61 ± 2.55 | 9.27 ± 0.76 | 9.3 |
| 1/64 | 7.06 ± 1.68 | 6.43 ± 0.73 | 8.2 |
| 1/128 | <6 | <6 | <6 |

Les résultats révèlent des comportements variables en fonction des souches et de la concentration de l'extrait testé et que la résistance aux antibiotiques n'a aucun rapport avec celle à l'HE.

On remarque que d'une manière générale, l'activité de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* sur les bacilles à Gram négatif est concentration dépendante, ce qui nous amène à penser à l'usage de cette HE en tant que désinfectant. Pour les cocci à Gram positif, l'huile apparaît plus efficace et reste active jusqu'à la dilution 1/8 pour les staphylocoques. Elle est active jusqu'à la dilution au 1/32 pour *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis* (effet antiseptique).

2.2. Concentrations minimales inhibitrices

Les valeurs absolues des CMI montrent de larges écarts allant de 0.1% à 2% selon l'espèce bactérienne étudiée. Par contre, les différences ne sont pas significatives pour les souches d'une même espèce. L'huile essentielle présente une activité antibactérienne avec une CMI modale de 1% pour la population bactérienne prise en compte.

Pour les bactéries à Gram positif, la concentration minimale inhibitrice moyenne (CMI_m) avoisine les 0.3%, inférieure à la CMI modale, alors qu'elle est de 1.5% vis-à-vis des espèces à Gram négatif.

2.2.1. Enterobacteriaceae

La CMI moyenne de l'HE sur les entérobactéries est de 1.5% (Tab.17). *Enterobacter sakazakii* est l'espèce la plus sensible à l'huile avec une CMI_m de 1%, alors que *Klebsiella oxytoca* est la plus résistante (CMI_m = 2%).

Les résultats des CMI ne montrent aucune différence entre les souches productrices de BLSE et celles non productrices de l'enzyme.

Tab.17. CMI_m de l'huile essentielle de *P. graveolens* sur les *Enterobacteriaceae* testés

| Bactéries (10 / espèce) | CMI _m (%) | Intervalle (%) |
|------------------------------------|----------------------|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 1 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1.5 ± 0.7 | 1 – 2 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2 ± 1.06 | 1.5 – 3 |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> | 1 ± 0.85 | 0.3 – 1.5 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 1.25 ± 0.53 | 1 – 1.75 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | 1.5 ± 0.71 | 1 – 2 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1.5 ± 0.71 | 1 – 2 |

CMI_m : Concentration Minimale Inhibitrice moyenne

% : Pourcentage

2.2.2. Bacilles à Gram négatif non fermentant

La CMI moyenne de l'HE sur *Acinetobacter baumannii* est de 1%, avec des valeurs variant de 0.4 à 1.75% (Tab.18).

Tab.18. CMI_m de l'HE de *P. graveolens* sur les bacilles à Gram négatif testés

| Bactéries (10 / espèce) | CMI _m (%) | Intervalle (%) |
|------------------------------------------|----------------------|----------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 1.5 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2 ± 0.08 | 1.75 - 2 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 ± 0.95 | 0.4 – 1.75 |

CMI_m : Concentration Minimale Inhibitrice moyenne

% : Pourcentage

Les souches *Pseudomonas aeruginosa* sont plus résistantes à l'HE avec des CMI de 2% pour toutes les souches sauf une, isolée des urines pour laquelle la CMI est de 1.75 %.

2.2.3. Cocci à Gram positif

Toutes les souches cocci à Gram positif testées ont des CMI relativement basses (< 0.85%), excepté une souche *Staphylococcus saprophyticus*, isolée des urines pour laquelle la CMI est de 1% (Tab.19).

Tab.19. CMI_m de l'HE de *P. graveolens* sur les cocci à Gram positif testées

| Bactéries (10 / espèce) | CMI _m (%) | Intervalle (%) |
|-----------------------------------------|----------------------|----------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 0.3 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0.4 ± 0.56 | 0.05 - 0.85 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0.5 ± 0.56 | 0.05 - 0.85 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 0.5 ± 0.64 | 0.1 - 1 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 0.2 | - |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 0.1 ± 0.13 | 0.01 - 0.2 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 0.2 ± 0.26 | 0.03 - 0.4 |

CMI_m : Concentration Minimale Inhibitrice moyenne

% : Pourcentage

Aucune différence de CMI entre les souches *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthiciline et celles sensibles à la méthiciline n'est observée.

Parmi les cocci à Gram positif testés, les souches de *Streptococcus agalactiae* sont les plus sensibles (CMI_m = 0.1%), suivies des souches de *Enterococcus faecalis* (CMI_m = 0.2%) puis des souches *S. aureus* (CMI_m = 0.4%). Les plus résistantes sont les staphylocoques coagulase négative (CMI_m = 0.5%).

Les résultats obtenus l'étude des DMI sont confirmées par l'étude des CMI de l'HE. Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles, surtout *Streptococcus agalactiae*. Les MRSA ou encore les entérobactéries résistantes aux β-lactamines ont montré une sensibilité comparable à celle observée pour les souches sensibles (MSSA et entérobactéries non productrices de BLSE). De là, il ressort que les enzymes impliquées dans la résistance chez ces bactéries n'agissent pas sur l'action de l'huile essentielle testée.

Les souches *Acinetobacter baumannii*, très résistantes aux antibiotiques sont parmi les bacilles à Gram négatif les plus sensibles à l'huile testée. Toutefois, elle semble être moins efficace sur *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif aérobie strict souvent multirésistantes aux antibiotiques [14].

3. Type d'activité antibactérienne

3.1. Repiquage à partir des zones d'inhibition

Selon M.C. Pibiri, l'huile essentielle étudiée a une activité inhibitrice vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et des entérobactéries testées. Cependant, l'activité est bactéricide vis-à-vis des souches d'*Acinetobacter baumannii*. Ce résultat est encourageant car ces bactéries sont impliquées dans les infections de plaies, les bactériémies et les pneumopathies [195,264].

L'huile essentielle étudiée est également bactéricide vis-à-vis de l'ensemble des cocci à Gram positif testés. Résultat prometteur vu le rôle joué par ces bactéries dans les bactériémies, les méningites, les infections urinaires, de plaies, sur dispositifs intra-vasculaires, septicémies et endocardites [264].

Selon Boukhatem et *al.*, l'huile essentielle de Géranium rosat est bactériostatique sur la majorité des souches de références testées dans l'étude, à savoir, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* [271].

3.2. Concentrations minimales bactéricides

Les résultats précédents se confirment par l'importante différence des valeurs absolues des CMB entre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif testées.

La CMB moyenne (CMB_m) des bactéries à Gram positif est de 0.4% et celle des bactéries à Gram négatif est supérieure à 4% à l'exception des souches d'*Acinetobacter baumannii* pour lesquelles elle avoisine les 2% d'HE (Tab.20).

Tab.20. CMB_m de l'HE de *Pelargonium graveolens* sur les souches bactériennes testées

| Souches (x10) | CMB _m (%) |
|------------------------------------------|----------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | > 4 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | > 4 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | > 4 |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> | > 4 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | > 4 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | > 4 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | > 4 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | > 4 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | > 4 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2 |

Tab.20. CMB_m de l'HE de *Pelargonium graveolens* sur les souches bactériennes testées (suite)

| Souches (x10) | CMB _m (%) |
|-----------------------------------------|----------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 0.4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0.4 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0.6 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 0.7 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 0.2 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 0.1 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 0.2 |

CMB_m : concentration minimale inhibitrice moyenne
% : Pourcentage

3.2.1. Entérobactéries

Du même tableau, il apparaît des valeurs de la concentration minimale bactéricide de l'HE importantes pour l'ensemble des entérobactéries testées et sont supérieures à 4%.

3.2.2. Bacilles à Gram négatif non fermentant

L'activité de l'HE sur les souches *Pseudomonas aeruginosa* est comparable à celle sur les entérobactéries, avec des CMB de l'HE supérieures à 4%. Cependant, les CMB sont moins importantes reflétant une meilleure activité sur les souches *Acinetobacter baumannii* testées.

3.2.3. Cocci à Gram positif

Toutes les souches cocci à Gram positif testées sont neutralisées à des concentrations d'HE basses (≤ 0.7 %).

L'activité de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* est de type bactériostatique sur les entérobactéries et *P. aeruginosa*, elle est bactéricide sur *A. baumannii* et les cocci à Gram positif testés dont le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 2. Ce pouvoir bactéricide est plus important sur les souches *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis* testées dont les CMB sont égales aux CMI.

Aucune différence de résultats n'est observée après l'utilisation des deux techniques (déterminations des CMI/CMB et DMI/type d'activité), donc ces deux techniques sont valables et le choix de l'une ou de l'autre ne se fait que par rapport à sa facilité ou encore à son coût.

VIII. Effet synergique : Antibiotiques - Huile essentielle

En chimiothérapie antibactérienne, il est d'usage et même recommandé d'utiliser des associations de deux molécules ; ce qui diminue du même coup et de manière sensible la fréquence d'apparition de résistances. Ainsi, devant la résistance de certaines souches aux antibiotiques et une activité moindre à l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, nous avons envisagé d'associer ces deux substances afin d'améliorer l'activité antibactérienne.

Dans notre cas, c'est surtout les *Enterobacteriaceae* et les bacilles à Gram négatif non fermentant qui montrent un certain degré de résistance aussi bien aux antibiotiques qu'à l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*. Nous avons retenu les trois souches les plus résistantes de chaque espèce.

Les résultats sous forme de moyennes sont regroupés dans le tableau 21 ci-dessous. Nous constatons selon le même tableau une meilleure activité dans plusieurs cas.

Tab.21. Diamètres d'inhibition de l'association antibiotiques – HE

| Espèces | Antibiotiques | Antibiogramme (mm) | Association ATB (1h) + HE | Association HE (1h) + ATB |
|------------------------------|---------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | AM | 6 | 9.5 ± 0.1 | 10.3 ± 0.3 |
| | AMC | 9.8 ± 0.2 | 11 ± 1 | 10 ± 0.6 |
| | AX | 6 | 10.7 ± 0.6 | 9.2 ± 0.4 |
| | CZ | 6 | 12.6 ± 0.2 | 12.1 ± 0.4 |
| | PEF | 6 | 10.3 ± 0.6 | 10.5 ± 0.3 |
| | NA | 6 | 10.7 ± 0.4 | 10.6 ± 0.1 |
| | SXT | 8 ± 0.2 | 16.5 | 16.5 ± 0.2 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | CZ | 6 | 10.6 ± 0.3 | 10.6 ± 0.6 |
| | FOX | 12.7 ± 1.2 | 15.7 ± 0.2 | 17.3 ± 0.6 |
| | CTX | 6 | 9 | 9.3 ± 0.2 |
| | CAZ | 6 | 10.2 ± 0.1 | 10 ± 0.3 |
| | CRO | 6 | 10.2 ± 0.1 | 9.8 ± 0.3 |
| | AK | 12.7 ± 0.1 | 15.3 ± 0.2 | 15.1 ± 0.5 |
| | GM | 7.9 ± 0.2 | 10.4 ± 0.4 | 9.2 ± 0.1 |
| | NA | 6 | 10.5 ± 0.6 | 9.5 ± 0.1 |
| | PI | 6 | 11 | 9.7 ± 0.2 |
| | OFX | 10.6 ± 0.8 | 11.4 ± 0.4 | 15.1 ± 0.5 |
| | PEF | 10.9 ± 0.2 | 11 ± 0.3 | 11.1 ± 0.2 |
| | CIP | 15 ± 0.4 | 17.2 ± 0.2 | 17.3 ± 0.2 |
| | SXT | 6 | 9.6 ± 0.4 | 10.4 ± 0.3 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | AMC | 6 | 11.1 ± 0.8 | 11 |
| | CZ | 6 | 11.6 ± 0.5 | 10.2 ± 0.2 |
| | CRO | 12.8 ± 0.2 | 22 | 20.1 ± 0.3 |
| | AK | 14.3 ± 0.3 | 15.1 ± 0.2 | 14.5 |
| | GM | 6 | 18 ± 0.1 | 16.2 ± 0.2 |
| | NA | 6 | 11.5 ± 0.1 | 10.8 ± 1 |
| | OFX | 10.5 | 10.9 ± 0.2 | 10.8 ± 0.3 |
| | PEF | 6 | 11 ± 0.4 | 10.5 ± 1.8 |
| | SXT | 10.3 ± 0.1 | 22.2 ± 0.5 | 20.1 ± 0.4 |
| | FOS | 12 ± 0.1 | 15.3 ± 0.5 | 15.7 ± 0.4 |

Tab.21. Diamètres d'inhibition de l'association antibiotiques – HE (suite)

| Espèces | Antibiotiques | Antibiogramme (mm) | Association ATB (1h) + HE | Association HE (1h) + ATB |
|--------------------------------|---------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Proteus mirabilis</i> | AM | 8.8 ± 0.3 | 10.7 ± 0.2 | 10.3 ± 0.8 |
| | AX | 15.1 ± 0.3 | 17.1 ± 0.6 | 16.6 ± 0.3 |
| | AMC | 6 | 7.3 ± 0.3 | 8.5 ± 0.1 |
| | CZ | 6 | 16.4 ± 0.1 | 15 ± 1.2 |
| | CAZ | 7.7 ± 0.2 | 15 | 13.8 ± 2.2 |
| | CRO | 6 | 16.4 ± 0.1 | 16.5 ± 0.2 |
| | FOX | 6 | 16 ± 1.2 | 15.5 ± 0.9 |
| | NA | 6 | 9.8 ± 0.2 | 9.2 ± 0.2 |
| | PEF | 14.6 ± 0.6 | 19.8 ± 0.6 | 18.8 ± 1.2 |
| | SXT | 6 | 15.5 ± 0.2 | 13.7 ± 0.7 |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> | AM | 6 | 12.5 ± 0.6 | 11.7 ± 1.2 |
| | AMC | 6 | 12 ± 0.5 | 12.7 ± 0.7 |
| | AX | 10.4 ± 0.1 | 14 ± 0.2 | 12.2 ± 1.2 |
| | CZ | 6 | 14.6 ± 0.2 | 13.3 ± 0.9 |
| | FOX | 6 | 11.5 ± 0.3 | 10 ± 1.3 |
| | NA | 6 | 17.7 ± 0.1 | 17 ± 0.7 |
| | CIP | 15.8 ± 0.2 | 24.4 ± 0.6 | 26 ± 2.2 |
| | SXT | 6 | 16.5 ± 0.8 | 15.7 ± 1.6 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | AX | 6 | 10.7 ± 0.7 | 10.4 ± 0.2 |
| | GM | 9.5 ± 0.2 | 16.4 ± 0.5 | 14.6 ± 0.3 |
| | NA | 8.1 ± 0.2 | 11.3 ± 0.8 | 13.8 ± 0.3 |
| | CIP | 11.2 ± 0.2 | 17.3 ± 0.2 | 17.7 ± 0.5 |
| | SXT | 6 | 12 ± 2.2 | 14.8 ± 1.5 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | AMC | 6 | 10.6 ± 0.2 | 10.8 ± 0.2 |
| | AX | 6 | 8.9 ± 0.1 | 9.5 ± 0.5 |
| | CZ | 12.4 ± 1.2 | 15.2 ± 0.2 | 18.4 ± 0.4 |
| | GM | 12 ± 0.5 | 15.8 ± 0.2 | 17.4 ± 0.5 |
| | NA | 6 | 9.3 ± 0.6 | 10 ± 0.1 |
| | PEF | 6 | 11 | 10.7 ± 0.6 |
| | FT | 14.5 ± 0.2 | 29.5 ± 1.5 | 30.2 ± 0.3 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | AX | 6 | 11.7 ± 0.3 | 10.1 ± 0.4 |
| | GM | 6 | 11.1 ± 0.4 | 10.4 ± 0.6 |
| | FT | 9.1 ± 0.4 | 15.1 ± 0.4 | 15.4 ± 0.4 |
| | NA | 10.4 ± 0.1 | 19.8 ± 0.2 | 19.5 ± 0.4 |
| | PEF | 11 ± 0.2 | 19.2 ± 0.3 | 19.1 ± 0.4 |
| | SXT | 6 | 8.7 ± 0.3 | 9.2 ± 0.2 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | CAZ | 6 | 10.8 ± 0.2 | 10.6 ± 0.4 |
| | TIC | 6 | 10 | 10 |
| | TCC | 6 | 10 ± 0.5 | 11.1 ± 0.4 |
| | PIP | 6 | 11.1 ± 0.4 | 11.5 ± 0.5 |
| | IPM | 10 ± 0.5 | 11 ± 0.8 | 11.3 ± 0.2 |
| | GM | 6 | 13.7 ± 0.7 | 14.6 ± 0.4 |
| | CIP | 8 ± 0.2 | 15 ± 1.3 | 14.5 ± 0.5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | CAZ | 6 | 9.3 ± 0.3 | 10.5 ± 0.5 |
| | CFS | 6 | 9.8 ± 0.1 | 9.7 ± 0.3 |
| | PIP | 14.1 ± 0.4 | 19.5 ± 0.4 | 20 ± 1.5 |
| | TIC | 6 | 10.1 ± 0.4 | 9.8 ± 0.2 |
| | TCC | 7 | 9.5 ± 0.5 | 10.7 ± 0.4 |
| | ATM | 15.8 ± 1.2 | 24 ± 0.1 | 22.1 ± 0.3 |
| | GM | 11.5 ± 0.3 | 15.4 ± 0.2 | 15.7 ± 0.3 |
| | CIP | 15 ± 0.1 | 27.6 ± 1.6 | 26 ± 0.2 |

Dans tous les cas et pour toutes les souches, les diamètres des zones d'inhibition ont vu leur valeur absolue augmenter. Ces changements sont devenus significatifs dans 35.80% des associations testées, où les souches sont devenues soit sensibles (16.05%) ou dans la classe intermédiaire (19.75%).

On note aussi qu'il n'y a pas de différence notable entre les diamètres des zones d'inhibition lorsque l'antibiotique est appliqué avant l'HE ou lorsque cette dernière est appliquée en premier.

La meilleure synergie avec l'HE testée est enregistrée avec les aminosides (gentamicine et amikacine), la ciprofloxacine, triméthoprime + sulfaméthoxazole, nitrofuranes et la fosfomycine.

1. β -lactamines

Les diamètres des zones d'inhibition restent plus ou moins réduits malgré une légère amélioration à l'exception des combinaisons avec l'aztreonam et avec la pipéracilline pour lesquelles les souches *Pseudomonas aeruginosa* ont atteint le seuil de sensibilité. On note également le passage du stade de résistance à la classe intermédiaire pour les souches *Klebsiella pneumoniae* (FOX-HE), *K. oxytoca* (CRO-HE) et *Proteus mirabilis* (AX-HE et FOX-HE).

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante surtout dans le traitement des infections dues aux entérobactéries [61]. Ils ont une activité bactéricide principalement temps-dépendante qui inhibe la synthèse de la paroi bactérienne [284,285]. Les transpeptidases et carboxypeptidases, enzymes associées à la membrane cytoplasmique, fixent de façon covalente ces antibiotiques. Cette liaison est due à une analogie structurale entre le substrat naturel de ces enzymes, l'acyl-D-alanyl-D-alanine et le cycle β -lactame. Les enzymes qui lient les pénicillines et les céphalosporines, sont également dénommées protéines de liaison aux pénicillines (PLP). La nature de ces PLP est relativement spécifique d'espèce et leur nombre varie d'une espèce bactérienne à une autre. Chacune a une fonction bien définie, mais certaines jouent un rôle prépondérant dans la synthèse du peptidoglycane, à l'étape de polymérisation à partir de sous unités faites d'un disaccharide peptide. L'activité enzymatique des PLP est inhibée par leur liaison avec les β -lactamines [286].

2. Aminosides

Toutes les souches testées aux combinaisons aminosides-HE sont devenues sensibles à l'exception des souches *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter freundii*.

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides concentration-dépendants [285]. Leur spectre s'étend essentiellement aux bactéries à Gram négatif et aux staphylocoques.

Le mécanisme de résistance principal aux aminoglycosides est l'acquisition d'enzymes bactériennes qui modifient les antibiotiques [287]. La diminution de l'accumulation de l'antibiotique est un autre mécanisme majeur de résistance, exprimé par des systèmes d'efflux [288]. La méthylation de l'ARNr 16S au sein de la sous-unité 30S des espèces comme *Escherichia coli* et *Klebsiella* altère la fixation des aminosides, ce qui bloque leurs activités antimicrobiennes exprimé chez les souches de *K. pneumoniae* et *C. freundii* testées [289].

3. Quinolones de 1^{ère} génération et fluoroquinolones

Les combinaisons avec l'acide nalidixique sont efficaces pour les souches *C. freundii* et à un degré moindre pour les souches *Enterobacter sakazakii*.

Les quinolones sont des antibiotiques synthétiques connus pour leur bonne diffusion tissulaire, ils sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires [290]. Ils agissent en se fixant au niveau de l'hélice α 4 topoisomérase II, la topoisomérase IV et de l'ADN gyrase, empêchant la progression de la fourche de réplication [291].

Les fluoroquinolones, utilisées depuis les années 80, sont beaucoup plus actives que les quinolones de 1^{ère} génération [292,286]. La résistance acquise à ces antibiotiques est le résultat de la combinaison de plusieurs mécanismes : une diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne par modification des porines, une excrétion active de l'antibiotique par des pompes membranaires, ou la mutation de l'ADN gyrase.

Le principal déterminant génétique de la résistance plasmidique aux quinolones est le gène *qnr*. À ce jour, trois *qnr* ont été mises en évidence, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* [290,291,293].

Les souches porteuses du gène *qnr* appartiennent le plus souvent aux espèces *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et récemment *Enterobacter cloacae* et sont toutes multirésistantes, en particulier résistantes aux C3G par production de BLSE ou de céphalosporinase plasmidique [294]. Plus récemment, deux nouveaux mécanismes de résistance plasmidique ont été décrits chez *E. coli* [72,73].

Parmi les fluoroquinolones testés dans notre étude, la ciprofloxacine, utilisée dans plusieurs spécialités médicales, associée à l'HE semble être très efficace contre les entérobactéries ainsi que *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats concordent avec ceux de Tripti et al., ayant étudié l'effet combiné de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* et de la ciprofloxacine sur *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus* impliqués dans des infections urinaires [196].

4. Triméthoprim + sulfaméthoxazole

A l'image des aminosides, l'association triméthoprim + sulfaméthoxazole + HE a donné un très bon résultat sur les souches testées à l'exception de *K. Pneumoniae* et *Citrobacter freundii*.

Le cotrimoxazole est une combinaison synergique de triméthoprim et de sulfaméthoxazole, un sulfamide. Ils agissent sur la voie de synthèse de l'acide folique, et donc des bases puriques de l'ADN bactérien, à 2 étapes différentes [295]. Triméthoprimes, sulfamides et leurs associations ont un spectre large, leur activité thérapeutique est bien établie en pathologie respiratoire, digestive, urinaire, notamment en traitements courts et en prophylaxie [296].

De toutes les familles d'antibiotiques, l'association sulfamide-triméthoprim incite indiscutablement la plus grande diversité de mécanismes de résistance acquise et de leur support génétique: modification de la perméabilité, activation de pompes d'efflux, modification quantitative ou qualitative des cibles, contournement métabolique, hyperproduction de précurseurs, absence de certaines enzymes et toute une variété de gènes exogènes acquis par la bactérie [297].

5. Furanes et fosfomycine

Ces antibiotiques combinés à l'HE n'ont été testés que sur certaines entérobactéries. Les résultats montrent une efficacité totale pour les souches testées avec des diamètres allant jusqu'à 30.5mm.

Les nitrofuranes acquièrent leur activité antibactérienne après la réduction enzymatique de leur fonction nitro, catalysée par des réductases bactériennes, ce qui assure leur spécificité d'action. Une fois activés métaboliquement, ces antibiotiques inhibent des enzymes impliqués dans la dégradation du glucose et du pyruvate. En outre, certaines de leurs

formes réduites possèdent un pouvoir alkylant et pourraient causer des dommages à l'ADN et aux protéines [298].

La fosfomycine est un antibiotique bactéricide, dérivé de l'acide phosphonique, inhibant la synthèse des précurseurs du peptidoglycane constituant la paroi bactérienne (interférence avec la pyruvate-UDP-N-acétylglucosamine transférase). Pour agir, la fosfomycine doit pénétrer dans la bactérie en utilisant des systèmes de transport : l'un constitutif (L-glycérophosphate) et l'autre inductible (hexoses monophosphates).

L'étude de l'activité de l'association HE-ATB sur les souches, exprimant une résistance à la fois aux antibiotiques et à l'HE proposée a révélé des résultats encourageants. Reste posées les questions sur le mécanisme de l'amélioration de l'activité de ces molécules combinées, est ce que l'antibiotique devient une des molécules composante de l'huile essentielle déjà complexe ? Ou bien l'HE déjoue les mécanismes de résistance donnant aux antibiotiques la possibilité d'exercer leurs actions antibactériennes ?

D'autres tests *in vivo* sont nécessaires pour évaluer le potentiel de cette combinaison à des fins thérapeutiques. Les études sur l'association d'antibiotiques avec des huiles essentielles connues pour leur pouvoir antibactérien sont vivement recommandées afin d'aller plus loin dans la recherche concernant ce domaine prometteur.

IX. Usages de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*

1. En tant qu'additif alimentaire

Il est connu que la charge microbienne moyenne "normale" de la plupart des aliments est de l'ordre de 10^4 à 10^6 UFC/g [299]. La présence massive de microorganismes dans le produit alimentaire conduit inexorablement à sa détérioration avec parfois des répercussions très graves sur la santé du consommateur.

En effet, la prolifération de bactéries ou de champignons dans un produit alimentaire se traduit obligatoirement par des modifications des qualités organoleptiques généralement détectables quand le nombre d'agents dépasse 10^6 UFC/g de produit. Les modifications d'aspect, de texture ou de flaveur (odeur et saveur) sont souvent défavorables incriminant le plus souvent les espèces des genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*,

Escherichia, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, etc.

La majorité de ces microorganismes se développe à des intervalles allant de 20°C à 42°C. Au contraire, d'autres préfèrent des températures extrêmes (0°C, 5°C, 45°C, et plus.).

Pour des températures inférieures à la température optimale de croissance, la vitesse des réactions impliquées dans le métabolisme et donc le taux de croissance ralentissent. Cependant, le froid ne conduit pas à une dénaturation significative des composants microbiens, une reprise des activités métaboliques est possible dès que la température redevient optimale à la croissance [300].

Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine agroalimentaire [5]. Elles sont connues à la fois pour leurs propriétés aromatisantes et antimicrobiennes et leur toxicité réduite comparée à celle des additifs alimentaires chimiques ou synthétiques [301,302]. La complexité de la composition de ces produits fait que la fréquence de l'apparition de résistances est très faible.

Parmi les aliments consommés par une large frange de la population, les crèmes pâtisseries. C'est un produit complexe, très riche et par conséquent propice à la prolifération de large variété de microorganismes.

La détérioration de ce type de produit constitue un énorme problème économique et de santé, malgré les mesures de bonnes conservations qui peuvent être entreprises. Cette situation peut être mieux contrôlée par l'utilisation de conservateurs alimentaires naturels qui en plus contribuent à l'amélioration de la saveur du produit.

Une minute après la préparation, l'examen bactériologique des crèmes pâtisseries n'a montré aucune prolifération microbienne visible à l'œil nu (nombre de *MMAT* et de staphylocoques inférieur à 10^2 UFC/g) pour les préparations additionnées ou non d'huile essentielle (planche A1). Ce qui témoigne d'un respect optimal des règles d'hygiène lors de la confection de la crème pâtisserie.

La même situation est observée après quatre heures pour l'échantillon contenant l'huile essentielle, aussi bien conservé à 4°C ou à température ambiante ($\approx 20^\circ\text{C}$) (planche : A2a, A3a). Ceci montre l'effet inhibiteur de l'HE malgré des températures propices au développement des microorganismes recherchés.

Pour le second échantillon constitué de crème pâtissière sans additif, à 04°C, on n'observe pas de colonies de *Staphylococcus sp.*, ce qui correspond à un taux inférieur à 10^2 UFC/g. Par contre, 10^2 UFC/g de *MMAT* ont pu être dénombrés sur GN (planche: A2b). Dans l'échantillon conservé à température ambiante, on a dénombré un nombre plus élevé de *MMAT*, équivalent à 7×10^2 UFC/g et toujours absence de staphylocoques (Planche: A3b).

Se dessine ainsi une différence visible de la charge microbienne entre les deux crèmes pâtisseries fabriquées initialement du même lot, ce qui montre encore une fois le pouvoir antimicrobien de l'extrait testé. Cet effet se maintient à un niveau acceptable en dépit du temps et de la température de conservation.

Après 24 heures, l'effet inhibiteur de l'HE se maintient aussi bien à 4°C ($2 \times 10^2 / 5.6 \times 10^3$ UFC/g) qu'à 20°C ($1.8 \times 10^4 / 3.25 \times 10^4$ UFC/g) pour la *MMAT* (planche: A4, A5).

Concernant les staphylocoques, et malgré leur apparition à 20°C, la qualité bactériologique de la crème pâtissière additionnée d'HE reste excellente aussi bien que celle conservée à 4°C.

Après 48 heures, la charge bactérienne est plus importante, on a dû diluer plus les échantillons pour les rendre dénombrables.

Dans les boîtes conservées à 4°C, la charge bactérienne est de 1.2×10^4 UFC/g de *MMAT* et de 3×10^2 UFC/g de staphylocoques pour l'échantillon contenant l'HE, alors qu'elle dépasse les 8×10^4 UFC/g de *MMAT* et 3×10^3 UFC/g de staphylocoques pour le second échantillon sans HE (Planche: A6).

A température ambiante, les boîtes de prélèvement de la crème pâtissière contenant de l'huile essentielle présentent une charge bactérienne de 4.2×10^5 UFC/g de *MMAT* et 2.8×10^3 UFC/g de staphylocoques, tandis que celles sans additif ont une charge de plus de 10^6 UFC/g de *MMAT* et de 1.3×10^5 UFC/g de *Staphylococcus sp.* (Planche: A7). Ce résultat est attendu vu la température élevée et la longue durée de conservation.

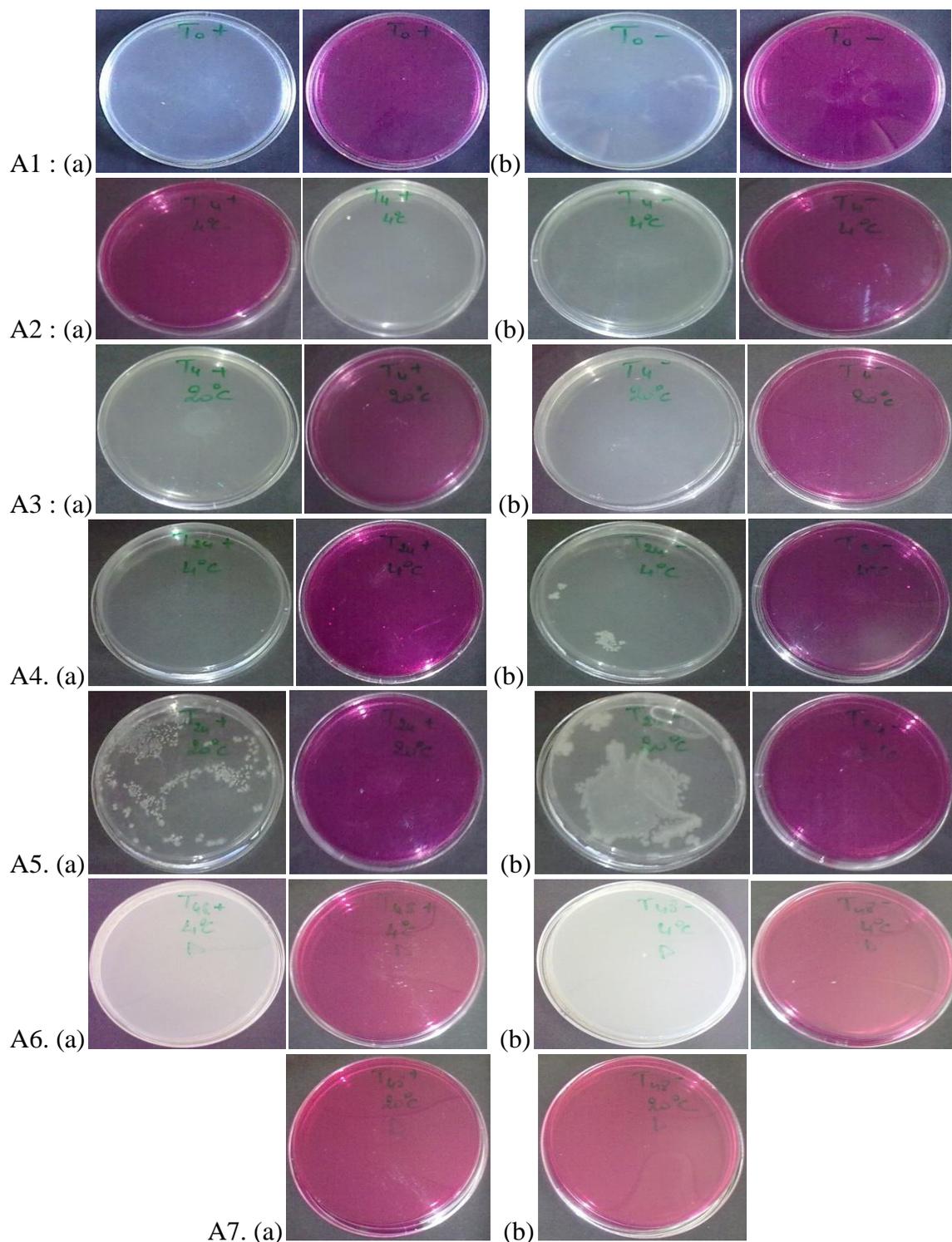


Planche. Effet conservateur de l'HE dans la crème pâtissière préparée

- A1. Culture après une minute de préparation de la crème pâtissière*
A2. Culture après quatre heures de conservation à 4°C
A3. Culture après quatre heures de conservation à 20°C
A4. Culture après vingt-quatre heures de conservation à 4°C
A5. Culture après vingt-quatre heures de conservation à 20°C
A6. Culture après quarante-huit heures de conservation à 4°C
A7. Culture sur milieu Chapman, après quarante-huit heures de conservation à 20°C
 (a): avec HE; (b): sans HE

La dynamique d'évolution de la charge bactérienne exprimée en UFC/g de crème pâtissière en fonction du temps est représentée par les courbes de la figure 42 A et B.

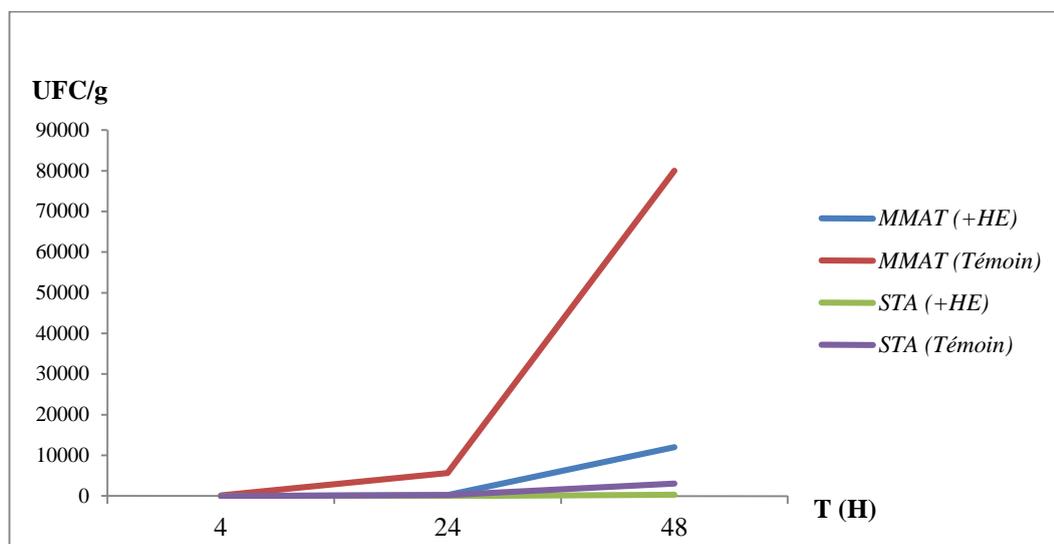


Fig.42.A. Dynamique de variation de la charge bactérienne de la crème pâtissière à 4°C

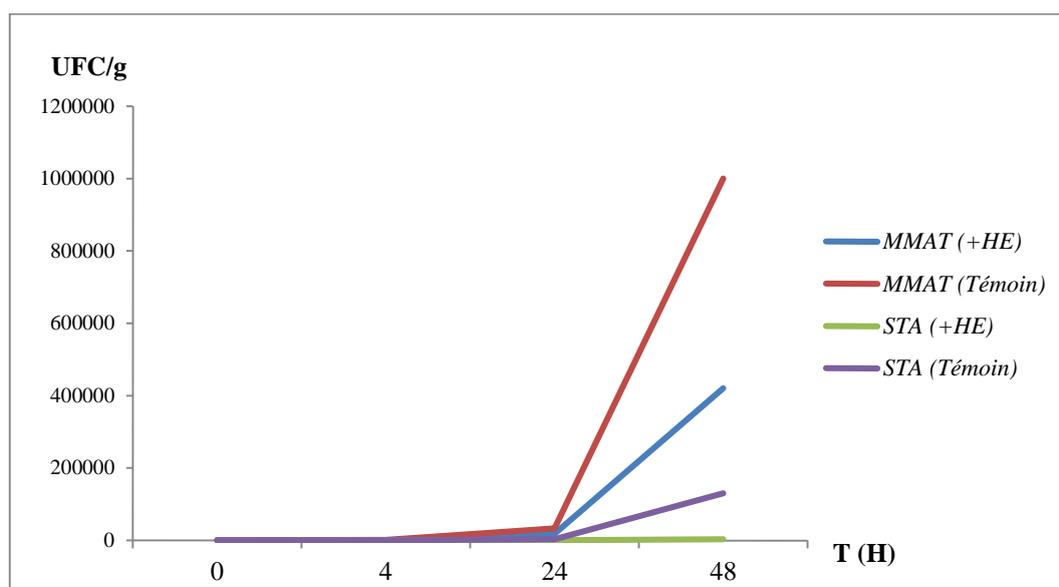


Fig.42.B. Dynamique de variation de la charge bactérienne de la crème pâtissière à 20°C

❖ Crème pâtissière du commerce

Comme la crème pâtissière préparée au laboratoire, celle du commerce a été partagée en deux parties. L'HE n'a été rajoutée qu'au premier échantillon.

Après incubation des boîtesensemencées, la charge microbienne a été très importante pour les deux types d'échantillons (Fig.43). Le nombre de colonies est incalculable sur GN, sur milieu Chapman et même à la seconde et à la troisième dilution.

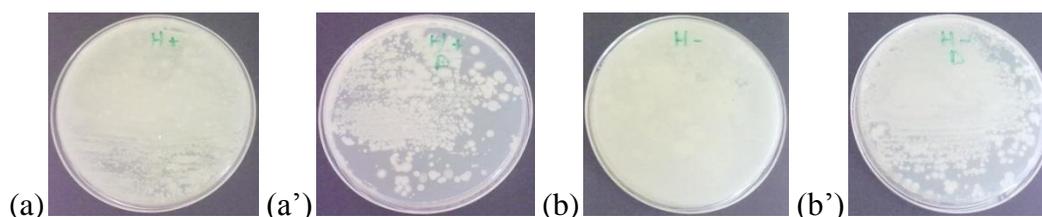


Fig.43. Culture sur gélose nutritive

(a): avec HE, dilution 10^{-1} ;
 (a') : avec HE, dilution 10^{-2} ; (b): sans HE, dilution 10^{-1} ; (b') : sans HE, dilution 10^{-2} ;

La charge bactérienne est de 1.2×10^6 UFC/g de *MMAT* et de 7.9×10^5 UFC/g de staphylocoques pour l'échantillon additionné d'HE et de 1.21×10^6 UFC/g de *MMAT* et de 8.02×10^5 UFC/g de staphylocoques pour l'échantillon témoin (Fig.44). On constate qu'après une minute du dépôt de l'extrait bioactif, une légère diminution du nombre des souches est notée, ce qui montre l'effet instantané de notre HE.

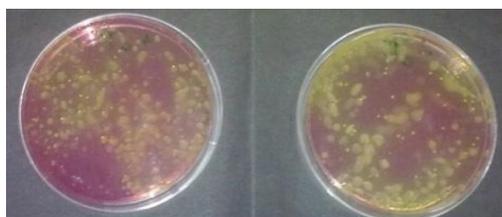


Fig.44. Culture sur milieu Chapman de la crème pâtissière après une minute d'addition de l'HE

Après 04 heures, l'échantillon à l'HE conservé à 04°C a présenté une charge bactérienne de 3.6×10^4 UFC sur gélose nutritive et de 5.2×10^3 UFC/g sur milieu Chapman. On constate une diminution progressive du nombre de colonies bactériennes. Pour le second échantillon sans HE, la charge bactérienne a légèrement augmenté, elle est de 1.32×10^6 UFC/g sur GN et de 8.2×10^5 UFC/g sur milieu Chapman (Fig.45).



Fig.45. Culture de la crème pâtissière après quatre heures de conservation à 4°C

Les échantillons conservés 04 heures à température ambiante présentent des charges bactériennes de 4.7×10^4 UFC/g de *MMAT* et de 9.9×10^3 UFC/g de staphylocoques dans l'échantillon à l'HE et plus de 10^6 UFC/g des deux groupes bactériens pour le second échantillon.

Après 24 heures et à 4°C, l'échantillon à l'HE contient 2.03×10^3 UFC/g de *MMAT* et 2.2×10^2 UFC/g de staphylocoques. On remarque que le nombre de microorganismes a encore diminué. Pour l'échantillon témoin, la charge bactérienne est très importante, nous avons dû diluer encore l'échantillon à la dilution suivante, où on a compté plus de 10^6 UFC/g dans toutes les boîtes (Fig.46).



Fig.46. Culture sur milieu Chapman après vingt-quatre heures de conservation à 4°C

Les échantillons additionnés de l'extrait testé, conservés un jour à température ambiante contiennent 6.68×10^4 UFC/g de *MMAT* et 7.5×10^2 UFC/g de staphylocoques. Alors que pour l'échantillon sans HE, les charges bactériennes sont très importantes.

Après 48 heures, la charge bactérienne augmente pour les deux types d'échantillons. Elle dépasse les 10^4 UFC/g pour l'échantillon à l'HE proposée et les 10^7 UFC/g pour l'échantillon témoin. Résultat attendu car la crème pâtissière est un produit de détérioration rapide, elle doit être consommée le jour de sa confection.

La cinétique de l'évolution bactérienne pour les deux échantillons de la crème pâtissière du commerce est représentée par les courbes ci-dessous (Fig.47).

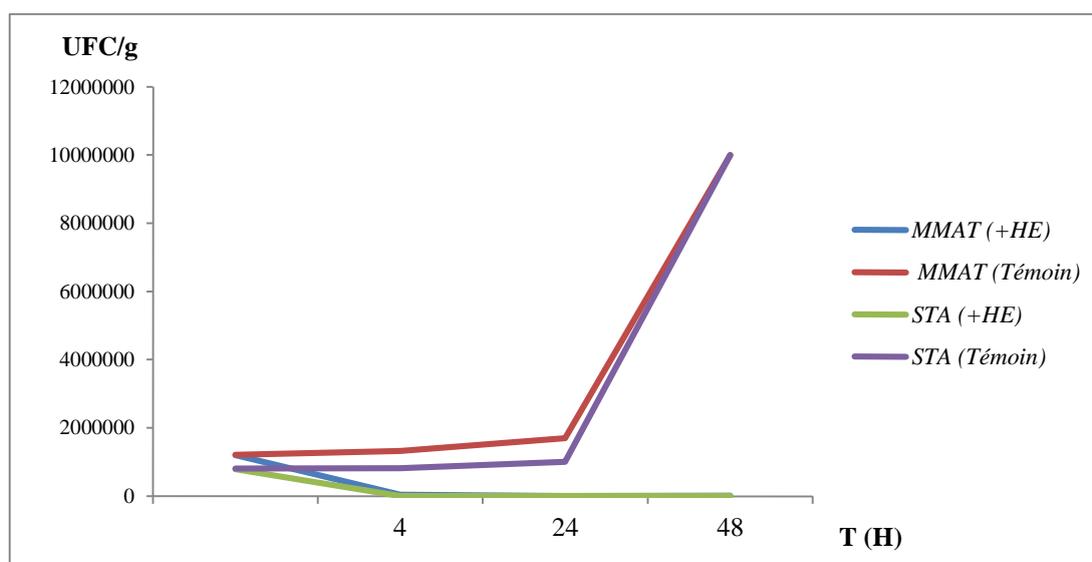


Fig.47.A. Dynamique de variation de la charge bactérienne de la crème pâtissière du commerce à 4°C

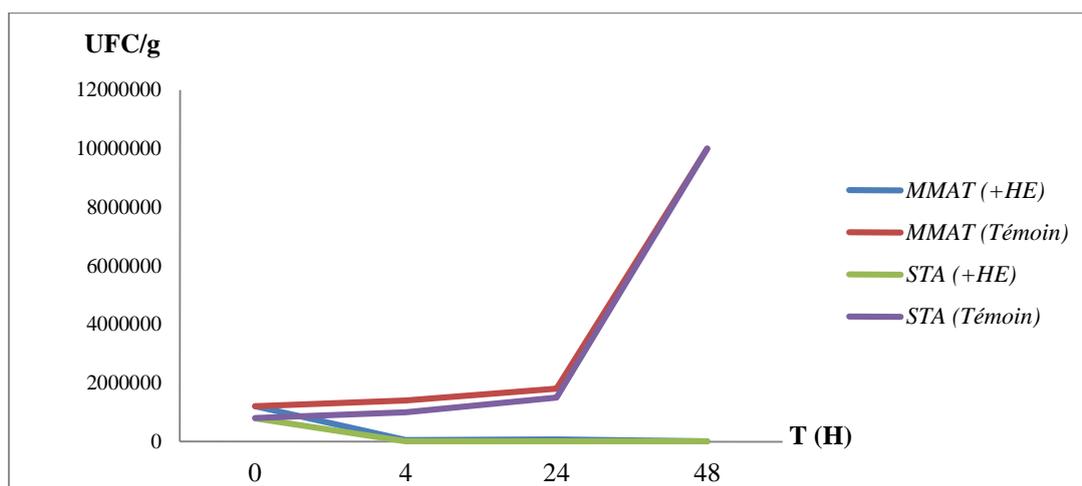


Fig.47.B. Dynamique de variation de la charge bactérienne de la crème pâtissière du commerce à 20°C

Les résultats statistiques révèlent que la différence du nombre de *MMAT* et de *Staphylococcus sp.* ne devient significative qu'après 24 heures de conservation de la crème pâtissière fabriquée au laboratoire, alors que pour celle du commerce, la différence devient significative à partir de quatre heures de conservation, puis très hautement significative après 24 heures.

Il paraît clairement que l'ajout de l'huile essentielle de Géranium rosat permet une réduction significative du nombre de *Staphylococcus sp.* et de la *MMAT* en générale, ce qui confirme les résultats obtenus "in vitro". En effet, on remarque que dès les premières heures d'entreposage, l'huile de Géranium a permis une réduction du nombre bactérien, alors que dans les autres spécimens dépourvus de l'HE, on constate une augmentation de ce dernier. Cela montre que l'effet de l'HE est instantané. Cette réduction est plus importante à 4°C, ceci peut s'attribuer au fait qu'à cette température, la concentration en HE est maintenue et l'évaporation est moindre.

On remarque également que les échantillons enrichis par l'HE et conservés toute une journée à 20°C présentent une charge bactérienne moins importante que l'échantillon à T₀ ce qui prouve que son activité progresse dans le temps, allant jusqu'à 24 heures.

On constate également que l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* possède une excellente rémanence car malgré la variation de la température et le temps passé la charge bactérienne reste dans la norme permise avec un nombre moins important par rapport à l'échantillon témoin.

H.J.D. Dorman et *al.* ont rapporté que l'ajout d'extraits de plantes aux produits alimentaires, ne causerait aucune modification des propriétés organoleptiques et retarderait la contamination microbienne [303]. C. N. Wendakoon et M. Sakaguchiont rapportent un effet synergique entre le chlorure de sodium et les HEs. Le mécanisme suggéré pour son interaction avec l'eugénol est l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire et par conséquent inhibition de la croissance bactérienne en raison de son action sur les enzymes intracellulaires [304]. N. Matan et *al.* ont testé des mélanges d'HEs de cannelle et de Clous de girofle sur des souches *Staphylococcus aureus* sous atmosphère modifiée (O_2 : < 0.05 à 10% et CO_2 : 20 ou 40%). Cette combinaison a augmenté considérablement l'efficacité antibactérienne [305].

Des études faites à travers le monde, montrent également que les huiles essentielles peuvent être ajoutées pratiquement à tous les aliments. Les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'huile essentielle selon le type d'aliment considéré. L'emploi des huiles essentielles lors de la transformation des aliments peut présenter un triple intérêt: aromatisant, antioxydant et antimicrobien [5].

Le résultat de la dégustation de la crème pâtissière à base de Géranium rosat indique que l'acceptation est unanime par l'ensemble des personnes ayant eu recours à ce test. Le goût est jugé bon pour 60% des sujets interrogés et très bon pour les 40% restants.

Notre étude confirme l'intérêt des HEs offrant ainsi un patrimoine à préserver, à développer et à valoriser, dans la mesure où nos résultats constituent, une base essentielle en faveur de leur exploitation dans l'industrie agroalimentaire, secteur émergent dans notre pays.

2. En tant que produit antiseptique

La main de l'homme est porteuse d'une microflore en perpétuelle variation. Elle est caractérisée par une gestuelle active la mettant en contact permanent avec des sites extrêmement divers et souvent très pollués [306]. On rapporte que la densité moyenne de la microflore des mains varie de 10^4 à 10^7 UFC/cm² [307]. Parmi les principaux microorganismes manu-portés les staphylocoques occupent une place prépondérante et leur densité varie de 10^3 à 10^6 UFC/cm² au niveau des zones humides tel que la paume de la main et les espaces interdigitaux. Elle est de 10 à 10^3 UFC/cm² au niveau des zones sèches comme le dos de la main [308].

Dans notre étude, aucun prélèvement n'a été effectué au delà de 03 heures après le lavage des mains car au-delà de ce temps, il n'y a pas de changement de tendances et que les étudiants se relavent automatiquement les mains.

Après incubation, les cultures des empreintes étaient confluentes dans la plupart des prélèvements effectués avant lavage des mains, ce qui a rendu difficile leur dénombrement. Nous avons supposé qu'un cm^2 de cultures confluentes est égal à 5×10^2 UFC.

On dénombre dans les boîtes de prélèvements effectués avant le lavage au savon 4.8×10^2 UFC/ cm^2 de *MMAT* et 3.8×10^2 UFC/ cm^2 de staphylocoques. Ce qui témoigne de la collaboration des volontaires en respectant les consignes demandées.

La caractérisation biochimique des cellules de divers colonies sur GN ainsi que sur milieu Chapman a permis d'associer les bactéries aux genres *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*), *Bacillus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* ou encore aux espèces *Corynebacterium jeikium*, *Acinetobacter baumannii*, etc.

Les cultures des prélèvements effectués aussitôt après le lavage des mains montrent une diminution très importante au niveau de toutes les boîtes.

Après le lavage au savon ordinaire, la présence de colonies bactériennes concerne 70% des sujets (Fig.48), représentée en moyenne par 9 UFC/ cm^2 de *MMAT* [0-16 UFC/ cm^2] et 6 UFC/ cm^2 de *Staphylococcus sp.* [0-10 UFC/ cm^2]. Il pourrait s'agir de bactéries de la microflore résidente, mais aussi du niveau de respect du protocole de lavage décrit précédemment.

La situation est nettement meilleure après lavage des mains au savon à base de l'HE de *Pelargonium graveolens*, où l'on note une absence totale de cultures microbiennes pour les deux groupes physiologiques bactériens recherchés. Ces résultats sont une preuve supplémentaire de la bonne activité de l'HE en question, aussi bien vis-à-vis de la microflore de contamination que la microflore résidente représentée par les staphylocoques. C'est ce qui nous a conduit à prévoir un second prélèvement après une heure de temps.

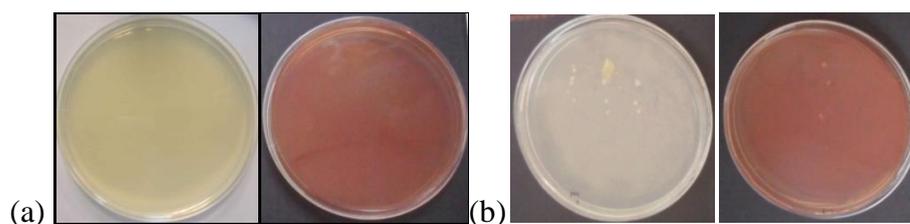


Fig.48. Culture après une minute du lavage des mains

(a) : au savon à base d'HE de *P. graveolens* ; (b) : au savon sans additif

Une fois l'heure écoulée, la croissance bactérienne est constatée sur toutes les boîtes de prélèvement fait après lavage au savon ordinaire et le dénombrement donne en moyenne 1.4×10^2 UFC/cm² de *MMAT* [$52 - 2.3 \times 10^2$ UFC/cm²] et 10^2 UFC/cm² de staphylocoques [$60 - 1.9 \times 10^2$ UFC/cm²] (Fig.49).



Fig.49. Cultures après une heure du lavage des mains au savon ordinaire

(a) : *MMAT* ; (b) : *Staphylococcus*

Pour les prélèvements après lavage au savon à tester, une croissance bactérienne est décelable dans 80% des boîtes de gélose nutritive avec une colonisation moyenne de 49 UFC/cm² et 55% des boîtes de gélose Chapman avec une moyenne de 12 UFC/cm². On constate que la microflore résidente et de contamination s'est reconstituée mais reste à des niveaux bas par rapport aux cas précédents (Fig.50).

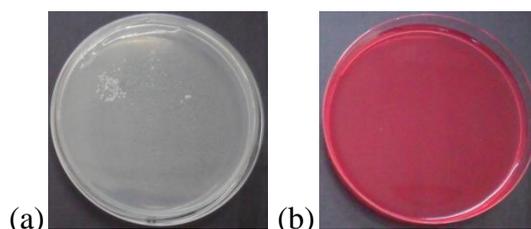


Fig.50. Cultures après une heure du lavage des mains au savon proposé

(a) : *MMAT* ; (b) : *Staphylococcus*

Deux heures après le lavage des mains et après que chaque étudiant ait repris ses activités habituelles, les résultats montrent que les bactéries ont proliféré dans tous les cas. Exception est constatée dans 10% des prélèvements d'échantillons après lavage des mains au savon additionné d'HE où il n'y a aucune croissance de staphylocoques. La charge bactérienne est beaucoup plus importante pour la première tranche d'étudiants, où elle dépasse 10^2 UFC/cm² sur toutes les empreintes (2×10^2 UFC/cm² de *MMAT* et 1.5×10^2 UFC/cm² de staphylocoques) (Fig.51).

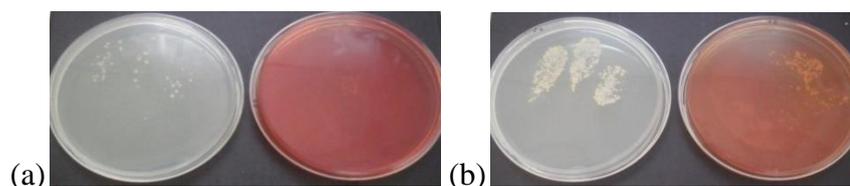


Fig.51. Cultures après deux heures du lavage des mains

(a) : au savon à base d'HE de *P. graveolens* ; (b) : au savon ordinaire

Pour les boîtes de prélèvements après le lavage au savon à tester, on remarque une réduction au tiers et l'on dénombre en moyenne 70 UFC/cm² de *MMAT* et 31 UFC/cm² de staphylocoques.

Après trois heures, apparaît une croissance bactérienne dans toutes les boîtes. Cette croissance est plus importante dans les boîtes après lavage au savon ordinaire. En effet, la charge bactérienne est indénombrable sur certaines empreintes sur gélose nutritive et dépasse 3x10² UFC/cm² sur gélose Chapman (Fig.52). Dans les prélèvements après lavage au savon proposé, la charge bactérienne est moins significative. Elle est en moyenne de 92 UFC/cm² de *MMAT* et de 42 UFC/cm² de staphylocoques.

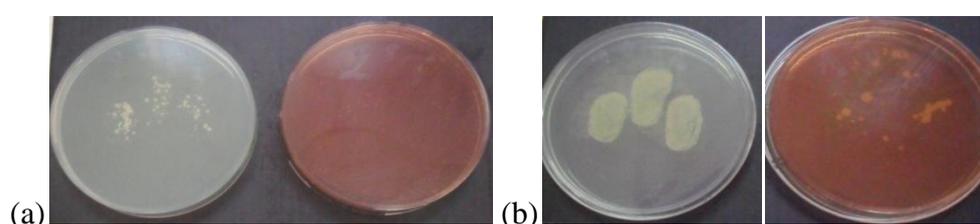


Fig.52. Cultures après trois heures du lavage des mains

(a) : au savon à base d'HE de *P. graveolens* ; (b) : au savon ordinaire

Des taux de réduction (TR) moyens ont été calculés. Les résultats sont résumés sur la figure 53 ci-dessous.

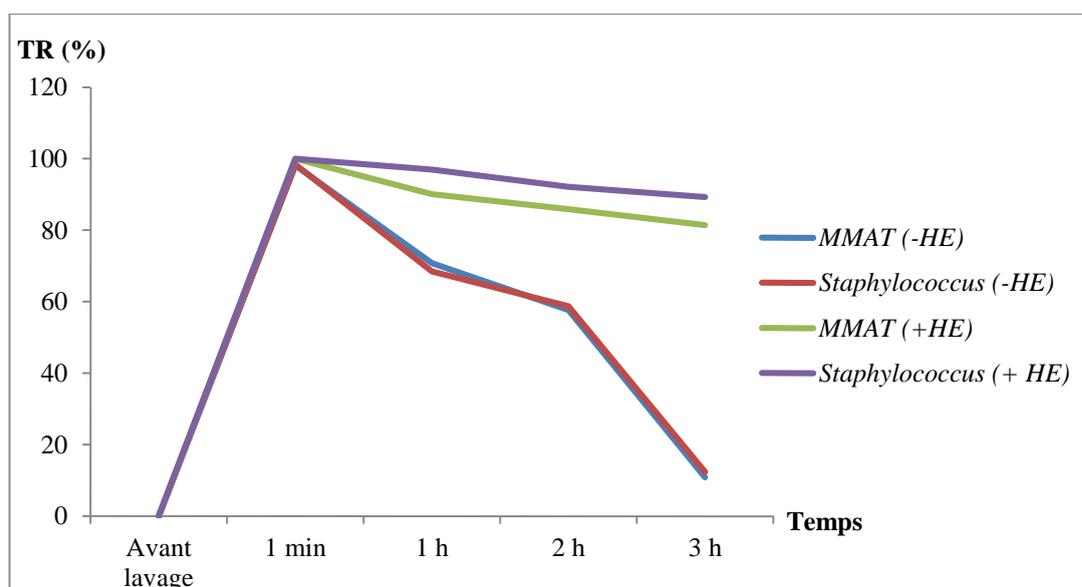


Fig.53. Taux de réduction bactérienne après lavage

Les résultats des analyses statistiques révèlent qu'avant lavage des mains, il n'y a aucune différence décelable entre les microflores des sujets, par contre après le lavage, la différence entre le nombre de *MMAT* et de *Staphylococcus sp.* des sujets testés et celui des sujets témoins, devient très hautement significative.

Les résultats des tests bactériologiques réalisés sont très satisfaisants montrant qu'après un lavage soigneux des mains durant une minute avec le savon proposé, le taux de réduction bactérienne sur la peau peut atteindre les 100%.

Le savon proposé montre une activité bactéricide prolongée dans le temps, jusqu'à deux heures après le lavage des mains, puisque le taux de réduction de *Staphylococcus sp.* est resté voisin de 100% chez certains sujets. La microflore ne s'est pas reconstituée malgré la reprise par les étudiants de leurs activités habituelles, ce qui prouve l'excellente rémanence du savon utilisé. Ajouté à tout cela, une bonne odeur attestée par la majorité des étudiants et aucune réaction allergique visible n'a été signalée.

Quand on sait que contrairement aux résultats obtenus dans notre étude, certains travaux rapportent une augmentation de la charge microbienne dans certains cas après lavage au savon. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer ce phénomène, la plus reprise fait état de la mise à nu de la microflore normale de la peau après la suppression de la couche superficielle de l'épiderme. Ajouté à cela, l'hypothèse d'une neutralisation de l'activité bactéricide des sécrétions voir leur élimination de la peau par le savon. A ne pas négliger la possibilité de contamination lors des prélèvements par le matériel (robinet, papier de séchage, etc.) [309].

Ce savon se confirme comme produit désinfectant et pourrait être utilisé dans la désinfection chirurgicale des mains. En effet, il a été démontré que la transmission croisée des agents pathogènes par les mains du personnel soignant au cours des soins est la cause principale des infections nosocomiales et que les staphylocoques, sensibles à l'HE sont les plus incriminés dans ce type d'infections [310].

Après ces résultats très encourageants, notre étude sur l'efficacité du savon à base de *Pelargonium graveolens* mériterait d'être améliorée et poursuivie en variant les concentrations de l'HE et le temps d'exposition, sur un échantillon plus large et pourquoi pas procéder à des essais dans des centres hospitaliers (services de soins intensifs, des brûlés, réanimation, etc.) où le lavage répété des mains est fortement recommandé.

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* présente plusieurs propriétés antibactériennes, ce qui fait d'elle une des solutions que l'on peut proposer pour soulever le défi de l'antibiorésistance.

Cette plante, connue surtout sous le nom dialectal de « *Attercha* » est peu utilisée en Algérie. Elle est surtout connue pour son aspect décoratif, alors qu'elle possède de grandes vertus aromatiques et médicinales. Appartenant à la famille des *Geraniaceae*, ce végétal s'adapte parfaitement au climat méditerranéen et rien ne s'oppose à sa culture intensive, la région de récolte de notre échantillon (*Chiffa*) en est l'exemple édifiant.

Le taux d'humidité des parties aériennes considérées est comparable aux taux normaux (70.16%) et les observations descriptives des coupes histologiques ne laissent apparaître aucune spécificité notable quand à la forme et la disposition des poils sécréteurs.

L'HE obtenue par hydrodistillation est liquide, de couleur jaune verdâtre, possédant une odeur rosée citronnée caractéristique de la plante. Le rendement et les indices physiques de l'essence sont à des taux compris dans l'intervalle des normes ISO et AFNOR. Les facteurs extrinsèques ont une influence certaine sur le rendement en HE, qui peut être augmenté par des améliorations génétiques, ou encore, par optimisation des conditions de culture.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier quarante composants correspondant à 96.86% des constituants isolés. Cette huile est composée principalement de citronellol, de géraniol, de formiate de citronellyle, de 10-épi- γ -eudesmol, d'acétate de géranyle, de linalol, de butyrate de géranyle, de longifolène et de l'isomenthone. Les concentrations des autres constituants sont inférieures à 3%.

Du point de vue biochimique, les constituants de cette HE se répartissent sur sept familles, représentées essentiellement par des alcools monoterpéniques (38.85%), des esters terpéniques (29.54%) et des sesquiterpènes (14.97%).

Le profil chromatographique de l'essence de la dite plante permet de l'associer au chémotype « citronellol » et au cultivar « Egypte ». Le Géranium rosat aurait plusieurs

comportements dictés par le milieu écologique, le climat, l'altitude, la pluviométrie et la nature du sol, facteurs importants qui influenceraient la biosynthèse des constituants volatils.

Par ailleurs, les 150 souches bactériennes isolées à partir d'infections communautaires sont multirésistantes aux antibiotiques, avec un pourcentage de souches *BLSE* et *MRSA* assez élevé. Cependant, ces souches sont sensibles à l'HE de *Pelargonium graveolens*, à l'exception d'*Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. Les valeurs absolues des diamètres des zones d'inhibition montrent de larges écarts allant de 7.20 mm à 42.80 mm, ce qui témoigne d'un comportement variable selon le groupe physiologique bactérien.

Klebsiella pneumoniae, *K. oxytoca*, *Enterobacter sakazakii*, *E. cloacae*, *Citrobacter koseri* et *C. freundii* sont sensibles à l'HE avec des diamètres de zones d'inhibition qui varient dans un intervalle relativement étroit reflétant un comportement identique des espèces du deuxième sous groupe de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Les souches *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* très résistantes aux antibiotiques et à l'origine de plusieurs échecs thérapeutiques montrent une sensibilité à l'huile testée, encore plus appréciable pour *A. baumannii*, ce qui témoigne encore une fois du rôle éco-biologique de protection de l'HE vis à vis des bactéries de l'environnement immédiat de la plante.

L'activité antibactérienne est encore beaucoup plus importante sur les cocci à Gram positif. En effet, les staphylocoques sont très sensibles, en particulier *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis* sont extrêmement sensibles à l'huile. Il ne ressort aucune relation directe entre la résistance aux antibiotiques et la sensibilité à l'HE de *P. graveolens*.

Les *MRSA* ou encore les entérobactéries résistantes aux β -lactamines, bactéries de plus en plus incriminées et qui posent d'énormes problèmes de santé, ont montré une sensibilité comparable à celle observée pour les souches sensibles (*MSSA* et entérobactéries non productrices de *BLSE*). Ce qui nous laisse déduire que les enzymes impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez ces bactéries n'ont aucun effet sur l'huile essentielle testée.

La valeur moyenne des concentrations minimales inhibitrices est de 1%. Toutes les souches testées sont sensibles à des concentrations inférieures ou égales à 2% d'huile essentielle. On enregistre une meilleure activité sur les cocci à Gram positif avec des CMI variant de 0.1% à 0.5%. Les concentrations minimales bactéricides de l'huile sont beaucoup

plus importantes et dépassent les 4% pour les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*, elles sont de 2% pour *Acinetobacter baumannii* et sont inférieures ou égales à 0.7% pour les cocci à Gram positif testés. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs des CMI et des CMB des souches résistantes aux antibiotiques (productrices de β -lactamases à spectre élargi et *Staphylococcus aureus* résistants à la méthiciline) et celles des souches sauvages.

L'activité de l'huile essentielle est de type bactériostatique sur les entérobactéries et *P. aeruginosa* et est bactéricide vis-à-vis d'*A. baumannii* et les cocci à Gram positif testés. Encore meilleur est ce pouvoir bactéricide sur les souches *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis*. Il ressort alors, une activité concentration dépendante vis-à-vis des bacilles à Gram négatif alors qu'elle est temps dépendante sur les cocci à Gram positif. Ceci ouvre des perspectives d'utilisation de cette HE vis-à-vis de ces souches en faible concentration ce qui réduirait le risque de toxicité et permettrait son usage interne au niveau des muqueuses.

L'activité de l'HE sur la plupart des bactéries testées dans cette étude semble s'expliquer par la présence en forte concentration d'alcools terpéniques. Ces derniers sont actifs sur les cellules bactériennes car solubles dans les milieux aqueux, ils provoquent d'importants dommages sur les parois bactériennes. Nous pouvons poser la question suivante: Par quel moyen procéder à l'amélioration de la productivité de ces composés et par conséquent, augmenter l'activité antibactérienne de cette huile essentielle ?

L'effet synergique de l'HE de *Pelargonium graveolens* avec les différents antibiotiques a permis une augmentation de tous les diamètres des zones d'inhibition. Ces changements sont devenus significatifs dans plus de 35% des associations, avec une meilleure synergie avec les aminosides (gentamicine et amikacine), la ciprofloxacine, triméthoprime + sulfaméthoxazole, nitrofurantoines et la fosfomycine, antibiotiques très utilisés en médecine humaine et vétérinaire.

L'HE étudiée est un agent antibactérien naturel efficace et devrait être utilisé comme produit antiseptique, mais aussi comme conservateur de denrées alimentaires, exposées aux contaminations microbiennes notamment par les staphylocoques. Ainsi, l'addition de l'HE de *Pelargonium graveolens* aux crèmes pâtisseries a permis une réduction significative du nombre de *Staphylococcus sp.* et de la microflore mésophile aérobie totale, ce qui reconforte les résultats obtenus "*in vitro*".

En plus d'une excellente rémanence, malgré la variation de la température et le temps passé, la charge bactérienne reste significativement réduite par rapport à l'échantillon témoin même après une journée de conservation à température ambiante ou encore 48 heures de conservation à 4°C. De plus, sa bonne saveur est attestée par l'ensemble des sujets ayant goûté cette crème pâtissière. Des études ultérieures plus approfondies doivent être effectuées afin de vérifier son innocuité par des tests de toxicité et d'allergénicité.

Une bonne activité antiseptique du savon à base d'HE de *Pelargonium graveolens* s'exprime par la diminution très hautement significative et le maintien à un niveau bas de la *MMAT* et de *Staphylococcus sp.* jusqu'à trois heures après le lavage. Ceci trouve un intérêt économique quand à la réduction du nombre de lavage des mains notamment chez le personnel soignant.

Cette étude conforte les opinions portant sur le grand intérêt qu'offrent les HEs comme un des éléments contribuant à la solution des problèmes de résistances et de la limite des synthèses chimiques de produits antimicrobiens. Ainsi, c'est un patrimoine à préserver, à développer et à valoriser, dans la mesure où nos travaux et les applications concrètes proposées, constituent une base non négligeable en faveur de leur exploitation dans l'industrie agroalimentaire. Ils laissent également entrevoir des perspectives d'application dans les processus de décontamination et de désinfection chirurgicale des mains, des surfaces et du matériel médico-chirurgicales, et ce, après étude et conception de formules adaptées.

Perspectives

Ce travail constitue une ébauche pouvant servir de base à des études plus élaborées sur un groupe bactérien plus conséquent et physiologiquement diversifié, dans la perspective d'une meilleure valorisation et des applications plus élargies par :

- Amélioration génétique de la plante afin d'avoir un meilleur rendement en HE et une meilleure qualité.
- Analyse approfondie de la composition chimique du cocktail et de chaque composé actif.
- Essais sur des champignons, virus et parasites.
- Analyse d'éventuelles synergies de l'HE avec d'autres molécules bioactives d'origine naturelle et/ou chimique.
- Réalisation de tests toxicologiques complets afin de préciser le domaine d'application et les concentrations adéquates.
- Réalisation de tests complémentaires afin de s'assurer de la non interférence de l'action du principe actif avec les cellules immunitaires (effet protéolytique sur les IgA)
- Conceptions de formules galéniques adaptées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. S. Carle. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! Le parrainage des antimicrobiens : vision 2010. *Pharmactuel* 2009 ; 42 (Suppl. 2) : 6-21.
2. J.L. Avorn, J.F. Barrett, P.G. Davey, S.A. McEwen, T.F. O'Brien, S.B. Levy. Organisation mondiale de la santé (OMS). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics, 2001.
3. K. Bush, P. Courvalin, G. Dantas, J. Davies, B. Eisenstein, P. Huovinen et al. Tackling antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011 ; 9 : 894-896.
4. J. Conly. Antimicrobial resistance in Canada. *Can. Med. Assoc. J.* 2002 ; 167: 885-891.
5. S. Caillet, M. Lacroix. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, RESALA Université de Laval, Québec, Canada ; 2007 : 1-8.
6. Institut de veille sanitaire (InVS) et Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Bilan des données de surveillance ; 2014 : 1-10.
7. E. Batard, E. Montassier, F. Ballereau, G. Potel. De la consommation d'antibiotiques aux résistances bactériennes : l'exemple de la résistance d'*Escherichia coli* aux quinolones. *Médecine thérapeutique* 2011 ; 17 : 294-301.
8. S. Bevilacqua. Evaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé). Thèse de Doctorat, Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement), 2011.
9. K. Herzog, M. Krause. Résistance bactérienne: début de l'ère post-antibiotique. *Swiss Medical Forum* 2015 ; 15: 266-270.
10. H. Goossens, M. Ferech, R. Vander Stichele, M. Elseviers. ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a crossnational database study. *Lancet* 2005; 365: 579-587.
11. D. Baudoux. L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. Ed. Amyris. 2008.
12. N. Bouzouita, F. Kachouri, M. Ben Halima, M. M. Chaabouni. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phœnicea*. *J. Soc. Chim. Tunisie* 2008 ; 10: 119-125.

13. F. Haddouchi, A. Benmansour. Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire* 2008 ; 8: 23-27.
14. S. Omar S. Hassane, M. Ghanmi, B. Satrani, A. Farah, N. Mansouri, A. Chaouch. Activité antifongique contre la pourriture du bois de l'huile essentielle de *Pelargonium x asperum* Erthrt. Ex Willd des îles Comores. *Bull. Soc. R. Sci. Liège* 2012 ; 81: 36-49.
15. M. Kempf, M. Eveillard, F. Kowalczyk, E. Rossines, G. Panhelleux, M. L. Joly-Guillou. Etude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composés JCA250 et JCA251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologies. *Path. Bio.* 2011; 59: 39-43.
16. B. Satrani, M. Ghanmi, A. Farah, A. Aafi, H. Fougrach, B. Bourkhiss et al. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 2007; 146: 85-96.
17. O. Toubal, A. Djahoudi, C. Henchiri, M. Bouazza. Phytochemical screening and antimicrobial evaluation of the aqueous extracts of *Ammoides verticillata*, an endemic species. *Journal of Life Sciences* 2012; 6: 243-247.
18. E. Yayi-Ladekan, D.S.S. Kpoviessi, F. Gbaguidi, B.G.H. Kpadonou-Kpoviessi, J. Gbenou, C. Jolival et al. Variation diurne de la composition chimique et influence sur les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims cultivé au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2011; 5: 1462-1475.
19. N.T. Beniston, W.S. Beniston. Fleurs d'Algérie. Ed 1822/84. Entreprise nationale du livre. Alger- Algérie. 1984.
20. H.R. Juliani, A. Koroch, J.E. Simon, N. Hitimana, A. Daka, L. Ranarivelo et al. Quality of *Geranium* oils (*Pelargonium* Species): Case Studies in Southern and Eastern Africa. *J. Essent. Oil Res.* 2006; 18 (Special Edition):116-121.
21. M. Lis-Balchin. *Geranium* and *Pelargonium*. The genera *Geranium* and *Pelargonium*. Ed. Taylor & Francis; South Bank University, London, UK. 2002; 49-51.
22. M.T. Lis-Balchin. Handbook of herbs and spices. Vol. 2, Ed. K.V. Pete; South Bank University, Royaume-Uni. 2004.
23. A. Moro Buronzo. Grand guide des huiles essentielles. Ed. Hachette pratique. 2008 : 191.
24. D. Yala, A.S. Merad, D. Mohamedi, M.N. Ouar Korich. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* 2001 ; 91: 5-12.
25. E. Guinoiseau. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, Université de Corse, 2010 : 65-68.

26. J. Favet. Les micro-organismes dans les aliments, Aspects positifs et négatifs! Séminaire de bactériologie ; Genève, Suisse. 2014.
27. V. Fournier. La résistance bactérienne aux antibiotiques. Projets interdisciplinaires : science, technologie, environnement, société. Université Laval, Canada. 2003 : 13-22.
28. J.P. Euzeby. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. Ed. Société de bactériologie systématique et vétérinaire ; Blagnac, France. 2009.
29. L. Michel. Etude de la sensibilité aux antimicrobiens. Documentation technique ; Grenoble, France. 2011 : 1.
30. G.S. Simonsen, J. W. Tapsall, B. Allegranzi, E. A. Talbot, S. Lazzari. The antimicrobial resistance containment and surveillance approach-a public health tool. *Bull. World Health Organ.* 2004; 82: 928-934.
31. Haut Conseil de la Santé Publique. Prévention de la transmission croisée des Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe). Paris, France. 2013.
32. Centre de santé et de services sociaux Champlain. Guide d'utilisation des antibiotiques. Ed.5 : Québec, Canada. 2013.
33. M.J. Rybak. Resistance to antimicrobial agents: an update. *Pharmacotherapy* 2004; 24(suppl 12): 203-215.
34. P.S. Morley, M.D. Apley, T.E. Besser, D.P. Burney, P.J. Fedorka-Cray, M.G. Papich et al. Antimicrobial drug use in veterinary medicine. *J. Vet. Intern. Med.* 2005; 19: 617-629.
35. A. Muylaert, J.G. Mainil. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.* 2012 ; 156 : 109- 123.
36. Comité canadien sur la résistance aux antibiotiques : Agroalimentaire, 2005. <http://www.ccar-ccra.com/french/agrifood-f.shtml> (site visité le 31 mars 2014).
37. P. Chevalier. L'usage des substances antimicrobiennes en production animale : position des experts et des gouvernements. Institut national de santé publique du Québec. Canada. 2012.
38. H. Chardon H. Brugere. Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes. Centre d'Information des Viandes ; Paris, France. 2014.
39. Santé Canada. La résistance aux antimicrobiens : établir une compréhension. Médicaments et produits de santé, 2009. [http : //www.sc-hc.gc.ca](http://www.sc-hc.gc.ca) (site visité le 31 mars 2014)
40. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. Mandell. Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Ed.6: Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA. 2005.

41. Z. Imounachen. Résistance aux antibiotiques: l'affaire de tous. *Infosanté : la revue des professionnels de la santé et du médicament* 2014 ; 2 : 14-16.
42. J.L.A. Moroh. Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne occidentale – Brest, France 2013 : 30-31.
43. A. Lozniewski, C. Rabaud. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins. CCLIN Sud-Est ; Nancy, France. 2010.
44. A. Cherrad. Evaluation critique de la prescription des antibiotiques dans l'angine : Etude prospective menée au centre de santé HAY EL HASSANI à Casablanca (MAROC). Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal. 2007 : 80-85.
45. A.M. Bourgault, M.C. Domingo, A. Fortin, F. Malouin, M. Troesch, A. Trudelle. Surveillance intégrée de la résistance aux antibiotiques. Institut national de santé publique du Québec, Canada. 2014.
46. Agence de la santé publique du Canada. Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales : Surveillance de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) chez les patients hospitalisés dans des hôpitaux canadiens de soins de courte durée. http://www.phac-aspc.gc.ca/nois-sinp/reports-rapport/mrsa-sarm_result-fra.php (site visite le 19 avril 2014).
47. A. Friggeri, H. Dupont. Infections à Cocci à Gram positif : les nouvelles molécules. Congrès national d'anesthésie et de réanimation. Conférences d'actualisation. Paris, France. 2008 : 233-245.
48. M. J. Rybak, K.L. Laplante. Community-associated-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. *Pharmacotherapy* 2005; 25:74-85.
49. C. Tremblay. Mise à jour du traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline. *Pharmactuel* 2008;41:284-95.
50. Agence de santé publique du Canada. Maladies évitables par la vaccination: le pneumocoque. <http://www.phac-aspc.gc.ca/im/vpd-mev/pneumococcal-fra.php>. (site visite le 19 avril 2014).
51. P. Vigeant, L. Jette, C. Frenette, M. Gourdeau, J. Letourneau. Rapport de surveillance de l'entérocoque résistant à la vancomycine. Rapport de septembre 2006 à aout 2007. Institut national de santé publique du Québec. Laboratoire de santé publique du Québec, Canada. 2008.

52. S. Vaux, B. Coignard. Alerte sur la résistance aux antibiotiques des entérobactéries en France : diffusion des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu (EBLSE) et émergence des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC). Journée européenne de sensibilisation au bon usage des antibiotiques. 2013.
53. T.H. Dellit, R.C. Owens, J.E. Jr. McGowan, D.N. Gerding, R.A. Weinstein, J.P. Burke et al. Infectious diseases society of America and the society for healthcare epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44:159-177.
54. K. Bush, G.A. Jacoby, A.A. Medeiros. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 1995; 39:1211-1233.
55. S.K. Dubois, M.S. Marriott, S.G.B. Amyes. TEM and SHV-derived extended spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure, and function. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 35:7-32.
56. L. Arsalane, Y. Qamouss, A. Chafik, M. Boughalem, L. Louzi. Epidémiologie des bactéries multirésistantes dans un service de réanimation polyvalente d'un hôpital universitaire de Marrakech entre octobre 2006 et septembre 2009. *Les technologies de laboratoire* 2010 ; 21 : 11-19.
57. A.A. Shah, F. Hasan, S. Ahmed, A. Hameed. Extended-spectrum beta-lactamases (ESbLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit. Rev. Microbiol.* 2004; 30: 25-32.
58. R. Colodner. Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *Am. J. Infect. Control.* 2005; 33: 104-107.
59. V. Cattoir. Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). *Pathologie infectieuse en réanimation* 2008 : 4-9.
60. M.E. Ibrahim, N.E. Bilal, M.A. Magzoub, M.E. Hamid. Prevalence of Extended-spectrum β -Lactamases-producing *Escherichia coli* from Hospitals in Khartoum State, Sudan. *Oman Med. J.* 2013; 28:116-120.
61. E. Zogheib, H. Dupont. Entérobactéries multirésistantes. Conférences d'actualisation. Ed. Elsevier 2005; 153-165.
62. H. Rodriguez Villalobos, M.J. Struelens. Résistance bactérienne par bêta-lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation.* 2006;15: 205-213.
63. Agence de santé publique du Canada. Lignes directrices pour l'évaluation de la sensibilité des *Enterobacteriaceae* résistants aux antibiotiques à cause des β -lactamases à spectre

- étendu (BLSE) et le signalement des cas. <http://www.phac-aspc.gc.ca/>. (Site visité le 22 Avril 2014).
64. A.M. Queenan, K. Bush. Carbapenemases: the versatile betalactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20:440-458.
65. G. Cornaglia, G.M. Rossolini. The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16:99-101.
66. M. Watanabe, S. Iyobe, M. Inoue, S. Mitsuhashi. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35:147-151.
67. W. Scaife, H.K. Young, R.H. Paton, S.G.B. Amyes. Transferable imipenem resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 36:585-586.
68. H. Yigit, A.M. Queenan, G.J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J.W. Biddle, C.D. Steward et al. Novel carbapenemhydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45:1151-1161.
69. N. Grall, A. Andremont, L. Armand-Lefèvre. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *J. antinf.* 2011; 03:87-102.
70. P. Nordmann, L. Poirel. Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatives: épidémiologie, aspects théoriques et détection. *Rev. Med. Suisse* 2014; 10: 902-907.
71. L. Martinez-Martinez, A. Pascual, G.A. Jacoby. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-799.
72. V. De Lastours, B. Fantin. Résistance aux fluoroquinolones en 2013 : quel impact pour l'interniste. *Rev. Med. Interne* 2014 ; 9 :601-608.
73. A. Muylaert, J.G. Mainil. Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. *Ann. Med. Vet.* 2013; 157: 15-26.
74. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Mise au point sur le traitement antibiotique probabiliste des urétrites et cervicites non compliquées. France. 2008. <http://www.afssaps.fr> (site internet visité le 22 mars 2014)
75. Organisation mondiale de la Santé. Résistance aux antimicrobiens. Aide-mémoire 2014 : 194.
76. J.M. Rolain, M. Berrazeg. Nouvelles stratégies de détection et de surveillance des bactéries multi-résistantes. Bactériologie : Résistance aux antibiotiques. *Feuillets de Biologie* 2014 ; 317 : 27-33.

77. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. 2013: 6.
78. Association Française de Normalisation. Les huiles essentielles. Recueil de normes. Ed.4 : AFNOR, Paris. 2011.
79. Organisation internationale de normalisation (ISO). Matières premières d'origine naturelle. Norme ISO 9235 2013 : 2.
80. A. Sanon, M. Garba, J. Auger, J. Huiganrt. Analysis of insecticidal activity of methulisocyanate on *Callosobruchus maculatus* and its parasitoid *Dinarmus basalis*. *J. Stored Prod. Res.* 2002; 38: 129-138.
81. M. Garnier, V. Delamarre. Dictionnaire des termes de médecine. Ed.31 : Maloine, Paris. 2012.
82. Laboratoires Phytosun Arômes. Guide pratique : les 46 huiles essentielles. 2006 : 38.
83. G. Girard. Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaires d'hier à aujourd'hui : Mise au point d'un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincare - Nancy 1, France. 2010 : 9-10.
84. S. Derbré. Emploi de la phytothérapie et de l'aromathérapie en prévention et traitement des dermatomycoses. *Act. Pharm.* 2009 : 484.
85. P. Franchomme, R. Jollois, D. Pénéol. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Ed. Jollois, Limoges, France. 1990 : 445-447.
86. G. Roulier. Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Ed. Dangles. 1990.
87. J.L. Abrassart. Aromathérapie essentielle : huiles essentielles : parfums pour le corps et l'âme. Ed. Guy Trédaniel.1997 : 271.
88. P. Manoury. ABC des médecines douces. Ed. Grancher. 2003 : 325.
89. E.J. Bowles. Guide des huiles essentielles : Que sont-elles? D'où viennent-elles? Comment agissent-elles? Le Courrier du Livre. 2004 : 160.
90. R.M. Gattefossé. Aromathérapie : les huiles essentielles, hormones végétales. Ed. Librairie des Sciences, Girardot et Cie, Paris. 1937 : 187.
91. M. Nicole. L'aromathérapie scientifique : une prodigieuse thérapie naturelle à découvrir!! Institut d'Aromathérapie Scientifique, 2009.

92. J. Valnet. Aromathérapie : traitement des maladies par les essences de plantes. Ed.10 : Maloine. 1984 : 544.
93. F.X. Garneau. Le matériel végétal et les huiles essentielles. *In* Huile essentielle : De la plante à la commercialisation. Ed. Corporation LASEVE. Université Chicoutimi, Québec, Canada. 2005.
94. J. Bruneton. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Ed.4 : Lavoisier, Paris. 2009 : 405-429.
95. A.C. Degryse, I. Delpla, M.A. Voinier. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement* 2008 : 87.
96. R. Anton, A. Lobstein. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec & Doc, Paris. 2005 ; 522.
97. Y. Li, A.S. Fabiano-Tixier, F. Chemat. History, localization and chemical compositions. *In: Essential oils as reagents in green chemistry*. Ed. Springer. Avignon, France. 2014: 4.
98. J.M. Prado, P.F. Leal, M.A.A. Meireles. Extracting bioactive compounds for food products: Theory and applications. Ed. CRD Press, Tayer & Francis Group. New York, USA. 2009 : 35.
99. N. Venturini. Contribution chimique à la définition de la qualité : exemples des spiritueux de myrte (*Myrtus communis* L.) et de cédrat (*citrus medica* L.) de corse. Thèse de Doctorat. Université de Corse-Pascal Paoli, France. 2012.
100. International Centre for Science and High Technology. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. 2008.
101. G. Dugo, A. Di Giacomo. *Citrus: The Genus Citrus*. Ed. CRC Press. 2002.
102. S. Clarke. Essential oils. Ed.2: Churchill Livingstone, Elsevier. 2008: 42-77.
103. P. Tongnuanchan, S. Benjakul. Essential Oils: extraction, bioactivities, and their uses for food Preservation. *Journal of Food Science* 2014; 7: 1231-1249.
104. F. Couic-Marinié, A. Lobstein. Composition chimique des huiles essentielles. Les huiles essentielles à l'officine. *Act. Pharm.* 2013 ; 565 : 22-25.
105. N.C.M. Kotamballi, G.K. Jayaprakasha, M.M. Shivappa, S.P. Bhimanagouda. *Citrus* monoterpenes: Potential source of phytochemicals for cancer prevention. *In: Emerging trends in dietary components for preventing and combating disease*. Ed. American Chemical Society; Washington, USA. 2012: 545-558.
106. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. 2008.

107. N. Sadgrove, G. Jones. A contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for australian agriculture. *Agriculture* 2015 ; 5 : 48-102.
108. J.P. Goossens, A. Lepoittevin. Allergie de contact aux cosmétiques et aux composants de parfums : aspects cliniques, chimiques et diagnostiques nouveaux. *Rev. Fr. Allergol.* 2003; 43: 294-300.
109. J. P. Haluk. L'univers du parfum. Ed. Académie Lorraine des Sciences. 2005.
110. L. Ngamo, T. Hancet. Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. *Tropicultura* 2007 ; 25 : 215-220.
111. D. Ciccarelli, F. Garbari, A.M. Pagni. The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae): secretory structures, unicellulaire *papillae*, and their ecological role. *Flora* 2008; 203: 85-93.
112. V. De Feo, F. De Simone, F. Snatore. Potential allelochemicals from the essential oils of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 2002; 61: 573-578.
113. F.K. El-Baz, K. Mahmoud, W.M. El-Senousy, O.M. Darwesh, A.E. El-Gohary. Antiviral-antimicrobial and schistosomicidal activities of *Eucalyptus camaldulensis* Essential Oils. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2015 ; 31: 262-268.
114. A.Y. Gibriel, H.M.A. Al-Sayed, A.H. Rady, M.A. Abdelaleem. Synergistic antibacterial activity of irradiated and nonirradiated cumin, thyme and rosemary essential oils. *J. Food Saf.* 2013; 33: 222-228.
115. G. Murganathan, S.C. Pabbithi. Antimicrobial constituents from plants. *Int. Res. J. Pharm.* 2012 ; 3 : 5-9.
116. L. R. Hernandez Ochoa. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale Toulouse, France. 2005 : 18.
117. A. Sipailiene, P.R. Venskutonis, R. Baranauskiene, A. Sarkinas A. Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *J. Essent. Oil Res.* 2006; 18: 698-703.
118. E. Guenther. The essential oils: History - Origin in Plants - Production – Analysis. Ed. D Van Nostrand, New-York, USA. 2007.
119. O. Koul, S. Walia, G.S. Dhaliwal. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopest. Int.* 2008; 1 : 63-84.
120. G.E. Wickens. Economic botany: principles and practices. Ed. Kluwer Academic; Dordrecht, The Netherlands. 2001.

121. L. De Masi, P. Siviero, C. Esposito, D. Castaldo, F. Siano, B. Laratta. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 2005; 223: 273-281.
122. A. Zhiri, D. Baudoux. Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Aromathérapie scientifique. Ed. Inspir développement. 2009.
123. S. Hellerström, N. Thyresson, G. Widmark. Chemical aspects of turpentine eczema. *Dermatologica* 1957;115: 277-286.
124. A.T. Karlberg, A. Dooms-Goossens. Contact allergy to oxidized *d*-limonene among dermatitis patients. *Contact Dermatitis* 1997; 36: 201-206.
125. M. Matura, M. Skold, A. Borje, K.E. Magnusson, M. Bruze, P. Frosch et al. Selected oxidized fragrance terpenes are common contact allergens. *Contact Dermatitis* 2005; 52: 320-328.
126. A.C. Le géranium rosat dans l'Afrique du Nord. *Rev. Bot. App. Agr. Col.* 1927 ; 68 : 273-275.
127. K. Ghedira, P. Goetz. Géranium rosat: *Pelargonium graveolens* L'Hér. *Phytothérapie* 2015 ; 13 : 197-201.
128. Recluz. Distillation du géranium à Lyon en 1819. *Pharm. Journal London* 1852 ; 11 :325.
129. F. Demarne. Histoire de la culture botanique et systématique du géranium. In : Le géranium rosat à la Réunion. APR, CIRAD, Chambre d'agriculture de la Réunion, CAHEB, Réunion-SPV, SAFER-Réunion. Ed. Saint-Denis : CAH. 1992 : 23-25.
130. L. Peyron. Histoire du « Géranium rosat pour parfumerie » dans le pays de Grasse. Association historique du pays de Grasse. France. 2013.
131. A. Chiris. Les essences de Géranium. *Les Parfums de France* 1925 : 272-280.
132. M.N. Boukhatem, F. Saidi, M.S. Hamaidi, Y. Hakim, M. Mekarnia. Culture et exploitation industrielle du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) en Algérie: état des lieux et perspectives. *Phytothérapie* 2011 ; 5 : 304-309.
133. Agribusiness in Sustainable Natural African Plant Products (ASNAPP). Rose scented *Pelargonium*. www.asnpp.org. (Site consulté le 21 juin 2011).
134. M. Maaoui. Atlas : Plantes ornementales des Ziban. Ed. CRSTRA, Biskra, Algérie. 2014: 225.
135. R. Lavergne. Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui. Ed. Orphie. 2004.
136. Union des Comores, Unité-Solidarité-Développement. Colloque international sur le Karthala. Moroni, Palais du Peuple, Comores. 2008 : 42-43.

137. J.B.H. Lejeune. Le Géranium Rosat au Congo belge. *Rev. Bot. App. Agr. Col.* 1936 ; 180 : 627-652.
138. U.A. Dasuki. *Pelargonium* Rosat Group. Plant Resources of Tropical Africa. Ed. Prota, Wageningen, Pays Bas. 2002.
139. International Standard ISO 4731. Oil of geranium (*Pelargonium* X ssp.) 2nd Ed. 2006.
140. B. Er-Rouissi, A. Kribii, A. Kribii, A. Habsaoui, K. Ounine. Etudes de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits du Géranium rosat du Gharb. Recueil des résumés; 3^{ème} Journées jeunes chercheurs « Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué ». Rabat, Maroc. 2014: 40.
141. F.S. Sharopov, H. Zhang, W.N. Setzer. Composition of geranium (*Pelargonium graveolens*) essential oil from Tajikistan. *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod.* 2014; 2: 13-16.
142. C. Zhong Yao, W. Sun, Z. Xu, C. Wang, W. Qu, C. Lin. Study on antioxidant activity of essential oils and its monomer from *Pelargonium graveolens*. Shanghai Institute of Technology. 2005.
143. S. Shin, S. Lim. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with Ketoconazole against *trichophyton spp.* *J. Appl. Microbiol.* 2004; 97: 1289-1296.
144. S. Shin. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. *Arch. Pharm. Res.* 2003; 26: 389-93.
145. A.M. Kumaran, P. D'Souza, A. Agarwal, R.M. Bokkolla, M. Balasubramaniam. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. *Phytother. Res.* 2003; 17:957.
146. B.M. Botha, C. M. Mc Crindle. An appropriate method for extracting the insect repellent citronellol from an indigenous plant (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) for potential use by resource-limited animal owners. *J. S. Afr. vet. Assoc.* 2000; 71: 103-105.
147. E. Paulsen. Immediate skin and mucosal symptoms from plants and vegetables in gardeners and greenhouses workers. *Contact Dermatis* 1998; 39: 166- 170.
148. Base de données MEDLINE, 2015.
149. J.W. Anderson. *Geranium* dermatitis. *Arch. Dermatol. Syph.* 1923; 7: 510-511.
150. M.N. Boukhatem, M.S. Hamaidi, F. Saidi, Y. Hakim, K. Benomier. Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) dans la dermopharmacie. *Nature et Technologie* 2010 ;02 : 59-64.
151. R.E. Gosselin, H.C. Hodge, R.P. Smith, M.N. Gleason. Clinical toxicology of commercial products. Ed. 4: Williams and Wilkins, Baltimore. 1976: 168.

152. A.M. Džamić, M.D. Soković, M.S. Ristić, S.M. Grujić, K.S. Mileski, P.D. Marin. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Pelargonium graveolens* essential oil. *J. App. Pharm. Sci.* 2014; 4: 01-05.
153. M. Boukhris, C. Ben Ahmed, I. Mezghani, M. Bouaziz, M. Boukhris, S. Sayadi. Biological and anatomical characteristics of the rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*, l'Hér.) grown in the south of Tunisia. *Pak. J. Bot.* 2013; 45: 1945-1954.
154. A. Ben Hsouna, N. Hamdi. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia. *Lipids Health Dis.* 2012; 11:167.
155. M.N. Boukhatem, M.S. Hamaidi, F. Saidi, Y. Hakim. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technologie* 2010 ; 03 : 37-45.
156. R.S. Verma, R.K. Verma, A.K. Yadav, Amit Chauhan. Changes in the essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit. ex Ait.) due to date of transplanting under hill conditions of Uttarakhand. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2010; 1: 367-370.
157. M. Djebbara, M.N. Chabaca, T. Hartani, B. Mouhouche, B. Ouzri. Rôle de l'action collective dans le développement de la profession agricole dans la wilaya de Blida (Algérie). L'avenir de l'agriculture irriguée en Méditerranée. Nouveaux arrangements institutionnels pour une gestion de la demande en eau. Actes du séminaire Wademed, Cahors. Cirad, Montpellier, France. 2007.
158. Agence Nationale de Développement de l'Investissement. Wilaya de Blida : invest in Algeria. 2013.
159. Association Française de Normalisation. Recueil des normes françaises : Les huiles essentielles. Ed.2 : AFNOR, Tour Europe, Paris. 1986.
160. C.L. Audigie, J. Figurearella, F. Zonszain. Manipulations d'analyses biochimiques. Ed. Doin, Paris. 1984 : 274.
161. R. Prat. Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations. Ed. Quae, Herman, Paris. 2007: 56.
162. T.S. Reighard, S.V. Olesik. Bridging the gap between supercritical fluid extraction and liquid extraction techniques: Alternative approaches of the extraction of solid and liquid environmental matrices. *Anal. Chem.* 2006 ; 26 : 1-39.

163. M.E. Lucchesi. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de La Réunion. 2005 : 72.
164. A.H. Liu, L. Li, M. Xu, Y.H. Lin, H.Z. Guo, D.A. Guo. Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006; 41: 48 -56.
165. M. Piochon. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Thèse de Doctorat. Université du Québec, Canada. 2008 : 5-9.
166. E. Lemberkovics, A. Kéry, B. Simándi, A. Kakasy, A. Balázs, E. Héthelyi, et al. Influence of extraction methods on the composition of essential oils. *Acta. Pharm. Hung.* 2004; 74: 166-170.
167. J.F. Clevenger. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1928 ; 17: 336-341.
168. A. El Haib. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, France. 2011:9.
169. F.E. Demarne. Le géranium rosat. *Parfums, cosmétiques et arômes* 1985 ; 62.
170. F. Neffar, Z. Benabdrrahmene. Quantification des huiles essentielles dans deux espèces de Romarin (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*) au niveau de Djebel Metlili (Batna). *Revue Agriculture* 2013 ; 05 : 19-23.
171. N. Elenkova. Chimie analytique et méthodes physiques d'analyse. Ed. technika Sofia, Bulgarie. 1983 : 123-128.
172. V. Matei, I. Comănescu, A.F. Borcea. Stationary phases. *In: Advanced gas chromatography - Progress in agricultural, biomedical and industrial applications.* Ed. InTech, Mustafa Ali Mohd. 2012: 2-50.
173. E. Stashenko, J.R. Martínez. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *In: Advances in Gas Chromatography.* Ed. InTech. 2014: 1-38.
174. E. Constantin. Spectrométrie de masse. Ed. Lavoisier, Tec & Doc, Paris. 1996 : 1-14.
175. E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant. Spectrométrie de Masse. Ed.2: Librairie Dunod, Paris, France. 1999.
176. F.W. McLafferty, F. Turecek. Interpretation of Mass Spectra. Ed.4: University Science Books, Sausalito, California, USA. 1993.

177. J.F. Cavalli. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone- CARBONE-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat. Université de Corse. 2002.
178. C. Baudry, H. Brezellec. Microbiologie et immunologie, exercices d'application. Ed.2 : Wolters Kluwer, France. 2006 : 27.
179. M. Nicolas, C. Daniel. Activités technologiques en microbiologie. Ed.3 : CRDP de Bordeaux, France. 2000 : 45-69.
180. G. Leyral, J. Figarella, M. Terret. Microbiologie générale et appliquée. Ed. Jacques Lanore. 2001.
181. N. Marchal, J.L. Bourdon, C.L. Richard. Les milieux de culture pour l'identification biochimique des bactéries. 4^{ème} Ed. 1991.
182. BioMérieux SA. API 20E : Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. 07584J. France. 2010.
183. BioMérieux SA. API NE : Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux. 07615H. France. 2009
184. BioMérieux SA. API Staph : Système d'identification des staphylocoques, microcoques et apparentés. 07468K. France. 2009
185. BioMérieux SA. API Strep : Système d'identification des *Streptococcaceae* et germes apparentés. 07625K. France. 2009
186. J.L. Watts, T. R. Shryock, M. Apley, D.J. Bade, S.D. Brown, J.T. Gray et al. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard. 3rd Ed. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2007: 28.
187. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Méthode EUCAST de diffusion en gélose. Version 3.0. 2013.
188. K. Rahal, A. Benslimani, H. Tali-Maamar, M.F.K. Missoum, S. Kechih Bounar, H. Ammari et al. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6^{ème} Ed. 2011 : 41-168.
189. M.C. Vincent. Aromatogramme. Encyclopédie des médecines naturelles. Phytothérapie ; aromathérapie. Paris, France. 1991: 6.
190. B. Ngameni, V. Kuete, I.K. Simo, A.T. Mbaveng, P.K. Awoussong, R. Patnam et al. Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *South African J. Botany*. 2009; 75: 256-261.

191. A.G. Ponce, R. Fritz, C. Del Valle, S.I. Roura. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 2003; 36: 679-684.
192. V.L. Couderc. Toxicité des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, France. 2001 : 1- 15.
193. J. Janin. Intoxication volontaire par ingestion d'huile essentielle de géranium bourbon (*Pelargonium graveolens*). A propos d'un cas réunionnais. Thèse de Doctorat. Université Henry Poincaré Nancy 1, France. 2006 : 26-56.
194. C. Agnem Etchiké, A. Mebanga Sassa, A. Abba, E. Nyonbourg. Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle de l'Adamaoua (Cameroun). *Cameroon J. Exp. Biol.* 2011 ; 1 : 22-27.
195. M.C. Pibiri. Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, Suisse. 2006 : 28-52.
196. M. Tripti, S. Padma, P. Shailja, C. Nirpendra, L. Hema. Potentiation of antimicrobial Activity of ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* essential oil against selected uropathogens. *Phytother.* 2011; 25: 1225-1228.
197. A. Rosato, C. Vitali, N. De Laurentis, D. Armenise, M.A. Milillo. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* 2007 ; 14 : 727-732.
198. Commission des communautés européennes. Les additifs alimentaires et le consommateur. Bruxelles-Luxembourg, Belgique. 1980 : 9.
199. C. El Kalamouni. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, France. 2010.
200. A.A. Dobre, V. Gagi, N. Petru. Antimicrobial activity of essential oils against food-borne bacteria evaluated by two preliminary methods. *Rom. Biotech. Lett.* 2011 ; 6(Suppl.) : 119-125.
201. M.C. Frey. Salon saveurs des plaisirs gourmands. France 2010 : 10.
202. EGK-Caisse de Santé. Connaissance des herbes, série de Brigitte Speck, Ursula & Christian Fotsch. <https://www.egk.ch/assets/Newsletter/Img/G-ranium-rosat.pdf>. (Site visité le 13 Mars 2013).
203. E. Pasquet. La pâtisserie familiale. Plus de 700 recettes de pâtisserie. Ed. Flammarion, Paris. 1974 : 114.

204. C. Bonnefoy, F. Guillet, G. Leyral, E. Verne-Bourdaï. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Biosciences et techniques. Ed. Doin, Paris 2002 : 50.
205. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris-Nord (C.CLIN Paris-Nord). Hygiène des mains, guide de bonnes pratiques. 3^{ème} Ed. 2001.
206. World Health Organization. Normal bacterial flora on hands. *In* : WHO guidelines on hand hygiene in health care. Genève, Suisse. 2009.
207. Laboratoire L3MA. Matériaux et Molécule en Milieux Amazonien. Fête de la science. 2012.
208. S. Miller-Cavitch. The Soapmaker's Companion. Ed. Storey books. 2010.
209. M.G. Marchetti, G. Kampf, G. Finzi, G. Salvatorelli. Evaluation of the bactericidal effect of five products for surgical hand disinfection according to prEN 12054 and prEN 12791. *J. Hosp. Infect.* 2003; 55: 238.
210. R. Herruzo-Cabrera, M.J. Vizcaino-Alcaide, M.J. Fdez-Acinoro. Usefulness of an alcohol solution of N-Duopropenide for the surgical antisepsis of hands compared with handwashing with iodine-povidone and chlorhexidine: clinical essay. *J. Surg. Res.* 2000; 94 : 6-12.
211. G. Mulbery, A.T. Snyder, J. Heilman, J. Pyreck. Evaluation of a waterless scrubless chlorhexidine gluconate / ethanol surgical scrub for antimicrobial efficacy. *Am. J. Infect. Control* 2001; 29: 377-382.
212. M.L.M.J. Tanneur. Etude de l'efficacité *in vivo* d'un savon chirurgical à base de chlorhexidine. Thèse de Doctorat. Université Paul-Sabatier de Toulouse, France. 2006.
213. S. Salhi, M. Fadli, L. Zidane, A. Douira. Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa* 2010 ; 31: 133-146.
214. D.P.B. Lakouéténé, G. Ndolngar, B. Berké, J-M. Moyen, É. Kosh Komba, I. Zinga et *al.* Enquête ethnobotanique des plantes utilisées dans le traitement du paludisme à Bangui. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 2009 ; 148 : 123-138.
215. M.E. Dossou, G.L. Houessou, O.T. Lougbégnon, A.H.B. Tenté, J.T.C. Codjia. Etude ethnobotanique des ressources forestières ligneuses de la forêt marécageuse d'Agonvè et terroirs connexes au Bénin. *Tropicultura* 2012; 30 : 1, 41-48.
216. A. Pourmazâheri. De certaines variétés de plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle iranienne. *La revue de Téhéran* 2012 : 77.

217. O. Benkhniq, L. Zidane, M. Fadli, H. Elyacoubi, A. Rochdi, A. Douira. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta. Bot. Barc.* 2011 ; 53: 191-216.
218. R. Mehdioui, A. kahouadji. Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). *Bull. Ins. Sci.* (Rabat) section Sciences de la Vie 2007 ; 29: 11-20.
219. J.P. Willem. 60 maux de la vie quotidienne soignés par les huiles essentielles. L'aromathérapie pour toute la famille. Ed. Albin Michelle, Paris. 2009.
220. Organisation mondiale de la Santé. Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. Genève. 2003.
221. F. Bardeau. La Médecine par les Fleurs. Ed. Pocket, Paris, France. 1998.
222. D.G. Jouhanneau. La Médecine des Plantes Aromatiques. Ed. Orphie, St. Denis, Réunion. 2011.
223. P.V. Goeb. Découvrez les huiles essentielles tropicales pour votre confort et l'aromathérapie au service du bien être. Ed. LRK. 2005.
224. S. Kapoor, S. Saraf. Topical Herbal Therapies an Alternative and Complementary Choice to Combat Acne. *Research Journal of Medicinal Plant* 2011; 5: 650-669.
225. S.T. Chang, P.F. Chen, S.C. Chang. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloem*. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 77: 123-127.
226. H. Baydar, O. Sagdic, G. Ozkan, T. Karadogan. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymus* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.* 2004; 15: 169-172.
227. S. Burt. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *J. Food Microbiol.* 2004; 94: 223-253.
228. S. Prabuseenivasan, M. Jayakumar, S. Ignacimuthu. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Comp. Alter. Med.* 2006; 6: 39.
229. M. Kelen, B. Tepe. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresour. Technol.* 2008; 99: 4096-4104.
230. J.Y.Y. Lalli, R.L. Van Zyl, S.F. Van Vuuren, A. M. Viljoen. *In vitro* biological activities of South African *Pelargonium* (*Geraniaceae*) species. *South African J. Botany* 2008; 74: 153-157.

231. Z. Yi, Y. Yu, Y. Liang, B. Zeng. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT- Food Sci. Technol.* 2008; 41: 597-603.
232. S.A. Fayed. Antioxidant and anticancer activities of *Citrus reticulata* (Petit grain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (*Geranium*) essential oils. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2009; 5: 740-747.
233. R. Heller. Séves. Physiologie végétale. <http://www.universalis.fr/encyclopedie/seves/>. (Site visité le 12 Janvier 2011).
234. A. Kémajou, L. Mba, A.A. Bagda. Effet du séchage sur les principes actifs des plantes médicinales: cas des alcaloïdes totaux des écorces de *Alstonia boonei* Wild., plante antipaludéenne. *Nature & Technologie* 2012 ; 07 : 62-66.
235. N.M. Mosta. Essential oil yield and composition of rosescented geranium (*Pelargonium* sp.) as influenced by harvesting frequency and plant shoot age. Thesis of Doctorat, University of Pretoria, South Africa. 2006.
236. S. Zrira, B. Benjliali. Effect of drying leaf oil of Moroccan *E. camaldulensis*. *J. Ess. Oil Res.* 1991; 3: 443-444.
237. B. Benjliali. Le matériel végétal et l'extraction. In : Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation, Manuel pratique. Corporation Laseve, Université Du Québec, Canada. 2005.
238. C. Kanko, B.E. Sawaliho, S. Kone, G. Koukoua, Y.T. N'Guessan. Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *C. R. Chim.* 2004 ; 7 : 1039-1042.
239. Laboratoire florame armoathérapie. Bulletin d'analyse de l'huile essentielle de géranium type Afrique du nord biologique. 2008.
240. B.R. Rajeswara Rao, P.N. Kaul, G.R. Mallavarapu, S. Ramesh. Effect of seasonal climatic changes on biomass yield and terpenoid composition of rosescented geranium. *Biochem. Sys. Ecol.* 1996; 24: 627-635.
241. H. Boira, A. Blanquer. Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. *Biochem. Sys. Ecol.* 1997; 26:811-822.
242. J.D. Thompson, J.C. Calchat, A. Michet, Y.B. Linhart, B. Ehlers. Qualitative and quantitative variation in monoterpenes co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. chem. Ecol.* 2002; 29: 859-880.

243. J.A. Randrianalijaona, P.A.R. Ramanoelina, J.R.E. Rasoarahona, E.M. Gaydou. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. essential oils from Madagascar. *Anal. Chim. Acta* 2005; 545: 46-52.
244. M.A. Curado, C.B.A. Oliveira, J.G. Jesus, S.C. Santos, J.C. Seraphin, P.H. Ferri. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* 2006; 67 : 2363-2369.
245. E. Guenther. The essential oils. Vol. 4, Ed. D. Van Nostrand, New-York, USA. 1950: 752.
246. E.E. Stashenko, N.Q. Prada, J.R. Martinez. HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. *J. high Res. Chrom.* 1996; 19: 353-358.
247. B.R. Rajeswara Rao. Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L.f. *piperascens* Malinv. Ex Holmes). *Industrial crops and products* 2002; 16: 133-144
248. L.F. Barnola, A. Cedeno. Inter-population differences in the essential oils of *Pinus caribaea* needles. *Biochem. and systematics ecology* 1999; 28: 923-931.
249. B.R. Rajeswara Rao, A. K. Bhattacharya, P.N. Kaul, S. Chand, S. Ramesh. Changing in profiles of essential oil rose scented geranium (*Pelargonium* sp.) during leaf ontogeny. *J. Essent. Oil Res.* 1993; 5: 301-304.
250. B.R. Rajeswara Rao, K.P. Sastry, E.V.S. Prakasa Rao, S. Ramesh. Variation in yield and quality of geranium (*Pelargonium graveolens*) under varied climatic and fertility conditions. *J. Essent. Oil Res.* 1994 ; 2 :73-79.
251. J.P. Lavigne, V. Le Moing, A. Sotto. Quels antibiotiques utiliser en pratique courante dans les infections urinaires communautaires en France ? *Spectra Biologie* 2005; 24: 18-23.
252. K. Rahal, M.F.K. Missoum, A. Benslimani, H. Ammari, A. Aboun. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 13ème Rapport d'évaluation (Janvier à Décembre 2011). 2012 : 68-82.
253. Y. Kadri, A. Ferjani, M. Marzouk, N. Hannachi, J. Boukadida. Pouvoir pathogène et sensibilité aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés au CHU Farhat Hached de Sousse. *Rev. Tunisienne d'Infectiologie* 2010 ; 1 :26.

254. P.O. Lang, F. Jehl, M. Berthel, G. Kaltenbach. Description de la flore bactérienne responsable des bactériuries symptomatiques en unité de soins de longue durée : étude prospective au CHRU de Strasbourg. *Med. Mal. Infect.* 2006; 36 : 280–284.
255. S. Siah, E.M. Hatimi, M. Elouennass, N. Drissi Kamili. Analyse de la prescription des antibiotiques pour l'infection urinaire en urologie. 4^{ème} Journée Scientifique de la Société Marocaine de Microbiologie Médicale : « Infection urinaire : du diagnostic à la thérapeutique ». Fes, Maroc. 2011.
256. F. Bourjilat, N. Dersi, B. Bouchrif, H. Amarouch, M. Timinouni. Profil de résistance aux antibiotiques des *Escherichia Coli* uropathogènes communautaires au Maroc. *Eur. J. Sci. Res.* 2009; 38: 57-62.
257. P. Bernanose. Antibiorésistance : La montée des entérobactéries. *InVS BEH.* 2012 : 42-43.
258. Institut Pasteur d'Algérie. Rapport d'activité 2012. www.pasteur.dz. (Site visité le 31 Janvier 2014).
259. M. Touati, S.M. Diene, A. Racherache, M. Dekhil, A. Djahoudi, J.M. Rolain. Emergence of blaOXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2012; 40: 89-91.
260. M. Touati, S.M. Diene, M. Dekhil, A. Djahoudi, A. Racherache, J.M. Rolain. Dissemination of class I integron carrying VIM-2 carbapenemase gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from intensive care unit of University Hospital of Annaba, Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013 ; 57: 2426-7.
261. P. Courvalin, R. Leclercq, E. Bingen. Antibiogramme. Ed.2 : ESKA, Paris. 2006 : 67-133.
262. European Antimicrobial Resistance Surveillance. Caractéristiques de la résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques. EARS-Net. 2014.
263. M. Emaneini, A. Mirsalehian, R. Beigvierdi, A.A. Fooladi, F. Asadi, F. Jabalameli et al. High Incidence of Macrolide and Tetracycline Resistance among *Streptococcus Agalactiae* Strains Isolated from Clinical Samples in Tehran, Iran. *Maedica* 2014 ; 9:157-61.
264. T. Hart, P. Shears. Atlas de poche de microbiologie. Ed.2 : Flammarion Médecine & Sciences. 1999 : 85- 162.

265. S. Cosentino, C.I. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi et al. *In vitro* antibacterial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999; 29: 130-135.
266. H. Falleh, R. Ksouri, K. Chaieb, N. Karray-Bouraoui, N. Trabelsi, M. Boulaaba et al. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies* 2008; 331: 372-379.
267. E.A. Hayouni, M. Abedrabba, M. Bouix, M. Hamdi. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* 2007; 105:267-273.
268. N. Turkmen, Y.S. Velioglu, F. Sari, G. Polat. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 2007; 12:484-496.
269. B. Shan, Y.Z. Cai, J.D. Brooks, H. Corke. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 117: 112- 119.
270. W.M. Koné, K. Kamanzi-Atindehou, C. Terreaux, K. Hostettmann, D. Traoré, M. Dosso. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 93: 43-49.
271. M.N. Boukhatem, M.S. Hamaidi, F. Saidi, Y. Hakim. Huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) : un antiseptique à large spectre. 2ème Congrès de la Société Algérienne de Biologie Clinique. Palais de la Culture Moufidi Zakaria, Alger, Algérie. 2010.
272. D. Georgantelis, I. Ambrosiadis, P. Katikou, G. Blekas, S.A. Georgakis. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Sci.* 2007; 76: 172-181.
273. M. Abi-Ayad, F.Z. Abi Ayad, H.A. Lazzouni, S.A. Rebiahi. Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 2011.1: 33-36.
274. B. Ouattara, R.E. Simard, R.A. Holley, G.J.P. Piette, A. Begin. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 1997; 37:155-162.
275. K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999; 6: 985-990.

276. V.G. De Billerbeck, C. Roques, P. Vanière, P. Marquier. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*. 2002 ; 3 : 248- 254.
277. E.L. Souza, T.L.M. Stamford, E.O. Lima. Sensitivity of spoiling and pathogen foodrelated bacteria to *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *Braz. J. Microbiol.* 2006; 37: 527-532.
278. A.M. Ahmad, I. Khokhar, I. Ahmad, M.A. Kashmiri, A. Adnan, M. Ahmad. Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. *J. Food Safety* 2006; 5: 56-60.
279. E. Derwich, Z. Benziane, A. Boukir. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2010; 6: 191-198.
280. M.A. Bari, W. Islam, A.R. Khan, A. Mandal. Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (*Solanaceae*). *Int. J. Agric. Biol.* 2010; 12: 386-390.
281. C.F. Bagamboula, M. Uyttendaele, J. Debevere. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *J. Food Microbiol.* 2004; 21: 33-42.
282. R.K. Upadhyay, P. Dwivedi, S. Ahmad. Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains. *Asian J. Med. Sci.* 2010 ; 2:152-158.
283. H. Rodriguez-Villalobos, M.J. Struelens. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Rev. Réanimation* 2006 ; 15: 205-213.
284. D. Bibbal. Impact des bêta-lactamines sur l'émergence d'entérobactéries résistantes dans la flore digestive chez le porc : caractérisation et stratégie de prévention. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse III- Paul Sabatier. France. 2008.
285. G. Aubert, A. Carricajo. Place du laboratoire dans le choix et le suivi pharmacodynamique de l'antibiothérapie des infections sévères. *Ann. Fr. Anesth.* 2004; 23: 704-713.
286. C. Nauciel. Bactériologie médicale: connaissance et pratique. Ed.2 : Elsevier Masson, Paris. 2009 : 125-146.
287. L. Chen, D. Hainrichson, M. Bourdetsky, A. Mor, S. Yaron, T. Baasov. Structure-toxicity relationship of aminoglycosides: Correlation of 2'-amine basicity with acute toxicity in pseudo-disaccharide scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16: 8940-8951.
288. E. Durante-Mangoni, A. Grammatikos, R. Utili, M.E. Falagas. Do we still need the aminoglycosides? *Int. J. Antimicrob Agents* 2009; 33: 201-205.

289. Y. Doi, Y. Arakawa. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45: 88-94.
290. L. Meradi, A. Djahoudi, A. Abdi, M. Bouchakour, J.D. Perrier Gros Claude, M. Timinouni. Résistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathol. Biol.* 2011 ; 59: 73-78.
291. T. Guillard, E. Heckel, M. Galimand. Résistance plasmidique aux quinolones chez les bactéries à Gram négatif. 2008: 1-8.
292. S. Nseir, F. Ader, C.H. Marquette, A. Durocher. Impact de l'utilisation des fluoroquinolones sur l'émergence des bactéries multirésistantes. *Path. Bio.* 2005; 53: 470-475.
293. J.H. Tran, G.A. Jacoby D.C. Hooper Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein *QnrA* with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 118-25.
294. S. Honoré, C. Lascols, D. Malin, R. Targaouchi, V. Cattoir, P. Legrand et al. Emergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones *Qnr* (résultats hôpital Henri-Mondor 2002-2005). *Pathol. Biol.* 2006; 54: 270-279.
295. P. Singeton. Bactériologie. Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Ed.6 : Dunod. 2005 : 463.
296. A. Bryskier. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ed. Ellipses, Paris. 1999 : 436-445.
297. F.W. Golsdein. Sulfamides et Triméthoprime. *In* : Antibiogramme. Ed.2 : ESKA. 2006 : 341-348.
298. F. Van Bambeke, P. Tulkens. Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse. Syllabus national belge de pharmacologie. Bruxelles, Belgique. 2008.
299. C. Barthe, P. Daigle, F.P. Desroches. Centre québécois d'inspection des aliments et de sante animale. Lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire. Système qualité enregistré selon la norme ISO-9001 (2000). accrédité selon ISO/CEI 17025 par le conseil canadien des normes (n°131). Québec, Canada. 2006 : 2-25.
300. J.L. Cuq. Microbiologie alimentaire. Sciences et Techniques du Languedoc. Université Montpellier II, France. 2007.
301. H.N. Bassole, Z.I. Kabore, A.S. Traore. Etude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits de végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la

- contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 2001 ;13-122
302. M. Lis-Bachlin, S.G. Deans. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.*1997; 82: 759-762.
303. H.J.D. Dorman, S.G. Deans. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*2000; 88 : 308-316.
304. C.N. Wendakoon, M. Sakaguchi. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *J. Food Prot.* 1993; 56: 410-413.
305. N. Matan, H. Rimkeeree, A.J. Mawson, P. Chompreeda, V. Haruthaithanasan, M. Parker. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 107 : 180- 185.
306. A.L. Servin. Ça chat entre la microflore intestinale et l'hôte. *Médecine/Sciences* 2007 ; 23 : 229-262.
307. A. Perrod. Hygiène dans les soins. 2005. <http://www.arath.ch/>. (Site visité le 11 Octobre 2013)
308. A.C. Simon. Confrères, pourquoi nous lavons-nous si peu les mains? *Louvain Med.* 2002 ; 122 : 75-81.
309. S. Sutter. Désinfection des mains à l'ESSanté. Ecole supérieure de la santé. France. 2009.
310. D. Pittet, A. Widmer. Hygiène des mains : nouvelles recommandations. *Swiss-NOSO* 2001 ; 8 : 25-32.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Principales familles de plantes aromatiques [93]

| Groupes | Familles | Principaux genres | Principales espèces |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Conifères | <i>Cupressaceae</i> | <i>Cupressus</i> <i>Juniperus</i> <i>Thuja</i> | <i>Cupressus lusitanica</i> <i>Juniperus virginiana</i> <i>Thuja occidentalis</i> |
| | <i>Pinaceae</i> | <i>Abies</i> <i>Picea</i> <i>Pinus</i> | <i>Abies balsamea</i> <i>Picea mariana</i> <i>Pinus mugo</i> |
| Monocotyles et Dicotyles | <i>Anacardiaceae</i> | <i>Heeria</i> <i>Schinus</i> | <i>Heeria insignis</i> <i>Schinus molle</i> |
| | <i>Annonaceae</i> | <i>Monodora</i> | <i>Monodora grandiflora</i> |
| | <i>Apiaceae</i> | <i>Ammi</i> | <i>Ammi visnaga</i> |
| | | <i>Anethum</i> | <i>Anethum graveolens</i> |
| | | <i>Coriandrum</i> | <i>Coriandrum sativum</i> |
| | | <i>Diplolophium</i> | <i>Diplolophium africanum</i> |
| | | <i>Foeniculum</i> | <i>Foeniculum vulgare</i> |
| | | <i>Ligusticum</i> | <i>Ligusticum scoticum</i> |
| | | <i>Steganotenia</i> | <i>Steganotaenia araliacea</i> |
| | <i>Apocynaceae</i> | <i>Carissa</i> | <i>Carissa edulis</i> |
| | <i>Araceae</i> | <i>Acorus</i> | <i>Acorus calamus</i> |
| | <i>Asteraceae</i> | <i>Achillea</i> | <i>Achillea millefolium</i> |
| | | <i>Artemisia</i> | <i>Artemisia absinthium</i> |
| | | <i>Baccharis</i> | <i>Baccharis salicifolia</i> |
| | | <i>Matricaria</i> | <i>Matricaria chamomilla</i> |
| <i>Solidago</i> | | <i>Solidago canadensis</i> | |
| <i>Tanacetum</i> | | <i>Tanacetum vulgare</i> | |
| <i>Chenopodiaceae</i> | | <i>Chenopodium</i> | <i>Chenopodium ambrosioides</i> |
| <i>Chloranthaceae</i> | <i>Hedyosmum</i> | <i>Hedyosmum angustifolium</i> | |
| <i>Geraniaceae</i> | <i>Pelargonium</i> | <i>Pelargonium graveolens</i> | |
| <i>Iridaceae</i> | <i>Iris</i> | <i>Iris florentina</i> | |
| <i>Lamiaceae</i> | <i>Aeollanthus</i> | <i>Aeollanthus pubescens</i> | |
| | <i>Hyptis</i> | <i>Hyptis suaveolens</i> | |
| | <i>Hyssopus</i> | <i>Hyssopus officinalis</i> | |
| | <i>Lavandula</i> | <i>Lavandula angustifolia</i> | |
| | <i>Melissa</i> | <i>Melissa officinalis</i> | |
| | <i>Mentha</i> | <i>Mentha piperita</i> | |
| | <i>Minthostachys</i> | <i>Minthostachys andina</i> | |
| | <i>Monarda</i> | <i>Monarda fistulosa</i> | |
| | <i>Ocimum</i> | <i>Ocimum basilicum</i> | |
| | | <i>Ocimum canum</i> | |
| | <i>Origanum</i> | <i>Origanum vulgare</i> | |
| | <i>Rosmarinus</i> | <i>Rosmarinus officinalis</i> | |
| <i>Salvia</i> | <i>Salvia officinalis</i> | | |
| <i>Thymus</i> | <i>Thymus vulgaris</i> | | |

Annexe 1. Principales familles de plantes aromatiques (suite) [93]

| Groupes | Familles | Principaux genres | Principales espèces |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------------------------------------|
| Monocotyles et Dicotyles | <i>Lauraceae</i> | <i>Aniba</i> | <i>Aniba parviflora</i> <i>Aniba rosaeodora</i> |
| | | <i>Cinnamomum</i> | <i>Cinnamomum camphora</i> |
| | | <i>Laurus</i> | <i>Laurus nobilis</i> |
| | | <i>Sassafras</i> | <i>Sassafras officinalis</i> |
| | <i>Liliaceae</i> | <i>Allium</i> | <i>Allium sativum</i> |
| | <i>Malvaceae</i> | <i>Abelmoschus</i> | <i>Abelmoschus moschatus</i> |
| | <i>Meliaceae</i> | <i>Cedrela</i> | <i>Cedrela odorata</i> |
| | <i>Moraceae</i> | <i>Ficus</i> | <i>Ficus elastica</i> |
| | <i>Myricaceae</i> | <i>Myrica</i> | <i>Myrica gale</i> |
| | <i>Myristicaceae</i> | <i>Myristica</i> | <i>Myristica fragrans</i> |

Annexe 2. Fiche d'enquête ethnobotanique sur le Géranium rosat

Région :

Sexe : Féminin Masculin

Age :

Profession :

Utilisez vous des plantes pour traiter des maladies : Oui Non

Si oui, quelles maladies :

Connaissez-vous le géranium rosat : Oui Non

Connaissez-vous un autre nom de cette plante :

Est-ce que vous l'utilisez : Oui Non

Usages : thérapeutiques culinaires cosmétologiques décoratifs

D'où est ce que vous vous procurez la plante ? : Herboriste Culture Récolte spontanée

Vous récoltez le plante en : Hiver Printemps Été Automne Toute l'année

Quelles sont les parties que vous utilisez ? : Feuilles Fleurs Tige Racine

Usage : Après séchage Fraiches

Usage : Interne Externe

Maladies traitées :

La plante est utilisée : Seule en recette (mélangée)

Mode de préparation et proportions :

.....

Fréquence d'utilisation :

L'utilisation se fait chez : Toute personne Adulte Enfant Homme Femme

Administration : Avant les repas Après les repas la nuit le matin

Le résultat obtenu est : Rapide Lent

La plante est utilisée à titre : Préventif Curatif

Effets indésirables :

Annexe 3. Composition des milieux de culture et réactifs (par litre d'eau distillée stérile):**Gélose nutritive :**

| | |
|-------------------------|-----|
| Peptone | 10g |
| Extrait de viande..... | 3g |
| Extrait de levure..... | 3g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Agar..... | 18g |
| pH= 7.3 +/- 0.2 | |

Milieu Chapman :

| | |
|------------------------------|-------|
| Extrait de viande..... | 3g |
| Extrait de levure..... | 3g |
| Tryptone..... | 5g |
| Peptone bactériologique..... | 10g |
| Chlorure de sodium..... | 70g |
| Mannitol..... | 10g |
| Rouge de phénol..... | 0.05g |
| Agar..... | 18g |
| pH= 7.4 | |

Gélose base au sang :

| | |
|-------------------------|-----|
| Peptone de viande..... | 10g |
| Extrait de casiene..... | 5g |
| Extrait de levure..... | 3g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Agar..... | 18g |
| pH= 6.9 +/- 0.1 | |

Gélose TSI :

| | |
|--------------------------------|-------|
| Peptone de viande..... | .15g |
| Proteose peptone..... | .5g |
| Extrait de viande..... | 3g |
| Extrait de levure..... | 3g |
| Glucose..... | 1g |
| Saccharose..... | 10g |
| Lactose..... | 10g |
| Citrate de Fer ammoniacal..... | 0.3g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Sodium Thiosulfate..... | 0.3g |
| Rouge de phénol..... | 0.05g |
| Agar..... | 18g |

pH= 7.4 +/- 0.1

Milieu de conservation :

| | |
|-------------------------|------|
| Extrait de viande..... | 3g |
| Proteose peptone..... | 10g |
| Chlorure de sodium..... | 3g |
| Disodium phosphate..... | 0.8g |
| Agar..... | 10g |

pH = 7

Milieu Muller-Hinton :

| | |
|----------------------------------|-------|
| Extrait de viande..... | 300g |
| Hydrolysât acide de caséine..... | 17.5g |
| Amidon de maïs..... | 1.5g |

| | |
|-------------|-----|
| Agar..... | 16g |
| pH= 7.2-7.4 | |

Bouillon nitrate :

| | |
|---------------------------|-----|
| Peptone de viande..... | 10g |
| Extrait de viande..... | 5g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Nitrate de potassium..... | 1g |
| PH= 7.2 | |

Eau physiologique distillée :

| | |
|-------------------------|--------|
| Chlorure de sodium..... | 9g |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| pH= 7 | |

Solution d'eau oxygénée à 10% :

| | |
|------------------------|--------|
| Eau oxygénée 10 V..... | 0.5ml |
| Eau distillée..... | 14.5ml |

Lugol pour coloration de Gram:

| | |
|--------------------------|---------|
| Iode en paillettes..... | 1 g |
| Iodure de potassium..... | 1g |
| Eau distillée..... | 14.5 ml |

Etalon 0.5 McFarland (DO = 0.08 à 0,1 à 625 nm)

| | |
|-----------------------------------------|--------|
| Chlorures de baryum dihydraté (1%)..... | 0.5 ml |
| Acide sulfurique (1%)..... | 99.5ml |

API Staph. Medium :

| | |
|------------------------|---------|
| Extrait de levure..... | 0.5 g |
| Bactopeptone | 10 g |
| NaCl..... | 5 g |
| Oligoéléments..... | 10 ml |
| Eau déminéralisée..... | 1000 ml |
| pH : 7.0 – 7.4 | |

Réactif VP 1 :

| | |
|-----------------------------|--------|
| Hydroxyde de potassium..... | 40 g |
| Eau déminéralisée | 100 ml |

Réactif VP 2 :

| | |
|-------------------------|--------|
| α -naphthol..... | 6 g |
| Ethanol..... | 100 ml |

Réactif NIT 1:

| | |
|--------------------------|-------|
| Acide sulfanilique | 0.4 g |
| Acide acétique..... | 30 g |
| Eau déminéralisée | 70 ml |

Réactif NIT 2:

| | |
|----------------------------------|-------|
| N,N-diméthyl-1-naphtylamine..... | 0.6 g |
| Acide acétique..... | 30 g |
| Eau déminéralisée | 70 ml |

Réactif ZYM A:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Tris-hydroxyméthyl-aminométhane..... | 25 g |
| Acide chlorhydrique à 37 % | 11 ml |
| Laurylsulfate Na..... | 10 g |
| Eau déminéralisée..... | 100 ml |

Réactif ZYM B:

| | |
|------------------------|--------|
| Fast Blue BB..... | 0.35 g |
| 2-méthoxy éthanol..... | 100 ml |

Réactif JAMES:

| | |
|-----------------------|--------|
| HCl 1N..... | 100 ml |
| Composant J 2183..... | 0.66 g |

API NaCl 0,85 % Medium:

| | |
|-------------------------|---------|
| Chlorure de sodium..... | 8.5 g |
| Eau déminéralisée..... | 1000 ml |

Violet de gentiane :

| | |
|-------------------------|--------|
| Violet de gentiane..... | 10g |
| Ethanol (90°)..... | 100 ml |
| Phénol..... | 20g |
| Eau distillée..... | 1000ml |

Fuchsine :

| | |
|-----------------------|--------|
| Fuchsine basique..... | 10g |
| Phénol..... | 50g |
| Ethanol..... | 100 ml |
| Eau distillée..... | 1000ml |

Api GP Médium :

| | |
|--------------------------------|---------|
| L-cystine..... | 0.5g |
| Tryptone (origine bovine)..... | 20g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Sulfite de sodium..... | 0.5g |
| Rouge de phénol..... | 0.17g |
| Eau déminéralisée..... | 1000 ml |
| pH 7.4-7.6 | |

NIN :

| | |
|----------------------------------|--------|
| Ninhydrine 2-méthoxyéthanol..... | 7g |
| Ethanol..... | 100 ml |

API NaCl 0,85 % Médium :

| | |
|-------------------------|---------|
| Chlorure de sodium..... | 8.5 g |
| Eau déminéralisée..... | 1000 ml |

Réactif TDA :

| | |
|-------------------------|--------|
| Perchlorure de fer..... | 3.4 g |
| Eau déminéralisée..... | 100 ml |

Annexe 4. Liste d'antibiotiques

| Famille | Antibiotique | Sigle | Charge |
|----------------------|-----------------------------------|-------|--------------------|
| β-lactamines | Pénicilline | P | 10 UI |
| | Oxacilline | OX | 1 µg |
| | Ampicilline | AM | 10 µg |
| | Amoxicilline + acide clavulanique | AMC | 20/10 µg |
| | Amoxicilline | AX | 25 µg |
| | Céfoxitine | FOX | 30 µg |
| | Céfotaxime | CTX | 30 µg |
| | Céftazidime | CAZ | 30 µg |
| | Ceftriaxone | CRO | 30 µg |
| | Céfalotine | CF | 30 µg |
| | Céfazoline | CZ | 30 µg |
| | Ticarcilline | TIC | 75 µg |
| | Ticarcilline + acide clavulanique | TCC | 75/10 µg |
| | Pipéracilline | PIP | 100 µg |
| | Pipéracilline + Tazobactam | TZP | 75/10 µg |
| | Aztréonam | ATM | 30 µg |
| | Cefsulodine | CFS | 30 µg |
| Imipénème | IMP | 10 µg | |
| Aminosides | Streptomycine | S | 300 µg |
| | Kanamycine | K | 30-1000 µg* |
| | Amikacine | AK | 30 µg |
| | Gentamicine | GM | 10-120- 500µg** |
| | Néomycine | N | 30 UI |
| | Nétilmicine | NET | 30 µg |
| Glycopeptides | Vancomycine | VA | 30 µg |
| | Teicoplanine | TEC | 30 µg |
| Tétracyclines | Doxycycline | D | 30 µg |
| | Tétracycline | TE | 30 µg |
| MLS | Erythromycine | E | 15 µg |
| | Spiramycine | SR | 100 µg |
| | Clindamycine | CM | 2 µg |
| | Pristinamycine | PM | 15 µg |
| | Lincomycine | L | 10 µg |

* 30µg pour *Staphylococcus sp.* et 1000µg pour *Streptococcus agalactiae*.

** 120µg pour *Enterococcus faecalis* et 500µg pour *Streptococcus agalactiae*.

Annexe 4. Liste d'antibiotiques (suite)

| Famille | Antibiotique | Sigle | Charge |
|--------------------------------|---------------------------------|-------|---------------|
| Quinolones | Ofloxacine | OFX | 5 µg |
| | Péfloxacine | PEF | 5 µg |
| | Lévofloxacine | LEV | 5 µg |
| | Ciprofloxacine | CIP | 5 µg |
| | Acide nalidixique | NA | 30 µg |
| | Acide pipémidique | PI | 20 µg |
| Rifamycines | Rifampicine | RD | 5-30 µg*** |
| Furanes | Nitrofurantoïne | FT | 300 µg |
| Acides phosphoniques | Fosfomycine | FOS | 50-200µg**** |
| Polymyxines | Colistine | CT | 10 µg |
| Phénicolés | Chloramphénicol | C | 30 µg |
| Sulfamides | Triméthoprim + Sulfaméthoxazole | SXT | 1.25/23.75 µg |
| Nitrohydroxyquinoléines | Nitroxoline | NI | 30 µg |
| Fusidanines | Acide fusidique | FA | 10 µg |

*** 5µg pour *Enterococcus faecalis*.

**** 200µg pour les entérobactéries.

Annexe 5. API 20 E

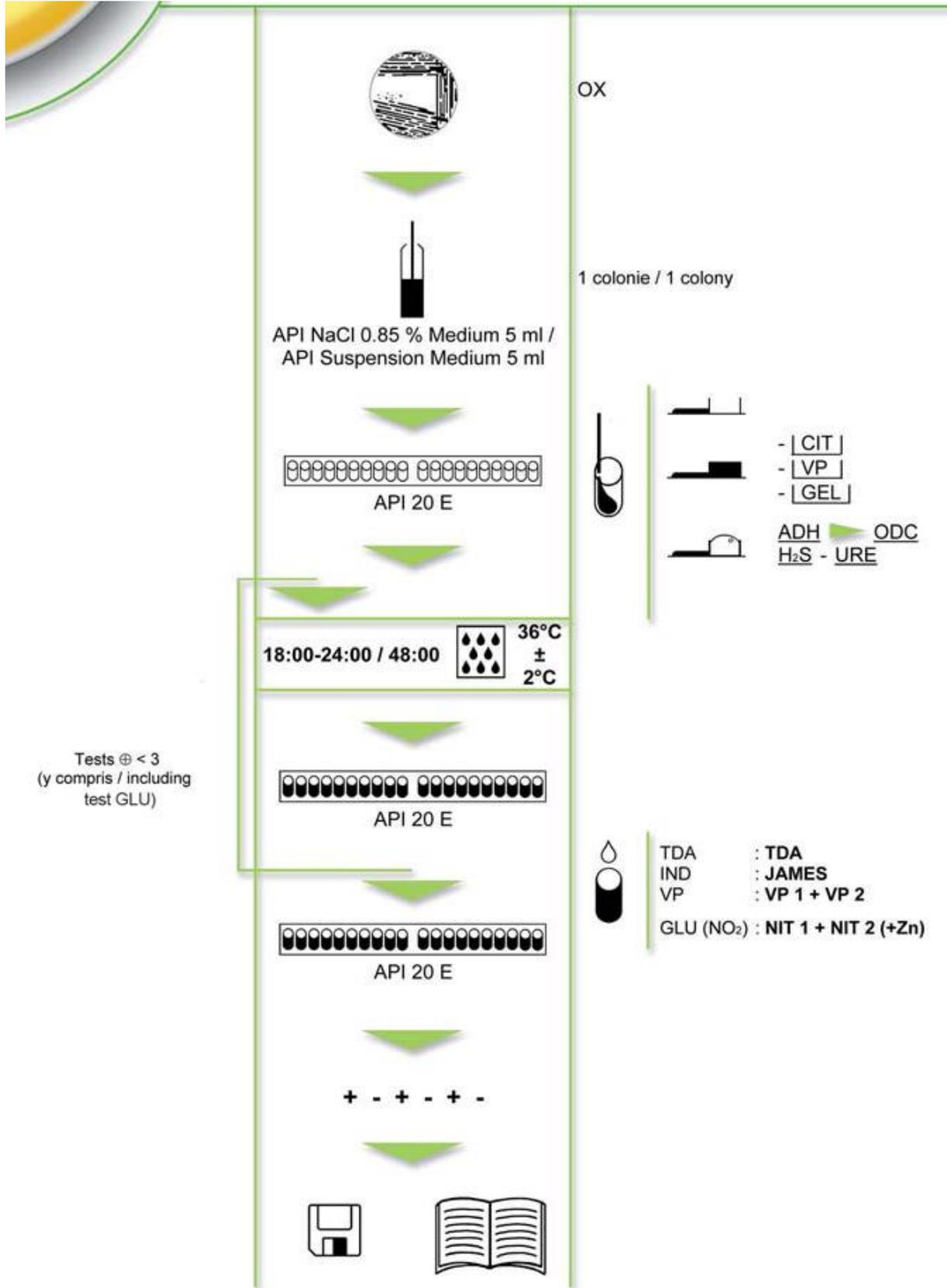


Tableau de lecture

| Test | Composants actifs | Quantité (mg/cup) | Réactions/Enzymes | Résultats | |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | | | Négatif | Positif |
| ONPG | 2-nitrophényl-βD-galactopyranoside | 0.223 | β-galactosidase (Ortho Nitrophényl-βD-Galactopyranosidase) | Incolore | Jaune (1) |
| ADH | L-arginine | 1.9 | Arginine dihydrolase | Jaune | Rouge /orangé (2) |
| LDC | L-lysine | 1.9 | Lysine décarboxylase | Jaune | Rouge /orangé (2) |
| ODC | L-ornithine | 1.9 | Ornithine décarboxylase | Jaune | Rouge /orangé (2) |
| CIT | trisodium citrate | 0.756 | Utilisation du Citrate | Vert pale/jaune | Bleu-vert/bleu (3) |
| H₂S | sodium thiosulfate | 0.075 | Production d'H ₂ S | Incolore /grisâtre | Dépôt noir |
| URE | Urée | 0.76 | Uréase | Jaune | Rouge – orangé (2) |
| TDA | L-tryptophane | 0.38 | Tryptophane désaminase | TDA/ immédiat | |
| | | | | Jaune | Marron-rougeâtre |
| IND | L-tryptophane | 0.19 | Production d'indole | JAMES / immédiat | |
| | | | | Incolore-vert pâle-jaune | Rose |
| VP | sodium pyruvate | 1.9 | Production d'acétoïne | VP 1+ VP2 / 10 min | |
| | | | | Incolore - rose pâle | Rose-rouge (5) |
| GEL | Gélatine (origine bovine) | 0.6 | Gélatinase | Non diffusion | Diffusion du pigment noir |
| GLU | D-glucose | 1.9 | Fermentation - oxydation (Glucose) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune - jaune gris |
| MAN | D-mannitol | 1.9 | fermentation - oxydation (Mannitol) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune |
| INO | Inositol | 1.9 | Fermentation - oxydation (Inositol) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune |
| SOR | D-sorbitol | 1.9 | Fermentation - oxydation (Sorbitol) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune |
| RHA | L-rhamnose | 1.9 | Fermentation - oxydation (Rhamnose) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune |
| SAC | D-saccharose | 1.9 | Fermentation - oxydation (Saccharose) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune |
| MEL | D-melibiose | 1.9 | Fermentation - oxydation (Melibiose) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune |

Tableau de lecture (suite)

| Test | Composants actifs | Quantité (mg/cup) | Réactions/Enzymes | Résultats | |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------------|------------------|---------|
| | | | | Négatif | Positif |
| AMY | Amygdaline | 0.57 | Fermentation - oxydation (Amygdaline) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune |
| ARA | L-arabinose | 1.9 | Fermentation - oxydation (Arabinose) (4) | Bleu - bleu-vert | Jaune |

- (1) Une très légère couleur jaune est également positive.
- (2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.
- (3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).
- (4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
- (5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

Annexe 6. API 20 NE

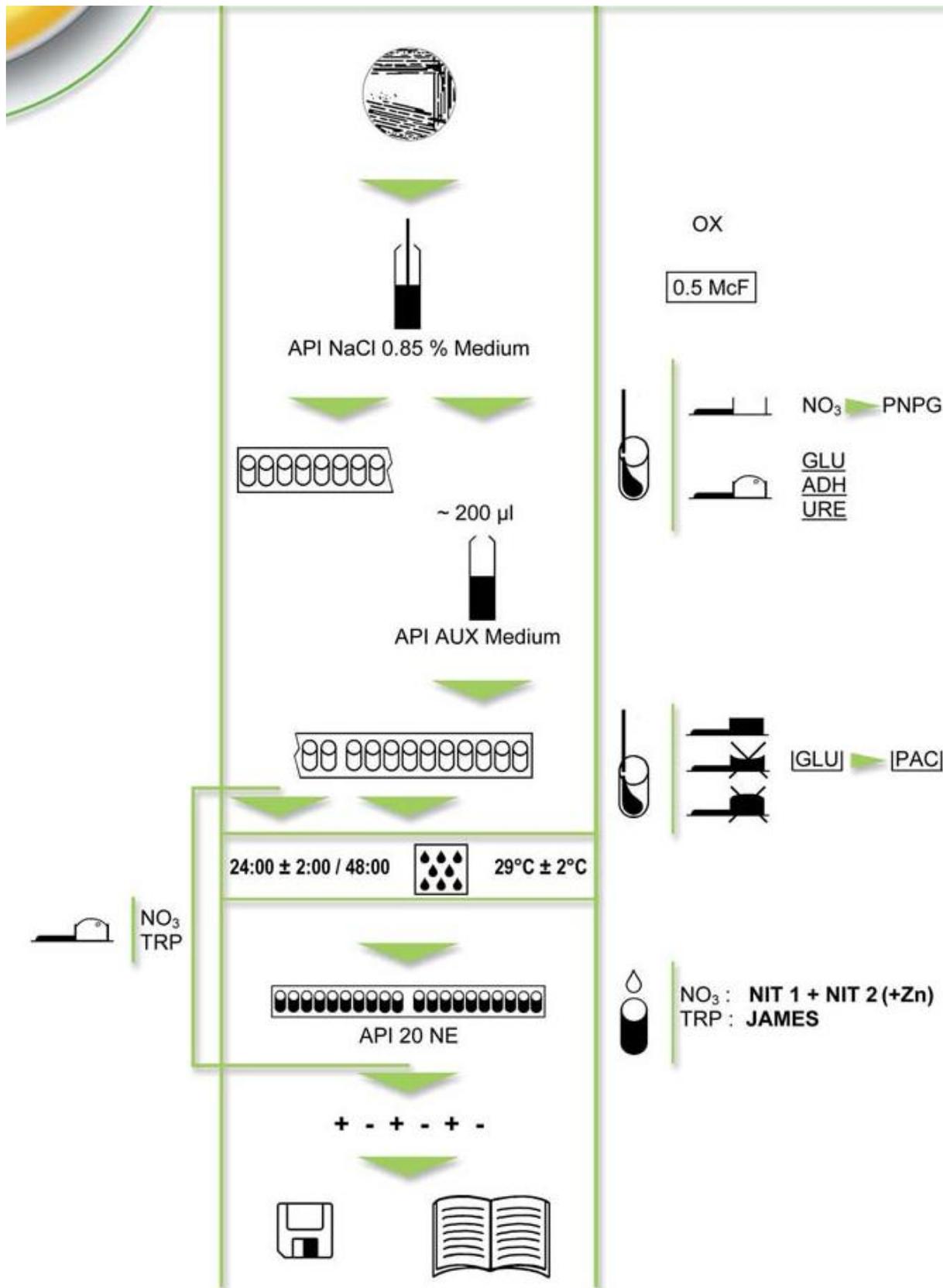


Tableau de lecture

| Test | Composants actifs | Quantité (mg/cup) | Réactions/Enzymes | Résultats | |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|
| | | | | Négatif | Positif |
| NO ₃ | Potassium nitrate | 0.136 | Réduction des nitrates en nitrites | <u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u> Incolore | Rose-rouge |
| | | | Réduction des nitrates en azote | <u>Zn/ 5 min</u> Incolore | Rose-rouge |
| TRP | L-tryptophane | 0.2 | formation d'indole (Tryptophane) | <u>JAMES / immédiat</u> Incolore | .Rose vert pâle / jaune |
| GLU | D-glucose | 1.92 | fermentation (Glucose) | Bleu à vert | Jaune |
| ADH | L-arginine | 1.92 | Arginine dihydrolase | Jaune | Orange / rose /rouge |
| URE | Urée | 0.76 | Uréase | Jaune | orange / rose /rouge |
| ESC | Esculine citrate de fer | 0.56 0.072 | Hydrolyse (β-glucosidase) (Esculine) | Jaune | Gris / marron / noir |
| GEL | Gélatine (origine bovine) | 0.6 | Hydrolyse (protéase) Gélatinase | Non diffusion du pigment | Diffusion du pigment noir |
| PNPG | 4-nitrophényl-βD-galactopyranoside | 0.22 | β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase) | Incolore | Jaune |
| GLU | D-glucose | 1.56 | Assimilation (Glucose) | Transparence | Trouble |
| ARA | L-arabinose | 1.4 | Assimilation (Arabinose) | Transparence | Trouble |
| MNE | D-mannose | 1.4 | Assimilation (Mannose) | Transparence | Trouble |
| MAN | D-mannitol | 1.36 | Assimilation (Mannitol) | Transparence | Trouble |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | 1.28 | Assimilation (N Acétyl-Glucosamine) | Transparence | Trouble |
| MAL | D-maltose | 1.4 | Assimilation (Maltose) | Transparence | Trouble |
| GNT | Potassium gluconate | 1.84 | Assimilation (potassium Gluconate) | Transparence | Trouble |
| CAP | Acide caprique | 0.78 | Assimilation (acide Caprique) | Transparence | Trouble |
| ADI | Acide adipique | 1.12 | Assimilation (acide Adipique) | transparence | Trouble |
| MLT | Acide malique | 1.56 | Assimilation (Malate) | transparence | Trouble |
| CIT | Trisodium citrate | 2.28 | Assimilation (Trisodium citrate) | transparence | Trouble |
| PAC | Acide phénylacétique | 0.8 | Assimilation (Acide phénylacétique) | transparence | Trouble |

Annexe 7. API staph.

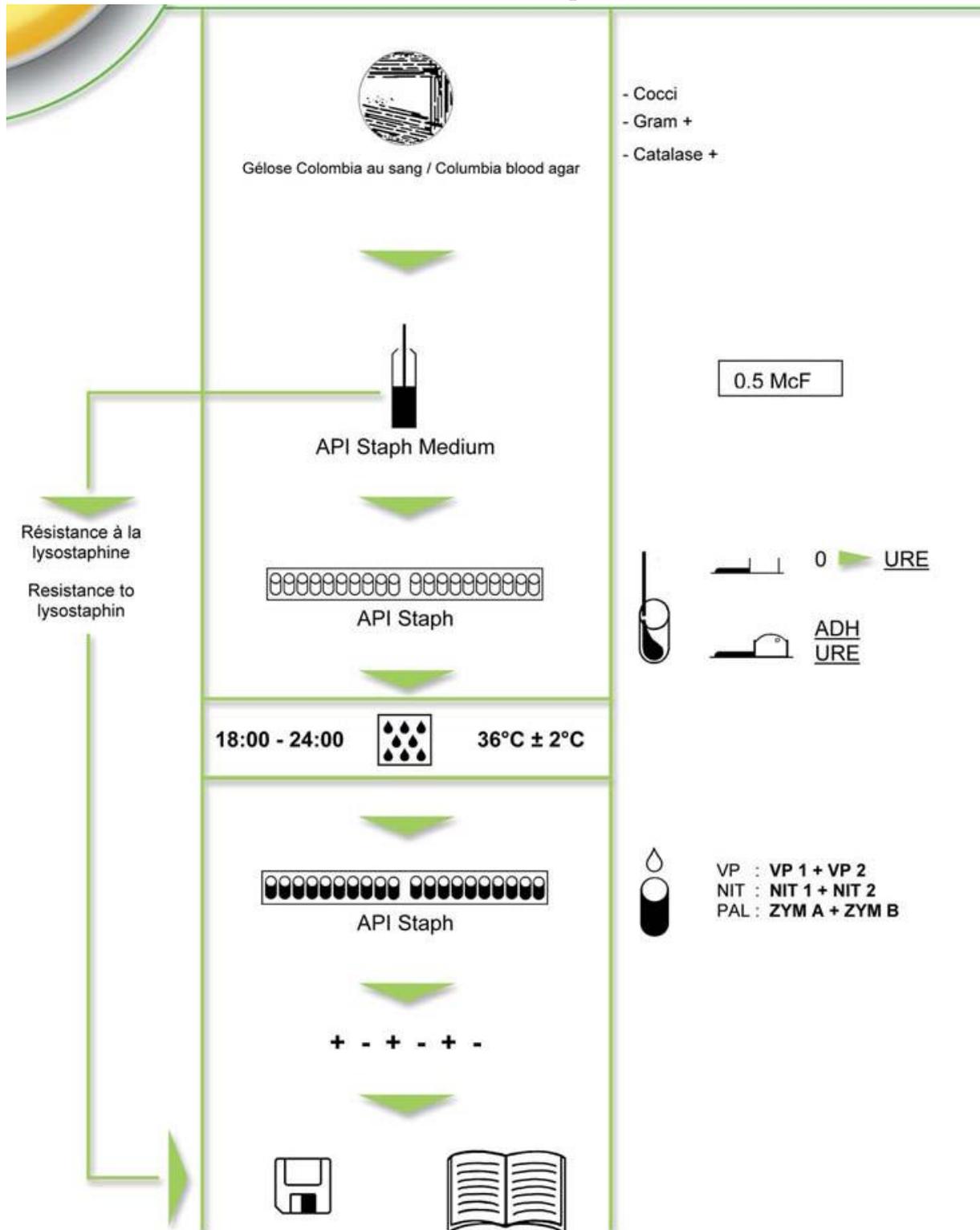


Tableau de lecture

| Test | Composants actifs | Quantité (mg/cup) | Réactions/Enzymes | Résultats | |
|------------|------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------|
| | | | | Négatif | Positif |
| 0 | Aucun | | Témoin négatif | Rouge | — |
| GLU | D-glucose | 1.56 | (Témoin positif) (D-Glucose) | | |
| FRU | D-fructose | 1.4 | Acidification (D-Fructose) | | |
| MNE | D-mannose | 1.4 | Acidification (D-Mannose) | | |
| MAL | D-maltose | 1.4 | Acidification (Maltose) | Rouge * | Jaune |
| LAC | D-lactose (origine bovine) | 1.4 | Acidification (Lactose) | | |
| TRE | D-tréhalose | 1.32 | Acidification (D-Trehalose) | | |
| MAN | D-mannitol | 1.36 | Acidification (D-Mannitol) | | |
| XLT | Xylitol | 1.4 | Acidification (Xylitol) | | |
| MEL | D-mélibiose | 1.32 | Acidification (D-Melibiose) | | |
| NIT | Nitrate de potassium | 0.08 | Réduction des nitrates en nitrites | <u>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</u> Incolore-rose pâle | Rouge |
| PAL | β -naphtyl phosphate | 0.0244 | Phosphatase Alcaline | <u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> Jaune | Violet |
| VP | Sodium pyruvate | 1.904 | Production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer) | <u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> Incolore-rose pâle | Violet-rose |
| RAF | D-raffinose | 1.56 | Acidification (Raffinose) | | |
| XYL | D-xylose | 1.4 | Acidification (Xylose) | | |
| SAC | D-saccharose | 1.32 | Acidification (Saccharose) | | |
| MDG | Méthyl- α D-glucopyranoside | 1.28 | Acidification (Méthyl- α D-Glucopyranoside) | Rouge | Jaune |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | 1.28 | Acidification (N-Acétyl-Glucosamine) | | |
| ADH | L-arginine | 1.904 | Arginine dihydrolase | Jaune | Orange-rouge |
| URE | Urée | 0.76 | Uréase | Jaune | Rouge-violet |

*Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.

Annexe 8. API strep.

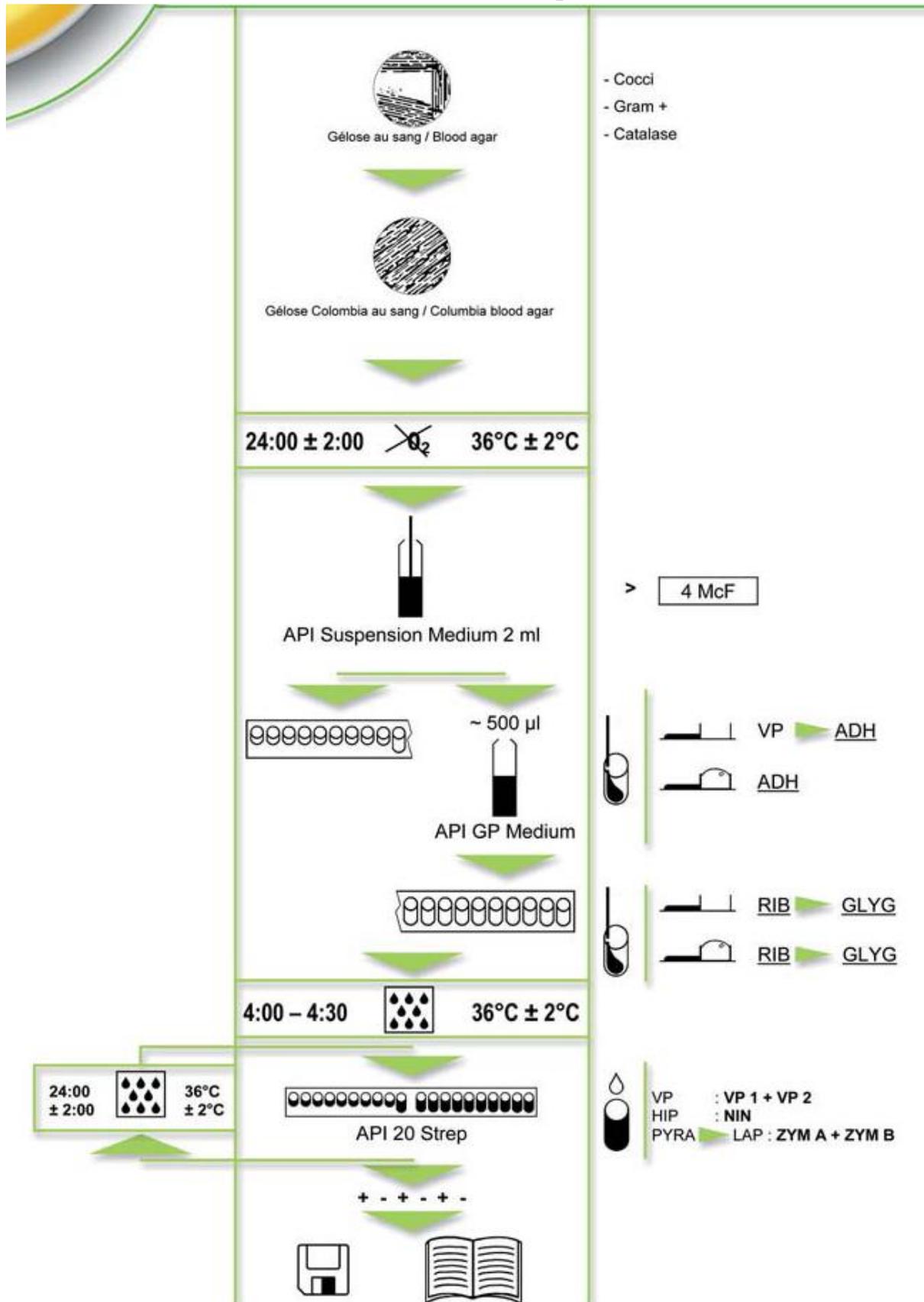


Tableau de lecture

| Test | Composants actifs | Quantité (mg/cup) | Réactions/Enzymes | Résultats | | | |
|-------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------|------|
| | | | | Négatif | | Positif | |
| VP | Sodium pyruvate | 1.9 | Production d'acétoïne (Voges Proskauer) | <u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> Incolore Rose-rouge | | | |
| HIP | acide hippurique | 0.4 | Hydrolyse (Acide hippurique) | <u>NIN / jusqu'à 10 min</u> Incolore-bleu pâle Bleu foncé-Violet Gris-bleuté | | | |
| ESC | Esculine citrate de fer | 1.16 0.152 | Hydrolyse β -glucosidase (Esculine) | 4 h | 24 h | 4 h | 24 h |
| | | | | Incolore Jaune pâle | Incolore Jaune pâle Gris clair | Noir Gris | Noir |
| PYRA | Acide pyroglutamique- β -naphtylamide | 0.0256 | Pyrrolidonyl arylamidase | <u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> <u>(PYRA à LAC)</u> Incolore ou orange très pâle Orange | | | |
| αGAL | 6-bromo-2-naphtyl- α D-galactopyranoside | 0.0376 | α -Galactosidase | Incolore | | Violet | |
| βGUR | Acide naphthol-ASBI-glucuronique | 0.0537 | β -Glucuronidase | Incolore | | Bleu | |
| βGAL | 2-naphtyl- β D-galactopyranoside | 0.0306 | β -Galactosidase | Incolore ou violet très pâle | | Violet | |
| PAL | 2-naphtyl phosphate | 0.0244 | Phosphatase alcaline | Incolore ou violet très pâle | | Violet | |
| LAP | L-leucine- β -naphtylamide | 0.0256 | Leucine aminopeptidase | Incolore | | Orange | |
| ADH | L-arginine | 1.9 | Arginine dihydrolase | Jaune | Rouge | | |
| | | | | 4 h | 24 h | 4 h | 24 h |
| RIB | D-ribose | 1.4 | Acidification (Ribose) | Rouge Orange-Rouge Orange-Jaune Jaune | | | |
| ARA | L-arabinose | 1.4 | Acidification (Arbinose) | | | | |
| MAN | D-mannitol | 1.36 | Acidification (Mannitol) | | | | |
| SOR | D-sorbitol | 1.36 | Acidification (Sorbitol) | | | | |
| LAC | D-lactose (origine bovine) | 1.4 | Acidification (Lactose) | | | | |
| TRE | D-tréhalose | 1.32 | acidification (Trehalose) | | | | |
| INU | Inuline | 5.12 | acidification (Inuline) | | | | |
| RAF | D-raffinose | 3.12 | Acidification (Raffinose) | | | | |
| AMD | Amidon | 2.56 | Acidification (Amidon) | | | | |
| GLYG | Glycogène | 1.28 | Acidification (Glycogène) | | | | |

Annexe 9. Article publié



D E L A R E C H E R C H E À L A P R A T I Q U E

ARTICLE VOL 13/3 - 2015 - pp.156-162 - doi:10.1007/s10298-015-0950-2

TITRE

Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivé en Algérie

TITLE

Chemical composition and antibacterial activity of geranium essential oil (Pelargonium graveolens L'Hér.) cultivated in Algeria

RÉSUMÉ

L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pelargonium graveolens*, obtenue par hydrodistillation, a permis d'identifier 96,86% de ses constituants. Les composants majeurs sont : le citronellol (19,22%), le géranol (14,03%) et le formiate de citronellyle (10,02%). L'étude de l'activité antibactérienne de cette l'huile essentielle sur une population bactérienne composée de cent trente souches isolées d'infections communautaires montre que la valeur moyenne des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est de 1%. Toutes les souches testées sont sensibles à des concentrations inférieures ou égales à 2% d'huile essentielle. On enregistre une meilleure activité sur les cocci à Gram positif, avec des CMI variant de 0,1% à 0,5%. Les concentrations minimales bactéricides de l'huile (CMB) sont beaucoup plus importantes et dépassent les 4% pour les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*, elles sont de 2% pour *Acinetobacter baumannii* et sont inférieures ou égales à 0,7% pour les cocci à Gram positif testés. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs des CMI et des CMB des souches résistantes aux antibiotiques (productrices de β -lactamases à spectre élargi et *Staphylococcus aureus* résistants à la méthiciline) et celles des souches sauvages. A partir de ces résultats, on peut proposer l'usage de cette substance naturelle en industrie pharmaceutique dans la lutte contre la contamination, la colonisation et la formation de biofilms.

ABSTRACT

The analysis by gas chromatography coupled to the mass spectrometry of essential oil of aerial parts Pelargonium graveolens obtained by hydrodistillation, has identified 96.86% of its constituents. The major components are: citronellol (19.22%), geraniol (14.03%) and citronellyl formate (10.02%). The study of the antibacterial activity of the essential oil of Pelargonium graveolens on a bacterial population composed of one hundred and thirty strains, isolated from community-acquired infections, shows that the average of the minimum inhibitory concentrations (MIC) is 1%. All tested strains were susceptible at concentrations less or equal to 2% of essential oil. There has been a better activity on Gram-positive cocci, with MIC ranging from 0.1% to 0.5%. The minimum bactericidal concentrations of the oil (MBC) are much more important and more than 4% for Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa, and equal to 2% for Acinetobacter baumannii and less or equal to 0.7% for Gram-positive cocci tested. Moreover, the difference was not significant between the values of MIC and MBC of antibiotic-resistant strains (producing strains of extended spectrum β -lactamase and Staphylococcus aureus resisting to the methicillin) and those of wild-type strains. The total results show an interesting antibacterial activity on bacteria isolated from community samples especially on Gram-positive cocci. Due to these results, we may propose the use of this natural substance in the pharmaceutical industry for the fight against contamination and biofilms composition.

AUTEUR(S)

I. ATAILIA, A. DJAHOUDI

MOTS-CLÉS

Pelargonium graveolens, Huile essentielle, Composition chimique, Activité antimicrobienne, Bio-décontamination

KEYWORDS

Pelargonium graveolens, Essential oil, Chemical composition, Antimicrobial activity, Bio-decontamination

BIBLIOGRAPHIE

phyto.revuesonline.com/revues/60/10.1007/s10298-015-0950-2.html

Résumé

L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pelargonium graveolens*, obtenue par hydrodistillation, a permis d'identifier 96.86% de ses constituants. Les composants majeurs sont : le citronellol (19.22%), le géraniol (14.03%) et le formiate de citronellyle (10.02%). Les constituants de l'huile essentielle appartiennent essentiellement aux alcools monoterpéniques (38.85%), aux esters terpéniques (29.54%) et aux sesquiterpènes (14.97%).

L'huile essentielle (HE) de *Pelargonium graveolens* est active sur 86.66% des souches bactériennes testées. Ces souches sont caractérisées par une importante résistance aux antibiotiques, en particulier les souches *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus agalactiae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'activité de l'HE est beaucoup plus significative sur les cocci à Gram positif, du genre *Staphylococcus* aussi bien que ceux des genres *Streptococcus* et *Enterococcus*. Les diamètres des zones d'inhibition de l'HE de cette plante varient dans un intervalle assez large allant de 7.2mm à 42.8mm. L'activité est beaucoup plus appréciable sur les espèces des genres *Streptococcus* et *Enterococcus*.

Quand à la concentration minimale inhibitrice (CMI) moyenne, elle avoisine à peine les 0.3% vis-à-vis des bactéries à Gram positif, alors qu'elle est de 1.5% vis-à-vis des espèces à Gram négatif. Les concentrations minimales bactéricides de l'huile (CMB) sont beaucoup plus importantes et dépassent les 4% pour les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*, elles sont de 2% pour *Acinetobacter baumannii* et sont inférieures ou égales à 0.7% pour les cocci à Gram positif testés. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs des CMI et des CMB des souches résistantes aux antibiotiques et celles des souches sauvages.

L'activité de l'huile essentielle est de type bactériostatique sur les entérobactéries et *P. aeruginosa* et est bactéricide vis-à-vis d'*A. baumannii* et les cocci à Gram positif testés. Encore meilleur est ce pouvoir bactéricide sur les souches *S. aureus*, *S. agalactiae* et *E. faecalis*.

La synergie de l'HE de *P. graveolens* avec les différents antibiotiques a permis l'amélioration de l'activité antibactérienne sur les souches les plus résistantes.

L'addition de l'HE au produit alimentaire (crème pâtissière) et au savon a permis une réduction significative du nombre bactérien. De plus l'HE semble posséder une excellente rémanence.

L'HE de *Pelargonium graveolens* peut être proposée comme substitut des additifs utilisés dans la protection des denrées alimentaires et aussi comme produit antiseptique. Cette substance naturelle peut être également modélisée en industrie pharmaceutique dans la lutte contre la contamination, la colonisation et la formation de biofilms.

Mots clés : Huile essentielle- *Pelargonium graveolens*- Composition chimique- Antibactérien- Conservateur- Antiseptique - Bio-décontamination.