

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé, la volonté et le courage d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous remercions notre promoteur M^r BOUKHATEM maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'Université Saâd Dahleb de Blida pour avoir accepté d'encadrer notre travail, nous former et nous diriger pendant la durée de ce mémoire.

Nous remercions chaleureusement, notre co-promotrice de mémoire, M^{me} le docteur AHNIA pour ses précieux conseils, son soutien, sa gentillesse, et de son dynamisme.

C'est avec un grand plaisir que nous remercions le professeur GUITARNI de nous faire l'honneur de présider le jury de ce mémoire, que ce travail constitue le témoignage de notre respect.

Nous adressons nos vifs remerciements par ailleurs à madame l'examinatrice, M^{me} BOUDJAMAA, pour nous avoir fait l'honneur en acceptant d'examiner notre mémoire.

Nos remerciements s'adressent également toute l'équipe du laboratoire de microbiologie de CHU Mustapha Bacha pour leur sympathie, leur coopération et leur soutien. Nous n'oublions pas à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs ayant participé à notre formation durant les cinq années de nos études.

Enfin, nous remercions toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci..... !

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très **chers parents**,

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être. Que ce humble travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez qu'Allah puisse vous accorde la santé, le bonheur, et la longévité.

A l'homme de ma vie,

mon support qui a sacrifié pour moi et qui est la cause d'allumer la bougie de mon avenir: **mon mari Mourad**. Je remercie Dieu de t'avoir dans ma vie.

A mon cher **fil Haithem** que j'adore.

A mes chers frères:

Mohamed, Abd el Madjid et Djaoued.

A ma sœur de cœur **Imene**.

A mon **binôme Rahma**,

pour m'accompagner tout au long de ce travail, je vous souhaite un avenir plein de joie, de succès, de réussite et surtout de santé.

A tout membre de **ma famille** petit et grand.

Aux personnes qui étaient toujours à mes côtés et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amies et sœurs de cœur **Loubna, Imene** et **Nesrine** sans oublier mes amies de la promotion microbiologie 2017.

Meriem

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes très chers parents, pour tout l'amour qu'ils me portent et pour leurs encouragements et leurs grands sacrifices. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux. Je leur dédie ce travail en témoignage d'un grand amour et reconnaissance infinie, Que Dieu vous protège.

Spéciale dédicace à mon mari, **Oussama** pour son soutien, ses conseils, ses encouragements, sa tolérance et sa patience.

A mes chères sœurs **Rayhane**, **Raoudha** et **Selma** et mon cher frère **Mohamed Riadh**.

A Mon beau-père, ma belle-mère, mes belles-sœurs **Zineb**, **Hafsa** et **Roumaissa** et Mes beaux-frères **Aymen** et **Abderrahmene**

A mon binôme **Meriem** pour les meilleurs moments que nous avons partagé au cours de ce travail, Je te souhaite beaucoup de bonheur, courage et de réussite dans ta vie autant personnelle que professionnelle.

Au nom de l'amitié sincère, mes aimables amies **Imene**, **Nesrine** et **Soumia** ainsi qu'à toute la promotion de Microbiologie 2017.

Et en fin à toute ma famille et toutes mes amies.

Rahma

LISTE DES TABLEAUX

| N° du | Titre | Page |
|----------------|--|------|
| Tableau | | |
| 1.1 | Classification anatomique des infections du site opératoire..... | 4 |
| 3.1 | Souches de référence utilisées dans l'étude..... | 14 |
| 3.2 | Réactifs et milieux de culture utilisés..... | 15 |
| 4.1 | Répartition des prélèvements positifs par âge..... | 33 |
| 4.2 | Répartition des entérobactéries isolées | 36 |
| 4.3 | Répartition des Entérobactéries CTX-R..... | 44 |
| 4.4 | Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)..... | 51 |
| 4.5 | Résultats des CMI de citronnelle de plusieurs équipes..... | 52 |

TABLE DES MATIERES

| | |
|---------------------------|---|
| Introduction | 1 |
|---------------------------|---|

Chapitre 1

Infections sur site opératoire

| | |
|---|---|
| 1.1 Définitions | 3 |
| 1.2 Epidémiologie | 4 |
| 1.3 Modes et voies de contamination | 4 |
| 1.3.1 L'origine endogène | 5 |
| 1.3.2 L'origine exogène | 5 |
| 1.4 Les facteurs de risque | 5 |
| 1.4.1 Facteurs de risque liés au patient | 5 |
| 1.4.2 Facteurs de risque liés à l'acte chirurgical | 5 |
| 1.5 Agents responsables des infections du site opératoire | 6 |
| 1.5.1 Les bactéries à Gram négatif | 6 |
| 1.5.2 Les bactéries à Gram positif | 7 |

Chapitre 2

Antibiotiques et antibiorésistance

| | |
|--|----|
| 2.1 Définition d'un antibiotique | 9 |
| 2.2 Mode d'action des antibiotiques | 9 |
| 2.3 Résistance bactériennes aux antibiotiques | 9 |
| 2.3.1 Définition de la résistance | 9 |
| 2.3.2 Types de résistance | 9 |
| 2.3.3 Mécanismes de résistance | 10 |
| 2.4 Multirésistance | 10 |
| 2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méticilline (SARM) | 11 |
| 2.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistant à la ceftazidime et ou l'imipénème | 11 |
| 2.4.3 <i>Acinetobacter baumannii</i> ceftazidime et ou imipénème multirésistant | 12 |
| 2.4.4 Entérobactéries résistantes aux Céphalosporines de 3 ^{ème} génération | 12 |

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

| | |
|--|----|
| 3.1 Matériel | 14 |
| 3.1.1 Produit pathologique | 14 |
| 3.1.2 Souches de référence | 14 |
| 3.1.3 Huile essentielle de Citronnelle..... | 15 |
| 3.1.4 Réactifs et milieux de culture | 15 |
| 3.2 Méthodes | 16 |
| 3.2.1 Examen cyto bactériologique du pus | 16 |
| 3.2.2 Tests complémentaires | 24 |
| 3.2.3 Evaluation du pouvoir antibactérienne de l'huile essentielle <i>in vitro</i> | 28 |

Chapitre 4

Résultats et discussion

| | |
|--|----|
| 4.1 Répartition des prélèvements selon la nature | 31 |
| 4.2 Répartition des prélèvements selon la culture | 32 |
| 4.3 Répartition des prélèvements positifs selon le sexe | 33 |
| 4.4 Répartition des prélèvements positifs par âge..... | 33 |
| 4.5 Répartition des prélèvements positifs par service hospitaliers..... | 34 |
| 4.6 Répartition des prélèvements positifs Selon le type de culture | 35 |
| 4.7 Répartition des germes isolés à partir des cultures positives | 35 |
| 4.8 Profil de résistance des souches isolées | 38 |
| 4.8.1 Entérobactéries | 39 |
| 4.8.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 39 |
| 4.8.3 <i>Acinetobacterbaumannii</i> | 40 |
| 4.8.4 <i>Staphylococcus aureus</i> | 41 |
| 4.8.5 Streptocoque | 41 |
| 4.8.6 Entérocoques | 42 |

| | |
|--|----|
| 4.9 Répartition des BMR isolées..... | 43 |
| 4.10 Screening antibactérien de l'huile essentielle de citronnelle <i>in vitro</i> | 46 |
| 4.10.1. Méthode de l'aromatogramme | 46 |
| 4.10.2. Méthode de Microatmosphère..... | 48 |
| 4.10.3. Méthode de dilution en milieu gélosé | 51 |
| Conclusion | 54 |
| Références bibliographiques | 56 |
| Annexes | |

LISTE DES FIGURES

| N° des figures | Titre | Page |
|----------------|--|------|
| 1.1 | Classification anatomique des infections du site opératoire..... | 3 |
| 2.1 | Les mécanismes de résistance de la bactérie..... | 10 |
| 3.1 | Test coagulase libre..... | 19 |
| 3.2 | Test Staphaurex..... | 20 |
| 3.3 | CMI de la pénicilline G d'une souche <i>S. pneumoniae</i> (technique E-test).. | 23 |
| 3.4 | Micro Scan® Walk Away 96 plus , plaque Walk Away 96 plus..... | 24 |
| 3.5 | Test de double disque positif..... | 26 |
| 3.6 | Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle déterminé par diffusion en milieu solide (aromatogramme)..... | 29 |
| 3.7 | Pouvoir antimicrobien de l'huile déterminé par microatmosphère..... | 29 |
| 4.1 | Répartition des prélèvements selon leur type..... | 31 |
| 4.2 | Répartition des prélèvements selon les cultures obtenues..... | 32 |
| 4.3 | Répartition des prélèvements selon le sexe..... | 33 |
| 4.4 | Répartition de prélèvements positifs par service hospitalier..... | 34 |
| 4.5 | Répartition des prélèvements positifs selon le type de culture..... | 35 |
| 4.6 | Répartition des germes isolés à partir des cultures positives..... | 36 |
| 4.7 | Profil d'antibiorésistance des entérobactéries..... | 39 |
| 4.8 | Résultats de l'antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i> | 40 |
| 4.9 | Résultats de l'antibiogramme d' <i>Acinetobacter baumannii</i> | 40 |
| 4.10 | Résultats de l'antibiogramme de <i>S. aureus</i> | 41 |
| 4.11 | Profil de résistance des streptocoques aux antibiotiques..... | 42 |
| 4.12 | Résultats de l'antibiogramme des entérocoques..... | 42 |
| 4.13 | Répartition des BMR isolées..... | 43 |
| 4.14 | Souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> productrice de Carbapénèmase de classe B (Test de Hodge modifié +)..... | 45 |
| 4.15 | Variation des DZI pour les Bactéries multi-résistantes en aromatoigramme (20 µL/disque)..... | 46 |
| 4.16 | Variation des DZI pour les Bactéries multi-résistantes en aromatoigramme (40 µL/disque)..... | 47 |
| 4.17 | Aromatoigramme d'une souche de SARM à 20 µL (a) et 40 µL (b)..... | 47 |
| 4.18 | Sensibilités des Bactéries multi-résistantes en microatmosphère (20 µL/disque)..... | 49 |
| 4.19 | Diamètre des zones d'inhibition de quelques BMR en microatmosphère (à droite : 40 µL, à gauche : 20 µL)..... | 49 |
| 4.20 | Sensibilités des Bactéries multi-résistantes en microatmosphère (40 µL/disque)..... | 50 |

RESUME

Les infections du site opératoire ont un impact significatif sur la santé et constituent donc un indicateur de la qualité des soins dispensés dans un établissement hospitalier.

L'objectif assigné à notre étude consistait à isoler et identifier les bactéries multi-résistantes (BMR) des prélèvements purulents du site opératoire au niveau de différents services hospitaliers du CHU Mustapha Bacha d'Alger et de déterminer leur profil de résistance aux antibiotiques et à l'huile essentielle (HE) de citronnelle (*Cymbopogon citratus*).

Un total de 136 prélèvements purulents ont été examinés dont 77 étaient positifs. L'examen cytot bactériologique du pus a révélé que les germes les plus dominants sont les entérobactéries avec un taux de 46.67%, suivis par *S. aureus* et *Streptococcus* sp. avec une fréquence de 15% et 10%, respectivement. Le profil d'antibiorésistance a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs BMR dont des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (22 souches), des *Staphylococcus aureus* résistant à la Mécilline (SARM) ainsi que des *Acinetobacter baumannii* résistant au céftazidime et imipénème (CAZ-R IMP-R) et des *Pseudomonas aeruginosa* résistant au céftazidime et imipénème.

Le profil de résistance de ces BMR à l'HE de citronnelle a été exploré par plusieurs méthodes. En aromato gramme, ce sont les SARM qui ont manifesté une plus grande sensibilité à l'action inhibitrice de l'huile avec des diamètres de zones d'inhibition de 43 et 85 mm, suivis par les espèces BLSE du genre *Proteus*. En microatmosphère, de meilleurs résultats ont été obtenus, en particulier pour les SARM où une inhibition totale a été obtenue pour la quasi-totalité des souches. En dilution en milieu gélosé, les SARM sont les plus sensibles à l'activité antibactérienne de citronnelle avec des valeurs de CMI qui oscillent entre 0.015% et 0.062%.

L'essence de citronnelle paraît être une solution naturelle et efficace dans la lutte contre les BMR et pourra faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique anti-infectieux. Reste à confronter ses résultats avec les données toxicologiques.

Mots-clés : Infections site opératoire ; Bactéries multi-résistantes ; Antibiogramme ; Huile essentielle ; Citronnelle ; Anti-infectieux.

ABSTRACT

Surgical site infections have a significant impact on health and are therefore an indicator of the quality of care provided in a hospital setting.

The aims of our study were to isolate and identify multi-drug resistant bacteria (MDR) from purulent samples of surgical site at the various hospital departments of the Mustapha Bacha Hospital in Algiers and then to determine their antibiotic resistance against both antibiotics and lemongrass (*Cymbopogon citraus*) essential oil the essential oil (LGEO).

A total of 136 purulent samples were examined while 77 samples were positive. The microbiological analysis of purulent samples revealed that the most dominant strains were enterobacteria with a rate of 46.67%, followed by *S. aureus* and *Streptococcus* sp. with a frequency of 15% and 10%, respectively. The antibiotic resistance profile revealed the presence of several MDR species including Enterobacteriaceae resistant to third generation cephalosporins (CTX-R 22 strains), Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii* resistant to ceftazidime and imipenem (CAZ-R IMP-R) and *Pseudomonas aeruginosa* resistant to ceftazidime and imipenem.

The resistance profile of MDR strains to Lemongrass was explored by several methods. By disc diffusion assay, MRSA were found to be the most sensitive strains with diameters of inhibition zone (DIZ) ranged between 43 and 85 mm, followed by the ESBL species of the genus *Proteus*. In the vapour diffusion method, better results have been obtained, in particular with MRSA microorganisms which have been inhibited totally for almost all strains. In dilution in agar medium, MRSA is the most sensitive to the antibacterial activity of citronella with MIC values ranging from 0.015% to 0.062%.

Finally, Lemongrass oil seems to be a natural and effective solution in the fight against MDR bacteria and can be used as a bioactive component to treat various diseases related to nosocomial infections. Further studies will be necessary in the future to assess the toxicology data of this volatile oil.

Keywords: Surgical infections site; Multi-drug resistant bacteria; Antibiotic; Essential oil; Lemongrass.

ملخص

إن لالتهابات الموقع الجراحي تأثير كبير على الصحة، وبالتالي فهي مؤشر على نوعية الرعاية المقدمة في المستشفى.

و قد كان الهدف المحدد لهذه الدراسة عزل وتحديد البكتيريا المتعددة المقاومة (BMR) من قريح جرح ما بعد الجراحة بالمستشفى الجامعي مصطفى باشا في الجزائر العاصمة ، وتحديد مدى مقاومة هذه البكتيريا للمضادات الحيوية و الزيت الاساسية سيترونيل (Cymbopogon citraus).

من مجموع 136 عينة قريحة تم فحصها, 77 منها كانت إيجابية. وكشف الفحص البكتيريولوجي لقريح جرح ما بعد الجراحة ان البكتيريا الأكثر انتشارا هي enterobacteria بمعدل 46.67%، تليها *Staphylococcus aureus* ، *Streptococcus sp.* 15% و 10% على التوالي. وقد ساعد تشخيص المقاومة للمضادات الحيوية على وجود العديد من البكتيريا المتعددة المقاومة (BMR) بما في ذلك entérobactérie المقاومة لسيفالوسبورين الجيل الثالث (22 سلالة) , و *Staphylococcus aureus* المقاومة للميثيسيلين (MRSA) ، *Acinetobacter baumannii* المقاوم لسافتازيديم و ايميبينام (CAZ-R) و *Pseudomonas aeruginosa* المقاوم لسافتازيديم و ايميبينام .

تم الكشف عن مدى مقاومة البكتيريا المتعددة المقاومة بزيت السترونيل بعدة طرق , بطريقة aromatogramme ، الجرثومة SARM التي أظهرت حساسية أكبر لخاصية الزيت المثبطة بأقطار من 43 الى 85 ملم، تليها BLSE من صنف بروتيوس *Proteus*. أما بطريقة microatmosphère ، تم الحصول على نتائج أفضل، وخاصة بالنسبة ل SARM حيث تم الحصول على تثبيط كلي لجميع السلالات تقريبا. اما بطريقة التخفيف في وسط جيلوزي , SARM هو الأكثر حساسية للنشاط المضاد للبكتيريا لسترونيل مع القيم CMI تتراوح بين 0.015% إلى 0.062%.

ويبدو أن زيت السترونيل هو الحل الطبيعي والفعال في مكافحة BMR وسوف تكون جزءا من عتاد مكافحة العدوى ، و ذلك بعد لمقارنة نتائجها مع بيانات السمية.

الكلمات المفتاحية : عدوى في الموقع الجراحي , بكتيريا متعددة المقاومة ,الكشف عن المضادات الحيوية,زيت أساسي سترونيل, ضد العدوى

INTRODUCTION

L'hôpital qui est normalement considéré comme un lieu de savoir, d'enseignement médical et d'hygiène, peut devenir dans certaines circonstances, une source d'infection ; ceci soit par l'utilisation de méthodes invasives, soit dans le cas de plusieurs hôpitaux, par défaut d'hygiène, d'organisation, de conscience professionnelle ou par manque de moyens (CTIN, 1999).

L'objectif principal de la chirurgie est de guérir le malade tout en évitant les complications liées à l'acte chirurgical. Aucune intervention n'est totalement aseptique, quels que soient les précautions prises et le traitement utilisé. L'altération des défenses immunitaires locales au niveau de l'incision, et générales par l'intervention, rendent tout site opératoire vulnérable à l'infection. Parmi ces complications, l'événement le plus redouté et honni des chirurgiens est l'infection du site opératoire (CTIN, 1999).

Les infections nosocomiales, aussi appelées « infections hospitalières », sont définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme des infections acquises pendant un séjour à l'hôpital et qui n'étaient ni présentes ni en incubation au moment de l'admission du patient. Parmi les infections nosocomiales, les infections du site opératoire sont les plus fréquentes (OMS, 2008)

Les infections du site opératoire (ISO) sont un sujet d'actualité et un véritable problème de santé publique parce qu'elles sont fréquentes. Aux États-Unis, les ISO représentent 14 à 16 % de toutes les infections nosocomiales soit la deuxième cause la plus fréquemment rapportée après les infections urinaires (Wong, 1999). Dans l'enquête de prévalence réalisée en France en 2001, 10,3% des infections nosocomiales étaient des ISO. La prévalence globale des ISO chez les patients opérés était de 2,7 % (Raisin, 2003). En Algérie et selon des études faites dans quelques hôpitaux, le taux d'incidence des ISO varie de 14 % (Soukhal *et al.*, 2006) au CHU de Béni Messous à 27.8 % au CHU de Blida (Bezzaoucha, 1999). Il s'agit d'un problème important qui limite le bénéfice potentiel des interventions chirurgicales (OMS, 2008). Elles constituent une source majeure de mortalité pour les patients soumis à des procédures chirurgicales (7.5%). Elles entraînent une prolongation du séjour postopératoire de 6.5 jours (en moyenne) de plus, des visites médicales supplémentaires, l'utilisation d'antibiotiques et d'autres traitements, une diminution de la qualité de vie et un surcoût de traitement très élevé (Institut national de santé publique du Québec, 2014).

L'infection est en général acquise pendant l'intervention elle-même, avec une origine soit exogène (air, matériel médical), soit endogène (flore cutanée). Les micro-organismes infectieux sont divers

et dépendent du type et de la localisation de l'intervention et des anti-infectieux reçus par le patient. Les principaux facteurs de risque sont l'étendue de la contamination peropératoire, la durée de l'intervention et l'état général du patient (OMS, 2008).

Un autre problème qui représente probablement l'un des problèmes de santé publique les plus inquiétants de ces dernières années, est la dissémination des bactéries multirésistantes (BMR). Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques (ATB) lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. La multirésistance est une étape vers l'impasse thérapeutique (Raisin., 2010).

La résistance aux antibiotiques est un phénomène biologique que la médecine aura du mal à faire disparaître. L'évolution permettra toujours aux bactéries de s'adapter. Une meilleure utilisation des antibiotiques ne pourra que ralentir l'extension des résistances et la découverte de nouvelles molécules actives reste une nécessité. Les huiles essentielles (HE) présentent une très grande richesse de molécules, tant en nombre qu'en variété. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des ATB conventionnels devenus inefficaces (Guinoiseau, 2010).

L'objectif assigné à notre travail consiste à isoler et identifier les espèces bactériennes impliquées dans les infections du site opératoire (plaies suppuratives) provenant de différents services hospitaliers du CHU Mustapha Bacha d'Alger et de déterminer leur profil d'antibiorésistance et d'estimer ainsi la prévalence des BMR. En outre et afin de lutter contre les BMR, la recherche de nouvelles molécules anti-infectieuses paraît être une nécessité. A cet effet, nous avons évalué le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'une plante aromatique et médicinale, la Citronnelle (*Cymbopogon citratus*) par plusieurs méthodes complémentaires (aromatogramme, microatmosphère et dilution en milieu gélosé) et ce sur toutes les souches BMR identifiées (Entérobactéries résistantes aux Céphalosporine de troisième génération, *Staphylococcus aureus* résistants à la Mécicilline (SARM), *Acinetobacter baumannii* ceftazidime/imipénème multirésistant et *Pseudomonas aeruginosa* résistant à la ceftazidime et l'imipénème).

L'objectif final de notre travail est d'essayer de juguler, un tant soit peu, la résistance bactérienne aux ATB via la recherche et la mise au point de nouvelles molécules anti-infectieuses naturelles et efficaces.

INFECTIONS SUR SITE OPERATOIRE

1.1.Définitions

Le terme nosocomial vient du grec « Nosokomeone » qui signifie hôpital, et quantifie ce qui se rapporte aux hôpitaux. Les infections nosocomiales sont des maladies infectieuses (bactérienne, fongique, parasitaire ou virale) contractées dans une structure de soins, soit par le personnel soignant du fait de son activité, soit par le patient. Dans ce dernier cas, l'infection est considérée comme nosocomiale lorsqu'il est prouvé qu'elle était inexistante lors de l'admission du patient à l'hôpital, et que 48 heures se sont écoulées entre l'hospitalisation et la déclaration des premiers signes cliniques (Amiel, 2005).

Les localisations les plus fréquentes sont les voies urinaires (sonde), les plaies opératoires, l'appareil respiratoire (malades sous ventilation assistée) et les cathéters intravasculaires (Nauciel, 2000).

Les infections du site opératoires (ISO) se définissent par la présence de pus provenant d'une des localisations suivantes :

- partie superficielle de l'incision chirurgicale (peau et tissus sous cutanés).
- partie profonde de l'incision chirurgicale (tissus mous profonds en dessous de l'aponévrose)
- cavité ou organe à proximité ou à distance du site opératoire mais lié(e) à l'intervention.

Une ISO est considérée comme une infection nosocomiale quand elle n'est ni présente ni en incubation à l'entrée et si elle survient dans les 30 jours qui suivent l'intervention ; cette période est étendue à un an en cas de mise en place de matériel prothétique artificiel (Vincent *et al.*, 2008).

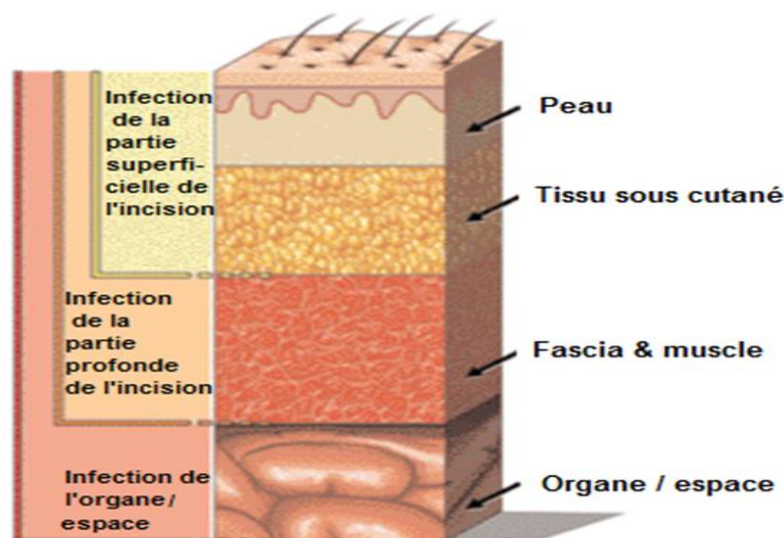


Figure 1.1. Classification anatomique des infections du site opératoire (Pear, 2007).

Tableau 1.1 : Classification anatomique des infections du site opératoire (**Benedettoet al., 2013**).

| Classification anatomique des ISO | Définition et organes concernés * |
|---|--|
| Infection superficielle de la plaie | L'infection se manifeste jusqu'à 30 jours après l'opération et elle concerne uniquement la peau ou les tissus sous-cutanés de l'incision. |
| Infection profonde de la plaie chirurgicale | L'infection se manifeste jusqu'à 30 jours après l'intervention (si pas d'implant) ou jusqu'à un an (si présence d'implant) et elle semble liée à l'opération. Elle implique les tissus mous profonds (par exemple, fascia, couches musculaires) de l'incision. |
| Infection du site opératoire d'organe ou cavité | L'infection se manifeste jusqu'à 30 jours après l'intervention (si pas d'implant) ou jusqu'à un an (si présence d'implant) et elle semble liée à l'opération. Elle implique n'importe quelle partie du site chirurgical (par exemple, organe ou cavité), en dehors de l'incision, qui a été ouverte ou manipulée durant l'opération. |

*Diagnostic d'infection du site opératoire (superficielle, profonde, d'organe ou cavité) établi par un chirurgien.

1.2. Epidémiologie

Aux États-Unis, les ISO représentent 14 à 16 % de toutes les infections nosocomiales soit la deuxième cause la plus fréquemment rapportée après les infections urinaires (**Wong, 1999**). Dans l'enquête de prévalence réalisée en France en 2001, 10,3 % des infections nosocomiales étaient des ISO. La prévalence globale des ISO chez les patients opérés dans les 30 jours précédant l'enquête (ou dans l'année pour ceux porteurs de matériel prothétique) était de 2,7 %. Parmi l'ensemble des infections nosocomiales identifiées chez les opérés, les ISO représentaient 25,4 % et les infections urinaires 37 %.

La surveillance des ISO réalisée en France en 2003 a démontré que sur 107576 interventions chirurgicales, 1 616 (1,5 %) ont été suivies d'une ISO (**Institut national de santé publique du Québec, 2014**). En Algérie, l'incidence des infections du site était estimée à 8 % selon une étude au CHU Bab El Oued en 2011 (**Makhlouf, 2011**).

1.3. Modes et voies de contamination

La contamination du site opératoire survient essentiellement en péri-opératoire (**Benedettoet al., 2013**). L'infection peut être d'origine endogène ou exogène :

1.3.1.L'origine endogène

Elle est représentée par le patient et qu'est majoritairement en cause dans les ISO. Les bactéries proviennent soit de la peau (staphylocoques pénétrant la plaie lors de l'incision ou des manœuvres chirurgicales), soit des tractus respiratoire, digestif, génital et urinaire (contenant naturellement des bactéries Gram négatif et anaérobies), soit d'un site opératoire infecté et concerné par l'acte chirurgical.

1.3.2. L'origine exogène

Elle est représentée par le personnel et l'environnement. Les bactéries commensales de la flore cutanée ou muqueuse (mains, cuir chevelu, naso-pharynx, périnée) des membres de l'équipe opératoire, les bactéries pathogènes dont ils seraient porteurs sains ou infectés (streptocoque du groupe A) et les bactéries présentes sur les instruments (mal stérilisés ou longtemps exposés à l'air ambiant) peuvent être à l'origine d'ISO (**Hajjar et Valence, 2008**).

Des ISO liées à des contaminations post-opératoires sont cependant possibles. En chirurgie digestive, il s'agit alors souvent d'un lâchage des sutures ; en chirurgie traumatologique, d'une ISO si le foyer opératoire n'a pas pu être fermé en fin d'intervention (perte de substance). La contamination post-opératoire par les drains ou les pansements est très rare.

Les voies de transmission des micro-organismes ne sont pas parfaitement connues. Elles peuvent être aériennes, manuportées ou de contiguïté à partir de la flore endogène (cutanée, digestive) (**Société Française d'Hygiène Hospitalière, 2010**).

1.4. Les facteurs de risque

1.4.1. Facteurs de risque liés au patient

Ils sont nombreux : âges extrêmes de la vie, maladies sous-jacentes (diabète, immunodépression), obésité, dénutrition, tabagisme (**Benedetto et al., 2013**). La présence d'une infection à distance du site opératoire, dont les micro-organismes peuvent contaminer le site chirurgical par voie cutanée, hématogène ou lymphatique. L'hospitalisation préopératoire prolongée et l'état générale du patient et sa susceptibilité à l'infection (**Hajjar et Valence, 2008**). Le score ASA (American Society of Anesthesiology) classe les patients en 5 catégories (**Kientega, 2012**) :

ASA 1 : patient sain ; ASA 2 : patient avec une atteinte systémique légère ; ASA 3 : patient avec une atteinte systémique sérieuse mais non invalidante ; ASA 4 : patient avec une atteinte systémique avec une menace constante pour la vie ; ASA 5 : patient moribond. (**Annexe 1, Tableau 1**)

1.4.2. Facteurs de risque liés à l'acte chirurgical

- Type de chirurgie : Parmi les facteurs de risque liés au geste opératoire lui-même, la classe de contamination d'Altemeier est le plus important (**Avril et al., 1992**). D'après Altemeier, les plaies chirurgicales sont classés en quatre classes de contamination (**Annexe 1, Tableau 2**) :

Classe I : chirurgie propre ; Classe II : chirurgie propre contaminée ; Classe III : chirurgie contaminée ; Classe IV : chirurgie sale et infectée ;

- Duréé d'intervention : le risque infectieux est d'autant plus important que la durée opératoire est plus longue.

- La technique opératoire : elle est liée à l'expérience et la compétence de chirurgien.

- Le site opératoire : L'intervention à proximité d'une zone infectée et sur une région pileuse et humide augmente le risque d'infection du site opératoire(**Kientega, 2012**).

1.5.Agents responsables des infections du site opératoire

Les bactéries sont les agents microbiens en cause dans la majorité des ISO. On observe aussi, dans certaines circonstances, des levures et des champignons filamenteux (**Hajjar et Valence, 2008**).

1.5.1. Les bactéries à Gram négatif

1.5.1.1.Entérobactéries

Les Entérobactéries font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries à Gram négatif, mobiles, péritriches et poussent sur milieux ordinaires en aérobie et en anaérobie. Sur gélose nutritive, elles forment des colonies de 1 à 3 mm de diamètre, bombées, lisses et brillantes (**Denis et al., 2007**). Elles réduisent les nitrates en nitrites, ont une réaction d'oxydase négative et utilisent le glucose par voie fermentaire. L'identification des entérobactéries se fait d'abord par l'étude des caractères biochimiques(**Fauchère et Avril, 2002**).

Les Entérobactéries sont des bactéries qui colonisent l'intestin de l'Homme et l'animal. En dehors du tube digestif, elles peuvent être transitoirement présentes sur différentes parties du revêtement cutanéomuqueux (**Nauciel, 2000**). Elles possèdent un antigène O ou somatique au niveau de la paroi bactérienne de nature lipopolysaccharidique, il est en fait l'endotoxine bactérienne. Les souches mobiles, pourvues de flagelles possèdent un antigène H ou flagellaire constitué d'une protéine, la flagelline. L'antigène K ou capsulaire est généralement constitué d'une couche externe poly-saccharidique. Quand il est présent, il entoure le corps bactérien et empêche les anticorps d'accéder à l'antigène O. Tous ces antigènes sont de structure très variable. Ils servent ainsi à définir des sérovars à l'intérieur de l'espèce (**Avril et al, 1992 ; Fauchère et Avril, 2002**).

Parmi les espèces les plus rencontrées en médecine humaine, *Escherichia coli*, les bactéries de genre *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Proteus* (**Nauciel, 2000**).

1.5.1.2.Pseudomonas aeruginosa

Les *Pseudomonas aeruginosa* font partie de la famille des *Pseudomonaceae*(**Delarras, 2007**). Ce sont bacille à Gram négatif, aérobie strict, oxydase positive, mobile par un flagelle polaire, se cultivent sur milieux ordinaires à une température optimale de croissance de 30° C. L'une des caractéristiques de l'espèce *P. aeruginosa* est la production d'un pigment bleu ou pyocyanine. L'aspect des colonies est

particulier ; elles sont rugueuses avec un reflet métallique. C'est une bactérie répandue dans la nature. On la trouve aussi dans l'environnement hospitalier. Elle fait partie de la flore transit de l'Homme ; dans le tube digestif et plus rarement dans la salive (**Fauchère et Avril, 2002**).

P.aeruginosa possède des fimbriaes qui permettent l'adhésion aux muqueuses. Certaines souches sont entourées d'une pseudocapsule polysaccharidique qui augmente l'adhésion de la bactérie et exerce une action antiphagocytaire. La bactérie produit plusieurs toxines cytotoxiques : deux hémolysines et l'exotoxine A (**Nauciel, 2000**).

1.5.1.3. *Acinetobacter baumannii*

Les *Acinetobacter baumannii* font partie de la famille des *Moraxellaceae* (**Delarras, 2007**). Ce sont des bacilles à Gram négatif d'aspect coccoïde. Ces bacilles sont dépourvus de flagelles, aérobies strictes, non fermentaires, ne réduisent pas le nitrate et sont oxydase négatif (**Denis et al., 2007**). Leur culture est facile sur les milieux usuels, elle donne des colonies lisses, muqueuses, blanc-jaunâtre et d'aspect butyreux (**Avril et al., 1992**).

A.baumannii est retrouvé au sein de la flore cutanée commensale de 25% des individus. Très répandu dans l'environnement hospitalier, *Acinetobacter* peut se développer dans des solutions antiseptiques, dans des savons liquides et coloniser les appareils médicaux et les mobiliers, et les sols (**Fauchère et al., 2002**). Il est doté d'un lipopolysaccharide aux propriétés d'endotoxine et une capsule protège la bactérie de la phagocytose (**Denis et al., 2007**).

1.5.2. Les bactéries à Gram positif

1.5.2.1. Staphylocoque

Le genre staphylococcus appartient à la famille de *Staphylococaceae* (**Delarras, 2007**). Ce sont des bactéries coques à Gram positif, non encapsulées, ayant un aspect en grappe en microscope optique, immobiles, anaérobies facultatives et catalase positive (**Denis et al., 2007**).

Ces germes se cultivent très bien sur milieux ordinaires à 37°C ; en 24 heures, les colonies sont lisses, rondes, opaques et bombées. Les colonies peuvent être pigmentées en jaune doré ou jaune citrin et sur gélose au sang, certaines souches sont hémolytiques. Les germes appartenant à ce genre sont des commensaux de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux (**Denis et al., 2007**).

On distingue notamment l'aptitude à produire une enzyme appelée coagulase. Cette enzyme inhibe la phagocytose, active la coagulation et permet la formation de thromboses. Ainsi, il existe les staphylocoques coagulases positifs (*Staphylococcus aureus*) et les staphylocoques coagulases négatifs (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. capitis* ...) (**Dennis et al., 2007**).

Staphylococcus aureus, comme toute bactérie pyogène, est l'origine d'infections suppuratives. Il s'agit le plus souvent d'auto-infection à partir de la flore endogène, mais l'origine peut aussi être exogène, c'est le cas des toxi-infections (**Denis et al., 2007**).

La paroi de *S. aureus* possède des adésines : protéine A, un récepteur pour la fibronectine et un récepteur pour le fibrinogène. Elle produit de nombreuses toxines : hémolysines, leucocidines,

entérotoxines et Exfoliatine. Et elle produit différentes enzymes qui peuvent favoriser sa diffusion (Nauciel, 2000)

1.5.2.2 .Streptocoque

Les streptocoques sont des cocci sphériques à Gram positif, se disposent en chaînette plus au moins longues, appartiennent à la vaste famille des *Streptococcaceae*. Ils sont immobiles, asporulés, différenciables des staphylocoques par l'absence de catalase et leur culture nécessite habituellement des milieux riches. Ce sont des bactéries ubiquistes, saprophytes des eaux, de l'air et du sol. Elles sont aussi commensales des cavités naturelles ou des téguments de l'Homme et des animaux (Hart et Shears, 1997 ; Delarras, 2007).

Trois grands groupes de streptocoques peuvent être distingués :

- 1 le groupe de streptocoques pyogènes ressemble les espèces les plus virulentes et responsables de suppurations. Ces souches sont bêta-hémolytiques et appartient aux groupes A, B, C et G de Lancefield ;
- 2 le groupe de streptocoques oraux « streptocoques viridans », commensaux des muqueuses habituellement non hémolytiques et non groupables par la méthode de Lancefield ;
- 3 les streptocoques du groupe D commensaux du tube digestif de l'Homme et des animaux (Avril, 1997)

La caractérisation d'un antigène polysaccharidique de la paroi permet ensuite de situer les streptocoques parmi les groupes sérologiques de Lancefield (A à H et de K à T).

1.5.2.3 . Entérocoques

Les Entérocoques font partie de la famille d'*Enterococaceae* ; ce sont des cocci ovulaires à Gram positif groupés en paire ou en chaînette. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs, rarement capsulés, immobiles et ne possède pas la catalase. Ils se cultivent bien sur milieux ordinaires ou sur des milieux hostiles (en particulier ceux contenant une concentration élevée de NaCl) (Nauciel, 2000).

Les entérocoques sont des germes ubiquistes (sols, eaux douces et marines, végétaux), qui vivent en commensalisme dans l'intestin de l'Homme et des animaux. Ils peuvent être pathogènes pour l'Homme et pour les animaux (Dellaras, 2007).

Chapitre 2

ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE

2.1. Définition d'un antibiotique

Les antibiotiques sont des substances élaborées par des microorganismes, ou des substances synthétiques, qui sont bactériostatiques ou bactéricides à faible dose. Elles ont une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes (**Fauchère et Avril, 2002**).

Les antibiotiques à spectre large, agissant sur la majorité des espèces bactériennes pathogènes à Gram + et à Gram- alors que les antibiotiques à spectre étroit, ayant une action limitée (antibiotiques des bactéries à Gram +) ou très limitée (antibiotiques staphylococciques) sur les bactéries (**Delarras, 2007**).

2.2. Mode d'action des antibiotiques

La plus part des ATB inhibent des voies métaboliques de la bactérie. Chaque famille d'ATB possède son site d'action propre (**Annexe 2, Tableau 1**) (**Nauciel et Jean-Louis, 2005**). On distingue :

- ✓ des antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane.
- ✓ des antibiotiques inhibant la synthèse protéique.
- ✓ des antibiotiques agissant sur les acides nucléiques.
- ✓ des antibiotiques agissant sur les membranes.

2.3. Résistance bactériennes aux antibiotiques

2.3.1. Définition de la résistance

En microbiologie, une bactérie est dite résistante quand elle supporte une concentration d'ATB notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce ou des individus de la même culture. Selon la définition clinique une bactérie résistante est une bactérie qui échappe au traitement ce qui peut se manifester par un échec clinique. La définition génétique correspond à la présence de gènes de résistance au sein de la bactérie, détectés par des techniques génétiques (**Guillot, 1989**).

2.3.2. Types de résistance

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques :

- **La résistance naturelle** : est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle a pour support génétique le chromosome bactérien.
- **La résistance acquise** : n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre.

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par la bactérie (qu'elle est habituellement sensible à l'ATB testé) par deux voies :

- Soit par des mutations dans le génome, on parlera alors de transmission verticale à la descendance.

- Soit par l'acquisition d'information génétique étrangère (elle a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons), en provenance d'autres bactéries, par transfert horizontal (Courvalin, 2008).

2.3.3.Mécanismes de résistance

Les bactéries ont développé quatre grands mécanismes de la résistance pour échapper à l'action des antibiotiques utilisés en thérapeutique (Louzniewski *et al.*, 2010) :

- Diminution de la perméabilité de la membrane bactérienne.
- Production d'enzymes inactivant les ATB.
- Un système d'efflux actif conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'ATB.
- Modification de la cible des antibiotiques.

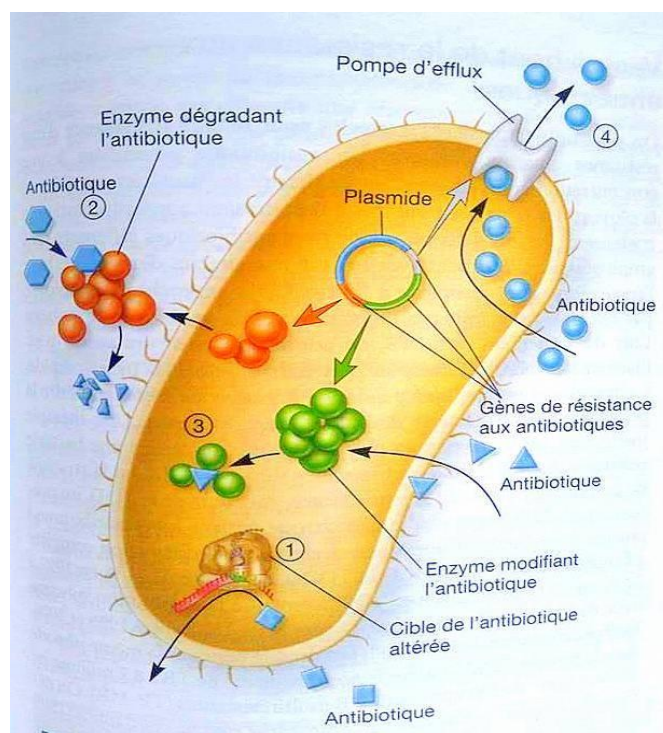


Figure 2.1 : Les mécanismes de résistance de la bactérie (Willey *et al.*, 2013).

2.4.Multirésistance

Il est d'usage de parler de multirésistance face à 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 face à "une bactérie sensible à moins de 3 familles d'antibiotiques" (Lozniewski *et al.*,2010). La multirésistance est une étape qui précède l'impasse thérapeutique (Gagnaire *et al.*,2015).

L'acquisition d'une BMR peut se faire de deux manières :

- soit de manière exogène à partir de l'environnement hospitalier du patient ou à partir d'autres patients porteurs dans une unité.
- soit de manière endogène par sélection au sein de la propre flore du patient d'une souche préexistante multirésistante (Cattoen, 2015).

Les principales bactéries multirésistantes sont :

2.4.1. *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM)

Résistante naturelle : Les *Staphylococcus aureus* sont naturellement résistants à l'aztréoname, l'acide nalidixique et la colistine (Courvelin *et al.*, 2006).

Résistance acquise : Deux mécanismes principaux de résistance (Daurela et Leclercq, 2008) sont décrits :

- la production d'une pénicillinase plasmidique qui inactive la pénicilline G et l'ampicilline.
- Métilino-résistance par modification de cible : La résistance à l'oxacilline est conférée par l'acquisition d'une cassette chromosomique SCCmec portant le gène mecA, qui code une protéine membranaire additionnelle (PLP2a) dont l'affinité pour les bêta-lactamines est très faible, entraînant une résistance croisée à toutes les molécules de cette famille (Haenni *et al.*, 2011).

2.4.2. *Pseudomonas aeruginosa* résistant à la ceftazidime et ou l'imipénème

Résistance naturelle : *P. aeruginosa* est caractérisé par la faible perméabilité de sa membrane externe, associée à la présence d'une céphalosporinase inductible et l'existence de pompes d'efflux actifs. Ces caractéristiques expliquent sa résistance à des β -lactamines comme les aminopénicillines, les céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et de 3^{ème} génération et même certains carbapénèmes (Mérensa *et al.*, 2012).

Résistance acquise :

- L'acquisition de résistance aux β -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa* résulte de mutations entraînant une surproduction de la céphalosporinase constitutive AmpC, une surexpression des systèmes d'efflux actif et une diminution de perméabilité membranaire.
- Production des BLSE qui sont des enzymes dont le spectre, plus ou moins large, inclut les C3G et les C4G (céfépime).
- Les carbapénémases sont des β -lactamases dont le spectre s'étend aux carbapénèmes (imipénème, méropénème et/ou doripénème).
- La résistance aux aminosides est liée à l'acquisition d'enzymes modificatrices ou de méthylases et parfois d'une surexpression de pompes d'efflux.

- La résistance aux fluoroquinolones est essentiellement liée à des mutations responsables d'une modification structurale de l'ADN gyrase. La surexpression des pompes d'efflux contribue également à cette résistance.

L'accumulation de ces différents mécanismes peut conduire à des souches *P. aeruginosa* multirésistants (Mérensa *et al.*, 2012).

2.4.3. *Acinetobacter baumannii* ceftazidime et ou imipénèm multirésistant

Résistance naturelle :

- Production des Céphalosporinases est à l'origine de la résistance aux aminopénicillines, à céfalotine et la céfoxitine chez l'espèce *A. baumannii*.
- Imperméabilité naturelle confère une résistance naturelle aux chloramphénicols et à triméthoprime.
- *A. baumannii* est également naturellement résistant à l'ertapénème, à la fosfomycine, au triméthoprime, à l'acide pipémidique, à la norfloxacin (mais pas à l'acide nalidixique), aux furanes et il est peu sensible à l'aztréonam (Decréa, 2012).

Résistance acquise :

- pénicillinases plasmidiques confèrent la résistance aux pénicillines à large spectre (ticarcilline, pipéracilline).
- résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) liée à la surexpression de céphalosporinases chromosomiques.
- La résistance aux carbapénèmes liée à l'association d'hyperproduction de céphalosporinase et d'imperméabilité.
- L'acquisition de BLSE plasmidique conférant une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception des carbapénèmes.
- la résistance aux aminosides est liée à la production d'enzymes inactivatrices (acétylases, adénylases et phosphotransférases) et à des mécanismes d'efflux impliquant des pompes.
- la résistance aux fluoroquinolones est due à des mutations au niveau des gènes de l'ADN gyrase et la topoisomérase, ainsi les systèmes d'efflux qui jouent un rôle important (Decréa, 2012).

2.4.4. Entérobactéries résistantes aux Céphalosporines de 3^{ème} Génération

Résistance naturelle : Le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux β-lactamines est la production de β-lactamase (Robin *et al.*, 2012).

Résistance acquis :

Résistances non enzymatiques

- Modification de la cible : modification des PLP par mutation
- Hyperproduction de système d'efflux : résistance au céfoxitine et C2G.

- Diminution de la perméabilité a été associée à une résistance aux carbapénèmes chez des souches hyperproductrices de céphalosporinases ou de BLSE (**Robin *et al.*, 2012**).

Résistance enzymatique

- β -lactamase à spectre étendu : Elles confèrent une résistance à toutes les pénicillines, aux céphalosporines de 1^{re} et 2^{eme} génération et l'aztréonam.
- L'hyperproduction d'un Céphalosporinase confère une résistance à au moins une C3G, à toutes les pénicillines ainsi qu'à toutes les céphalosporines de 2e génération (C2G) et aux céphamycines.
- Production de trois types de carbapénèmases appartient aux classes (A, B et D) d'Amber et confèrent une résistance au carbapénème.

Chapitre 3

Matériel et Méthodes

Notre stage de fin d'études a été effectué au niveau de l'unité de bactériologie du laboratoire de microbiologie au CHU Moustapha Bacha d'Alger et ce durant une période de 4 mois (1 Février au 31 Mai 2017). Durant cette période, nous avons réalisé une étude prospective qui a porté sur 136 prélèvements de pus du site opératoire (plaies suppuratives) des patients hospitalisés au niveau de différents services hospitaliers du CHU.

3.1 . Matériel

3.1.1. Prélèvements cliniques

Les prélèvements purulents au niveau du site opératoire ont été effectués par personnel soignant et acheminés au laboratoire de Microbiologie de l'hôpital. Ces échantillons englobent toutes suppurations qu'elles soient superficielles (plaie traumatique et chirurgicale) ou profondes (localisation abdominale, pelvienne, ostéo-articulaire).

Selon la localisation de pus, le prélèvement se fait à l'aide d'une seringue stérile pour les suppurations profondes ou bien avec un écouvillon dans le cas des suppurations superficielles.

Le prélèvement est reçu avec une fiche de renseignement clinique contenant le nom et le prénom du patient, l'âge, le sexe, le type d'intervention, le site de prélèvements, le service hospitalier et, éventuellement, les traitements antérieurs. Par la suite, il est enregistré dans un registre de laboratoire. Un numéro d'ordre interne au laboratoire lui est attribué (numéro inscrit sur la fiche de renseignements et sur le prélèvement).

3.1.2. Souches bactériennes de référence

Afin de valider les différents tests effectués, nous avons utilisé les souches de références citées dans le **Tableau 3.1**.

Tableau 3.1. Souches de référence utilisées dans l'étude

| Souches | Référence |
|--|---------------|
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> SASM | ATCC 25923 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> SARM | ATCC 43300 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapénèmase positif | ATCC BAA-1705 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapénèmase négatif | ATCC BAA-1706 |

SASM : *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méricilline ; SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline ;
ATCC : American Type Culture Collection

3.1.3. Huile essentielle de citronnelle

L'essence aromatique de citronnelle (*Cymbopogon citratus* DC.) provient de la société « Extral-Bio » de production des huiles essentielles, sise à Chiffa (Blida). Cette huile aromatique a été distillée à partir de la partie aérienne fraîche de la plante (tige et feuilles) qui est cultivée au niveau de ladite société, et ce au mois de Juin 2016. L'identification botanique de la plante a été faite antérieurement au niveau du conservatoire du Jardin d'Essais d'El-Hama (Alger). Le procédé d'extraction utilisé par la société est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle sous pression. Aussi, l'HE est certifiée « 100% naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. De plus, aucuns traitements organique (engrais) ou chimiques (pesticide) n'ont été utilisés durant la phase de culture. L'HE a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation, d'altération chimique ou de contamination microbienne.

La composition chimique de l'HE a été réalisée par analyse chromatographique et a révélé que le gèranial est le constituant majoritaire (28,9%), suivi par le néral (24,3%) et le myrcène (23.9%).

3.1.4. Réactifs et milieux de culture

Les réactifs, colorants et antibiotiques utilisés lors de notre étude sont cités en **Tableau 3.2**.

Tableau 3.2. Réactifs et milieux de culture utilisés.

| | |
|---------------------------|--|
| Colorants | Fuchsine ; Violet de Gentiane ; Solution de Lugol ; Bleu de méthylène |
| Réactifs | Réactif de Kovacs ; Réactif de Voges et Proskaver 1 et 2: VP1 et VP2 ; - Réactif de tryptophane désaminase TDA ; - Réactif pastorex et Réactif Staphaurex plus* ; Plasma de lapin reconstitué |
| Antibiotiques | Amoxicilline + Ac. clavulanique (AMC 10/20µg), Céfotaxime (CTX,30µg), Imipénème (IPM,10µg), Ertapénème (ERT,10µg), Gentamicine(GEN,30µg), Ciprofloxacine(CIP, 5µg), Cotrimoxazole(SXT,1.25/23. 75 µg), Ticarcilline (TIC,75µg), Pipéracilline (PIP,100µg), Céfotaxime (CAZ, 30µg), Tobramycine (TOB, 10µg), Lévofloxacine(LVX,5µg), Colistine (COL,10µg), Tobramycine(TOB,10µg), Oxacilline (OXA,1µg), Pénicilline (PEN ,10µl), Erythromycine(ERY,15µg), Clindamycine (CLI,2µg), Pristinamycine(PRI,15µg), Vancomycine(VAN,30µg), Tétracycline (TCY ,30µg), Acide fusidique (FUS,10µg), Amikacine (AMK,30µg), Ofloxacine (OFX, 5µg), Ampicilline (AMP,10µg), Gentamicine Haut niveau (GEN,120µg), Streptomycine Haut niveau (STH,300µg), Teicoplanine (TEC, 30µg), Lévofloxacine (LVX, 5µg). |
| Milieux de culture | Gélose Nutritive ; Gélose au Sang Cuit ; Gélose au Sang Frais ; Milieu de Chapman ; Gélose Hektoen ; Milieu de Mueller-Hinton |
| Autres | Alcool à 95% ; Eau oxygénée H ₂ O ₂ ; Eau physiologiques à 5% ; L'huile de vaseline ; L'huile à l'immersion stérile ; Eau de javel ; - Galerie Api 20 ^E |

3.2. Méthodes

3.2.1. Examen bactériologique du pus

3.2.1.1. Examen macroscopique du prélèvement

L'examen macroscopique repose sur l'observation de la consistance, la couleur, l'odeur et le caractère éventuellement sanglant (hémolyse) du pus.

3.2.1.2. Coloration simple au bleu de méthylène

Principe : La coloration simple au bleu de méthylène, consiste à évaluer l'abondance et la nature des leucocytes (lymphocytes, polynucléaires), la forme des bactéries (cocci, bacilles) et leur disposition (chaînettes, diplocoques, grappe) ainsi la présence des levures, des hématies, des cellules épithéliales (**Guezlane-Tebibel *et al.*, 2011**).

Technique :

- Déposer sur une lame porte objet une goutte de l'eau physiologique stérile puis mélanger avec le prélèvement de pus.
- Répandre quelques gouttes de colorant sur le frottis et laisser en contact pendant 20 minutes.
- Laver abondamment à l'eau distillée.
- Sécher dans la flamme d'un bec bunsen et examiner au microscope optique à l'objectif $\times 100$ à immersion (**Dellaras, 2007**).

3.2.1.3. Mise en culture

Principe : Pour les examens microscopique le prélèvement est ensemencé sur des milieux gélosés solides en boîte de Pétri et dans un milieu liquide en tube, afin de déterminer les caractères cultureux de ces bactéries (**Dellaras, 2007**). Ceci permet par la suite une identification bactérienne ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure (**Denis *et al.*, 2007**).

Technique :

- **Culture dans un milieu d'enrichissement**, le Bouillon Glucosé Tamponné (BGT) : tremper l'écouvillon de prélèvement dans le BGT, (ou déposer une goutte pour les prélèvements à la seringue), puis l'incuber à 37°C pendant 24h. Après 24h, observer à l'œil nu les cultures, et noter les trois caractères cultureux :
 - Turbidité, trouble plus au moins intense du milieu.
 - Formation d'une pellicule, masse de cellules flottant à la surface et formant un voile
 - Dépôt, sédiment au fond du tube plus au moins abondant, coloré ou non.
- **Culture sur milieu gélosé :**

- Ensemencer les boîtes de gélose (Gélose sans frais GSF, Gélose sang cuit GSC, Gélose Hektoen, Gélose Chapman) en effectuant un écouvillonnage au niveau de premier cadran puis poursuivre l'ensemencement par la technique des quatre cadrans à l'aide d'une pipette pasteur.
- Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 à 48 h à 37°C en atmosphère ambiante pour les milieux Chapman et Hektoen et à 35.5°C à 5% de CO₂ pour GSF et GSC.
- - Après l'incubation, observer à l'œil nu les colonies bactériennes développées sur les milieux gélosés en boîte de Pétri et noter les caractères culturels.

3.2.1.4. Examen microscopique à l'état frais

Principe : Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de groupement et de leur mobilité éventuelle (**Dellaras, 2007**).

Technique

- Déposer, sur une lame stérile une goutte de l'eau physiologique stérile puis apporter et dissocier dans l'eau une colonie bactérienne bien isolée.
- Recouvrir d'une lamelle et observer au microscope optique à objectif × 40.

3.2.1.5. Coloration de Gram

Principe : La coloration de Gram repose sur les caractéristiques de la paroi bactérienne. Elle permet de cataloguer les bactéries en deux grands groupes : les Gram-positifs et les Gram-négatifs (**Guezlane-Tebibel et al., 2011**).

Technique: Après fixation du frottis par passage de la lame dans la flamme du bec bunsen.

- Recouvrir la lame par un 1^{er} colorant, le violet de gentiane pendant une minute. Le violet de gentiane est un colorant puissant va traverser les parois et les membranes des bactéries pour se fixer dans le cytoplasme. A cette étape toutes les cellules sont colorées en violet.
- Rincer à l'eau distillée.
- Ensuite, traiter la lame au Lugol et laisser agir pendant 30 secondes. Le Lugol sert de mordant: celui-ci va renforcer le violet de gentiane contenu dans le cytoplasme bactérien.
- Rincer à l'eau distillée.
- Chasser en suite le violet de gentiane avec une solution d'alcool à 95°pendant 15 secondes. Cette étape est cruciale car elle détermine quelle bactérie est Gram+ et quelle est Gram- :
 - ✓ Les bactéries Gram + possèdent une paroi riche en peptidoglycane, composant qui empêche l'alcool d'emporter le violet de gentiane, celui-ci reste dans le cytoplasme. Les bactéries n'étant pas décolorées.

- ✓ Les bactéries Gram- possèdent une paroi pauvre en peptidoglycane, composant qui ne l'aide pas l'alcool d'emporter le violet de gentiane, celui-ci sort du cytoplasme. Les bactéries sont donc décolorées.
- Rincer la lame rapidement, puis la plonger dans un deuxième colorant de contraste, la Fushine. Ce colorant traverse toutes les parois et membranes et va colorer en rose toutes les bactéries qui ont été décolorées durant l'étape précédente. les bactéries Gram + étant colorées en violet n'apparaîtront pas en rose.
- Rincer et sécher la lame, puis observer au microscope optique à l'objectif $\times 100$, avec l'huile d'immersion.
 - ✓ Les bactéries à Gram + restent toujours colorées en violet
 - ✓ Les bactéries Gram – apparaîtront en rose (**Guezlane-Tebibel *et al.*, 2011**).

3.2.1.6. Identification des bactéries

3.2.1.6.1. Identification des cocci à Gram positif

- Test d'orientation : test de catalase

Principe : La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée en eau et en oxygène qui se dégage (**Delarras, 2007**).

Technique : Prendre une lame porte objet propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu la culture obtenue sur gélose.

Lecture : Le dégagement de gaz (O_2) indique la présence de la catalase: catalase +.

- Identification des staphylococcus

■ Recherche de la coagulase

Principe : La coagulase, enzyme capable de coaguler le plasma sanguin a été mis en évidence chez certains staphylocoques. La présence d'une coagulase est considérée comme étant l'élément principal de détermination du caractère pathogène des staphylocoques.

Staphylococcus aureus produit deux types de coagulase:

- ✓ **La coagulase libre extracellulaire** qui réagit avec la prothrombine du plasma.
 - ✓ **La coagulase liée** localisée sur la paroi bactérienne qui réagit avec les fibrinogènes plasmatiques pour produire un coagulum.
- **Recherche de la coagulase libre**
- Reprendre le lyophilisat de plasma de lapin en y ajoutant aseptiquement 6 ml d'eau distillée stérile.

- Agiter le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse.
- Dans un tube stérile introduire successivement: 0.3 ml de plasma de lapin reconstitué + quelques colonies du staphylocoque à tester. Bien homogénéiser.
- Dans un autre tube stérile, préparer un témoin positif en introduisant quelques colonies du l'ATCC *S. aureus*. Incuber les tubes à 37°C pendant 2h, 4h et 24 h

Lecture : La lecture est considérée comme positive lorsque le coagulum occupe les $\frac{3}{4}$ du volume initialement mis en jeu (**Figure 3.1**).

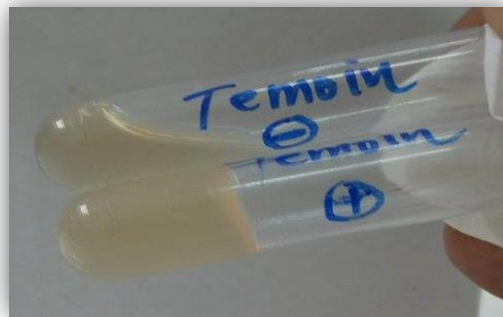


Figure 3.1: Test coagulase libre

➤ Recherche de la coagulase liée : Test de Staphaurex

Staphaurex est un test rapide d'agglutination latex pour l'identification des staphylococcus possédant le facteur d'agglutination, la protéine A et/ou les antigènes de surface spécifiques du *Staphylococcus aureus* (Remel, 2012).

Technique

- Placer une goutte de latex test sur un cercle d'une carte de réaction et 1 goutte de latex contrôle sur un autre cercle.
- A l'aide d'un bâtonnet d'homogénéisation, prélever une quantité suffisante de colonies bien isolées, pour couvrir l'extrémité du bâtonnet.
- Emulsionner l'échantillon de culture dans la goutte de latex test en frottant avec l'extrémité du bâtonnet. Etaler le latex sur environ la moitié de la surface du cercle.

Lecture :

Résultat positif : Une agglutination du latex test accompagnée d'une absence d'agglutination du latex contrôle indique la présence de coagulase, de protéine A ou d'antigènes communs de *S. aureus* dans la culture testée.

Résultat négatif : Une absence d'agglutination dans les deux réactifs signifie que la culture analysée n'est vraisemblablement pas de l'espèce *S. aureus* (**Figure 3.2**).

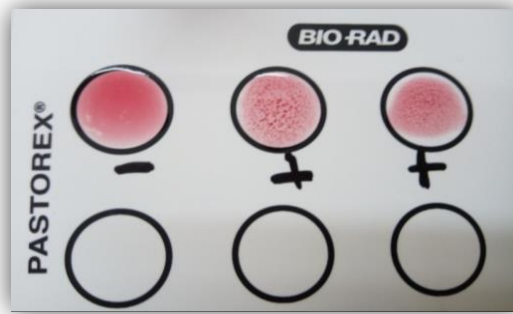


Figure 3.2 : Test Staphaurex

- **Identification des streptococcus**

a) Recherche du pouvoir hémolytique

Les streptocoques peuvent être classés selon l'hémolyse qu'ils produisent sur gélose au sang en:

- Streptocoques β hémolytiques, qui produisent une hémolyse complète des hématies avec éclaircissement de la gélose autour de la colonie.
- Streptocoques α hémolytiques qui produisent une hémolyse incomplète avec une coloration verdâtre autour des colonies
- Streptocoques non hémolytiques ne produisent aucune modification de la gélose autour des colonies (**Denis *et al.*, 2007**).

b) Test d'agglutination par Pastorex Streptococcus : Test de groupage

Principe : Test d'agglutination de particules de latex pour l'identification des streptococcus des groupes A, B, C, D, F et G. Lancefield a montré que la majorité des streptocoques pathogènes possédaient des antigènes spécifiques polysaccharidiques permettant leur classification en groupes. Ce test utilise une méthode simple d'extraction enzymatique de l'antigène spécifique du groupe contenu dans la paroi. L'antigène extrait est identifié par des particules de latex sensibilisées par un anticorps anti – antigène du groupe de streptocoques (**Biomérieux, 2016**).

Technique :

- Dans un tube de 10 mL de l'eau physiologique, ajouter 0.4 mL d'enzyme d'extraction.
- Prélever 2 à 5 colonies suspectes à l'aide d'une pipette pasteur et les émulsionner dans la solution enzymatique. Incuber 10 minutes à 37° C.
- Retirer les tubes et les laisser refroidir à température ambiante. L'extrait est alors prêt à être utilisé. Déposer une goutte de chaque réactif au latex sur les cercles de la carte de réaction.
- Ajouter une goutte de l'extrait sur chacun des six cercles avec une pipette Pasteur.
- Imprimer un mouvement de rotation douce à la carte. L'agglutination sur un ou plusieurs cercles doit normalement apparaître en 30 secondes.

Lecture : La réaction est positive si une agglutination apparaît avec un des réactifs ou si celle-ci est plus importante avec un des réactifs qu'avec les cinq autres. Si aucune agglutination n'apparaît, la réaction est négative.

3.2.1.6.2. Identification des bacilles à gram négatif

- Tests d'orientation : Test d'oxydase

Principe : L'oxydase ou Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes (**Dellaras, 2007**).

Technique :

- Sur un morceau du papier filtre, déposer une goutte de réactive d'oxydase.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur stérile une colonie isolée et l'écraser sur le papier.

Lecture : Une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le papier ou en quelques secondes : test oxydase +.

- Identification biochimique des entérobactéries par API 20E

Principe : API 20E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Cette technique consiste à réaliser 20 tests avec la galerie, puis interpréter les résultats à l'aide de la base de données API 20E. La galerie se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'enzymes ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui réhydrate les substrats. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par un changement spontané ou révélé par l'addition de réactifs. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré (**BioMérieux, 2009**).

Technique

- 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, puis placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Prélever quelques colonies et préparer une suspension bactérienne dans l'eau distillée stérile.
- Remplir les tubes et cupules des tests CIT, VIP et GEL avec la suspension bactérienne et uniquement les tubes des autres tests.
- Réaliser une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.
- Refermer la galerie et l'incuber à 37°C pendant 24H. - Après incubation, noter sur la fiche de résultat, toutes les réactions spontanées.

- La révélation des trois TDA, VP et indole est faite par l'ajout des réactifs nécessaires (TDA, VP1, VP2 et KOVACS).
- L'identification est obtenue à l'aide d'un code formulé après la lecture de la galerie.

Lecture : La lecture des galeries API se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique : les tests seront regroupés en groupe de 3 prennent les chiffres (1, 2 ou 4) pour un test positive et le chiffre 0 pour un test négative. On obtient un nombre de 7 chiffres (profil numérique). L'identification est alors obtenue en comparant avec le catalogue analytique.

3.2.1.7. Tests de sensibilité aux antibiotiques

3.2.1.7.1. Antibiogramme

Principe : L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton selon les normes et les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (CASFM, 2014). L'antibiogramme repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un antibiotique dans un milieu gélosé à partir d'un support papier pré-imprégné (Denis *et al.*, 2007).

Technique : Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% .
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MF.

Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche de haut en bas en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois en tournant la boîte 60 ° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Application des disques d'antibiotique :

- Appliquer les disques sur une gélose MH écouvillonnée de la suspension de la souche.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologique stérile et ne pas déplacer les disques après application.
- Incubées les boîtes pendant 24h à 37°C.

Lecture :

- Mesurer le diamètre des zones d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle graduée.
- Comparer les résultats obtenus aux valeurs critiques "standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 7^{ème} édition 2014 " (**Annexe 3, Tableaux 1,2,3,4,5 et 6**).
- Classer les bactéries dans l'une des catégories S sensible, I intermédiaire et R résistant.

3.2.1.7.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

- Technique E-Test

Principe : C'est une technique de détermination de la CMI, validée pour les bactéries non exigeantes et pour un certain nombre de bactéries exigeantes comme *Streptococcus pneumoniae* (**Benslimani et Benamrouche, 2011**)

Technique

- Sur une boîte de Gélose MH écouvillonnée de la suspension de la souche à tester (de la même manière que l'antibiogramme), déposer la bandelette à l'aide d'une pince stérile, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées. Eviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée. Laisser la boîte couvercle en haut pendant 15 mn au plus.
- Incuber la boîte à 35°C pendant 24h.

Lecture

- La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée.
- Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test (**Figure 3.3**). Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

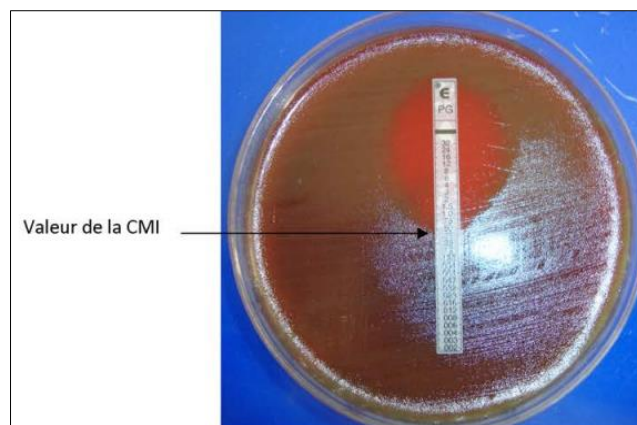


Figure 3.3. CMI de la pénicilline G d'une souche *S. pneumoniae* (E-test)

- **Technique automatisée par MicroScan® WalkAway96 plus**

Principe : L'automate MicroScan® WalkAway 96 plus (**Figure 3.4**) permet la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par micro-dilution, basée sur la croissance réelle des bactéries dans chaque puits d'antibiotique, suivant les normes recommandées par la CLSI (**Benamrouche, 2014**).

Mode opératoire

- Introduire toutes les données concernant le prélèvement et la souche à étudier, dans le logiciel Lab-Pro. Un code barre est attribué à chaque souche.
- Prélever 1 à 2 colonies bien isolées et inoculer dans la solution d'inoculation, mélanger vigoureusement (8 à 10 fois) afin de bien l'homogénéiser, puis vider dans le bac d'inoculation.
- A l'aide de l'appareil Renok, transférer le milieu d'inoculation à partir du bac vers la plaque
- Incuber la plaque dans le Walk-Away pendant 24h à 48h

Lecture : Après l'incubation, Le résultat est obtenu par l'impression automatique d'un rapport comprend le profil de résistance ou de sensibilité aux antibiotiques testés de l'espèce testée.



Figure 3.4: Micro Scan® Walk Away 96 plus (à gauche), plaque Walk Away 96 plus (à droite)

3.2.2. Tests complémentaires

Pour certains antibiotiques ou familles d'antibiotiques, l'antibiogramme standard n'est pas suffisant et, par conséquent, des tests complémentaires doivent être pratiqués avant une interprétation définitive (**Ammari et Ouar-Korichi, 2014**).

3.2.2.1. Recherche de la résistance de *Staphylococcus aureus* à l'oxacilline :

Principe : Pour *S. aureus*, le disque de céfoxitine est comparable à celui de l'oxacilline pour détecter la résistance à l'oxacilline par production de PLP2a (gène *mecA*<6) ; cependant, le disque de céfoxitine est plus facile à lire et donc c'est la méthode préférée (**Ammari et Ouar- Korichi, 2014**).

Technique :

- Déposer un disque de FOX sur une gélose MH écouvillonnée de la suspension de la souche à tester.
- Incuber à 35° C pendant 24h.

Lecture : Mesurer les diamètres d'inhibition. Pour les souches (OXA S), le diamètre d'inhibition doit être > 22 mm alors que pour les souches (OXA R) il doit être < 21 mm.

Remarque : A fin de valider les résultats, utiliser un contrôle de qualité à l'aide d'une souche *S. aureus* ATCC 43300 *mecA*(+) (diamètre d'inhibition FOX \leq 21 mm) et *S. aureus* ATCC 25923 *mecA* (+) (diamètre d'inhibition FOX 23 à 29 mm)

3.2.2.2. Recherche de la β -Lactamase à Spectre Elargi (BLSE) chez les entérobactéries

On recherchera une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes : céfotaxime (CTX \leq 27mm), ceftazidime (CAZ \leq 22mm), ceftriaxone (CRO \leq 25mm) .

Les méthodes de détection de la BLSE sont :

3.2.2.2.1. Test de synergie

Principe : Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Amler) sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamase (acide clavulanique) (Ammari et Ouar-Korichi, 2014).

Technique : Le test de synergie doit être fait dans les mêmes conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'AMC à 30 mm centre à centre d'un disque de : CAZ, CTX ou CRO et ATM.

Lecture : La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques : - AMC et CTX - AMC et CAZ - AMC et ATM.

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

Elle peut être due à :

- La synthèse d'une BLSE de type CMT (Complexe Mutants TEM)
- L'association de plusieurs mécanismes : BLSE + Céphalosporinase hyperproduite.

Dans ce cas, la recherche de CMT se fera en rapprochant les disques CTX- AMC de 20mm et 25mm au lieu de 30mm.

3.2.2.2.2. Test de confirmation ou technique du double disque

Ce test devra être fait systématiquement devant :

- L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G

- La présence d'une résistance aux molécules suivantes : ampicilline, ticarcilline, cèfazoline, avec un diamètre < 6mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition (**Ammari et Ouar-Korichi, 2014**).

Technique

- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) a une distance de 30 mm (centre à centre). Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse), la boîte sera déposée couvercle vers le haut.
- Après 1h d'incubation, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX ou CRO.
- Incuber la boîte 18h à 35°C.

Lecture

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G appliqué après la diffusion du disque AMC est ≥ 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G (**Figure 3.5**).

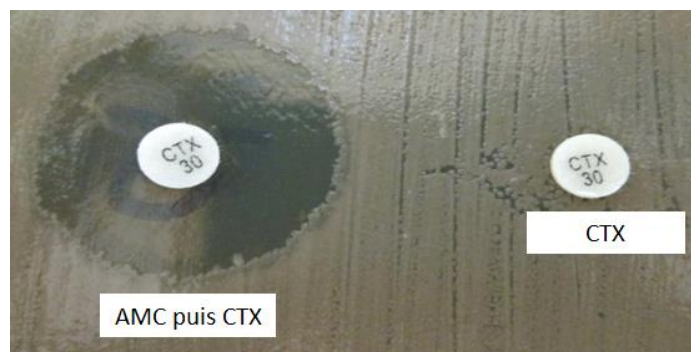


Figure 3.5 : Test de double disque positif

3.2.2.3 Recherche et approche phénotypique des carbapénèmases chez les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*

Signes d'appel

- Diamètre d'inhibition pour mérépénème et imipénème < 22 mm
- Diamètre d'inhibition pour ertapénème < 21 mm
- Présence de colonies discrètes dans la zone d'inhibition des carbapénèmes
- CMI (E-test) pour les carbapénèmes ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$
- CMI (E-test) pour ertapénème > 0.5 $\mu\text{g/ml}$

Et habituellement

- Résistance aux C3G (ceftazidime, céfotaxime, ceftriaxone)

3.2.2.3.1 . Carbapénèmase de la classe A d'Ambler : Test de synergie entre AMC-IMP

Principe : Ce test permet la détection des carbapénèmases de la classe A d'Ambler qui sont inhibées par l'acide clavulanique. Une image de synergie est recherchée entre l'acide clavulanique et l'imipénème (Ammari et Ouar-Korichi, 2014).

Technique

- Déposer les disques AMC et IMP l'un à côté de l'autre sur une gélose MH écouvillonnée de la suspension de la souche à tester. Incuber 18 à 24h à 35°C

Lecture : En présence d'une image de synergie entre le disque d'IMP et celui de l'AMC, le résultat est positif.

3.2.2.3.2. Carbapénèmase de classe B d'Ambler : Métallo-carbapénèmase

Il s'agit d'enzymes dépendantes du Zn^{++} et inhibées par l'EDTA. Ces enzymes confèrent une résistance aux pénicillines (la sensibilité à la piperacilline est variable selon le type d'enzyme), aux carbapénèmes, aux C3G et aux céphamycines ; seul l'aztréonam n'est pas inactivé (Ammari et Ouar-Korichi, 2014). Elles sont détectées par :

- Inhibition par l'EDTA :

Déposer un disque d'IPM +EDTA (IM+ED) à côté d'un disque d'imipénème.

Lecture : L'EDTA inhibe l'enzyme entraînant une augmentation du diamètre d'inhibition du disque IM+ED par rapport au disque IPM seul.

- **Test de Hodge modifié :** Ce test est à 100% de sensibilité et de spécificité pour détecter les carbapénèmases de la classe B d'Ambler.

Technique

- Préparer une suspension d'*E. coli* ATCC 25922 à 0.5MF dans 5 ml d'eau physiologique.
- Diluer cet inoculum au $1/10^{\text{ème}}$ (0,5 ml de suspension de 0,5 MF + 4,5 ml d'eau physiologique).
- Ensemencer une gélose MH par écouvillonnage, laisser sécher 3 à 5 mn.
- Déposer au centre un disque d'ertapénème 10 µg.
- A partir du disque, faire une inoculation en trait avec la souche à tester et avec deux souches de référence (*K.pneumoniae* ATCC BAA-1705 : carbapénèmase positive) et *K.pneumoniae* ATCC BAA-1706 : carbapénèmase négative). Incuber à 35°C pendant 24 h .

Lecture : Après l'incubation, les souches productrices de carbapénèmase de type B vont pousser jusqu'au contact du disque d'Ertapénème ou Méropinème.

- Le test est positif quand *E. coli* ATCC 25922 au contact d'une souche productrice de carbapénémase de type B, va pénétrer et croître dans le diamètre d'inhibition en donnant un aspect d'invagination de la culture.
- Le test est négatif quand il n'y a aucune modification du diamètre d'inhibition d'*E. coli* ATCC 25922 au contact des souches à étudier.

3.2.3. Evaluation du pouvoir antibactérienne de l'huile essentielle *in vitro*

L'évaluation des propriétés antimicrobiennes des molécules terpéniques et des produits naturels est basée sur l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'HE. A cet effet, nous avons utilisé deux méthodes qualitatives (aromatogramme et microatmosphère) et une technique quantitative (détermination des concentrations minimales inhibitrices) lors de notre screening.

3.2.3.1. Technique de diffusion en milieu solide (Aromatogramme)

Cette technique a été décrites par plusieurs auteurs (**Zaika, 1989 ; Tyagi et Malik., 2011**). C'est la méthode que nous avons adoptés pour évaluer, dans une première étape, le pouvoir antibactérien de l'essence de citronnelle sur la croissance des BMR (**Figure 3.6**). Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie, l'antibiogramme.

Au cours de cette méthode, nous avons utilisons des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne) qui ont été imprégnés d'une certaine quantité d'HE (20 et 40 µL d'HE par disque) afin d'apprécier l'effet « dose-dépendant ». Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. L'étude du pouvoir antimicrobien est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des disques d'ATB par des extraits aromatiques.

Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37°C pendant 24h pour les bactéries). La phase liquide de l'essence aromatique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les espèces BMR vont se développer sur toute la surface gélosée sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence suffisante qui inhibe leur croissance. Après incubation et à la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en millimètres (mm). Ainsi, la souche microbienne sera classée comme étant sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis de l'HE.

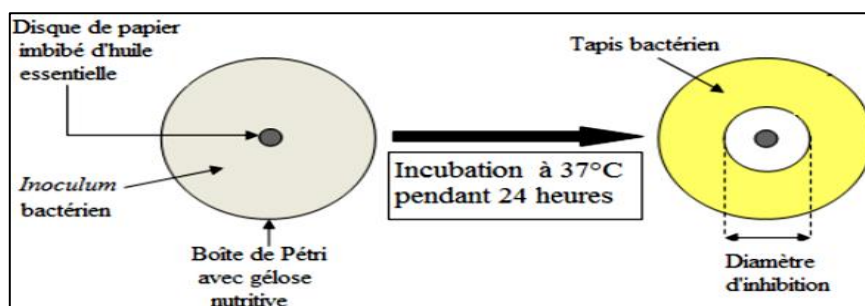


Figure 3.6: Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle déterminé par diffusion en milieu solide (aromatogramme) (Guinoiseau, 2010).

3.2.3.2. Technique de diffusion en phase vapeur (Microatmosphère)

Cette technique a été utilisée afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur de la phase volatile de l'HE (Figure 3.7). Cette méthode est rarement explorée ; peu d'auteurs ont évalué les propriétés inhibitrices de la phase vapeur des molécules terpéniques (Tyagi et Malik, 2011 ; Boukhatem *et al.*, 2014).

Le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 2 quantités croissantes au disque. En premier lieu, 20 μ L d'huile a été déposée sur un disque de papier filtre de 2 cm de diamètre. Dans le second essai, un disque de 4 cm a été imprégné par 40 μ L d'huile. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'huile à imprégner afin d'obtenir son bon étalement sur le couvercle et, par conséquent, une meilleure diffusion et évaporation. La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été réalisés de la même manière que la méthode de diffusion en milieu gélosé (Aromatogramme). La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à 37°C pendant 24 h. Il se produit une évaporation des substances volatiles qui, en contact avec les BMR ensemencés préalablement sur le milieu gélosé, va inhiber leur croissance. Après incubation et à la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire.

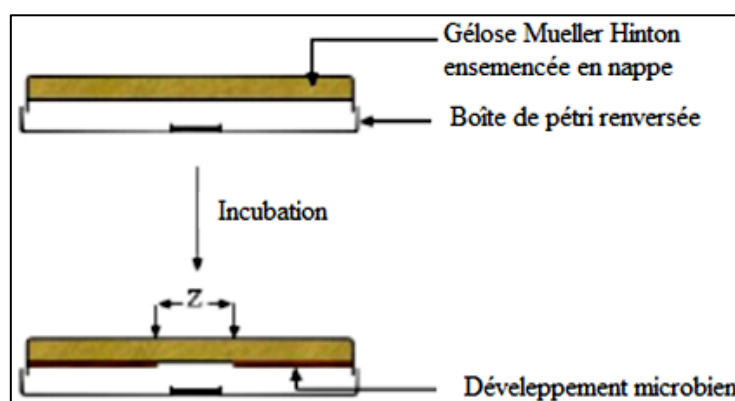


Figure 3.7 : Pouvoir antimicrobien de l'huile déterminé par microatmosphère (Bousbia, 2004).

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

3.2.3.3. Technique de dilution en milieu gélosé (macrodilution)

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000) pour évaluer la sensibilité des bactéries micro-aérophiles aux agents antibactériens. Elle consiste à ensemercer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE dispersée de façon homogène et stable dans le milieu de culture. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance bactérienne.

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

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

Une série de dilution de l'HE est préparée avec un intervalle de concentrations qui varie entre 2% à 0,0078% pour les BMR. L'ensemencement de chaque milieu sera fait par touche à l'aide d'un écouvillon stérile. Les boîtes Pétri seront incubées à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats se fait visuellement en observant s'il y a l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin (exempte d'HE). La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Le résultat sera exprimé en % (v/v).

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

Chapitre 4

Résultats et discussion

Notre étude s'est axée sur l'examen cytbactériologique des prélèvements purulents provenant de deux sites opératoires de différents services hospitaliers du CHU Mustapha Bacha (Alger). Aussi, les bactéries multi-résistantes ont été isolées et identifiées afin de déterminer leur profil de résistance aussi bien aux antibiotiques qu'à l'huile essentielle de citronnelle.

4.1. Répartition des prélèvements selon leur nature

Durant notre stage, nous avons effectué une analyse bactériologique de 136 prélèvements purulents provenant de patients post-opérés au niveau de différents services chirurgicaux et cliniques du CHU Mustapha Bacha.

Parmi les 136 prélèvements de pus obtenus, 97 prélèvements sont des suppurations superficielles avec un taux de 71.32% et 39 prélèvements sont des suppurations profondes avec un taux de 28.68% (**Figure 4.1**).

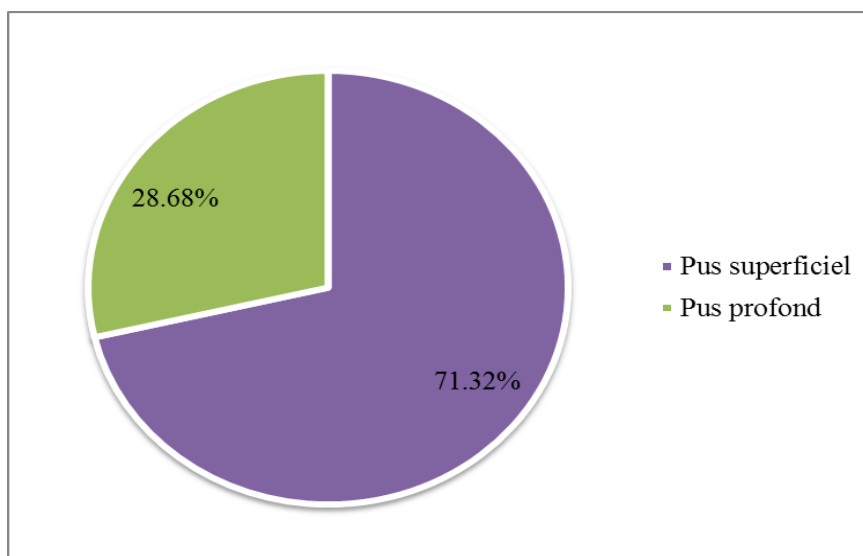


Figure 4.1 : Répartition des prélèvements selon leur type (n=136)

Cliniquement, le diagnostic d'infection repose surtout sur la présence d'un écoulement purulent au niveau du site chirurgical. Ceci peut être associé à un œdème, un érythème, une déhiscence de la plaie ou à la formation d'abcès. Lors de toute suspicion d'infection, des prélèvements doivent être réalisés pour examen microscopique direct, cultures et antibiogramme. Il est très important que cet envoi soit accompagné de bons renseignements cliniques notamment sur le niveau et le type de

prélèvement : la présence de bactéries isolées à partir d'un prélèvement purulents superficiels d'une plaie n'a pas du tout la même signification clinique qu'un prélèvement profond ou un écoulement purulent franc (**Dadé Ben Sidi et Hadara, 2008**). Au titre d'exemple, les staphylocoques à coagulase négative et les corynébactries sont considérés comme des contaminants dans les pus superficiels car ils font partie de la flore cutanée alors que leur isolement dans des pus profonds peut révéler une infection.

4.2. Répartition des prélèvements selon la culture

L'examen cyto-bactériologique a révélé la présence de germes dans 77 cas (55 superficiels, 22 profonds), avec des taux de 56.62% et 38.23%, respectivement et 7 cultures contaminées (flore poly-microbienne) avec une fréquence de 5.15 % (**Figure 4.2**).

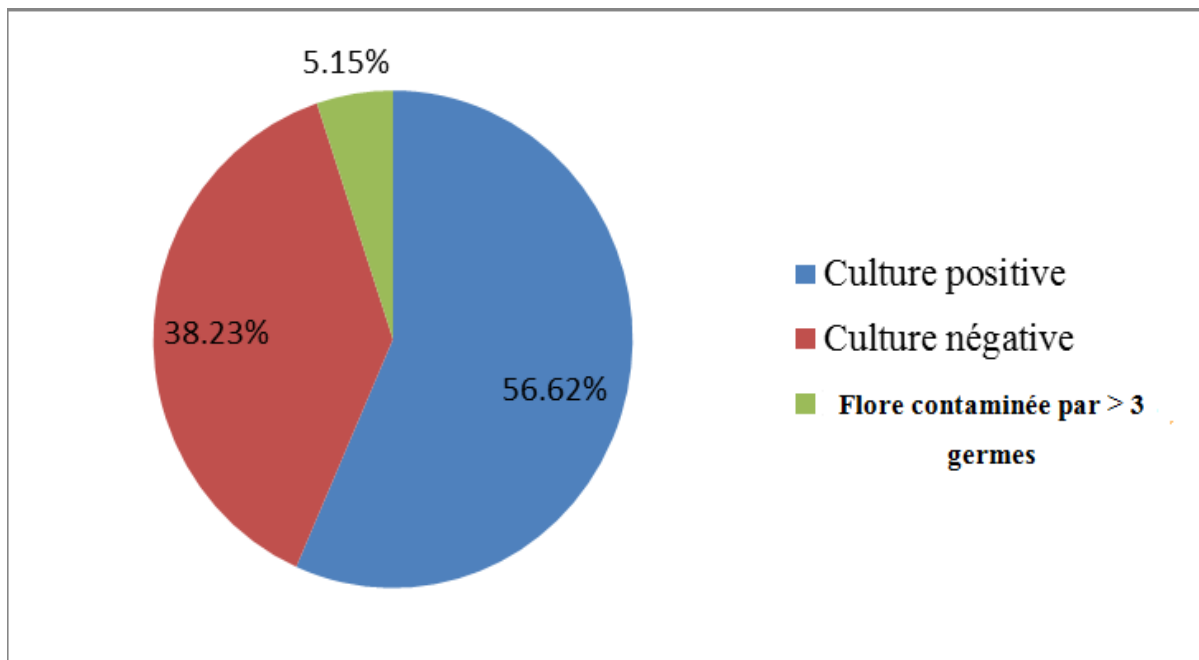


Figure 4.2 : Répartition des prélèvements selon les cultures obtenues (n=136).

Selon **Troillet et Zanetti (2002)**, la contamination bactérienne de la plaie est une étape obligatoire pour la survenue d'une ISO. Elle est le plus souvent endogène, la source de la bactérie étant dans ce cas la flore cutanée ou muqueuse du patient bien qu'une source exogène puisse être en cause (l'air de la salle d'opération, le personnel ou les instruments). Bien que les mesures d'asepsie soient efficaces, elles ne peuvent cependant pas éliminer toute contamination. Ceci provient entre autres du fait qu'environ 20% des bactéries cutanées colonisent en profondeur des annexes telles que les follicules pileux, et peuvent ainsi résister à une désinfection de surface.

La présence d'un écoulement stérile à la culture peut être expliquée par la présence des germes anaérobies stricts qui nécessitent des milieux et des conditions d'incubation spécifiques, où par la

décapitation des germes par une antibiothérapie préalable (Schadé, 2001), comme il peut s'agir d'un examen de contrôle que le médecin demande pour mieux établir le diagnostic.

Les cultures qui présentent 4 types de germes (ou plus) sont considérées comme des cultures contaminées par une flore polymicrobienne. La contamination peut être expliquée par le non-respect des conditions idéales de prélèvement et de transport des échantillons ou par une mauvaise manipulation au niveau de laboratoire.

4.3. Répartition des prélèvements positifs selon le sexe

La répartition des patients par sexe, fait apparaître que le taux des femmes (55.84%) se rapproche au taux des hommes(44.16%), avec un sexe ratio Femme/homme 1.26 (Figure 4.3).

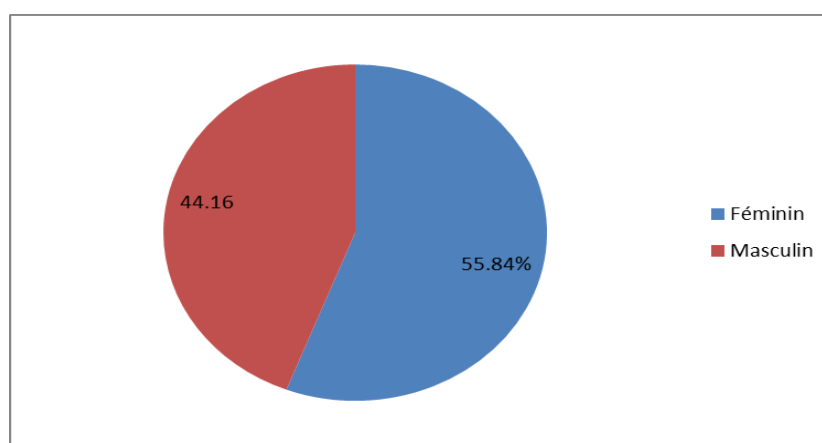


Figure 4.3 : Répartition des prélèvements selon le sexe (n= 77).

4.4. Répartition des prélèvements positifs par tranches d'âge

Durant notre étude, nous avons réparti les cas positifs en tranches d'âge. Eu égard des résultats obtenus, il apparait clairement que les adultes sont les plus touchés par l'infection du site opératoire.

(Tableau 4.1)

Tableau 4.1: Répartition des prélèvements positifs selon l'âge (n= 77)

| Tranche d'âge | Effectif | Pourcentage (%) |
|--------------------------|----------|-----------------|
| < 1 ans | 7 | 9.09 |
| 1- 9 ans | 4 | 5.19 |
| 10- 19 ans | 2 | 2.6 |
| 20- 49 ans | 14 | 18.18 |
| 50 – 99 ans | 13 | 16.88 |
| Adulte d'âge indéterminé | 37 | 48.05 |
| Total | 77 | 100 |

Ces taux élevés sont associés à la comorbidité (diabète, HTA, immunodépression, insuffisance rénale ...) présente souvent chez des adultes.

4.5. Répartition des prélèvements positifs par service hospitaliers

Les prélèvements purulents des plaies opératoires reçus au laboratoire de microbiologie du CHU Mustapha proviennent de différents services hospitaliers. Au cours de notre étude, nous avons réparti les prélèvements positifs par service. Nous avons noté que le taux le plus élevé des ISO a été retrouvé dans les services d'orthopédie-traumatologie avec un taux de 24.68%, suivi par la clinique de chirurgie infantile (CCI) et chirurgie générale, avec des taux de 12.99% et 11.69 % respectivement. La fréquence la plus faible a été enregistrée au niveau des services d'oncologie, ORL, dermatologie, diabétologie et pneumologie avec un même taux de 1.30%. Aussi, nous avons noté un taux de 7.79% pour les patients consultés à titre externe (patients sortants mais hospitalisés auparavant) (**Figure 4.4**).

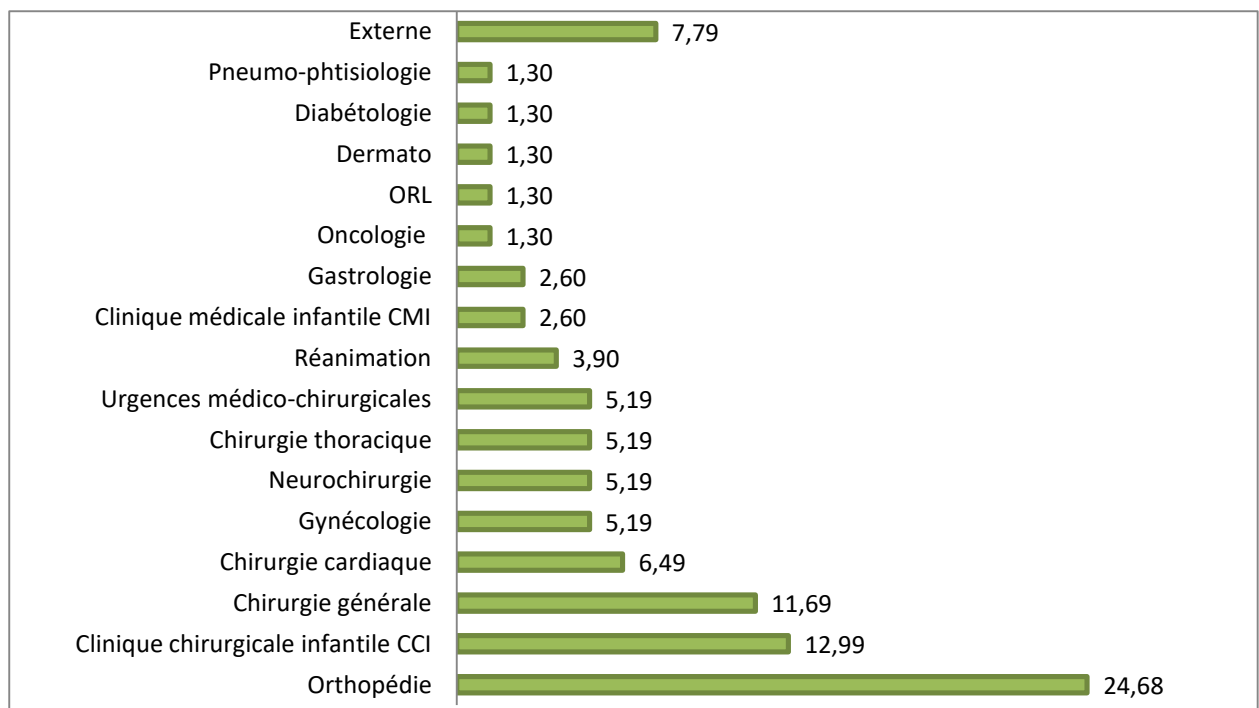


Figure 4.4 : Répartition de prélèvements positifs par service hospitalier (n=77).

Il semblerait que les services où sont effectués des actes chirurgicaux invasifs, nécessitant l'utilisation d'importantes ouvertures et le pose de matériels prothétiques tels que les services d'orthopédie, CCI et chirurgie générale qui ont un risque élevé d'être le siège de développement de germes potentiellement pathogènes. Ce risque est d'autant exacerbé, si le patient est à un âge

critique (personne âgée, enfant bas âge) où s'il présente des maladies chroniques sous-jacentes responsables d'une immuno-dépression.

4.6. Répartition des prélèvements positifs selon le type de culture

L'analyse cyto bactériologique du pus nous a permis de classer les cultures en deux groupes : cultures monomicrobiennes avec un taux de 54.55% et cultures polymicrobiennes avec un taux de 45.45% (**Figure 4.5**).

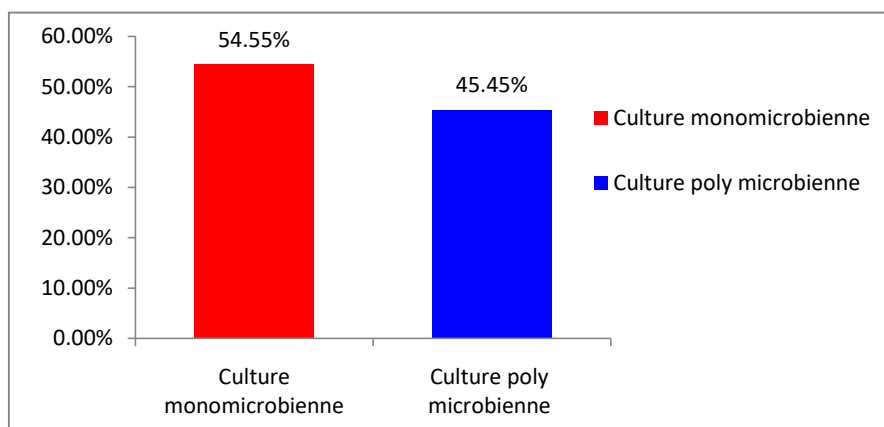


Figure 4.5 : Répartition des prélèvements positifs selon le type de culture (n=77).

La contamination du site opératoire est ainsi très fréquente et souvent inévitable (**Troillet et Zanetti, 2002**). Les germes responsables d'une infection du site chirurgical sont normalement inoculés durant l'intervention et proviennent de la peau ou des muqueuses non stériles touchées (digestive, urogénitale, respiratoire) durant l'intervention. En outre, les germes peuvent provenir d'un foyer infectieux distant concomitant. Les sources exogènes peuvent être: le personnel chirurgical, l'environnement de la salle opératoire et tous les instruments qui entrent en contact avec le site opératoire. La présence de plusieurs sources d'infection augmente les chances de contamination des plaies opératoires par une variété de germes hospitaliers (**Benedetto et al., 2013**).

4.7. Répartition des germes isolés à partir des cultures positives

Au cours de cette étude, nous avons enregistré 77 cas de prélèvements purulents de culture positive. Les germes ayant été identifiés, à partir de ces cultures, ont été au nombre de 120 bactéries. Les germes les plus fréquemment isolés étaient : les entérobactéries en première position avec un taux de 46.67% et une prédominance de genre *Klebsiella* spp. (17 sur 56 entérobactéries) et *E. coli* (11

sur 56 entérobactéries) (**Tableau 4.2**). Ensuite, les *S. aureus* viennent en deuxième position avec un taux de 15% suivi par les *Streptococcus* spp. avec un taux de de 10%. Nous avons noté la présence de *P. aeruginosa* et *A. baumannii* avec une fréquence de 8.33 et 7.5%, respectivement. Et en dernier nous avons trouvé les entérocoques, les BGN oxydatifs autre que *P. aeruginosa* (*Aeromonas hydrophila* et *Achromobacter xylosoxidans*) et les SCN avec des taux plus faibles (6.67, 4.16 et 1.67%, respectivement) (**Figure 4.6**).

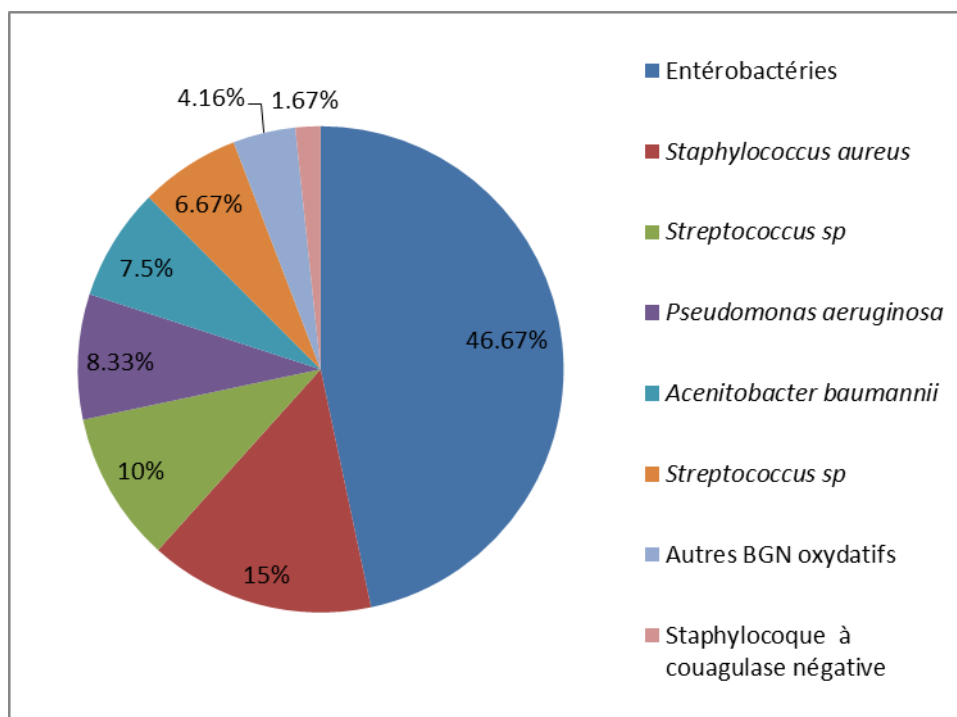


Figure 4.6: Répartition des germes isolés à partir des cultures positives (n=120).

Tableau 4.2 : Répartition des entérobactéries isolées (n= 56)

| Germes isolés | Effectif | % |
|------------------------------|--------------------------------------|-------|
| <i>Klebsiella</i> | 18 (<i>K. pneumoniae</i> = 13) | 32.14 |
| <i>Escherichia coli</i> | 11 | 19.64 |
| <i>Proteus</i> sp. | 7 | 12.5 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 8 (<i>Enterobacter cloacae</i> = 7) | 14.28 |
| <i>Serratia</i> | 4 | 7.14 |
| <i>Morganella morganii</i> | 3 | 5.35 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 2 | 3.57 |
| <i>Providencia stuartii</i> | 1 | 1.78 |
| Entérobactérie non identifié | 2 | 3.57 |

Concernant les entérobactéries, il s'agit d'une vaste famille qui représente près de trois quarts des isolements d'un laboratoire de bactériologie médicale. Ce sont pour la plus part des hôtes de tractus

digestif de l'Homme et des animaux, mais certaines, telles les *Serratia*, sont rencontrées d'une manière prépondérante dans le milieu extérieur. Elles sont responsables de maladies opportunistes dans le cadre des infections nosocomiales (**Denis et al., 2007**). Elles proviennent en ce cas de la flore digestive résidente ou d'un défaut d'hygiène ou d'asepsie (**Vaubourdolle, 2013**).

Dans notre études les entérobactéries représentent les germes les plus isolées dans les ISO avec un taux de 46.67%. Ce résultats concorde avec de celui de **Guetarni (2014)** sur les ISO au CHU d'Oran de l'année 2014, où les entérobactéries représentent 60% des germes isolés.

Parmi les entérobactéries identifiées, nous retrouvons les *Klebsiella* spp. (32.14% dont 23.21% de *K. pneumoniae*), et *E. coli* (19.67%) qui prédominent. Plusieurs études rapportent la prévalence de ces espèces dans les ISO. Citons l'étude de **Mahiout et Taleb (2014)** sur les ISO au CHU de Blida en 2014 qui ont obtenu des taux de 17.73% de *K. pneumoniae* et 12.41% de *E. coli* chez des patients hospitalisés.

Les *Klebsiella* sont des bactéries très répandues dans la nature, elles sont présentes dans la flore fécale de l'Homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires (**Podschun et Ullmann, 1998**). Les infections à *Klebsiella pneumoniae* sont généralement des infections nosocomiales suite à des actes chirurgicaux lourds, de la pose de cathéter, de dialyse (**Kone, 2010**).

E. coli est l'espèce dominante de la flore aéro-anaérobie du tube digestif. Elle est impliquée dans de nombreuses infections à point de départ urinaires ou digestives : suppurations localisées ou septicémies. Il peut s'agir d'infections communautaires ou nosocomiales (**Nauciel et Vildé, 2000**).

Les *S. aureus* sont des commensaux de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux. Ces bactéries tiennent une place très importante aussi bien dans les infections communautaires que dans les infections nosocomiales. Elles peuvent provoquer des suppurations localisées ; les plus fréquentes sont cutanées et sous-cutanées comme les surinfections de plaies post-opératoires (**Nauciel et Vildé, 2000**).

Dans notre étude, *S. aureus* prend la deuxième place des germes responsables d'ISO avec une fréquence de 15%. Le rapport de Enquête National de Prévalence des Infections Nosocomiales (ENPIN) en 2012, montre un taux de 13.5% de *S. aureus* dans les ISO ce qui concorde avec nos résultats.

Ces taux élevés de *S. aureus* peuvent être expliqués par la présence de deux facteurs de risque d'infection : la rupture de la barrière cutané-muqueuse qui favorise la pénétration des germes et le portage nasale (**Corne, 2004**). Le portage nasal est un facteur de risque de survenue d'ISO et peut quadrupler le risque d'ISO à ce même germe, en comparaison de patients non porteurs (**Birgand, 2014**). En chirurgie propre, cardiaque ou orthopédique, il a été montré que les *S. aureus* responsables des ISO sont identiques dans 75% à 80% des cas aux *S. aureus* présents en pré-opératoire dans le nez du patient opéré (**Société Française d'Hygiène Hospitalière, 2010**).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste par excellence. C'est un microorganisme hydrophile, retrouvé dans les environnements humides tels que les sols, les végétaux et les eaux (**Cabrolier et al., 2014**).

Dans notre étude, le taux de *P. aeruginosa* est de (8.33%) qui concorde avec les résultats de l'ENP des IN 2012 soit (6.9%) d'ISO. Les infections à *P. aeruginosa* sont presque toujours nosocomiales. (**Nauciel et Vildé, 2005**). Ces infections sont favorisées par les exigences nutritives restreintes de cette bactérie, par sa capacité à survivre dans l'environnement humide et à coloniser l'eau ou des solutions diverses. Les épidémies hospitalières rapportées concernent des secteurs d'activité variés et mettent en jeu divers modes de transmission : contamination des patients par l'intermédiaire de l'eau du réseau, de solutions ou de matériel médicochirurgical et de transmission manuportée (**Sécher et al., 2005**).

A. baumannii sont des microorganismes ubiquistes de l'environnement naturel et hospitalier. Elles font partie de la flore cutanée de l'Homme et des animaux. Ces bactéries sont responsables d'infection nosocomiale qui concerne essentiellement l'arbre respiratoire, l'appareil urinaire, les plaies, notamment sur cathéter, et peuvent évoluer en bactériémie (**Denis et al., 2007**).

Dans notre étude *A. baumannii* représente 7.5% des germes isolés du ISO. Ce taux est élevé par rapport au taux marqué dans l'étude de **Mahiout et Taleb (2014)** au CHU de Blida (2.66%). Selon d'autres études, ce germe est considéré comme un pathogène opportuniste responsable d'un taux croissant d'infections nosocomiales sévères. Plusieurs épidémies dues à cette bactérie ont été répertoriées, touchant principalement les patients immunodéprimés, sous une antibiothérapie et exposés à des séjours prolongés. La diffusion épidémique est attribuée à la transmission manuportée et à la survie prolongée du germe dans l'environnement hospitalier (**Lahsoune et al., 2007**).

4.8. Profil de résistance des souches isolées

Durant notre étude réalisée au niveau de service de microbiologie CHU Mustapha Bacha, 120 souches ont été isolées de différents prélèvements de pus des ISO reçus au laboratoire. Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé par méthode de diffusion sur milieu gélosé (antibiogramme) ou par automate Walk-Away (CMI en milieu liquide) et interprété selon les recommandations du CLSI.

4.8.1. Entérobactéries :

Un total de 56 souches d'entérobactéries ont été isolées. Nous avons constaté une très grande résistance des entérobactéries vis-à-vis d'amoxicilline-acide clavulanique (64.28%), gentamicine (58.93%) et cotrimoxazole (53.57%). Nous avons noté une résistance remarquable aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime) avec un taux de 39.28% ; sur les 22 souches, la majorité (21 souches) sont sécrétrices de BLSE et 1 souche non sécrétrice (Céphalosporinase haut niveau), et aux fluoroquinolones (ciprofloxacine) avec un taux de (32.28%).

Par contre la résistance à l'imipénème et l'ertapénème était rare avec un taux de 1.78% (*K. terrigena*). L'ensemble des antibiotiques testés et les résultats de l'antibiogramme sont illustré dans la **Figure 4.7**.

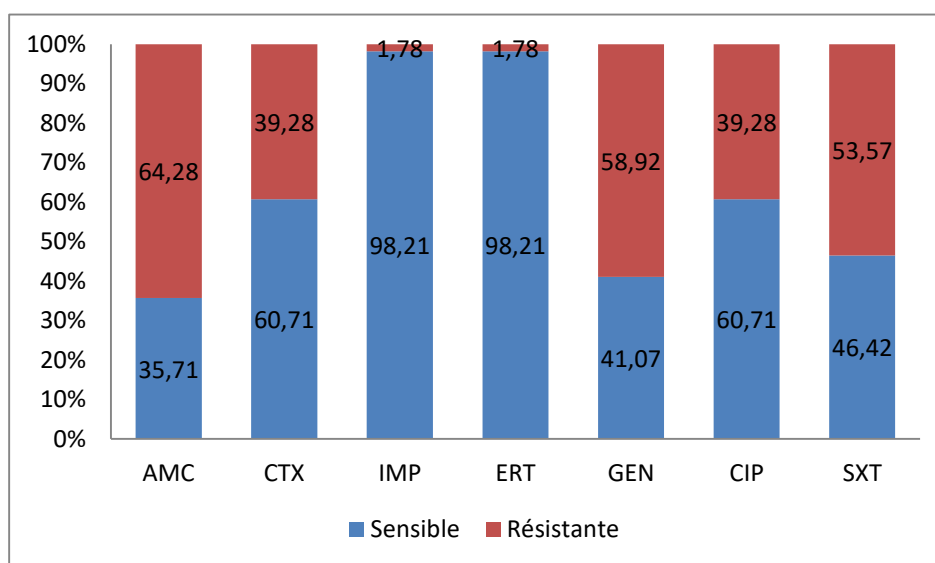


Figure 4.7: Profil d'antibiorésistance des entérobactéries (n=56)

4.8.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Un nombre de 10 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées. Nous avons noté 30% de résistance à la ticarcilline, 20% de résistance à la pipéracilline et un taux faible de résistance à la

ceftazidime, gentamicine tobramycine, ciprofloxacine, lévofloxacine et/ou colistine avec un taux de 10%. L'ensemble des antibiotiques testés et les résultats sont résumés dans la **figure 4.8**.

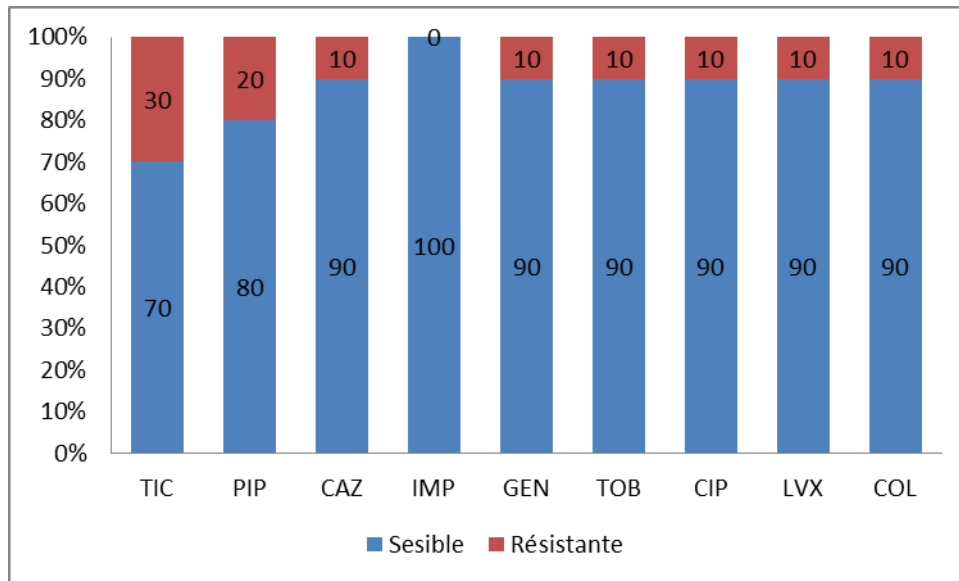


Figure 4.8 : Résultats de l'antibiogramme de *P. aeruginosa* (n= 10)

4.8.3. *Acinetobacter baumannii*

Un total de 9 souches d'*A. baumannii* qui ont été identifiées. Nous avons noté des taux élevés de résistance à la ticarcilline (88.88%), à ceftazidime (77.77%) par sécrétion d'une Céphalosporinase, à imipénème (77.77%), à gentamicine (77.77%), à Ciprofloxacine (77.77%) et à tobramycine (66.66%). Aucune résistance n'a été signalée pour la colistine. L'ensemble des antibiotiques testés et les résultats de l'antibiogramme sont résumés dans la **figure 4.9**.

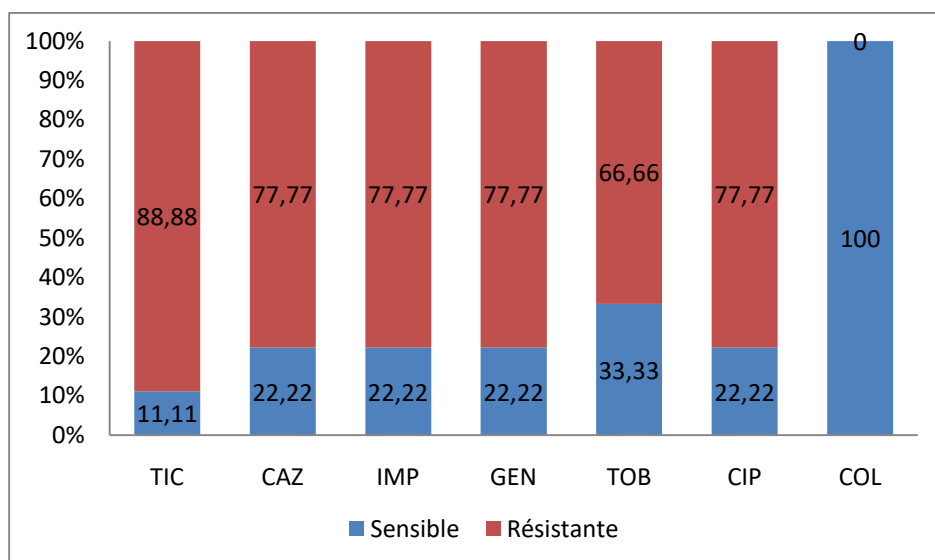


Figure 4.9 : Résultats de l'antibiogramme d'*Acinetobacter baumannii* (n= 9).

4.8.4. *Staphylococcus aureus*

Les souches de *S. aureus* étaient au nombre de 18. Elles étaient toutes résistantes à la pénicilline. 7 souches de SARM ont été identifiées avec un taux de 38.88%. nous avons noté aussi une résistance remarquable à la gentamicine, à l'amikacine à l'érythromycine avec un taux de 38.81%. Des faibles taux de résistance ont été enregistrés pour l'acide fusidique (27.77%), l'ofloxacine (11.11%) et la clindamycine (11.11%). Aucune résistance n'a été observée pour les pristinamycine et la vancomycine. Le profil de sensibilité des *S. aureus* est illustré dans la **figure 4.10**.

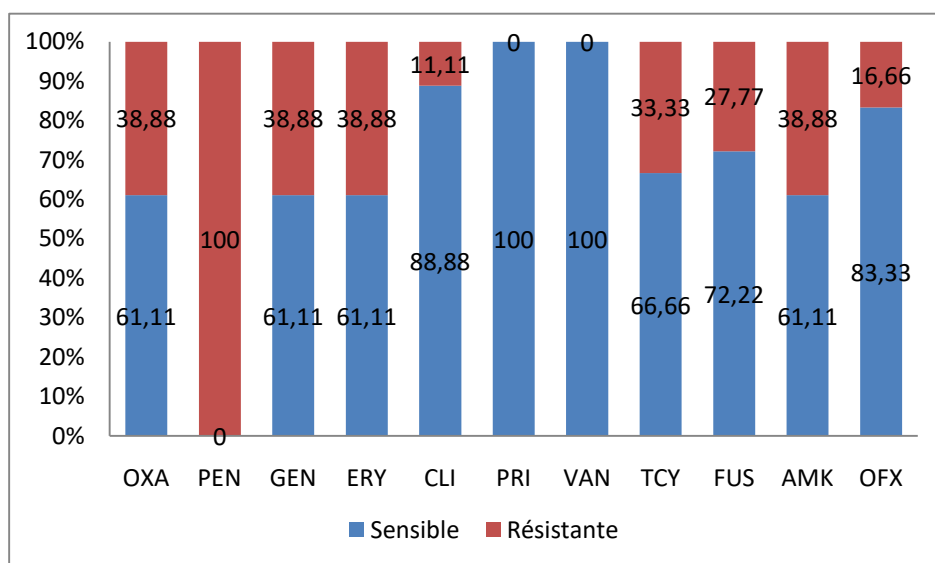


Figure 4.10 : Résultats de l'antibiogramme de *S. aureus* (n= 18)

4.8.5. Streptocoques

Un total de 12 souches de streptocoque ont été isolées. Les streptocoques ont présentés une résistance remarquable à l'érythromycine et à la tétracycline avec un taux de 50% et à la clindamycine avec un taux de 33.33%. Des faibles taux de résistance à la pénicilline (25%) et à ampicilline (8.33%). Par ailleurs, toutes les souches étaient sensibles à la pristinamycine et à la vancomycine. Leur profil de résistance est illustré dans la **figure 4.11**

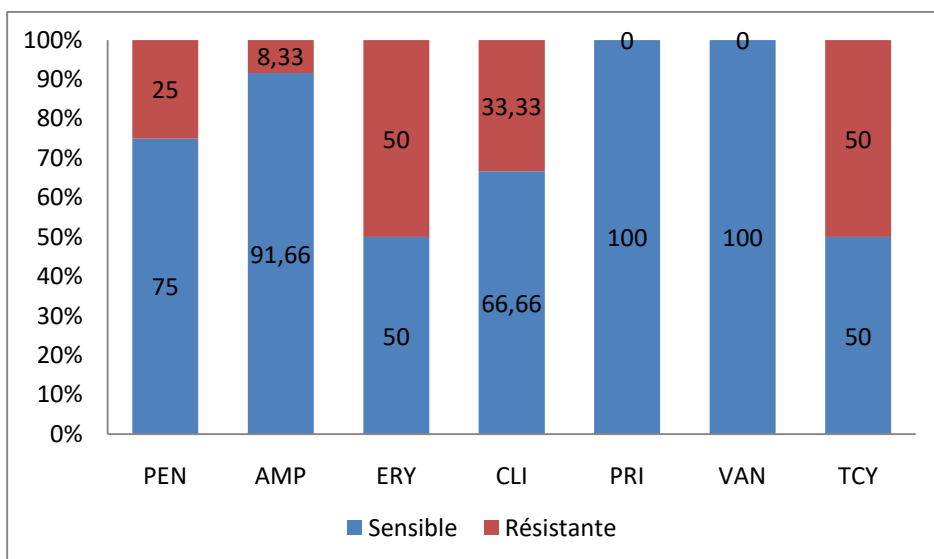


Figure 4.11 : Profil de résistance des streptocoques aux antibiotiques (n=12).

4.8.6. Entérocoques

Les souches d'entérocoque isolées étaient de nombre de 8, elles étaient toutes résistantes à la clindamycine. Un taux élevé de résistance a été enregistré pour l'érythromycine (75%) et la lévofloxacine (50%) et la streptomycine HN (50%). Une résistance faible a été enregistré pour la gentamicine HN (37.5%) et l'ampicilline (25%). Aucune résistance n'a été observée pour la vancomycine. L'ensemble des résultats obtenus lors de l'antibiogramme sont illustré dans la **figure 4.12**.

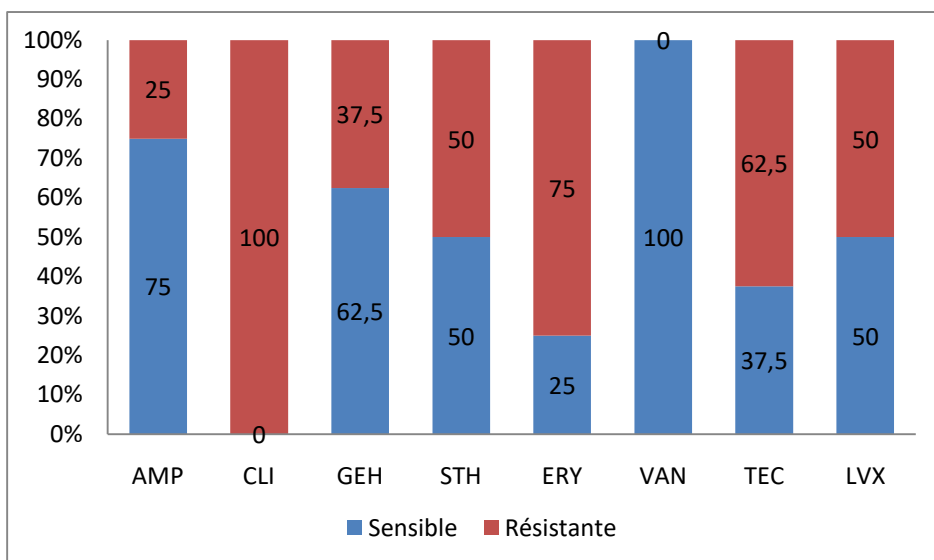


Figure 4.12: Résultats de l'antibiogramme des entérocoques (n= 8)

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être naturelle (phénotype sauvage) ou bien acquise (phénotype résistant).

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en thérapeutique en milieu hospitalier du fait de leur bonne diffusion tissulaire et leur large spectre d'action. Leur utilisation souvent excessive contribue à l'apparition de résistance acquise parmi les principales espèces bactérienne isolées dans les ISO de notre étude.

Durant notre stage nous avons enregistré 37 souches de BMR avec un taux de 30.83% ce qui concorde avec les résultats de **Mahiout et Taleb (2014)** sur les ISO au CHU de Blida où le taux de BMR était de 36.84%.

4.9. Prévalence des BMR dans les prélèvements purulents du site opératoire

Nous définissons comme BMR :

- Les entérobactéries résistantes aux C3G (sécrétion d'une BLSE/ Céphalosporinase haut niveau).
- *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline SARM.
- *Acinetobacter baumannii* résistant à la CAZ / IMP.
- *Pseudomonas aeruginosa* résistant à la CAZ/IMP.

Les BMR fréquemment rencontrés étaient les entérobactéries CTX R (en majorité sécrétrice de BLSE) avec un taux de 59.46%, suivi par *A. baumannii* multirésistant et SARM avec un taux de 18.92% et le *P. aeruginosa* résistant à la CAZ et l'IMP avec un taux de 2.70% (**Figure 4.13**).

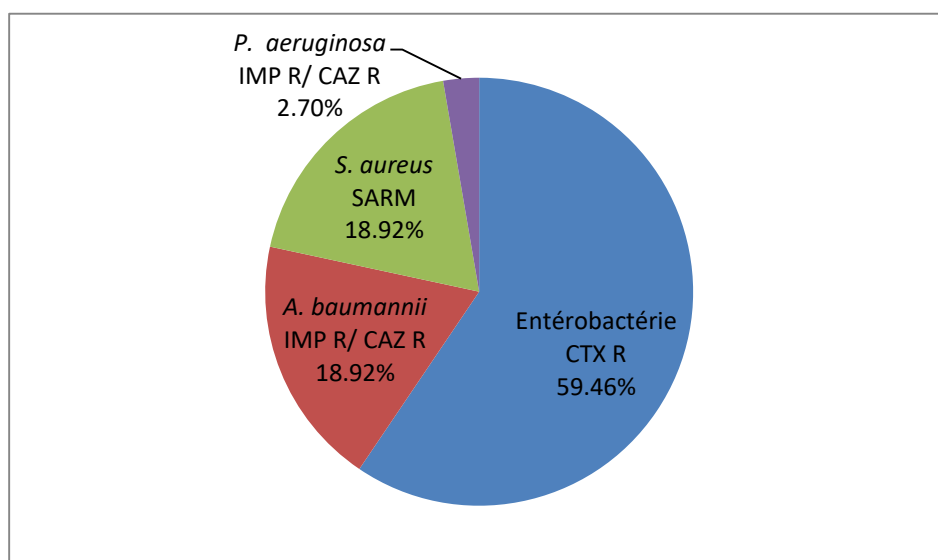


Figure 4.13 : Répartition des BMR isolées (n= 37)

Parmi les entérobactéries isolées (**Tableau 4.3**), nous retrouvons en premier les Klebsielles avec un taux de 45.45% (7 souches *K. pneumoniae* BLSE+, 2 souches *K. terrigena* BLSE+ et une *K. terrigena* BLSE-), suivi d'*E. coli* BLSE+, *Enterobacter* BLSE+ avec un taux de 18.18%. Ensuite, nous retrouvons *Proteus* sp. avec un taux de 13.63% et *Serratia* sp. avec une fréquence de 4.54%.

Tableau 4.3: Répartition des entérobactéries résistante à la céfotaxime (n= 22)

| Souche | % |
|-------------------------|----------|
| <i>Klebsiella</i> | 45.45 |
| <i>Escherichia coli</i> | 18.18 |
| <i>Enterobacter</i> | 18.18 |
| <i>Proteus</i> | 13.63 |
| <i>Serratia</i> | 4.54 |

Les statistiques que nous avons effectuées dévoilent la dominance de l'espèce *K. pneumoniae* par rapport aux souches d'entérobactéries résistantes au C3G dans tous les prélèvements de pus des ISO reçus au laboratoire. Effectivement, c'est chez l'espèce *K. pneumoniae* que la première résistance au céfotaxime fut détectée, ajoutant à cela qu'elle est suspectée d'être la cause de l'émergence des plasmides de résistance au C3G.

Le test de synergie (image de bouchon de champagne entre AMC- CTX s'avère positif pour 21 souches d'entérobactéries CTX R et 1 souche BLSE- (*K. terrigena*) mais sécrétrice de carbapénèmase (IMP-R et ERT-R).

Les taux de résistance associés les plus élevés ont été observés pour les aminosides (GN), le cotrimoxazole et les fluoroquinolone (ciprofloxacine).

Nous remarquons aussi l'apparition des souches IMP-R et ERT-R, dans telle situation, des impasses thérapeutiques sont à craindre.

A. baumannii est un germe hospitalier qui présente des taux élevés de résistance. Dans notre étude des taux de résistance élevés ont été observés pour la majorité des antibiotiques testés et aussi pour l'imipénème par la sécrétion de carbapénémases (test de Hodge modifié positif pour 5 souches), sauf la colistine qui reste toujours sensible.



Figure 4.14: Souche d'*Acinetobacter baumannii* productrice de Carbapénèmase de classe B (Test de Hodge modifié +)

Un nombre de 7 souches de SARM a été enregistré parmi les BMR avec un taux de 18.92% ce qu'est en accord avec les résultats obtenus dans l'étude de **Chablou (2011)** sur les infections nosocomiales au service de réanimation polyvalente de Fès (Maroc), où le taux de SARM isolé des ISO était de 11.6%.

La résistance à la Méricilline est en fait croisée à toutes les β -lactamines. Elle est due à l'acquisition d'une nouvelle PLP inductible, la PLP2a, ayant très peu d'affinité pour les β -lactamines. La PLP2a est codée par le gène *mecA*, inclus dans un élément génétique mobile intégré dans le chromosome « staphylococcal cassette chromosome » ou SCC *mec* (**Jehl et al., 2012**).

Les SARM hospitaliers sont habituellement résistants à la kanamycine, l'amikacine, la gentamicine et aux fluoroquinolones. Ils peuvent également résister aux macrolides, aux tétracyclines, à la fosfomycine et à la rifampicine (**Jehl et al., 2012**).

Aucune souche de *S. aureus* résistant aux glycopeptides n'a été enregistrée.

Chez le *Pseudomonas aeruginosa*, il n'est pas exceptionnel d'isoler des souches cliniques résistantes aux antibiotiques.

En effet ; *Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques notamment aux bêta-lactamine par la production d'une céphalosporinase inductible de type AmpC analogue à celle des entérobactéries du groupe 3, mais aussi aux difficultés de pénétration des antibiotiques (porines peu perméables et nombreux systèmes d'efflux) (**Jehl et al ; 2012**).

Cette résistance naturelle touche les aminopénicillines, céphalosporine de 1ere génération, céphalosporine de 2eme génération y compris les céphamycines, le céfotaxime, la céftriaxone et l'ertapénème, il reste donc sensible aux carboxypénicilline, ureidopénicilline, à certaines

céphalosporines de 3eme génération (céftazidime), au céfépime, à l'aztréonam et aux carbapénèmes (imipinème, méropénème, doripénème) (Jehl *et al* ; 2012)

Rares souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants ont été isolées dans notre étude (nous avons enregistré une souche résistante au céftazidime et imipénème).

4.10. Screening antibactérien de l'huile essentielle de citronnelle *in vitro*

L'étude de l'activité antibactérienne de l'essence aromatique de citronnelle a été effectuée par 3 méthodes différentes et complémentaires (aromatogramme, microatmosphère et dilution en milieu gélosé pour la détermination des CMI). Ce screening a été réalisé sur des souches bactériennes multirésistantes isolées à partir des prélèvements purulents du site opératoire. Au total, 28 BMR à Gram- et 7 Gram+ ont été utilisées lors de cette étude.

4.10.1 Méthode de l'aromatogramme

L'activité antibactérienne a été effectuée par technique de diffusion en milieu de culture gélosé (aromatogramme) en utilisant deux quantités croissantes en huile (20 et 40 µL/disque). Les résultats de ce screening sont illustrés dans les **figures 4.15, 4.16 et 4.17**.

Il apparait clairement, d'après les zones d'inhibition obtenues, que les souches de SARM qui sont les plus sensibles avec des DZI qui varient entre 39 et 85 mm et une moyenne de 55.7 mm, suivis par les espèces BLSE du genre *Proteus* avec des DZI qui oscillent entre 18 et 40 mm et une moyenne de 25.6 mm. Les espèces BLSE de *K. pneumoniae* sont les moins sensibles à l'action inhibitrice de l'HE avec une moyenne de DZI de l'ordre de 10.5 mm. En revanche, une seule espèce de *P. aeruginosa* a été testée avec une résistante totale.

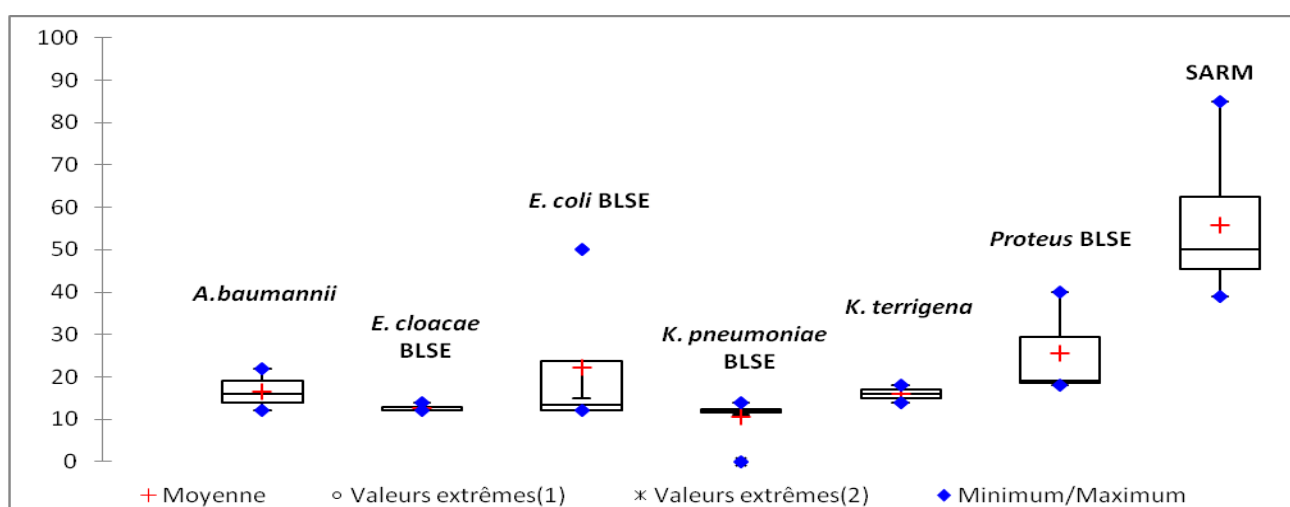


Figure 4.15: Variation des DZI pour les Bactéries multi-résistantes en aromagramme (20 µL/disque).

En outre et avec la dose de 40 μL en HE, de meilleurs résultats ont été obtenus. Dans le même sillage que précédemment, c'est toujours les SARM qui sont les plus sensibles à pouvoir inhibiteur de la phase liquide de l'essence avec des DZI qui s'échelonnent entre 43 et 85 mm avec une moyenne de 65,2 mm, suivis par les espèces BLSE de *Proteus* (35 mm) et d'*E. coli* (24.7 mm). Par contre, les espèces BLSE de *K. pneumoniae* demeurent les moins sensibles avec une moyenne de DZI égal à 14.2 mm.

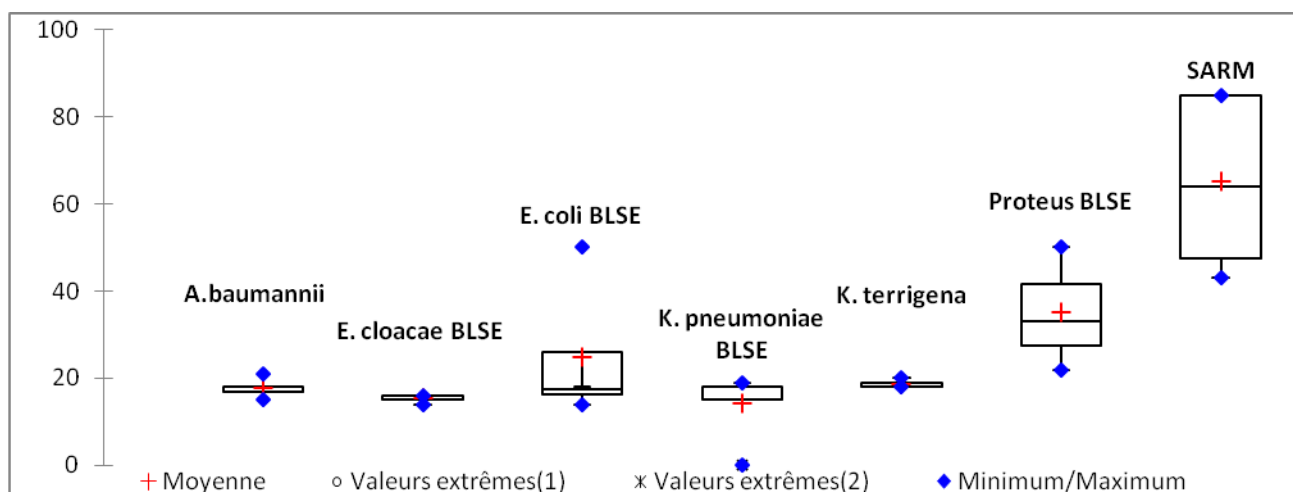


Figure 4.16 : Variation des DZI pour les Bactéries multi-résistantes en aromatoigramme (40 μL /disque).

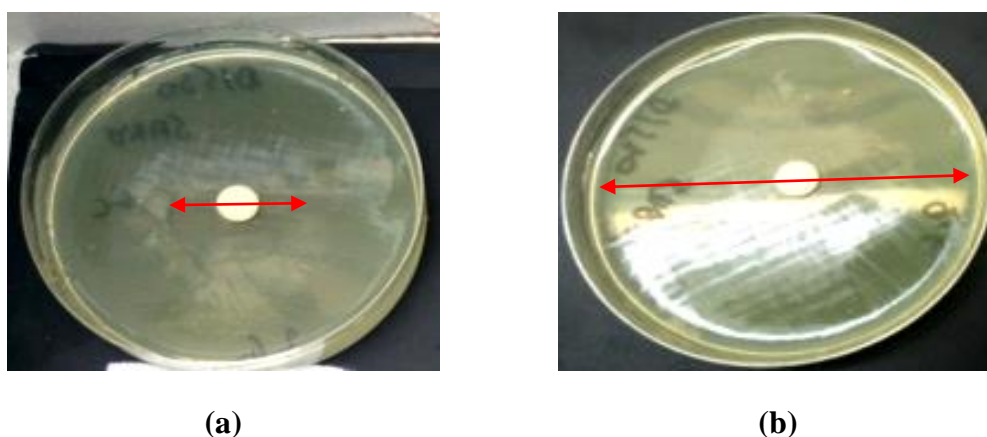


Figure 4.17: Aromatogramme d'une souche de SARM à 20 μL (a) et 40 μL (b)

La bibliographie regorge d'études sur le pouvoir antibactérien des HE et actuellement, personne ne peut nier l'action des HE sur les souches bactériennes résistantes, voire multirésistantes, aux antibiotiques (Dorman et Deans, 2000 ; Burt, 2004 ; Doran *et al.*, 2009 ; Tyagi et Malik, 2011).

Nos résultats obtenus révèlent que les bactéries à Gram+ sont les plus sensibles en comparaison avec les Gram – qui ont été inhibées certes, mais leurs DZI demeurent inférieurs. En fait ces dernières possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne (Tepe, 2005 ; Gille, 2010). Cependant, du fait que les mécanismes d'action des HE et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés, d'autres auteurs ont mentionné, dans leurs publications, qu'il n'existe aucun lien apparent ni aucune corrélation entre l'action bactéricide des HE et la nature de la paroi bactérienne (Wilkinson, 2003). Sur le plan phytochimique, l'activité antifongique de l'HE de citronnelle pourrait être due à la présence de plusieurs éléments connus pour leur activité biologique. Ces principaux composants sont Géraniol, Néral et Géraniol, qui ont déjà prouvé leur fort pouvoir dans l'inhibition de la croissance bactérienne (Doran *et al.*, 2009).

4.10.2. Méthode de Microatmosphère

La microatmosphère ou méthode de diffusion en phase vapeur est une technique basée sur l'exploitation des propriétés volatiles pour inhiber la croissance bactérienne sans contact direct avec l'HE. Les résultats de ce screening sont illustrés dans les **Figures 4.18, 4.19 et 4.20**.

Nous pouvons conclure que les SARM sont, de loin, les souches les plus sensibles à l'action inhibitrice de la phase vapeur de l'HE avec des DZI variant entre 31 et 85 mm et une moyenne de 56.7 mm. De plus, deux isolats SARM ont été inhibés totalement. A moindre degré, les espèces BLSE du genre *Proteus* ont été aussi inhibées avec une moyenne de DZI égale à 26.3 mm. En revanche et contrairement à la méthode des aromagramme, beaucoup de résistance ont été constatées aussi bien pour le *P. aeruginosa* que tous les isolats du genre *Klebsiella* avec *E. coli*.

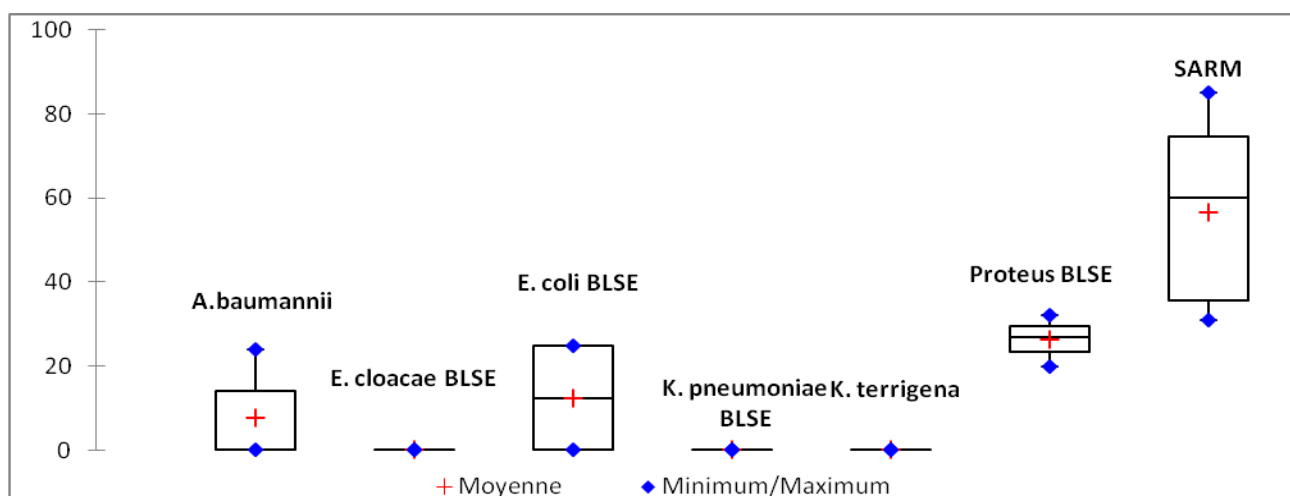
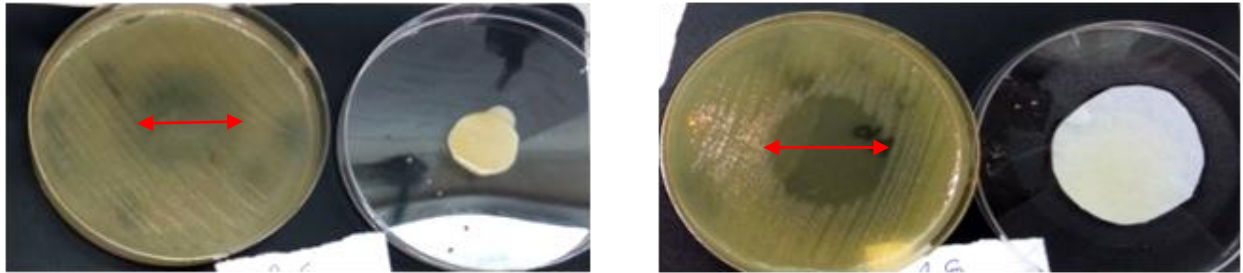
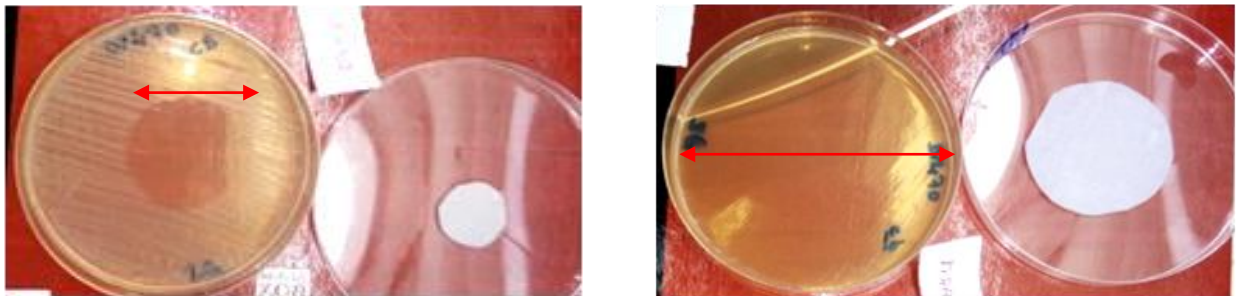


Figure 4.18 : Sensibilités des Bactéries multi-résistantes en microatmosphère (20 µL/disque).

A forte dose, de meilleurs résultats ont été enregistrés, en particulier pour les SARM où, cette fois ci, la quasi-totalité des espèces qui ont été inhibées totalement. Les DZI obtenus varient entre 70 et 85 mm avec une moyenne de 82.8 mm, suivis par les *Proteus* (44.3 mm) et *A. baumannii* (31 mm). Seules les espèces BLSE de *K. pneumoniae* et *E. cloacae* qui ont manifesté une résistance totale. Pour ce qui est d'*E. coli*, 2 espèces (50%) qui ont présenté une résistance totale alors que les 2 autres ont manifesté une certaine sensibilité avec des DZI de 35 et 45 mm.



Acinetobacter baumannii



Staphylococcus aureus SARM



Proteus rettgeri BLSE

Figure 4.19: Diamètre des zones d'inhibition de quelques BMR en microatmosphère (à droite : 40 µL, à gauche : 20 µL)

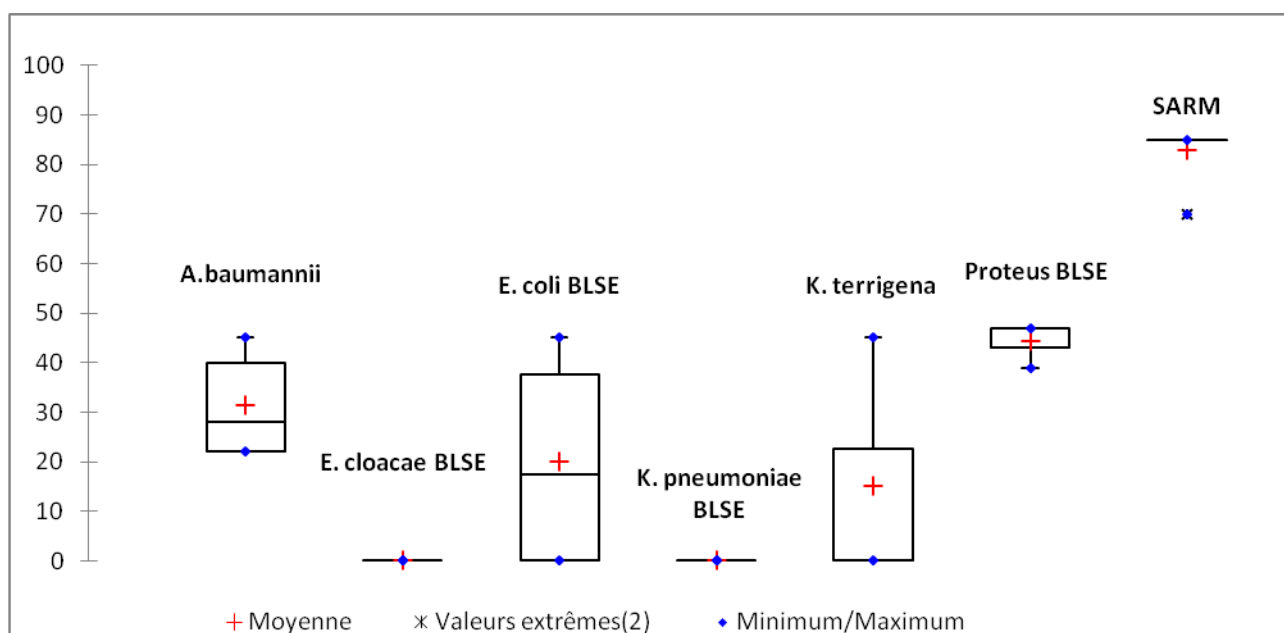


Figure 4.20: Sensibilités des Bactéries multi-résistantes en microatmosphère (40 µL/disque).

Le pouvoir antibactérien de la phase gazeuse des essences aromatiques n'est pas surprenant du moment que plusieurs travaux ont été publiés en ce sens mais la littérature scientifique reste peu prolifique (Tyagi et Malik, 2011). A l'heure actuelle, nous pouvons affirmer, sans conteste, qu'il existe des centaines de publications et autres conférences publiées et qui mettent en évidence le potentiel antibactériens des extraits végétaux aromatiques en aromatoigramme. Cependant, ce nombre ne dépasse pas, au mieux, une vingtaine d'articles de recherche ou revues de synthèse (review) qui mettent en exergue l'effet bactériostatique de ces produits volatils en microatmosphère.

Une étude scientifique (Doran *et al.*, 2009) a testé l'activité de la phase vapeur de l'essence de citronnelle contre les germes bactériens de *S. aureus* résistant à la Méricilline (SARM). Les résultats de cette étude ont révélé que la vapeur de l'HE a exhibé une certaine activité inhibitrice sur la croissance de toutes les bactéries, mais qu'elle est variable et dépendante du temps d'exposition. De plus, d'autres souches ont été inhibées *in vitro* (*Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile* et *Enterococcus faecium* résistant à la Vancomycine).

Il en découle, d'après les résultats de ce screening, que les HE pourront être utilisées en tant qu'agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment dans le milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air.

4.10.3. Méthode de dilution en milieu gélosé :

Cette technique a été utilisée pour la détermination des CMI et ce uniquement pour les bactéries ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action antibactérienne de l'HE. Nous n'avons incorporé que les BMR ayant des DZI supérieur à 40 mm. Les souches résistantes n'ont pas été incluses dans notre recherche. Du fait de la non miscibilité des HE dans la gélose, l'incorporation d'un tensio-actif non ionique (polysorbate 80) a été nécessaire pour une bonne diffusion de l'HE à travers le milieu gélosé. Par ailleurs, la gamme de dilutions en HE utilisée, lors de cette étude, varient entre 2,5 à 0.0078%. Les résultats de cette analyse sont rapportés dans le **Tableau 4.4**

Tableau 4.4 Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

| Souches bactériennes | CMI (%) |
|-------------------------------------|---------|
| SARM (S3) | <0.007 |
| SARM (S4) | 0.015 |
| SARM (S1) | 0.031 |
| SARM (S5) | 0.062 |
| <i>E. coli</i> BLSE+ (E2) | 0.031 |
| <i>E. coli</i> BLSE+ (E3) | 0.031 |
| <i>Proteus rettgeri</i> BLSE+ | 0.031 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (A1) | 0.062 |

Les résultats de notre analyse ont révélé que les SARM sont les plus sensibles à l'activité antibactérienne de citronnelle avec des valeurs de CMI qui oscillent entre 0.015% et 0.062%. Loin d'être exhaustif, l'espèce SARM (S3) a présenté la CMI la plus faible (< 0.007%). Toutes les autres souches des entérobactéries ont eu des CMI variant entre 0.031% et 0.062%.

Plusieurs études, de part du monde, ont été réalisées pour évaluer les activités biologiques de l'HE de citronnelle ainsi que leurs composés majoritaires (**Singh et al., 2011 ; Sonker et al., 2014**). Aussi et d'un point de vue microbiologique, cette huile a été classée dans la catégorie des antimicrobiens les plus puissants (**Pattnaik et al., 1997 ; Zulfa et al., 2016**). De plus, elle possède des propriétés antimicrobiennes avérées mais la quantité nécessaire pour inhiber ces germes est variable (de 1 à 100 mg/ml) selon les souches microbiennes (**Negerelle et Gomes, 2007 ; Singh et**

al., 2011). Il semblerait que l'HE de citronnelle ainsi que son composé majoritaire (citral) sont plus actifs sur *E. coli* avec des CMI qui varient entre 1 à 5 µL/mL et 0,001 µL/mL, respectivement.

Tableau 4.5: Résultats des CMI de citronnelle de plusieurs équipes (in Akhila, 2010)

| Souches | CMI | Auteurs (année) | Notre étude (2017) |
|-------------------------|--------------|-------------------------------|--------------------|
| <i>E. coli</i> | 0.06% (v/v) | Mayaud <i>et al.</i> (2008) | 0.031% (v/v) |
| | 0.94% (v/v) | Mohd <i>et al.</i> (2010) | |
| | 10 mg/ml | Bassolé <i>et al.</i> (2011) | |
| <i>S. aureus</i> | 0.38% (v/v) | Mayaud <i>et al.</i> (2008) | |
| | 2.5 mg/ml | Mohd <i>et al.</i> (2010) | |
| | 0.03% (v/v) | Bassolé <i>et al.</i> (2011) | |
| | 0.06% (v/v) | Emmanuel <i>et al.</i> (2016) | |
| SARM | 9 µg/ml | Ganjewala <i>et al.</i> 2014 | <0.007% (v/v) |
| | 4.5 µg/ml | | 0.015 % (v/v) |
| | 18 µg/ml | | 0.031% (v/v) |
| | | | 0.062% (v/v) |
| <i>A. Baumannii</i> | 0.25 % (v/v) | Mohd <i>et al.</i> (2010) | 0.062% (v/v) |
| | 0.5 % (v/v) | Emmanuel <i>et al.</i> (2016) | |
| <i>A. baumannii</i> BMR | 4.5µg/ml | Ganjewala <i>et al.</i> 2014 | |
| | 18 µg/ml | | |
| | 4.5 µg/ml | | |

En revanche, nos résultats semblent être en désaccord avec ceux obtenus par **Hammer *et al.* (1999)**. Ces derniers ont rapporté que, parmi les 52 HE, celle de citronnelle est la plus active sur *P. aeruginosa*. Par conséquent, il est difficile, voire problématique, de faire des comparaisons entre les valeurs des CMI de différentes publications. D'un côté, la composition chimique de l'huile varie considérablement, en quantité et en qualité, entre les différents travaux et, de l'autre, les méthodes utilisées pour asseoir cette activité *in vitro* et le choix des germes étudiés diffèrent entre les études.

La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'huiles essentielles. Les notions de CMI et CMB ne sont pas définies de façon précise et universelle ; les auteurs ont exprimé les résultats avec différentes unités (**Tableau 4.5**). Ces concentrations peuvent être exprimées en $\mu\text{g/mL}$ (**Oussou et al., 2008**), en $\mu\text{L/mL}$ (**De Billerbeck et al., 2002**) ou en % (vol/vol) (**Hammer et al., 1999**), ce qui rend la comparaison des résultats entre eux difficile.

Les résultats que nous avons obtenus sont très prometteurs pour l'utilisation de la fraction aromatique de citronnelle comme principe actif dans des préparations pharmaceutiques à visée thérapeutique et pour lutter contre les infections nosocomiales ou liées au site opératoire. En général, une substance peut être considérée comme un bon agent antibactérien *in vivo* lorsqu'elle agit à de faibles concentrations *in vitro* car il y a un risque de confrontation aux problèmes de toxicité *in vivo*. Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* sont très encourageants pour tester l'activité de cette essence *in vivo*. De plus, l'essence de citronnelle pourra faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique anti-infectieux, en particulier contre certaines bactéries multirésistantes (SARM et *Proteus* BLSE).

CONCLUSION

Les infections du site opératoire ont un impact significatif sur la santé ; elles sont associées dans certaines études, à une morbidité significative, une surmortalité et à des surcoûts hospitaliers et pour la collectivité. Elles constituent donc un indicateur de la qualité des soins dispensés dans un établissement.

L'objectif assigné à notre étude consiste à identifier les bactéries multi-résistantes (BMR) isolées des prélèvements purulents du site opératoire au niveau de différents services hospitaliers du CHU Mustapha Bacha d'Alger et de déterminer leur profil de résistance aux antibiotiques et à l'huile essentielle (HE) de citronnelle.

Les prélèvements proviennent de différents services hospitaliers, principalement ceux d'orthopédie-traumatologie, clinique chirurgicale infantile et chirurgie générale. L'examen cyto bactériologique des prélèvements purulents a révélé que les germes les plus dominants sont les entérobactéries, suivis par *S. aureus* et *Streptococcus* sp.

Le profil d'antibiorésistance a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs bactéries multi-résistantes dont des entérobactéries avec Béta-Lactamase à spectre élargie, des *S. aureus* résistant à la Méricilline ainsi que des *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Et dans la perspective de trouver une alternative à l'antibiorésistance des bactéries isolées, nous avons essayé de trouver d'autres alternatives qu'elles soient naturelles et efficaces et ne présentant pas un degré de toxicité avéré.

Eu égard de l'importance, sans cesse croissante, des huiles aromatiques en phytaromathérapie, il nous a semblé nécessaire de leur consacrer une étude pour asseoir le bienfondé de leur potentiel anti-infectieux. A cet effet, l'essence aromatique de citronnelle a été choisie pour évaluer son efficacité dans l'inhibition de la croissance des BMR.

Des résultats très encourageants ont été obtenus, en particulier pour les SARM et les espèces du genre *Proteus* où une inhibition importante, voire totale, a été enregistrée pour certains isolats.

La phase vapeur de l'essence est aussi efficace ce qui laisse présager une possibilité d'application dans la désinfections de l'air des hôpitaux et la lutte contre les contaminations aéroportées.

Les infections du site opératoire sont un aspect privilégié des infections nosocomiales en ce qu'elles sont relativement faciles à surveiller et à prévenir. Leur prévention s'avère un enjeu important pour augmenter la sécurité du patient.

L'essence de citronnelle paraît être une solution naturelle et efficace dans la lutte contre les BMR et pourra faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique anti-infectieux. Reste à confronter ses résultats avec les données toxicologiques.

Comme perspective, il serait intéressant de tester les composés purs de l'huile vis-à-vis des bactéries multi-résistantes et d'apprécier l'effet synergie-antagonisme entre les différents constituants, majoritaire et minoritaire.

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

En somme, l'objectif de notre étude a été atteint puisque nous avons contribué à valoriser la fraction aromatique de citronnelle comme ingrédient potentiel dans la lutte-prévention des infections bactériennes du site opératoire liées aux BMR. Son intégration dans l'arsenal thérapeutique paraît pleinement justifiée.

Références bibliographiques

Adesegun A.S., Samuel F.O., Olawale R.G ., 2013, Antioxidant activity of the volatile oil of *Cymbopogon citratus* and its inhibition of the partially purified and characterized extracellular protease of *Shigella sonnei*.

AFSSAPS., 2008, Pharmacopée européenne, Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire Des Produits de Santé (Afssaps) Mai 2008.

Akhila, A., 2010. Essential oil-bearing grasses: the genus *Cymbopogon*. CRC Press, Taylor & Francis, New York, USA.

Alexandre H., Granvalet C., Guilloux-Benatier M., Remize-Barnavon F., Tourdot-Maréchal R., 2008, les bactéries lactiques en œnologie Lavoisier, p8.

Ammari H., Ouar-Korichi M.N., 2014, Standardisation des tests de sensibilité aux Antibiotiques à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire), 7^{ème} édition, p 41, 48-52, 65-67.

Amiel C., 2005, « On sait qu'il n'y a pas de "vrais" risques ». Discours et pratiques de soignants autour des infections nosocomiales. In: Sciences sociales et santé. Vol. 23, n°3, 38p

Avril J et Carlet , J., 1998 , Les infections nosocomiales et leurs prévention., Ed.ellipse marketing S.A, p 242 -247 .

Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil., 1992, Bactériologie clinique - 3^e édition entièrement refondue et mise à jour, Ed. Ellipses, pp608 .

Avril J.L., 1997, Nouveau dictionnaire pratique de bactériologie clinique, Ed.Ellipse marketing S.A p56 .

Bardeau F., 2009, Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Fernand Lanore.

Bayala B., 2014, Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes, these Présentée Pour obtenir le grade de docteur d'université Spécialité : Physiologie et génétique moléculaire, p 4-5.

Benedetto C .D., Bruno A., Bernasconi A., 2013, Infection du site chirurgical : facteurs de risque, prévention, diagnostic et traitement, Revue Médicale Suisse, p 1832-1833-1834 .

Benamrouche N., 2014, Standardisation des tests de sensibilité aux Antibiotiques à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire), 7^{ème} édition, p 78-79.

Benslimani A et Benamrouche N., 2014, Standardisation des tests de sensibilité aux Antibiotiques à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire), 7^{ème} édition, p 37-38.

Bezzaoucha A., 1999, Prévalence des infections nosocomiales au CHU de Blida.

Birgand G., 2014, infections du site opératoire : approches originales du diagnostic et de la prévention, Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie , Ecole doctorale Pierre Louis de sante publique à paris : épidémiologie et sciences de l'information biomédicale (France).

Biokardiagnostics, Plasma de lapin lyophilisé, Identification des *Staphylococcus* à coagulase positive, <http://www.biokar-diagnostics.fr/>

Biomérieux., 2009, Système d'identification des Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux.

Biomérieux., 2016, Coffret Pour Groupage Des Streptocoques .

Boukhatem M.N., Ferhat M .A., Kameli A., Saidi F., Tchoketch K. H., 2014, Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs.

Bousbia N., 2004 , Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leur s activités antimicrobiennes . Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique, Alger (Algérie).

Boyle W ., 1955, Spices and essential oils as preservatives, Ed. Perfumer Essent. p25-28

Burt S., 2004 , Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review. Ed. Food Microbiol, p223-253 .

Cabroliera .N. b., Lafoliea J., Bertrand X; 2014, journées claudes bernard ,Épidémiologie et facteurs de risques des infections liées à *Pseudomonas aeruginosa* ; Journal des Anti-infectieux ,Ed. Elsevier Masson ,p9.

Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V., 2002, Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

CASFM ., 2014 , Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, <http://www.sfm.asso.fr/>.

Cattoen C., 2015, Persistance du portage de bactéries multirésistantes après la réanimation Duration of colonization with multiresistant bacteria after intensive ,Ed. Lavoisier, p1-8.

Chablou M, 2011, Les infections nosocomiales aux services de réanimation polyvalente de Fés (Maroc),P 110.

Chiasson H et Beloin N., 2007, Les huiles essentielles, des biopesticides, Nouveau genre. Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec.

Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Vlietinck A. J., 2002, Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology.

Cohen Y et Jacquot C., 2008, Pharmacologie, Ed.Elsevier Masson, p348.

Corne P., 2004, *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique, thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université, école doctorale : sciences biologiques et chimiques de la santé discipline : biologie santé p8 .

Couic-marinier F., Lobstein A., 2013, Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine, Actualités pharmaceutiques, p 18- 21.

Courvalin P., 2008, la résistance des bactéries aux antibiotiques: combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques ,ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *cymbopogon citratus* stapf chinese, journal of natural medicines, Ed.Elsevier , 2008 - Tome 161 - N°1, p8.

CTIN; 1999, Comité technique des infections nosocomiales,100 recommandations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales. Paris.

Dadé Ben Sidi B et Hadara B .,2008 , Etude des facteurs associés aux infections des plaies opératoires a l'hôpital zone Ouidah au Bénin, Mémoire pour l'obtention de Master en Epidémiologie, Université d'Abomey Calavi .

Daurela. C et Leclercqa R., 2008, L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*, revue francophone des laboratoires - décembre 2008, p81- 90.

De Billerbeck, G.,2000. Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur *l'Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Thèse de Doctorat, Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.

Deepak G., Ruchika M., Ashish K.G., Martha P., Reetika D., 2014, Antibacterial Properties of Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) Wats Essential Oils in Single form and Combination of Honey Against Drug Resistant Pathogenic Bacteria, p 282.

Decré D., 2012, *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation, revue francophone des laboratoires - avril 2012 - n° 441 ,p 43-52.

Delarras C., 2007, Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Ed.Lavoisier ,France ,p 476, p 387- 447, 448,449.

Denis F.,Edouard B.,Christian M.,Marie C.P.,Roland Q.,2007, Bactériologie médicale : techniques usuelles, Ed.Elsevier Masson p573, p 295- 344-252-264.

Doran, A. L., Morden, W. E., Dunn, K., & Edwards-Jones, V. ,2009. Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. Letters in Applied Microbiology, 48(4), 387-392.

Desmons S et Paca A., 2013, Les prélèvements en bactériologie Cclin AR ,p63- 67 .

Dorman H.J.D et Deans S.G., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, p 308-316.

Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé., 2012, France, établissements de santé, mai-juin 2012.

Fauchère J-L et Avril J-Loup., 2002, Bactériologie générale et médicale, Ed.Ellipses,p 368, P 238- 259- 280.

Gagan S., Richa S., Vivek P., Narender S., Bharpur S., Mann A.,2011, Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, Stapf (Lemongrass) .,Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research,Vol 2 , p 3-8.

Gagnaire J., Verhoeven P., Denis C., Grattard F., Carricajo A., Pozzetto B., Berthelot., 2015, Prise en charge des bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans les établissements de santé, feuillets de Biologie N° 322 - JANVIER 2015, p13-20.

Ganjewala D., Mittala R., Gupta A.K., Premlathab M, Dawarc R., 2014, Antibacterial Properties of Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) ,Wats Essential Oils in Single form and Combination of Honey Against Drug Resistant Pathogenic Bacteria, Har Krishan Bhalla & Sons, p 282.

Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S.,2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. Food Chemistry, 119(2), 731-737.

Grosjean N.,2007, L'aromathérapie tout simplement. Ed.Eyrolles , Belgique. p 53-55.

Guetarni N., 2014, Les infection du site opératoire (ISO) au CHU d'Oran, Thèse pour l'obtention du Doctorat en sciences médicales, Université d'Oran.

Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B., Athmani-Guemour S.I., 2011, microbiologie travaux pratique, 4^{ém} edition corrigé office des publications universitaire,p133.

Guillot J.F., 1989, Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques, Annales de Recherches Vétérinaires, Ed. INRA, p3-16.

GuinoiseauE., 2010, Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action, Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur de l'universite de Corse .

Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H .,2007, Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia*. Food Chemistry.

Haenni M ., Eric J., Jean-Yves M., Frédéric L., 2011,*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : un partage entre l'Homme et l'animal, Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n^o 53,Spécial Antibiotiques et Antibiorésistances, p40- 43.

HAIJAR J., Valence., 2008, infection du site operatoire, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux, CCLIN Sud-Est, Août 2008, P 2-3.

Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V., 1999, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, Journal of AppliedMicrobiology , p 986.

Hart T., Shears P., 1997, Atlas de poche de Microbiologie, Ed.Flammarion médecine-science, France, p93.

Institut national de santé publique du Québec ., 2014, Surveillance des infections du site opératoire : outils et méthodologies pour les milieux de soins, p 151 .

Jehl F., Chomarar M., Tankovic J., Gérard A., 2012, De l'antibiogramme à la prescription, Ed. BioMérieo .

Joffin J.N., Leyral.G., 2006, Microbiologie technique -Tome 1: Dictionnaire des techniques. CRDP d'Aquitaine , p 368.

Josphat C.,Matasyoh ., Isabel N., Wagara., Jesca L., Nakavuma ., Anderson M., Kiburai ., 2011,Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species African, Journal of Food Science ,p138-142.

Kalembe D., Kunicka A ., 2003, Antibacterial and antifungal properties of essential oils.

Kheyar N., Meridja D., Belhamel K., 2014, Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia, Algerie, Journal of Natural Products, p 22.

Kientega S. J ., 2012, les infections du site opératoire : aspects épidémiologiques, cliniques, bactériologiques et thérapeutiques dans le service de chirurgie viscérale du Chuyo. A propos de 55 cas, Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur en médecine, université de Ouagadougou .

Koh H L ., 2009, A guide to medicinal plants , an illustrated scientific and midicinal approach World,p57.

Kone K. D., 2010, frequence d'isolement des *klebsiella* au laboratoire de bactériologie,université de Bamako, faculté de médecine ,Pharmacie et d'odontostomatologie , thèse pour obtenir de grade de docteur en pharmacie.

Lahsoune M, Boutayeb H, Zerouali K, Belabbes H, El Mdaghri N, 2007, Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain, Médecine et maladies infectieuses, Elsevier Masson SAS. P 830

Le Minor L et Véron M .,1982 , Bactériologie médicale. Flammarion médecine-sciences.

Louzniewski A., Rabaud C., Nancy., 2010, résistance bactérienne aux antibiotiques, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins , CCLIN Sud-Est, p 1-4.

Mahiout N et Taleb S., 2014, Les infections du site opératoire du CHU Blida, diagnostic de pus de plaie au laboratoire, et résistance aux antibiotiques, memoire de master en biologie universite de BLIDA 1.

Makhlouf Fayçal., 2011, Etude de l'impact de l'hygiène des mains sur l'incidence des infections du site opératoire au niveau des services de chirurgie du CHU Bab El Oued (2010 – 2011), thèse pour l'obtention du doctorat en sciences médicales, université d'Alger 1 benyoucef benkhedda faculté de médecine .

Marchal N., Boudon J-L., Richard C-L ., 1982 , les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries,p61.

May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L., 2000, Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates,p639-643 .

Mchich Anas., 2002, Les infections nosocomiales de 55 cas colligés au Maroc, Thèse de médecine, université cheikh AntaDiop de Dakar, p53.

Mérensa A., Janviera F., Vu-Thienb H., Cavallo J., Jeannotc K., 2012, Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, Revue francophone des laboratoires Septembre-Octobre 2012 ,p45-74.

Millet F ., 2013, Le grand guide des huiles essentielles, Ed.Marabout (Hachette livre), Espagne ,p 17.

MoselioS., Gerald M., Barry I. E.,1999, Microbiologie et pathologie infectieuse, Ed De Boeck Supérieur ,pp 198.

Nauciel C., 2000. Bactériologie médicale. Éditions Masson, Paris,pp.27-33.

Nauciel C et Vildé J-L., 2005, Bactériologie médicale, 2em Ed. Masson Paris ,p82 - 83,272,275.

NCCLS.,2000, National Commite for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: Approved standard ,Ed.Villanova.

O'Brien K.L., Beall B., Barrett N.L., 1999 ,Epidemiology of invasive group a *streptococcus* disease in the United States ,Ed.Clin Infect Dis,Vol.35,p76.

OMS., 2008, Prévention des infections nosocomiales 2e édition, Organisation mondiale de la Santé 2008,p5- 6.

Oussou, K. R., Yolou, S., Boti, J. B., Guessennd, K. N., Kanko, C., Ahibo, C., & Casanova, J., 2008. Étude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la Pharmacopée Ivoirienne. European Journal of Scientific Research, 24(1), 94-103.

Patrick H.W., Stephan T.B ., Rainer P., Sureshan S ., Ingo N.S ., Paul A.J.R ., Joerg W., Helmut F., Eugene S., 2009, The battle against multi-resistant trains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections, Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery , P 394.

Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., &Kole, C. R., 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils.Microbios, 89(358), 39-46

Pear S.M.,2007, Patient risk factors and best praticices for surgical site infection prevention. Managing infection control, March 2007 .

Podschn R et Ullmann U., 1998, *Klebsiella spp* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors ,Clin MicrobiolRev.

PUJA S .,JAMES P.M., ALBERT R., 2013,ten essential oils inhibit growth of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) AND methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), international journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences ,p53.

Puraima J ., 1999, Medicinal and aromatic plant series, lemongrass (*Cymbopogon citratus*), Industrial Technology Institute (CISIR) & National Science Foundation ,p 45.

Rahal K ., 2013, Les antibiotiques. Office des publications universitaires ,p54.

Raisin., 2003, Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales,enquête de prévalence nationale des infections nosocomiales .

Raisin ., 2010, Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France, Réseau BMR-Raisin, Maladies infectieuses ,p 3.

Remel ., 2012,Staphaurex Plus, Remel Europ Ltd.

Robin F., Gibolda L., Bonneta R., 2012, Résistances naturelles et acquises aux -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne, revue francophone des laboratoires - septembre-octobre 2012 ,p47 -58.

Sécher I., Hermès B ., Carreau C ., Bahuet F., 2005, Cas groupes d'infections du site opératoire a *Pseudomonas aeruginosa* en orthopédie-traumatologie, Médecine et maladies infectieuses, Ed.Elsevier,p 150.

Schadé J.P ., 2001, encyclopédie médecine et santé ,Ed : serges Mediasarl , Paris, P1223.

Sharma P., Mack J., Rojzman A., 2013, Ten essential oils inhibit growth of methicillin resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) and methicillin sensitive *staphylococcus aureus* (MSSA), International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,p53 .

Silva C., Guterres S., Weisheimer V., Schapoval E., 2008, Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp, p63-66.

SmithP. A., Stewart J., Fyfe L.,1998, Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens,Ed. AppliedMicrobiology, p118–122 .

Société Française d'Hygiène Hospitalière., 2010, Surveiller et prévenir les infections associées aux soins, Edition Health & Co.

Sonker, N., Pandey, A. K., Singh, P., & Tripathi, N. N., 2014. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil as herbal preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, and antiochratoxin activities and *in vivo* efficacy during storage. Journal of food science, 79

Soukhal A., Belkaid R., Nait-Djoudi K., Adjali M.,2006, Incidence des ISO chez les patientes césarisées à la maternité du CHU Beni-Messous-Alger,XVII congrès national de SFHH. Nantes.

Sue C., Gary Y., Craig O., Karen N., John W., Sons L., 2008, Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils, 2008, Flavour and Fragrance Journal, p 446.

Taybik., 2013, Approche Méthodologique de l'Activité Antimicrobienne des Huiles Essentielles : Fragrance de Citronnelle (*Cymbopogon citratus*(DC).) Mémoire de Fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie, Université Saad Dahleb de Blida.

Tennstedt D., 2004, Peau et moustiques. Progrès en dermato-allergologie: Lille
Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). Food Chemistry, 90(3), 333-340.

Teuscher., Anton R., Lobstein A., 2005, Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris, Ed.Lavoisier, p 197 -522.

Troillet G et Zanetti G., 2002, L'infection du site opératoire : une complication hospitalière qui concerne le médecin de premier recours, Revue Médicale Suisse .

Tyagi A. K et Malik A ., 2011, Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapor phase against foods spoilage microorganisms. Food Chemistry, p 228-235.

Vincent A ., Saintg. L ., Laprugneg. E., 2008, infections associées aux soins définition, fréquence et facteurs de risque, fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – infection, CCLIN Sud-Est, p3.

Vaubourdolle M., 2013, infectiologie, Ed.Le Moniteur des pharmacies ,p1036.

Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., & Cavanagh, H. M.; 2003. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(1), 76-81

Willey J.M., Sherwood L.M., Christopher J., Woolverton., Jacques Coyette., Prescott., Harley., Klein., 2013, Microbiologie, 4^{ème} Ed. De Boeck Supérieur, Belgique-Bruxelles, p 845.

Wong E., 1999, Surgical site infections. In: Mayhall C, editor. Hospital epidemiology and infection control. 2e Ed. Philadelphia, p189-210.

Zhiri A et Baudoux D., 2005, Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies: aromathérapie scientifique, Luxembourg: Éd.Inspir Development.

Zaika, L.L., 1988, Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. Journal of Food Safety, p97-118.

Zulfa, Z., Chia, C. T., & Rukayadi, Y.,2016. *In vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus*(lemongrass) extracts against selected foodborne pathogens. International Food Research Journal,

Annexe 3

Tableau 1: Activité antibactérienne de l'HE de Citronnelle sur les entérobactéries multirésistantes par différentes méthodes microbiologiques.

| Souches bactériennes | Aromatogramme (DZI, mm) | | Microatmosphère (DZI, mm) | | Antibiogramme (mm) | | | | | | |
|---|---------------------------------------|-----------|---------------------------|-----------|--------------------|------|-------|-------|------|------|------|
| | Quantité d'huile (goutte(µl) /disque) | | | | AMC | CTX | IMP | ERT | GEN | CIP | SXT |
| | 1G (20µl) | 2G (40µl) | 1G (20µl) | 2G (40µl) | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> BLSE+ (E1) | 12 S | 18 S | - | - | 17 R | <6 R | 30 S | 30 S | 13 R | 28 S | <6R |
| <i>E. coli</i> BLSE+ (E2) | 50 S | 50S | 25 S | 35 S | <6 R | <6 R | 36 S | 36 S | <6 R | 18R | <6 R |
| <i>E. coli</i> BLSE+ (E3) | 15 S | 17 S | 25 S | 45S | <6 R | <6 R | 31 S | 31 S | <6 R | 28 S | <6 R |
| <i>E. coli</i> BLSE+ (E4) | 12 S | 14 S | - | - | <6 R | <6 R | 25 S | 30 S | <6 R | 16 R | 10 R |
| <i>Enterobacter amnigenus</i> BLSE+ | 13S | 17 S | - | - | <6 R | <6 R | 30 S | 30 S | <6 R | 30 S | >30s |
| <i>E. cloacae</i> BLSE+ (E.c1) | 12 S | 14 S | - | - | 12 R | <6 R | 36 S | 32 S | <6 R | 20 R | <6 R |
| <i>E. cloacae</i> BLSE+ (E.c2) | 14 S | 16 S | - | - | <6 R | <6 R | 28 S | 28 S | <6 R | 18 R | <6 R |
| <i>E. cloacae</i> BLSE+ (E.c3) | 12 S | 16 S | - | - | 12 R | 9 R | 30 S | 30 S | <6 R | <6 R | 20 S |
| <i>K. pneumoniae</i> BLSE+ (Kp1) | - | - | - | - | 16 R | <6 R | 29 S | 26 S | <6 R | 30 S | <6 R |
| <i>K. pneumoniae</i> BLSE+ (Kp2) | 12 S | 15 S | - | - | <6 R | <6 R | >30 S | >30 S | <6 R | 10 R | <6 R |
| <i>K. pneumoniae</i> BLSE+ (Kp3) | 12 S | 15 S | - | - | <6 R | <6 R | 32 R | 30 S | <6 R | 16 R | <6 R |
| <i>K. pneumoniae</i> BLSE+ (Kp4) | 11 S | 17 S | - | - | S | 12 R | 33 S | 31 S | 19 R | <6 R | <6 R |
| <i>K. pneumoniae</i> BLSE+ (Kp5) | 12 S | 15 S | - | - | 20 S | <6 R | 34 S | 32 S | <6 R | 10 R | <6 R |
| <i>K. pneumoniae</i> BLSE+ (Kp6) | 13 S | 19 S | - | - | <6 R | <6 R | 31 S | 26S | <6 R | <6 R | <6 R |
| <i>K. pneumoniae</i> BLSE+ (Kp7) | 14 S | 19 S | - | - | <6 R | <6 R | 30 S | 28 S | <6 R | 10 R | <6 R |
| <i>K. terrigena</i> BLSE+ (Kt1) | 16 S | 18 S | - | - | 16 R | <6 R | 32 S | 30 S | <6 R | <6 R | <6 R |
| <i>K. terrigena</i> BLSE+ (Kt2) | 14 S | 20 S | - | - | 14 R | <6 R | >30 S | > 30S | <6 R | <6 R | <6 R |
| <i>K. terrigena</i> Carbapénèmase + (Kt3) | 18 S | 18 S | - | 45 | <6 R | <6 R | 19 R | 8 R | <6 R | <6 R | 19 R |
| <i>P. rettgeri</i> BLSE+ | 40 S | 50 S | 27 S | 47 S | 19 S | <6 R | 30 S | 30 S | 15 S | 16 R | <6 R |
| <i>P. penneri</i> BLE + | 18 S | 22 S | 32 | 47 | 21 S | 16 R | 30 S | 30 S | <6 R | 22S | 10 R |
| <i>Proteus sp</i> BLSE+ | 19 S | 33 S | 20 | 39 | 22 S | 18 R | > 30S | 32 S | 10 R | 18 R | <6 R |
| <i>Serratia sp</i> BLSE + | 13 S | 15 S | - | - | <6 R | <6 R | 30 S | 30 S | <6 R | 40 S | <6 R |

Tableau 2: Activité antibactérienne de l'HE de Citronnelle sur *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline (SARM) par différentes méthodes microbiologiques

| Souches bactériennes | Aromatogramme (DZI, mm) | | Microatmosphère (DZI, mm) | | Antibiogramme (mm) | | | | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 G (20µl) | 2 G (40µl) | 1 G (20µl) | 2 G (40µl) | GEN | OXA | ERY | CLI | VAN | FOX | TCY |
| | Quantité d'huile gouttes (µl)/disque | | | | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> SARM (S1) | 65 S | >85 S | >85 | >85 | 10R | 9 R | 31 S | 25 S | 22 S | 18 S | 19 S |
| <i>S. aureus</i> SARM (S2) | 48 S | 43 S | 31 S | >85 | 17 S | 29 R | 25 S | 26 S | 19 S | 20S | 14 R |
| <i>S. aureus</i> SARM (S3) | 43 S | 45 S | 36 S | 70 S | <6 R | 10 R | 26 R | 27 S | 15R | 18 S | 30 S |
| <i>S. aureus</i> SARM (S4) | 39 S | 85 S | 35S | >85 S | 24 S | <6 R | 31 S | 31 S | 24 S | 20 S | 31 S |
| <i>S. aureus</i> SARM (S5) | 50 S | 50 S | 60 S | >85 S | <6 R | <6 R | 25 S | <6 R | <6 R | 21 S | 20 S |
| <i>S. aureus</i> SARM (S6) | 60 | 64 | 64 | >85 | <6 R | <6 R | <6 R | <6 R | 19 S | 10 R | 12 R |
| <i>S. aureus</i> SARM (S7) | >85 | >85 | >85 | >85 | <6 R | <6 R | 11 R | 28 S | 24 S | <6 R | 14 R |

Tableau 3: Activité antibactérienne de l'HE de Citronnelle sur *Pseudomonas aeruginosa* IMP-R / CAR- R par différentes méthodes microbiologiques.

| Souches bactériennes | Aromatogramme (DZI, mm) | | Microatmosphère (DZI, mm) | | Antibiogramme (mm) | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|--------------------|------|-------|------|------|------|
| | 1G (20µl) | 2G (40µl) | 1G (20µl) | 2G (40µl) | TIC | PIP | CAZ | TOB | COL | LVX |
| | Quantité d'huile gouttes (µl)/disque | | | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | - | - | 64 S | 64 S | >30 R | <2 S | <2 S | <1 S |

