



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :/2020

Présenté et soutenu par:

LAMOURI Abdelmouman

Le: mercredi 7 octobre 2020

Etude comparative de biofilm clinique *in vitro* de secteurs médicaux entre quelques souches bactériennes: cas de l'hôpital d'El-Meghaier

Jury:

Dr.	SIMOZRAG Ahmed	MCA	Université Biskra	Président
Mme.	BENGUERAICHI Fatiha	MAA	Université Biskra	Rapporteur
Dr.	BENBELAID Fethi	MCB	Université Biskra	Examineur

Année universitaire: 2019-2020

Remerciements

A travers cette humble mémoire, je remercie avant tout mon dieu Allah qui m'a donné la capacité et la santé de terminer ce travail. Je remercie également toutes les personnes proches ou lointaines qui ont contribué à moi, même si avec un mot de motivation.

Je ne peux pas continuer à remercier sans mentionner l'encadreuse Mme. BENGUERAICHI Fatiha maître assistant de classe A à l'université Mohamed Khider de Biskra, je la remercie beaucoup d'avoir accepté ce sujet qu'elle a proposé, le décrivant comme plus récente et intéressant. Je la remercie également pour sa confiance, ses encouragements, son soutien continu et les conseils précieux qu'il m'a prodigués tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie également les membres, y compris le président du jury Dr. SIMOZRAG Ahmed maître de conférences de classe A à l'université Mohamed Khider de Biskra, en sa présidence de la supervision à propos du lancement de présentation, soutenance du mémoire et ses discussions.

Je remercie aussi le tiers du jury qui est le membre examinateur Dr. BENBELAID Fethi maître de conférences de classe B à l'université Mohamed Khider de Biskra, pour son intégrité et sa transparence à poser des questions scientifiques et pratiques.

Je remercie les personnels médicaux et paramédicaux, ainsi que les laborantines dirigé par M^r. BRAMKI Mohamed chef du laboratoire central au l'établissement public hospitalier DEBAKH Saïd d'El-Meghaier, de ses fournissent l'équipement nécessaire pour cette étude et création d'une bonne circonstance appropriée pour cela.

Je tiens également à remercier beaucoup tous les enseignantes de département des sciences de la nature et de la vie à filière sciences biologique de l'université Mohamed Khider de Biskra qui m'ont enseigné pendant le cursus universitaire, où il a été marqué par de nombreuses expérience, idées pratiques et scientifiques.

Je remercie également tous les travailleurs de laboratoire pour leur plus grande attention aux équipements et moyens de laboratoire et aux instructions pour leur utilisation et leur acquisition.

Je remercie tout le personnel de la bibliothèque du département pour son dévouement au travail et les conseils fournis lors de l'emprunt de livres, je n'oublie pas non plus de remercier le personnel administratif pour l'activité constante et le suivi pédagogique.

LAMOURI Abdelmouman

Dédicaces

Je dédie ce travail

À ma chère mère♥ et mon cher père♥

À ma deuxième mère, ma tante N♥

À mes frères et sœurs

À tous mes collègues

À tous mes amis

 *Abdelmouman*

Liste des tableaux

Tableau 01. Caractéristiques de biofilm bactérien clinique.....	04
Tableau 02. Liste des tests qui nécessitent des réactifs en galerie API 20.....	29
Tableau 03. Les catégories de biofilms en fonction de densité optique.....	33
Tableau 04. Liste des antibiotiques testés.....	35
Tableau 05. Facteurs des virulences des cocci à Gram positif et leurs maladies.....	41
Tableau 06. Principaux tests de différenciations entre les staphylocoques.....	51
Tableau 07. Principaux tests de différenciation entre <i>E. faecalis</i> et autre streptocoques.....	53
Tableau 08. Caractéristiques générales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et d' <i>E. coli</i>	54
Tableau 09. Etablir de profil numérique à la galerie API 20 Staph.....	55
Tableau 10. Etablir de profil numérique à la galerie API 20 Strep.....	56
Tableau 11. Etablir de profil numérique à la galerie API 20 E.....	56
Tableau 12. Etablir de profil numérique à la galerie API 20 NE.....	57
Tableau 13. Fréquence des souches en termes de secteur médicale et site de prélèvement....	59
Tableau 14. Capacité formatrice de biofilm en termes d'aspect chromatique sur RCA.....	70
Tableau 15. Fréquence des souches formatrice de biofilm sur RCA.....	72
Tableau 16. Croisement biofilm-souches par le test statistique Khi-deux.....	72
Tableau 17. Comparaison de biofilm formé sur RCA par Khi-deux de Pearson.....	73
Tableau 18. Lecture quantitative de la densité optique estimée du biofilm formé.....	74
Tableau 19. Densité optique de biofilm formé pour chaque souche bactérienne isolée.....	75
Tableau 20. Comparaison multiple de test Tukey entre les différentes souches.....	76
Tableau 21. Résultats de sensibilisation des bactéries isolées aux antibiotiques.....	79

Liste des figures

Figure 01. Microorganismes de biofilm observé par Leeuwenhoek.....	03
Figure 02. Développement d'un biofilm clinique bactérien.....	06
Figure 03. Infections associées au dispositif et chroniques.....	10
Figure 04. Carte géographique et hôpital d'El-Meghaier.....	14
Figure 05. Quelques services hospitaliers.....	15
Figure 06. Isolement des souches sur gélose nutritive.....	20
Figure 07. Différents aspect des colonies sur les milieux des cultures.....	21
Figure 08. Différents types d'hémolyse (α , β et γ) sur gélose au sang frais.....	22
Figure 09. A: <i>E. coli</i> lac ⁺ , B: <i>P. aeruginosa</i> lac ⁻ en MacConkey.....	22
Figure 10. Coloration de Gram pour quelques bactéries.....	24
Figure 11. Protocole d'identification des CGP et BGN.....	30
Figure 12. Quelques différents aspects de biofilm par méthode RCA.....	31
Figure 13. Démarche de technique de plaque de culture tissulaire.....	33
Figure 14. Aspect de culture mixte sur gélose nutritive.....	37
Figure 15. Aspect de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Chapman.....	38
Figure 16. Aspect de <i>S. aureus</i> sauvage et SCV sur gélose au sang frais.....	39
Figure 17. <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i> sur gélose Chapman.....	39
Figure 18. Aspect d' <i>Enterococcus faecalis</i> sur gélose au sang frais.....	40
Figure 19. Aspect d' <i>E. coli</i> sur différents milieux de culture.....	41
Figure 20. Aspect de <i>P. aeruginosa</i> sur différents milieux de culture.....	43
Figure 21. Observation microscopique de quelques bactéries.....	46
Figure 22. Structure de peptidoglycane.....	47
Figure 23. Catalase positive par décomposition de H ₂ O ₂ et formation O ₂	48
Figure 24. Coagulation positive de plasma par <i>S. aureus</i>	49
Figure 25. Dépolymérisation d'ADN par enzyme DNase de <i>S. aureus</i>	50
Figure 26. Détection de protéine A chez <i>S. aureus</i> par l'agglutination.....	51
Figure 27. Hydrolyse de l'esculine biliaire par <i>Enterococcus faecalis</i>	52
Figure 28. Tolérance au milieu hypersalé chez <i>E. faecalis</i>	52
Figure 29. Détection de cytochrome oxydase chez <i>P. aeruginosa</i>	53
Figure 30. Identification biochimique de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
Figure 31. Identification biochimique d' <i>Enterococcus faecalis</i>	55
Figure 32. Identification biochimique d' <i>Escherichia coli</i>	56

Figure 33. Identification biochimique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Figure 34. Pyramide évolutive et distributaire d'infection nosocomiale.....	58
Figure 35. Fréquences des souches isolées indiquées par prélèvements positifs.....	59
Figure 36. Fréquences des prélèvements positifs de chaque secteur médical.....	60
Figure 37. Fréquences des prélèvements positifs de chaque site de prélèvement.....	62
Figure 38. Ratios de chaque souche bactérienne isolée à hôpital d'El-Meghaier.....	64
Figure 39. Ratios des souches bactériennes isolées selon le secteur médical.....	66
Figure 40. Ratios des souches bactériennes isolées dans chaque site de prélèvement.....	68
Figure 41. Détection de la production de slime et formation de biofilm sur RCA.....	69
Figure 42. Ratios de formation de biofilm entre les souches bactériennes isolées.....	71
Figure 43. Formation de biofilm in vitro par technique TCP.....	74
Figure 44. Ordre des isolats formateurs de biofilm en termes de DO dans les 24 h.....	77
Figure 45. Evaluation des biofilms cliniques formés au cours du temps.....	77
Figure 46. Antibiogramme des souches isolées de l'environnement hospitalier.....	79
Figure 47. Dominance des bactéries multi-résistantes en l'environnement hospitalier.....	80
Figure 48. Effet d'ultraviolet sur la formation de biofilm clinique <i>in vitro</i>	82

Liste des abréviations

ACE: Adhésine du Collagène d'*E. faecalis*

ADH: Arginine DiHydrolase

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADP: Adénosine DiPhosphate

AHL: AcylHomosérines Lactones

AK: Amikacine

AMX: Amoxicillin

API: Appareils et Procédés d'Identification

ARN: Acide RiboNucléique

ATP: Adenosine TriPhosphate

BCP: Pourpre de BromoCrésol

BEA: Bile Esculine Agar

BGN: Bacilles à Gram Négative

BHI: Brain Heart Infusion agar

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

C: Chloramphenicol

CGP: Cocci à Gram Positif

CIT: CITrate de Simmons

CMI: Concentration Minimal Inhibitrice

CN: Gentamicine

CRF: Coagulase Reaction Factor

CVC: Cathéters Veineux Centraux

CZ: Cefazoline

DDL: Degré De Liberté

DNase: DésoxyriboNucléase

DO: Densité Optique

DSH: Différence Significative Honnête

E.c: *Escherichia coli*

E.f: *Enterococcus faecalis*

ECAD: *E. coli* à Adhésion Diffuse

ECEA: *E. coli* Entéro-Aggrégatifs

ECEH: *E. coli* Entéro-Hémorragiques

ECEI: *E. coli* Entéro-Invasifs
ECEP: *E. coli* Entéro-Pathogènes
ECET: *E. coli* Entéro-Toxinogènes
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPH: Etablissement Public Hospitalier
EPS: ExoPolySaccharide
ERV: Entérocoques Résistants à la Vancomycine
ESP: Enterococcique Surface Protéine
ETC: Electron Transport Chains
GEL: GELatine de Kohn
GN: Gélose Nutritive
HEA: Hektoen Entérique Agar
HIB: Acide HIPpurique
I: Intermédiaire
IAB: Infections Associées aux Biofilm
IBM-SPSS: International Business Machines-Statistical Package for the Social Sciences
IgG: Immunoglobulin G
IND: INDole
ISO: Infections du Site Opérateur
IUN: Infections Urinaires Nosocomiales
Lac⁻: Lactose Négatif
Lac⁺: Lactose Positif
LAP: Leucine AminoPeptidase
LDC: Lysine DéCarboxylase
LPS: LipoPolySaccharides
MAEC: Meningitis Associated *E. coli*
MEC: Matrice ExtraCellulaire
MLST: MultiLocus Sequence Typing
NAG: N-Acétyl-Glucosamine
NAM: N-Acétyl-Muramique
NIN: NINhydrine
Nit: Nitrate
NPV: Negative Predictive Value

ODC: Ornithine DéCarboxylase
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
ORL: Oto-Rhino-Laryngologie
OX: Oxacillin
P.a: *Pseudomonas aeruginosa*
P: Penicillin
PAL: Phosphatase ALcaline
PCR: Polymerase Chain Reaction
pH: Potentiel Hydrogène
PIA: Polysaccharide Intercellular Adhesin
PPV: Positive Predictive Value
PYRA: PYRrolidonyl Arylamidase
QS: Quorum Sensing
R: Résistante
RCA: Rouge Congo Agar
S.a: *Staphylococcus aureus*
S: Sensible
SARM: *Staphylococcus aureus* Résistante à la Méricilline
SASM: *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méricilline
SCN: *Staphylococcus* à Coagulase Négatifs
SCV: Small Colonies Variants
TCP: Plaque de Culture de Tissu
TDA: Tryptophane DésAminase
TRP: Tryptophane
UFC: Unité Formatrices des Colonies
UPEC: UroPathogenes *E. coli*
URE: Uréase
UV: Ultra-Violet
VP: Voges Proskauer
ZYM: Recherche d'activités enzymatiques
αGAL: α-galactosidase
βGAL: β-galactosidase
βGUR: β-glucuronidase

Table des matières

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	IV
Introduction.....	01

Partie I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Généralité sur le biofilm clinique

1. Histoire de découverte.....	03
2. Définition de biofilm.....	03
3. Facteurs favorisant et affectent la formation de biofilm.....	03
4. Propriétés d'un biofilm.....	04
5. Cycle de formation du biofilm.....	04
5.1. Attachement réversible.....	05
5.2. Attachement irréversible.....	05
5.3. Accumulation des microcolonies.....	05
5.4. Maturation du biofilm.....	06
5.5. Détachement et dispersion du biofilm.....	06
6. Quorum sensing.....	07
7. Emplacements des biofilms cliniques.....	07
8. Lutte contre le biofilm.....	07

Chapitre 2. Infection nosocomiale et les maladies bactériennes émergentes

1. Définition des infections nosocomiales.....	08
2. Epidémiologie des infections nosocomiales.....	08
3. Degrés de risque des secteurs médicaux.....	08
4. Principaux types des infections nosocomiales.....	09
4.1. Infections urinaires.....	09
4.2. Infections liées aux dispositifs médicaux.....	09
4.3. Endocardite infectieuse.....	09
4.4. Pneumopathie nosocomiales.....	09
4.5. Bactériémie nosocomiales.....	10
4.6. Autres infections nosocomiales.....	10
5. Quelques bactéries d'environnements médicales.....	10
5.1. Cocci à Gram positif.....	11

5.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
5.1.2. <i>Staphylococcus</i> à coagulase négatifs.....	11
5.1.3. <i>Streptococcus spp.</i>	11
5.1.4. <i>Enterococcus spp.</i>	11
5.2. Bacilles à Gram négative.....	12
5.2.1. <i>Escherichia coli</i>	12
5.2.2. <i>Klebsiella spp.</i>	12
5.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
5.2.4. <i>Legionella pneumophila</i>	13
6. Prévention contre les infections nosocomiales.....	13

Partie II. Expérimental

Chapitre 3. Matériel et méthodes

1. Présentation de lieu d'étude.....	14
2. Méthode d'échantillonnage.....	14
2.1. Sites de prélèvement.....	14
2.2. Équipements et produits d'étude.....	16
2.3. Réactifs.....	16
2.4. Méthode de prélèvement des échantillons.....	17
3. Préparation des milieux de culture.....	17
3.1. Milieux de culture liquide.....	17
3.1.1. Bouillon cœur cervelle.....	17
3.1.2. Bouillon nutritif.....	17
3.2. Milieux de culture solide.....	18
3.2.1. Gélose nutritive.....	18
3.2.2. Milieux Chapman.....	18
3.2.3. Gélose MacConkey.....	18
3.2.4. Milieu Hektoen.....	18
3.2.5. Milieu BCP.....	18
3.2.6. Gélose au sang frais.....	18
3.2.7. Milieu Muller-Hinton.....	19
4. Méthodes d'isolement des souches bactériennes.....	19
4.1. Pré-enrichissement.....	19
4.2. Enrichissement.....	19

4.3. Mise en culture et isolement.....	19
4.4. Purification des souches.....	20
4.5. Conservation des souches.....	20
5. Méthode d'identification des souches bactériennes.....	20
5.1. Identification macroscopique.....	20
5.1.1. Aspects macroscopiques clé pour les CGP.....	21
5.1.1.1. Mannitol-Sel.....	21
5.1.1.2. Test d'hémolyse.....	21
a. Hémolyse α	21
b. Hémolyse β	21
c. Hémolyse γ	21
5.1.2. Aspects macroscopiques clés pour les BGN.....	22
5.1.2.1. Fermentation de lactose.....	22
a. Lactose sur MacConkey.....	22
b. Lactose sur Hektoen.....	22
c. Lactose sur BCP.....	22
5.2. Identification microscopiques.....	23
5.2.1. Examen de l'état frais.....	23
5.2.2. Coloration de Gram.....	23
5.3. Identification biochimiques.....	24
5.3.1. Tests biochimiques classiques.....	24
5.3.1.1. Testes biochimiques clé pour les CGP.....	24
a. Test catalase.....	24
b. Test coagulase.....	25
c. Test DNase.....	25
d. Test d'agglutination.....	26
e. Test bile esculine.....	26
f. Test de pousse en NaCl.....	26
5.3.1.2. Tests biochimiques clé pour les BGN.....	27
a. Test oxydase.....	27
5.3.2. Galeries biochimiques miniaturisées.....	27
5.3.2.1. Galerie API 20 Staph.....	27
5.3.2.2. Galerie API 20 Strep.....	27

5.3.2.3. Galerie API 20 E.....	28
5.3.2.4. Galerie API 20 NE.....	28
5.3.2.5. Manipulation sur galerie API 20.....	28
6. Protocole générale d'identification.....	29
7. Technique de formation et détection de biofilm <i>in vitro</i>	31
7.1. Méthode de gélose rouge Congo.....	31
7.1.1. Réalisation de méthode RCA.....	31
7.1.2. Interprétation sur RCA.....	31
7.2. Technique de plaque de culture de tissu.....	32
7.2.1. Condition et choix de technique TCP.....	32
7.2.2. Démarche de technique TCP.....	32
7.2.3. Principe de lecture sur TCP.....	33
8. Méthode de comparaison biostatistique de biofilm clinique.....	34
8.1. Logiciel statistique IBM SPSS 20.....	34
8.2. Collection de données de RCA.....	34
8.3. Rassemblement des valeurs de densité optique de TCP.....	34
9. Application de quelques moyens de lutte.....	34
9.1. Antibiogramme.....	34
9.1.1. Réalisation d'antibiogramme.....	35
a. Bactérie sensible à l'antibiotique.....	36
b. Bactérie résistante à l'antibiotique.....	36
c. Bactérie intermédiaire à l'antibiotique.....	36
9.2. Rayonnement de l'ultraviolet.....	36
9.2.1. Procédure d'exposition à l'ultraviolet.....	36

Chapitre 4. Résultats et discussion

1. Résultats d'identifications macroscopiques.....	37
1.1. Aspect préliminaire sur gélose nutritive.....	37
1.2. Résultats de recherche des cocci à Gram positif.....	38
1.2.1. Aspect des staphylocoques.....	38
1.2.2. Aspect des entérocoques.....	40
1.3. Résultats de recherche des bacilles à Gram négatif.....	41
1.3.1. Aspect des entérobactéries.....	41
1.3.2. Aspect de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43

2.	Résultats d'identifications microscopiques.....	45
2.1.	Observation des mouvements bactériens.....	45
2.2.	Coloration différentiel de Gram.....	45
3.	Résultats des tests biochimiques.....	48
3.1.	Différenciation des tests biochimiques classique pour les CGP.....	48
3.1.1.	Décomposition du peroxyde d'hydrogène.....	48
3.1.2.	Coagulation de plasma.....	48
3.1.3.	Dépolymérisation d'ADN.....	50
3.1.4.	Agglutination dus à protéine A.....	50
3.1.5.	Hydrolyse de l'esculine biliaire.....	51
3.1.6.	Tolérance au milieu hypersalé.....	52
3.2.	Différenciation des tests biochimiques classique pour les BGN.....	53
3.2.1.	Détection de cytochrome oxydase.....	53
3.3.	Identifications biochimiques par le profil numérique.....	55
3.3.1.	Profil numérique de galerie API 20 Staph.....	55
3.3.2.	Profil numérique de galerie API 20 Strep.....	55
3.3.3.	Profil numérique de galerie API 20 E.....	56
3.3.4.	Profil numérique de galerie API 20 NE.....	57
4.	Taux des prélèvements.....	58
4.1.	Pyramide d'infection nosocomiale.....	58
4.2.	Fréquences des prélèvements positifs d'hôpital.....	59
4.3.	Fréquences des prélèvements positifs de chaque secteur médical.....	60
4.4.	Fréquences des prélèvements positifs de chaque site de prélèvement.....	62
4.5.	Ratios des souches bactériennes isolées.....	63
4.5.1.	Réparties en l'environnement hospitalier.....	63
4.5.2.	Réparties en chaque secteur médical.....	65
4.5.3.	Réparties en chaque site de prélèvement.....	67
5.	Résultats de détection de biofilm <i>in vitro</i>	69
5.1.	Biofilm par méthode gélose rouge Congo.....	69
5.1.1.	Aspect de biofilm sur RCA.....	69
5.1.2.	Ratios des biofilms formés sur RCA.....	71
5.1.3.	Comparaison biostatistique de biofilm sur RCA.....	72
5.2.	Biofilm par technique de plaque de culture tissulaire.....	74

5.2.1. Quantification de biofilm par TCP.....	74
5.2.2. Comparaison biostatistique de biofilm sur TCP.....	75
6. Résultats d'antibiogrammes.....	79
7. Effet de l'ultraviolet.....	82
Conclusion.....	83
Liste des références.....	85
Annexes.....	
Résumés.....	

Introduction

Introduction

Les hôpitaux, bien que fournis pour la prévention et le traitement ils sont parfois la cause des infections. Au cours des 20 dernières années, l'infection nosocomiale ou les infections liées aux soins est devenu un problème majeur de santé publique aux niveaux mondial, notamment les infections urinaires et néonatales, opératoires et cutanées, les infections nasales, pneumonies et bactériémies.

En l'Algérie, le taux de prévalence des infections nosocomiales en 2010 atteindre 13 %, où il était plus faible dans les centres hospitalo-universitaires comparé aux l'établissement public hospitalier (**Amazian et al., 2010**). La lutte contre ces infections est bien organisée dans les pays développés comparé par les pays de faible niveau socio-économique qui souffrent pour la majorité une absence de réglementation et du manque de données représentatives de surveillance. Les premières sources de cette infection sont les biofilms qui jouent un rôle écologique très important ainsi qu'en microbiologie clinique et médecine.

Les infections microbiennes humaines qui sont associées à la formation de biofilm a été estimé de vaut 75 % (**Miquel et al., 2016**), et la raison de cela est susceptible des difficultés diagnostiques et thérapeutiques avec un mode chronique au cours d'infection et des symptômes retardée. Les biofilms associés aux secteurs médicaux peuvent être abordés sous trois angles différents. Premièrement, les biofilms directement liés aux surfaces tissulaires peuvent être distingués pour les professionnels de la santé, les visiteurs et les patients. Ces biofilms dans la cavité buccale sur les dents, dans le tube digestif et le tractus génital féminin. En plus, il existe des biofilms associés aux biomatériaux implantés dans le corps humain comme les lentilles ou bien les valves cardiaque et les pièces additionné au genou. Les biomatériaux médicaux sont fabriqués à partir d'une variété des matériaux différents comme l'ivoire, l'or, l'argent, le plastique ou le verre avec une large gamme de propriétés mécaniques et de surface. Ainsi que matériels hospitalières de travaille et l'ambulance sont donc fréquemment colonisés par des microorganismes. Aussi, on peut distinguer également les biofilms qui ne sont pas directement associés à la santé, ces biofilms se produisent dans tous les coins de l'environnement hospitalier par exemple dans les systèmes de distribution d'eau ou dans les systèmes de refroidissement et de climatisation.

Les bactéries qui forment le biofilm sont en deux états ou modes de vie, on trouve des cellules libres en amas ou en suspension appelée état planctonique et des cellules qui adhèrent à des surfaces appelées état sessile, ces derniers sont considérées comme les plus courantes.

La présence de bactéries varie à travers l'hôpital qui forme une niche écologique à la fois quantitativement et qualitativement, cela affecte toujours le côté sain. De nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif forment des colonies capables de propager l'infection aux personnes ou l'équipement. Le biofilm bactérien cause une transmission permanente d'infection hospitalière, ce qui en fait un sujet d'étude et d'analyse important.

Le but principal de cette étude est la surveillance de la santé de la communauté hospitalière et la fourniture de conditions de soins pour limiter la propagation des infections nosocomiales, c'est aussi une dimension de la réforme hospitalière et la devise principale du ministère de santé algérienne.

Dans notre travail, on choisit deux types de bactéries l'une sont des cocci à Gram positive et l'autre des bacilles à Gram négatif, ils étaient isolés à partir de l'établissement public hospitalier d'El-Meghaier pour l'évaluation de formation de biofilm clinique *in vitro* quantitativement et qualitativement par la mesure de densité optique et sa capacité de formation, on propose une méthode de comparaison afin de contribuer au développement du diagnostic biostatistique du biofilm à l'origine des infections hospitalières. Pour cela nous nous sommes fixés plusieurs objectifs:

- Isolement et identification des échantillons hospitaliers;
- Etude épidémiologique des infections nosocomiales;
- Evaluation de biofilm *in vitro* par deux méthodes RCA et TCP;
- Comparaison biostatistique de biofilm formé entre deux types bactériens;
- Application de quelques moyens de lutte.

Partie

II

Synthèse bibliographique

Chapitre

1

Généralité sur le biofilm clinique

1. Histoire de découverte

La découverte des biofilms microbiens est attribuée à l'inventeur du microscope Antonie Van Leeuwenhoek en 1683 (**figure 01**), qui observa la présence des communautés des microorganismes appelé «animalcule» à la surface de ses propres dents (**Donlan, 2002**).

Zobell en 1936 montra que surfaces solides bénéfiques au développement des bactéries, et la quantité de bactéries fixées sur un substrat est largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide.

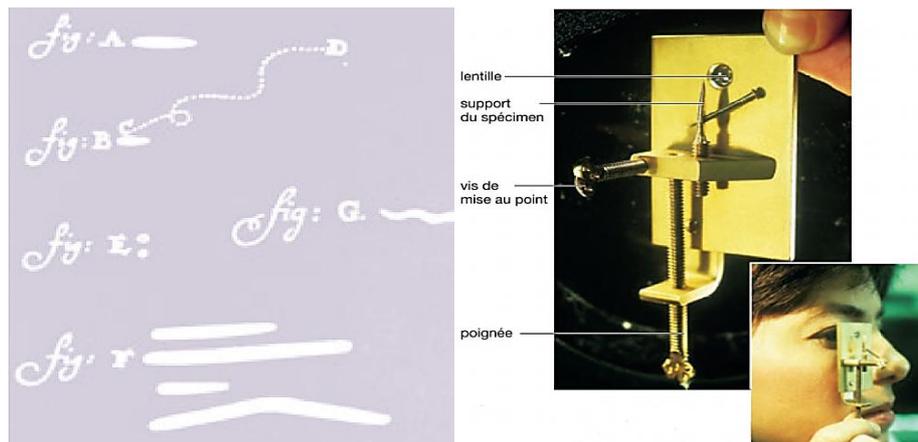


Figure 01. Microorganismes de biofilm observé par Leeuwenhoek.

2. Définition de biofilm

Communautés complexes des micro-organismes attachés à une surface ou à une interface enfermée dans une matrice d'exopolysaccharide (EPS) d'origine microbienne (**Filloux et Vallet, 2003**), qui forme une structure tridimensionnelle organisée spatialement. Il est peut être constitué d'une ou plusieurs couches composé chez laquelle constitué d'une ou plusieurs espèces des microorganismes (**Behlau et Gilmore, 2008**). Les biofilms bactériens clinique se développant sur des implants ou lors d'infections chroniques constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections nosocomiales (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

3. Facteurs favorisant et affectent la formation de biofilm

Outre que les propriétés des bactéries et sa proximité avec l'attachement surface, la nature de la surface de fixation a également un rôle important dans le processus d'adhésion. Certaines des propriétés de surface importantes qui déterminent les bactéries la fixation comprend la charge de surface, l'énergie libre de surface, la rugosité, l'hydrophobicité et la rigidité (**Song et al., 2015**). Parmi les conditions qui affectent sur le développement du biofilm aux certaines valeurs sont la température, le pH, les niveaux d'O₂, l'hydrodynamique, l'osmolarité, la présence d'ions spécifiques, de nutriments, croissance ralentie et de facteurs dérivés de l'environnement biotique (**Goller, 2008**).

4. Propriétés d'un biofilm

Les bactéries qui se développent dans les biofilms ont un certain nombre de propriétés qui les distinguent des populations planctoniques (**tableau 01**). Dans les biofilms médicaux, il peut être plus approprié de décrire un biofilm par les propriétés phénotypiques et physiologiques microbiennes plutôt que par la structure, les biofilms se caractérisent par leurs populations microbiennes qui s'adaptent rapidement à de nouveaux environnements et en présentant une large gamme de phénotypes (**Jass *et al.*, 2003**).

Tableau 01. Caractéristiques de biofilm bactérien clinique (**Jass *et al.*, 2003**).

Fonctionnalité	La description
Protection	<ul style="list-style-type: none"> • De la défense de l'hôte et prédateurs. • Des agents antimicrobiens (taux de croissance lent, mauvaise pénétration, phénotype modifié).
Acquisition des nutriments	<ul style="list-style-type: none"> • Dessiccation des nutriments (phénomène de surface, piégeage des nutriments). • Hétérogénéité microbienne et environnementale pour coopération métabolique. • Hétérogénéité spatiale à optimiser le transport de sous-produits et augmenter l'afflux de nutriments.
Nouveaux traits	<ul style="list-style-type: none"> • Plasticité phénotypique (nouvelle expression génique et phénotype bactérien). • Transfert génétique entre les organismes. • Mutation due à la sélection.
Communication intercellulaire	<ul style="list-style-type: none"> • QS (communication dépendant de la densité) • Communication interspécifique

5. Cycle de formation du biofilm

La formation de biofilm est un processus dynamique complexe (**O'Toole *et al.*, 2000**). Les surfaces sont normalement conditionnées avec de l'eau, des lipides, une matrice polymère extracellulaire ou d'autres nutriments provenant du milieu environnant (**Dunne, 2002**).

Le biofilm mature est le site de gradients inverses en nutriments et O₂ et en déchets définissant des niches physiques et chimiques. Il peut se disperser et libérer des bactéries

mobiles ou des agrégats bactériens entourés de matrice (**Filloux et Vallet, 2003**). La formation se fait généralement en cinq étapes (**figure 02**) :

5.1. Attachement réversible

L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement (**Filloux et Vallet, 2003**). Une fois à la surface, différents processus physiques, chimiques et biologiques ont lieu au cours de cette interaction initiale entre la cellule bactérienne et la surface. Sur la surface abiotique, l'attachement primaire entre les bactéries et la surface est généralement avec médiation par des interactions non spécifiques telles que électrostatique, hydrophobe ou forces de van der Waals, alors que l'adhérence à la surface biotique comme les tissus est à travers moléculaire spécifique (lectine ou adhésine) par mécanismes d'accostage (**Dunne, 2002**).

5.2. Attachement irréversible

Après la liaison à la surface à travers la matrice exopolymères, les cellules bactériennes commencent le processus d'adhésion irréversible, de prolifération et d'accumulation en tant que cellule multicouche grappes. Ces matrices extracellulaires, composées d'un mélange de matériaux tels que les polysaccharides, les protéines, les acides nucléiques et d'autres substances sont considérés comme essentiel dans la cimentation des cellules bactériennes ensemble dans la structure du biofilm, en aidant à piège et conserve les nutriments pour la croissance du biofilm, et dans la protection des cellules de la déshydratation et les effets des agents antimicrobiens. Les flagelles, pili et lipopolysaccharides (LPS) constituent des éléments clés dans la mise en place de la phase d'adhésion irréversible (**Costerton, 2001**).

5.3. Accumulation des microcolonies

La bactérie fonde une microcolonie qui produit une matrice extracellulaire et qui peut accueillir d'autres espèces bactériennes par accréation (**Lebeaux et Ghigo, 2012**). Les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'exopolysaccharide (EPS) et être utilisé par les bactéries (**Filloux et Vallet, 2003**). La formation des agrégats de microcolonies générer des interactions significatives tel que l'échange de substrats, produits, inhibiteurs, déploiement de molécules de signaux entre eux. La densité cellulaire, la taille et la géométrie de l'agrégat et son activité métabolique conduisent à des barrières de diffusion, qui peuvent être minimales ou suffisamment provoquer des changements importants dans sa biologie. Le plus souvent, en raison de sa faible solubilité dans eau et taux élevé d'utilisation par les bactéries, un fort gradient de tension en oxygène se développe ce qui peut conduire à des régions anoxiques et à la prolifération d'espèces anaérobies (**Allison et al., 2000**).

5.4. Maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation des canaux aqueux et des pores entre les microcolonies, permettant l'acheminement d'oxygène et des nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Filloux et Vallet, 2003**). Un biofilm est constitué de 85 % de matrice extracellulaire et de 15 % de microorganismes (**Bahlau et Gilmore, 2008**). La matrice extracellulaire (MEC) est principalement constituée 97 % d'eau. Autres substances souvent présentes dans la matrice du biofilm comprennent l'ADN, l'ARN, les protéines et les enzymes atteignant des niveaux d'environ 2 % au total (**Sutherland, 2001**).

5.5. Détachement et dispersion du biofilm

Les cellules bactériennes détachées du biofilm reviennent à l'état planctonique et peuvent rattacher aux zones vierges et initier un nouveau cycle de formation de biofilm. La carence nutritionnelle est le facteur déclencheur du phénomène poussant les bactéries à trouver un milieu plus favorable (**O'Toole et al., 2000**).

Il peut se disperser activement et libérer des bactéries mobiles ou peut s'effectuer passivement via l'action de stress hydrodynamique (**Lebeaux et Ghigo, 2012**). Le détachement passif d'un groupe de cellules se fait par l'action de flux ou des forces selon trois modes différents:

- Erosion (détachement continu de cellules individuelles ou de petits agrégats).
- Relargage (détachement massif et rapide de quantités importantes de bactéries).
- Abrasion (détachement par collision de particules).

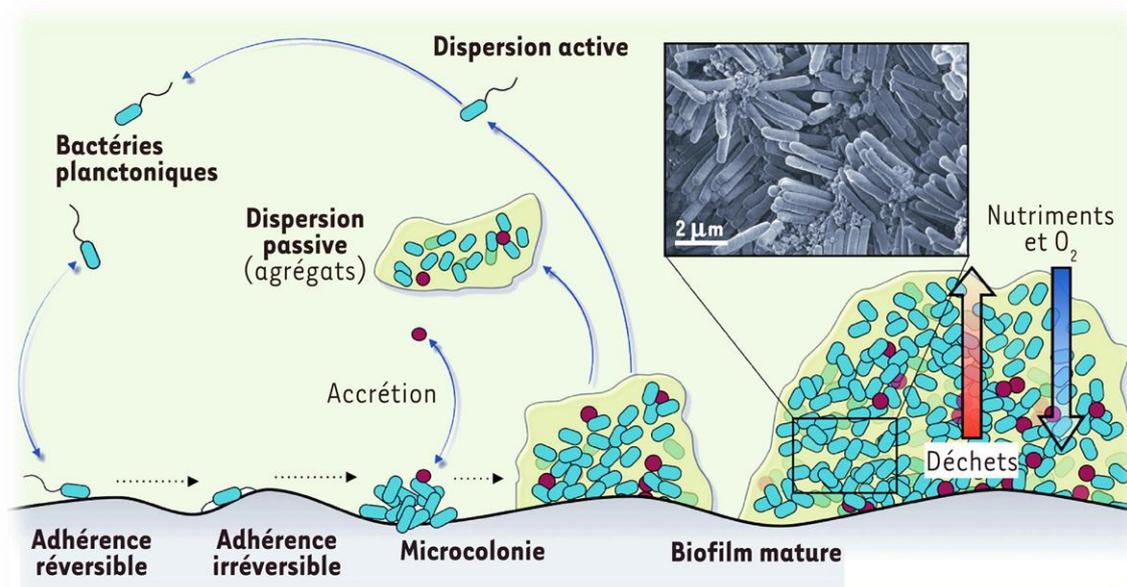


Figure 02. Développement d'un biofilm clinique bactérien (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

6. Quorum sensing

Dans certaines conditions environnementales, les bactéries peuvent afficher une réponse collective à l'environnement et démontrer le même comportement, ce qui est indicatif de la communication entre les individus de la population (**Riedel *et al.*, 2001**). Cette forme de communication autrement appelée quorum-sensing (QS) et dépend des signaux de densité cellulaire (**Iglewski, 2000**). Généralement de nombreuses espèces bactériennes à Gram négatif utilisent les acylhomosérines lactones (AHL) comme molécule de signalisation, tandis que d'autres ont des molécules différentes qui n'ont pas encore été identifiées. Les bactéries à Gram positif utilisent principalement un traitement post-transcriptionnel des peptides comme auto-inducteurs ou des γ -butyrolactones (**Wai-Leung et Bassler, 2009**).

7. Emplacements des biofilms cliniques

Les biofilms peuvent se former sur les surfaces biotiques et abiotiques. Les infections associées aux biofilms (IAB) sont généralement classées comme des infections associées aux dispositifs médicaux et des infections associées aux tissus (**Høiby *et al.*, 2014**). Dans certains cas, les hôtes peuvent souffrir des deux types d'infections, en raison de l'autre. La principale différence entre les deux types est que les infections associées aux tissus n'impliquent pas de surface de corps étranger. Les exemples courants incluent les infections associées aux biofilms des dents, tractus gastro-intestinaux, vagin et peau. De plus, le biofilm dans les infections des plaies et les poumons infectés des patients atteints de mucoviscidose sont également considérés comme des biofilms tissulaires. IAB dans les dispositifs médicaux tels que cathéters, divers implants chirurgicaux, prothèses valvulaires cardiaques, donc il faut améliorer le diagnostic et le traitement des infections à biofilm (**Seneviratne, 2017**).

8. Lutte contre le biofilm

L'antibiofilm a pour but d'immuniser un individu contre certains antigènes bactériens exprimés lors de l'adhésion initiale (adhésines) ou dans le biofilm mature (matrices polysaccharidiques) afin d'empêcher le développement du biofilm (**Pflumm, 2011**). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que cette approche liée à l'antibiofilm réduit le risque de colonisation et d'infection des voies urinaires en ciblant les adhésines impliquées dans les souches uropathogènes d'*E. coli* et plusieurs vaccins ciblant *S. aureus* ou *S. epidermidis* sont en cours d'évaluation (**Ebert *et al.*, 2011**). Les vaccins pourraient concerner des patients pour lesquels l'implantation d'un matériel tel qu'un stimulateur cardiaque, une valve cardiaque mécanique ou une prothèse articulaire est prévue, ou chez des patients à risque d'infection chronique comme mucoviscidose et infection urinaire (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

Infection nosocomiale et les maladies bactériennes émergentes

1. Définition des infections nosocomiales

Le terme "nosocomial" à l'origine du grec ancien, "nosos" signifier maladie et "komein" signifier soins qui forment le mot "nosokomia". Les infections qui surviennent pour les patients hospitalisés sont appelées infections nosocomiales et certains l'appellent les infections associées aux soins de santé ou infection acquise, ce développe après 48 h de séjour à l'hôpital et représente un délai supérieur à la période d'incubation (**Bearman *et al.*, 2014**), les infections contractées par le personnel, les visiteurs de l'hôpital ou autre établissement de santé peuvent aussi être considérées comme des infections nosocomiales (**Ducel *et al.*, 2008**).

2. Epidémiologie des infections nosocomiales

La santé est une priorité élevée pour toute société et les infections restent une des principales causes des maladies. De telles ces infections acquises entraînent une morbidité, une mortalité et un fardeau économique importants au-delà de ceux attendus des seules maladies sous-jacentes des patients. Dans le monde occidental, le taux d'infection associé aux soins de santé est de 5 à 10 % infections pour 100 admissions de patients. Dans les pays en développement, le taux peut atteindre 25 % ou plus. Certains hôpitaux préfèrent mesurer le nombre de personnes infectées pour 100 admissions. D'autres préfèrent additionner la durée totale d'hospitalisation en jours pour tous les patients sur une période donnée et signaler le nombre d'infections par 1000 jours-patients (**Bearman *et al.*, 2014**). Les infections nosocomiales peuvent être envisagées en tant qu'endémiques ou épidémiques, ces derniers sont les plus répandues (**Ducel *et al.*, 2008**).

3. Degrés de risque des secteurs médicaux

Il est utile de stratifier les secteurs de soins en fonction du risque d'acquisition d'une infection parmi la population de patients. Pour certains services, tels que l'oncologie, la néonatalogie, les soins intensifs et les unités de transplantation, il peut être souhaitable de prévoir une ventilation spéciale.

De même, dans une unité centrale de stérilisation ou une cuisine d'hôpital les zones contaminées ne doivent pas présenter de risque pour les zones non contaminées et les patients infectés doivent être séparés des patients immunodéprimés. On a quatre degrés de risque en secteurs médicales (**Ducel *et al.*, 2008**):

- **Secteurs à faible risque:** par exemple services administratifs.
- **Secteurs à risque modéré:** par exemple services de patients ordinaires.
- **Secteurs à haut risque:** par exemple unités d'isolement, unités de soins intensifs.
- **Secteurs à très haut risque:** par exemple salles d'opération.

4. Principaux types des infections nosocomiales

Les infections hospitalières varient selon le lieu d'infection biotique ou abiotique, l'agent causal et les maladies qui les provoquent (**figure 03**), on a de nombreux aspects que les bactéries peuvent coloniser et se développer en infections temporaires ou chroniques. Parmi les infections hospitalières courantes on a:

4.1. Infections urinaires

Les infections urinaires nosocomiales (IUN) sont dominées par les infections survenant après sondage ou plus rarement après d'autres manœuvres instrumentales. Ces situations bouleversent les mécanismes physiologiques de défense, de telle sorte que des microorganismes sans facteur de virulence spécifique pour l'arbre urinaire peuvent induire une infection (**Caron, 2003**). Des souches d'*E. coli* uropathogènes sont coloniser les cellules de l'épithélium vésical et de former de larges agrégats intracellulaires entourés d'une matrice correspondant à un biofilm qui constituerait le réservoir de bactéries pathogènes cystites et pyélonéphrites (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

4.2. Infections liées aux dispositifs médicaux

Tous les dispositifs médicaux implantés sont concernés par le risque de contamination microbienne et de survenue d'une infection. La fréquence de cette complication varie d'un type de dispositif à un autre, lorsque des micro-organismes adhèrent à la prothèse médicale à demeure ou implantée. Si des conditions favorables prévalent, l'adhérence conduit à la formation de biofilm sur ces surfaces qui entraîne un dysfonctionnement du dispositif et des conséquences désastreuses pour l'hôte (**Lebeaux et al., 2014**). Le risque de colonisation n'est jamais nul du fait de possibles contaminations par voie hématogène ou par contact avec milieux extérieur et constituent des réservoirs bactériens à l'origine d'infections liées aux soins (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

4.3. Endocardite infectieuse

L'endocardite infectieuse est une pathologie qui n'a cessé d'évoluer sur le plan diagnostique et thérapeutique depuis sa première description clinique par William Osler à la fin du XIXe siècle. Le profil épidémiologique et microbiologique de l'endocardite infectieuse a été transformé ces dernières années par l'évolution des pratiques médicales et par les changements démographiques dans les pays du nord. Elle correspond au développement d'un biofilm localisé aux valves cardiaques (**Parize, 2011**).

4.4. Pneumopathie nosocomiales

Les pneumopathies nosocomiales restent à l'origine d'une importante morbidité et mortalité, malgré les progrès en antibiothérapie (**Chastre et Fagon, 2002**). Le diagnostic de

pneumopathie nosocomiale est suspecté lorsque le patient présente des infiltrats nouveaux ou progressifs sur la radiographie pulmonaire avec des signes d'infection telles que la fièvre, sécrétions trachéales purulentes, hyperleucocytose (Allaouchiche et Boselli, 2005).

4.5. Bactériémie nosocomiales

Les bactériémies ne représentent qu'une faible proportion des infections nosocomiales (environ 5 %) mais possèdent un taux de létalité élevé plus de 50 % pour certains micro-organismes. L'infection peut se développer au point d'insertion cutané d'un dispositif intravasculaire ou sur le trajet sous-cutané d'un cathéter (Ducel *et al.*, 2008).

4.6. Autres infections nosocomiales

Les infections oto-rhino-laryngologie (ORL), infection buccodentaires (carie ou stomatite) et des infections des plaies avec des complications cutanées liées au diabète impliquent également le développement des infections associées à un biofilm polymicrobien et chroniques (Lebeaux et Ghigo, 2012).

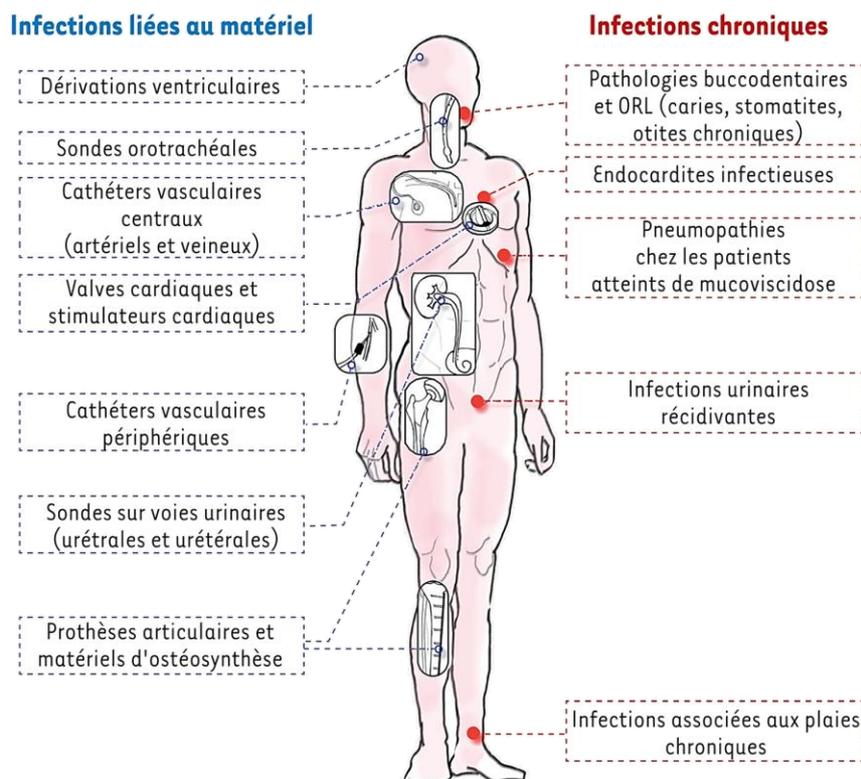


Figure 03. Infections associées au dispositif et chroniques (Lebeaux et Ghigo, 2012).

5. Quelques bactéries d'environnements médicales

Les surfaces de l'environnement hospitalier peuvent être colonisées par des bactéries multirésistantes et la surveillance microbiologique de ces surfaces doit faire partie intégrante de la prévention des infections nosocomiales (Méité *et al.*, 2010). Parmi ces bactéries on a :

5.1. Cocci à Gram positif

Les cocci à Gram positif (CGP) sont un groupe hétérogène d'organismes définis par leur apparence morphologique et font partie de la flore normale de toutes les surfaces cutanéo-muqueuses et sont souvent isolées des infections telles que les abcès des organes profonds, la septicémie obstétricale et gynécologique ainsi que les infections intra-orales.

5.1.1. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des CGP qui se groupent en amas. Une espèce, *Staphylococcus aureus* ou *S. doré*, tient une place très importante dans les infections communautaires et des épidémies nosocomiales. La bactérie cultive facilement sur les milieux usuels et aussi sur des milieux riches en NaCl. Elle possède une enzyme coagulase et DNase positive. La transmission interhumaine s'opère par contact direct (manuportage) ou indirecte par les vêtements, la literie ou les aliments (Nauciel et Vildé, 2007).

5.1.2. *Staphylococcus* à coagulase négatifs

Les SCN (*S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. capitis* et *S. auricularis*) sont trouvées de façon constante sur la peau ou les muqueuses des orifices naturels. Les staphylocoques à coagulase négatifs ne sont identifiés complètement que lorsque les circonstances de leur isolement indiquent qu'ils sont potentiellement en situation de jouer un rôle de pathogène. Aujourd'hui les espèces *S. epidermidis* (le plus important des SCN) et *S. saprophyticus* sont des opportunistes potentiellement pathogènes (Gillespie et Bamford, 2012).

5.1.3. *Streptococcus spp.*

Les streptocoques sont classés en fonction de leur groupe sérologique et de caractères biochimiques et hémorragique, ce sont des cocci Gram positif. Le *S. pyogenes* groupe A est responsable d'infections courantes pharyngées ou cutanées de la scarlatine et plus rarement d'infections invasives ou de complications post-infectieuses. Le *S. agalactiae* de groupe B est surtout responsable d'infections néo-natales. Ils peuvent être responsables d'infections diverses et surtout d'endocardites et une place très importante dans la pathologie infectieuse communautaire (Nauciel et Vildé, 2007). Les humains sont le seul hôte de *S. pneumoniae* qui est généralement asymptomatique. Les sérotypes *S. pneumoniae* varient selon les pays, temps et groupe de sujets. Elle est la principale cause de pneumonie et de méningite d'origine communautaire chez les enfants (Gillespie et Bamford, 2012).

5.1.4. *Enterococcus spp.*

Le genre *Enterococcus* est constitué de cocci à Gram positif groupés par paires ou en courtes chaînettes. Il se distingue du genre *Streptococcus* par des caractères génotypiques et par sa capacité à cultiver sur des milieux hostiles. Les espèces le plus fréquemment isolées

chez l'homme sont *E. faecalis* et *E. faecium*. Il repose sur l'isolement de la bactérie au site de l'infection ou par hémoculture (Nauciel et Vildé, 2007).

5.2. Bacilles à Gram négative

Les bacilles à Gram négative (BGN) sont un groupe hétérogène d'organismes définis par leur apparence morphologique. Un certain nombre de bacilles à Gram négatif de l'environnement se comportent comme des bactéries opportunistes et sont souvent à l'origine d'infections nosocomiales. Parmi lesquels:

5.2.1. *Escherichia coli*

L'*E. coli* peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers. Elle est la bactérie le plus souvent en cause dans les infections urinaires, les infections néonatale. Les souches responsables d'infections intestinales par différents mécanismes entéropathogènes, entérotoxinogènes, entéro-invasifs, entéroagréants et *E.coli* à adhérence diffuse. Le diagnostic repose sur l'isolement de la bactérie au site de l'infection (Nauciel et Vildé, 2007).

5.2.2. *Klebsiella spp.*

L'infection par *Klebsiella spp.* est généralement acquis dans l'environnement hospitalier. Ces organismes sont une cause importante de pneumonie associée au ventilateur, d'infection des voies urinaires, d'infection des plaies et de bactériémie. L'infection flambées en situation de forte dépendance des patients ont été décrits et sont associés à une septicémie et une mortalité élevée. La maladie la plus courante causée par la bactérie *Klebsiella* à l'extérieur de l'hôpital est la pneumonie grave d'origine communautaire, associée à un mauvais pronostic. Le traitement de la pneumonie se fait par des antibiotiques tels que les aminosides et les céphalosporines. L'espèce *K. rhinoscleromatis* provoque une infection granulomateuse progressive des voies nasales et les environnantes muqueuses. La plupart des infections se trouvent sous les tropiques et *K. ozanae* a été associée à des maladies chroniques bronchectasie (Gillespie et Bamford, 2012).

5.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Le *P. aeruginosa* ou bacille pyocyanique mobiles à ciliature polaire se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies. Elle peut provoquer principalement la maladie de mucoviscidose et des infections urinaires, des infections bronchiques, des infections oculaires, des infections ostéo-articulaires. La bactérie produit plusieurs toxines cytotoxiques deux hémolysines et l'exotoxine a dont le mode d'action est similaire à celui de la toxine diphtérique. La pression de sélection des antibiotiques en milieu hospitalier augmente le risque de colonisation qui rend la bactérie multirésistante (Nauciel et Vildé, 2007).

5.2.4. *Legionella pneumophila*

Ce sont des bacilles à Gram négatif, mobiles, aérobies, elles ne cultivent que sur un milieu spécifique. Elles sont très répandues dans l'environnement hydrique surtout les eaux chaudes et dans les biofilms. La transmission à l'homme se fait par l'inhalation d'aérosols contaminés. En milieu hospitalier la contamination peut aussi résulter du rinçage à l'eau courante de matériels mis en contact direct ou indirect avec les voies respiratoires sondes, humidificateurs, appareils à aérosols. La maladie des légionnaires se traduit par une pneumopathie souvent sévère et survient surtout chez des sujets immunodéprimés et caractérisent par son résistantes aux β -lactamines, mais sensibles aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine. Les cas de légionellose surviennent de manière sporadique ou bien sous forme d'épidémies plus ou moins importantes. (Nauciel et Vildé, 2007).

6. Prévention contre les infections nosocomiales

La prévention des infections nosocomiales passe par l'ensemble des personnes et des services impliqués dans les soins de santé. Chacun doit contribuer à réduire le risque d'infection à la fois pour les patients et pour le personnel. Le concept de prévention englobe le personnel soignant, la direction, l'implantation de l'établissement, la fourniture du matériel et des produits, et la formation des agents de santé. Pour être efficaces, les programmes de lutte contre les infections nosocomiales doivent être très complets et porter aussi bien sur les activités de surveillance et de prévention que sur la formation du personnel. Ils doivent aussi bénéficier d'un soutien effectif au niveau national et régional, la prévention des infections nosocomiales nécessite un programme intégré, contrôlé pour les différents niveaux de risque infectieux dont les éléments suivants (Ducel *et al.*, 2008):

- Limiter la transmission d'agents microbiens de patient à patient pendant les activités de soins directs par le lavage adéquat des mains et le port de gants, et en observant des pratiques et stratégies d'asepsie, d'isolement, de stérilisation, de désinfection et de blanchisserie appropriées.
- Maîtriser les risques infectieux liés à l'environnement et protéger les patients par l'usage approprié d'anti-infectieux, par l'alimentation et les vaccinations.
- Limiter le risque d'infection endogène par la réduction des gestes invasifs et par la promotion d'un usage optimal des anti-infectieux surveiller les infections, identifier et maîtriser les flambées et assurer la prévention des infections chez les membres du personnel et les patients ainsi que les visiteurs.
- Renforcer les pratiques de soins et assurer la formation continue du personnel.

Partie

III

Expérimentale

Matériel et méthodes

1. Présentation de lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au niveau de l'établissement public hospitalier (EPH) DEBAKH Saïd d'El-Meghaier pour la première fois à propos du biofilm de secteur médical, où tout le travail de laboratoire a été appliqué (**annexe 01**).

El-Meghaier est une ville algérienne à la région d'Oued Righ et nouvelle wilaya selon le décret présidentielle n° 15-140 du 27 mai 2015, elle est divisée en 8 communes (El-Meghaier, Oum Thiour, Stil, Sidi Khelil, Tindela, Djamaâ, Merara, Sidi Omran). El-Meghaier est délimitée au nord par la wilaya de Biskra, à l'est par la wilaya d'El Oued, à l'ouest par la wilaya d'Ouled Djellal et au sud par la wilaya de Touggourt et d'Ourgla (**figure 04**).

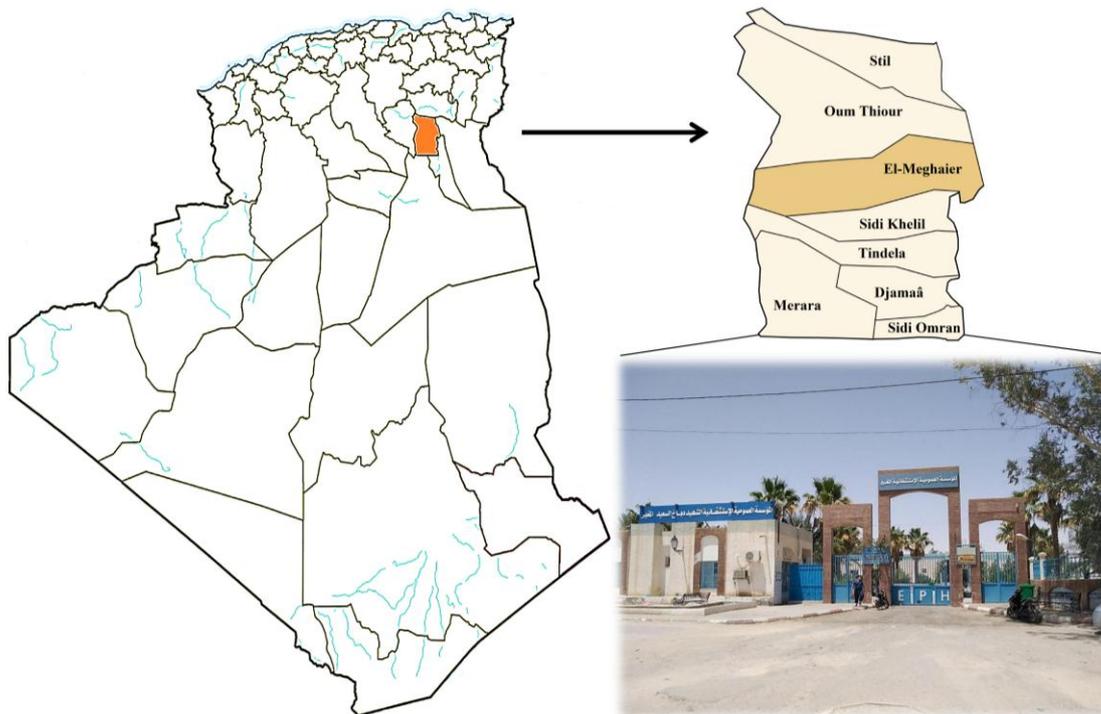


Figure 04. Carte géographique et hôpital d'El-Meghaier.

2. Méthode d'échantillonnage

2.1. Sites de prélèvement

Le type d'hôpital le plus connu en l'Algérie est l'établissement public hospitalier comme EPH DEBAKH Saïd d'El-Meghaier, il contient généralement deux parties administratives et médicales, qui offrent des services de santé gratuits. Parmi lesquels, des cas d'urgence et réanimation tels que l'étouffement et l'asthme, la fièvre, l'amygdalite, les fractures osseuses, brûlures, les accidents et crises cardiaques avec un laboratoire des analyses médicale. De plus, le service maternité et de pédiatrie avec néonatalogie, ainsi que médecine homme et femme avec la médecine interne, bloc opératoire et salle de réveil, laboratoire central, unité de

stérilisation et des salles dans lesquelles les patients résident quelques jours, la cuisine et service des cadavres et blanchiment. Tout cela forme un environnement hospitalier diversifié pour l'échantillonnage.

Des échantillons ont été prélevés dans 6 services hospitaliers à raison de 3 échantillons pour chacun, c'est-à-dire 18 échantillons à partir des sites sèche et humide. Ils ont été réalisés au niveau des services suivants (**figure 05**):

- Pédiatrie et néonatalogie
- Médecine femmes
- Médecine hommes
- Urgence
- Bloc opératoire
- Maternité



Figure 05. Quelques services hospitaliers. **A:** Urgence, **B:** Bloc opératoire, **C:** Pédiatrie

Les échantillons ont été prélevés après avoir observé les endroits les plus soupçonnés de contenir l'infection par la formation du biofilm autour de lui ou bien les lieux que les travailleurs et les patients consultaient fréquemment. Les prélèvements ont concerné:

- Poignée de porte
- Sol
- Paillasse
- Table fixe
- Avabo
- Chariot
- Instruments opératoires
- Lits

Dans le cadre d'un programme efficace de lutte contre les infections nosocomiales, le laboratoire de microbiologie peut être appelé à réaliser des cultures de divers sites environnementaux (surface, l'eau, l'air). Les recommandations pour le contrôle des infections environnementales ont été largement discutées, l'environnement est impliqué dans la transmission de la maladie chez les patients immunodéprimés. Il y a des moments où ils deviennent un élément important et souvent nécessaire d'un programme de contrôle des infections qui affecte le laboratoire de microbiologie. L'objectif du transport des échantillons directement vers le laboratoire est de maintenir l'échantillon aussi près que possible de son état d'origine avec détérioration minimale et pour éviter tout risque pour le manipulateur d'échantillons (**Connie et Donald, 2019**).

2.2. Équipements et produits d'étude

On utilise le matériel et les produits microbiologiques standards pour l'échantillonnage, l'isolment, la sélectivité et l'identification ainsi que la conservation des souches (**annexe 02**), toutes ces étapes nécessitent de travailler dans un endroit stérile avec l'eau de Javel et une hotte microbiologique. À chaque fois nous utilisons un outil doit être jeté après avoir pris les résultats pour maintenir un travail cohérent hors de doute. L'expérience doit être répétée plusieurs fois et en gardant les bactéries que nous recherchons dans un étuve spécial et des conditions de croissent optimal.

2.3. Réactifs

- Voges Proskauer (VP1 et VP2)
- Nitrate (Nit1 et Nit 2) ± poudre de zinc
- ZYM A et ZYM B
- Kovacs (JAMES)
- Ninhydrine (NIN)
- Tryptophane désaminase (TDA)
- Standard de McFarland
- Disques d'oxydase
- Eau oxygénée (H₂O₂)
- Huile de paraffine
- Plasma de sang
- Ethanol
- Chlorure de sodium (NaCl)
- Chlorure d'hydrogène (HCl)

2.4. Méthode de prélèvement des échantillons

L'écouvillon doit être rempli d'eau physiologique stérile en laboratoire et placé dans un support. Nous visitons les services hospitaliers à partir desquels les échantillons seront prélevés de la manière suivante:

- Ouvert l'écouvillon et se retirer progressivement, en exerçant une légère pression sur le coton imbibé d'eau physiologique.
- Déplacé l'écouvillon sur la surface du site choisi verticalement et horizontalement sur laquelle la couleur du coton passe du blanc au jaune sale.
- On remet l'écouvillon dans le tube en une position modérée et on le ferme.

Nous faisons de même avec d'autres emplacements secs et humides, puis transférons les échantillons directement au laboratoire. Des gants et des masques doivent être portés pendant l'échantillonnage pour éviter la contamination. Pour entrer dans le bloc opératoire, il est nécessaire de porter un vêtement spécial sur le tablier (**Leboffe et Pierce, 2011**).

3. Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture (liquide et solide) servent de support pour la croissance des micro-organismes en leur apportant les éléments essentiels à leur bon développement. Ils sont utilisés dans plusieurs domaines notamment l'environnement et médical. Il existe de nombreux types dans lesquels ils diffèrent en compositions et en propriétés tels que milieu de culture empirique, sélectif, enrichi et différentiel. Dans cette étude, ont été choisis les milieux de culture appropriés suivants (**annexe 03**):

3.1. Milieux de culture liquide

3.1.1. Bouillon cœur cerveau

Le bouillon cœur cerveau (BHIB) est un milieu culture liquide, polyvalent riche en produits d'origine naturelle (empirique) utilisé pour la culture des germes exigeants et la recherche de la coagulase libre et la DNase thermostable des *Staphylococcus*. Il peut aussi servir dans la recherche d'*enterococcus*. Le milieu en flacons ou tubes se conserve entre 15 et 25 °C (**Connie et Donald, 2019**). On utilise ce milieu dans cette étude pour évaluation de biofilm sur les 96 puits de microplaque et pour préparer le milieu RCA.

3.1.2. Bouillon nutritif

C'est un milieu de culture liquide largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants et pour conservation des souches. Le milieu en flacons ou tubes se conserve entre 15 et 25 °C. Ce milieu se caractérise par la survie des bactéries par une période plus longue par rapport au milieu solide.

3.2. Milieux de culture solide

3.2.1. Gélose nutritive

La gélose nutritive ordinaire (GN) est un milieu solide d'isolement non-sélectif. Sur la gélose nutritive, on observe un nombre des colonies différentes. Il permet de séparer des micro-organismes dans un mélange qui pourront être ainsi étudiés individuellement.

3.2.2. Milieux Chapman

C'est un milieu d'isolement sélectif, différentiel et semi-synthétique des bactéries du genre *Staphylococcus* (bactéries halophiles) cultivant en milieu hypersalé avec la présence de chlorure de sodium et le rouge de phénol (Connie et Donald, 2019).

3.2.3. Gélose MacConkey

La gélose MacConkey est un milieu sélectif et différentiel contient le cristal violet, les sels biliaires et l'indicateur de pH le rouge neutre pour l'isolement des bacilles à Gram négatif qui fermentent certains sucres et d'éliminer les bactéries à Gram positif, la gélose MacConkey est employée entre autres pour la culture des entérobactéries et du *Pseudomonas aeruginosa* qui ont la capacité de fermenter le lactose monohydraté (Connie et Donald, 2019).

3.2.4. Milieu Hektoen

Un milieu d'isolement de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu différentiel. L'identification d'entérobactéries pathogènes repose sur le non utilisation des glucides (salicine, saccharose et le lactose) présents dans le milieu. Deux indicateurs sont présents dans le milieu, l'indicateur de pH le bleu de bromothymol et la fuschine acide qui se colore en présence d'aldéhyde (Connie et Donald, 2019). On observe alors une teinte saumonée si la souche utilise un ou plusieurs des glucides présents.

3.2.5. Milieu BCP

Gélose pourpre de bromocrésol (BCP) est un milieu non sélectif utilisé pour la détection et l'isolement des *Enterobacteriaceae* et des bacilles à Gram négatif non exigeants dans l'eau, l'urine et les selles. Ce milieu différentiel comportant un indicateur de pH qui facilite la différenciation des colonies par le caractère lactose (Gillespie et Hawkey, 2006).

3.2.6. Gélose au sang frais

L'hémolysine est une toxine qui joue un rôle important dans la pathogénicité. La gélose au sang frais est un milieu riche non sélectif pour l'isolement des bactéries exigeantes quel que soit leur métabolisme. C'est une gélose contenant des globules rouges du sang de mouton, l'hémolyse est un critère d'orientation, notamment pour des différentes espèces de *Streptocoques* et d'*Enterococcus* (Leboffe et Pierce, 2011).

3.2.7. Gélose Muller-Hinton

C'est une gélose non sélectif et riche pour la réalisation d'antibiogramme standard, il permet de tester l'action des antibiotiques sur les bactéries non exigeantes par l'ensemencement en nappe (Gillespie et Hawkey, 2006).

4. Méthodes d'isolement des souches bactériennes

Les échantillons prélevés contiennent de nombreux micro-organismes, nous le mélangeons par vortex pour homogénéiser l'inoculum et nous passons par des étapes pour isoler les bactéries que nous recherchons, et toutes leurs conditions doivent être respectées pour obtenir des isolats purs, nous appliquons une série de techniques suivantes:

4.1. Pré-enrichissement

Nous effectuons un pré-enrichissement pour permettre aux micro-organismes de se développer, en particulier ceux affectés par des facteurs de stress tels que la température, en plaçant les échantillons dans des tubes de bouillon nutritif et les maintenons à une température de 37 °C sur un court temps d'incubation de moins de 24 h.

4.2. Enrichissement

L'enrichissement a pour but de faciliter la détermination de la présence des microorganismes dans les échantillons prélevés et les développer pour obtenir le plus grand nombre afin d'assurer leur présence et de faciliter leur étude (Leboffe et Pierce, 2011).

Pour cela, nous réalisons en plaçant chaque écouvillon dans un tube contenant le bouillon nutritif et en le laissant dans l'incubateur pendant 24 h à 37 °C. Tous les échantillons sont numérotés, un code est établi vers l'endroit d'où l'échantillon a été prélevé.

4.3. Mise en culture et isolement

Après la dilution en séries, l'isolement permet de séparer une ou plusieurs souches contenues dans un mélange. Onensemencer la suspension diluée de 1: 100 à la surface d'un milieu solide la gélose nutritive de manière suivante (Leboffe et Pierce, 2011):

- Stérilisez une anse en platine ou une pipette Pasteur par la flamme de bec benzène et prenez une suspension bactérienne à partir d'un bouillon nutritif enrichi après 24 h.
- Ouvrir la boîte de pétri et déposer la pointe de l'anse ou de la pipette au point de départ.
- Nous déplaçons l'anse de platine de point de départ, on formant des stries serrées sans rayer la gélose, faisant tourner la boîte à chaque fois pour trouver des endroits ensemencés où les micro-organismes sont répartis différemment.
- Stériliser l'anse ou jeter la pipette, refermer la boîte et la déposer dans l'étuve chez lequel le couvercle est au bas.

Pendant l'incubation 24 h à 37 °C, chaque micro-organisme déposé se multiplie pour donner un clone de cellules identiques. Lorsque les micro-organismes sont suffisamment éloignés, le clone se développe abondamment pour produire une colonie (**figure 06**).

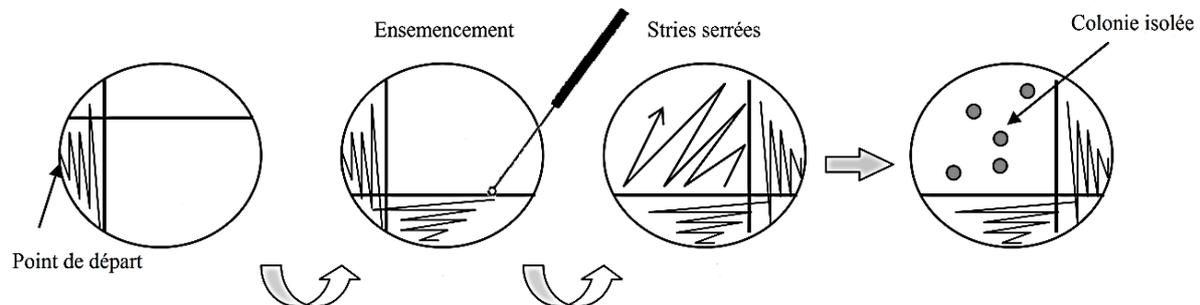


Figure 06. Isolement des souches sur gélose nutritive.

4.4. Purification des souches

Après 24 h de culture en gélose nutritive, nous réensemencions différentes colonies de chaque échantillon dans des milieux de culture sélectifs et différentiels avec une anse de platine ou pipette Pasteur afin d'obtenir des bactéries complètement pures, nous lisons les données des différents milieux de culture en fonction de ses caractéristiques spécifique (**Connie et Donald, 2019**) où nous avons distribué les colonies de 18 échantillons pour chaque milieu et laissé incubé au l'étuve pendant 24 h à 37 °C.

4.5. Conservation des souches

Nous conservons des souches pendant toute la durée de cette étude. Les souches sont cultivées dans des tubes contenant la gélose nutritive pendant 24 h 37 °C, puis ils sont conservés au réfrigérateur à 4 °C pour que nous puissions réutiliser plus tard.

5. Méthode d'identification des souches bactériennes

Pour déterminer les souches bactériennes, nous passons plusieurs examens à travers les changements qui se produisent dans le milieu de culture et l'observation en microscope optique, ainsi que les résultats de leur interaction avec un groupe de réactifs. Nous classons ces examens en:

5.1. Identification macroscopique

Les observations macroscopiques sont la première étape dans l'identification des souches en lisant les résultats dans les différents milieux de culture après 24 h, où nous prenons une information préliminaire sur la forme, le bord, la couleur, l'élévation, la taille des colonies bactériennes qui caractérisent une souche (**figure 07**).

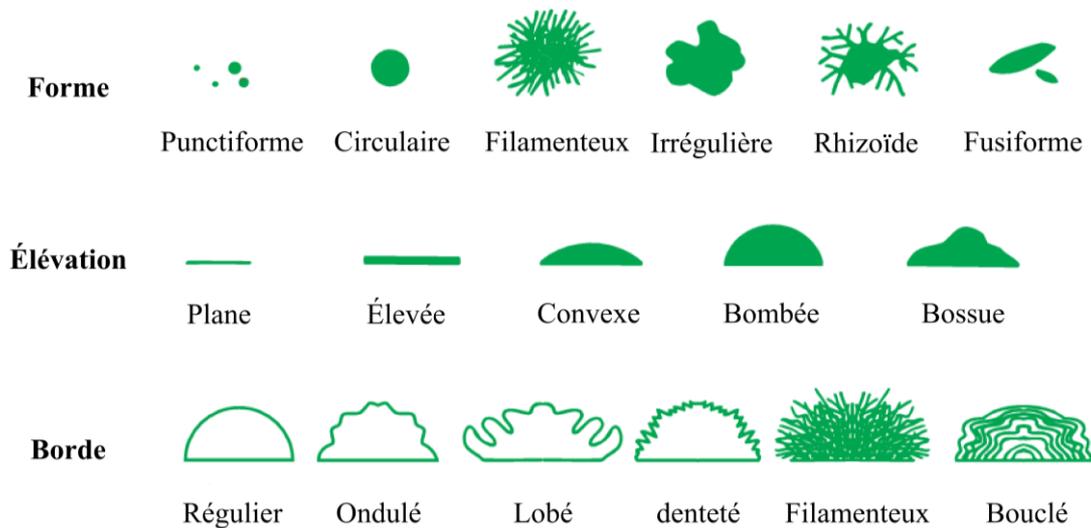


Figure 07. Différents aspect des colonies sur les milieux des cultures (Willey *et al.*, 2008).

5.1.1. Aspects macroscopiques clé pour les CGP

Il existe de nombreux milieux de culture différents pour identifier les isolats de *Staphylococcus* et de *Streptococcus* à travers plusieurs propriétés macroscopiques dans le boîte de pétri permis laquelle:

5.1.1.1. Mannitol-Sel

Le milieu Chapman ou (mannitol-sel) contient le chlorure de sodium qui rend cela milieu sélectif pour les staphylocoques puisque la plupart des autres bactéries ne peut survivre à ce niveau de salinité. Le halo jaune autour des colonie de *S. aureus* est dû à la fermentation du mannitol avec des produits acides finaux (Leboffe et Pierce, 2011). La fermentation du mannitol révélé grâce au virage de l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol).

5.1.1.2. Test d'hémolyse

Le test d'hémolyse sur gélose au sang frais est un critère de sélection très important en milieu clinique (figure 08). Il est utilisé pour différentier les souches de *Streptococcus* et d'*Enterococcus* et la recherche de l'activité hémolytique (Leboffe et Pierce, 2011). Après une incubation de 24 h à 37°C, on trouve trois types d'hémolyse (Gillespie et Hawkey, 2006):

- a. **Hémolyse α :** en cas d'hémolyse partielle, qui distingue la souche *Streptococcus pneumoniae* le plus abondant et *S. viridans*, *S. mutans*, *S. sanguin*.
- b. **Hémolyse β :** en cas d'hémolyse complète, qui distingue la souche *Streptococcus agalactiae* de group B le plus courant et *S. pyogenes* de group A.
- c. **Hémolyse γ :** qui se caractérise par l'absence d'hémolyse, qui distingue deux souches soit *Enterococcus faecalis* de group D ou bien *Enterococcus faecium*. La confirmation des souches a été réalisée par galerie api 20 Strep.

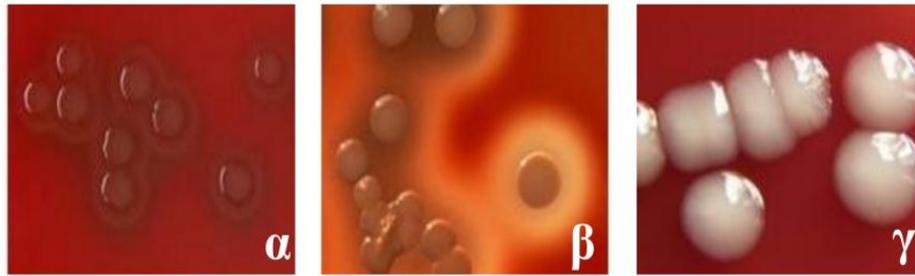


Figure 08. Différents types d'hémolyse (α , β et γ) sur gélose au sang frais.

5.1.2. Aspects macroscopiques clés pour les BGN

Il existe des milieux de culture pour les bactéries Gram négatives qui contiennent des inhibiteurs pour empêcher la croissance des bactéries Gram positives, qui ont des caractéristiques qui nous permettent de les différencier macroscopiquement:

5.1.2.1. Fermentation de lactose

Nous avons utilisé trois milieux implantaires qui permettent de différencier les isolats en fermentant le lactose. Les milieux de culture diffèrent en lisant les résultats de la fermentation du lactose sur eux, mais ils donnent plus de validation du résultat, ils sont:

- a. **Lactose sur MacConkey:** le pH de rouge neutre fait la différence entre Gram négatif fermentant et non fermentant le lactose par la couleur de la croissance coloniale rose ou clair en cas de *Pseudomonase aeruginosa* et d'*E. coli* (**figure 09**).
- b. **Lactose sur Hektoen:** la gélose entérique Hektoen (HEA) a un couleur vert et contient des indicateurs de la fermentation du lactose, des colonies jaune saumon chez *E. coli* et des colonies vert à bleuâtre avec oxydase positive chez *Pseudomonase aeruginosa* par exemple (**Bailey et Scott's, 2014**).
- c. **Lactose sur BCP:** Ce milieu a une couleur violette et devient jaune si le lactose au milieu est fermenté par les bactéries.

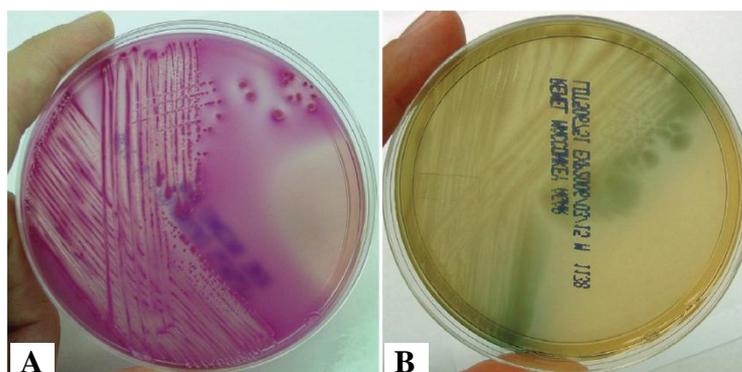


Figure 09. A: *E. coli* lac⁺, B: *P. aeruginosa* lac⁻ en MacConkey (**Bailey et Scott's, 2014**).

5.2. Identification microscopiques

Les méthodes mettant en évidence les bactéries dans leur intégralité sont fondées principalement sur les techniques de microscopie en absence de coloration ou après la coloration, on a plusieurs techniques:

5.2.1. Examen de l'état frais

La technique de l'état frais correspond à l'observation d'une suspension bactérienne entre lame et lamelle sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool à l'objectif x40, avec cette technique nous pouvons observer le mouvement des bactéries. En fonction de la mobilité observée si elle est présente, on peut classer le type de ciliature de la bactérie. On a des parties décrivent mouvement de bactéries polaires monotriches, et les parties décrivent les mouvements de bactéries péritriches, ce qui oriente sur la bactérie en cause.

5.2.2. Coloration de Gram

En 1884, le médecin danois Hans Christian Gram développe une technique de coloration qui différencier les cellules bactériennes dans le tissu pulmonaire malade. La coloration de Gram est un outil de diagnostic précieux utilisé en milieu clinique et de recherche. Bien que plus récent des techniques moléculaires ont été développées, la coloration de Gram est encore une méthode largement utilisée pour l'identification des bactéries inconnues et dans certains cas, il peut fournir une identification présomptive de l'organisme. Il est possible de faire la différence entre les bactéries à Gram positives et à Gram négatives (**figure 10**), car il est considéré comme un moyen principal de classer les bactéries (**Brown et Smith, 2015**). Les étapes de coloration de Gram sont (**annexe 04**):

- **Coloration primaire:** couvrir un frottis fixé à la chaleur avec violet de Gentien et laisser reposer 30 secondes.
- Laver brièvement la tâche à l'aide d'une pissette de lavage d'eau distillée et égoutter l'excès d'eau.
- **Mordantage:** couvrir le frottis avec la solution lugol et laisser reposer 1 minute.
- Laver le lugol par l'eau distillée.
- **Décoloration:** ajouter l'alcool pendant 15 secondes, mais peut augmenter la période, en notant la dissolution de la couleur de tache sur la lame.
- Arrêter la décoloration en lavant la lame avec l'eau distillée.
- **Contre coloration:** Couvrir le frottis par fuschine pendant 1 minute.
- Laver pendant quelques secondes, sécher avec du papier absorbant et laissé à l'air.
- Examinez la lame avec une goutte d'huile à immersion sous l'objectif x100.

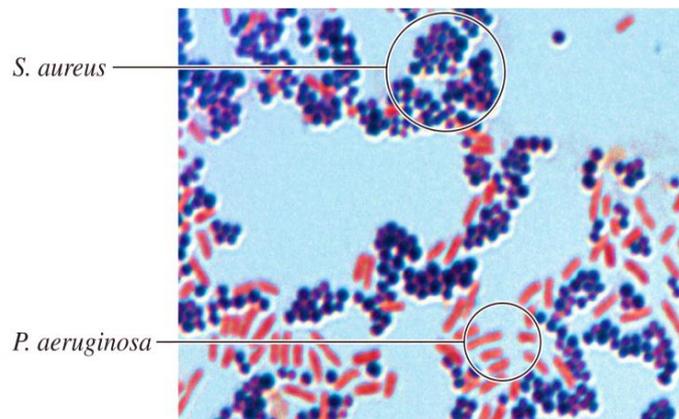


Figure 10. Coloration de Gram pour quelques bactéries (Brown et Smith, 2015).

5.3. Identification biochimiques

Les bactéries se distinguent entre elles par des propriétés biochimiques qui aident au diagnostic et à l'identification microbiologiques grâce à un ensemble de tests qui révèlent une partie de l'identité des bactéries telles que leurs enzymes, substrats, composants de surface et sécrétions ... etc. La méthode de réalisation de ces tests varie selon les exigences et la méthode de travail.

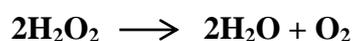
5.3.1. Tests biochimiques classiques

Les tests biochimiques classiques sont effectués dans des tubes à essai prêts à l'emploi avec un milieu approprié pour la détection ou bien sur la lame ou en présence des disques révélateurs, comme suit:

5.3.1.1. Testes biochimiques clé pour les CGP

a. Test catalase

La catalase est une enzyme appartenant à la catégorie des oxydoréductases qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène et en eau. Cette enzyme utilise les groupes hème et manganèse comme cofacteur (Leboffe et Pierce, 2011).



Placer une goutte de H_2O_2 sur une lame propre, puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prise directement avec une pipette pasteur ou une anse de platine.

- Si on observe la formation des bulles d'air, les bactéries ont un enzyme catalase.
- Si n'est rien observation, la bactérie n'a pas d'enzyme catalase.

Ce test a pour but de différencier les bactéries à Gram positive, Les bactéries des genres *Staphylococcus* ont un catalase positif tandis que les bactéries des genres *Enterococcus*, *Streptococcus*, possèdent un catalase négatif. La plupart des bactéries à Gram négatif ont une catalase positif et la recherche de catalase sur ce type de bactérie est donc sans intérêt.

b. Test coagulase

Le fait que 97 % des souches de *S. aureus* sont coagulase positive et que les autres espèces sont toujours coagulase négative rend le test de coagulase un excellent test définitif pour confirmer l'identification de *S. aureus* (**Brown et Smith, 2015**).

Le test de la coagulase consiste à inoculer un petit tube de plasma avec plusieurs boucles de l'organisme et l'incuber à 37 °C pendant plusieurs heures. Si le plasma se coagule (forme un caillot), l'organisme est coagulase positive. La coagulation peut se produire en 30 minutes ou plusieurs heures plus tard. Tout degré de coagulation, d'un caillot meuble en suspension dans le plasma à un caillot solide et inamovible, est considéré comme un résultat positif, même si cela prend 24 h. La méthode comme suit (**Brown et Smith, 2015**):

- Etiqueter les tubes à plasma en fonction des boîtes contenant des colonies ressemblant à des staphylocoques.
- Avec une anse de platine, ensemercer le tube approprié de plasma avec des organismes des colonies.
- Fermer les tubes et placer dans un bain marie à 37 °C.
- Vérifier la solidification du plasma tous les 30 minutes pour le reste de la période.

Ce test est valable uniquement pour les bactéries à Gram positives ressemblant à des *staphylocoques* car certains bacilles à Gram négatifs, tels que *Pseudomonas*, peuvent provoquer une réaction faussement positive. Le mécanisme de coagulation dans ces organismes n'est pas dû à coagulase.

c. Test DNase

Une enzyme qui catalyse la dépolymérisation de l'ADN en petits fragments est appelé désoxyribonucléase (DNase). Le fait que les bactéries à coagulase positive sont également capables hydrolyser l'ADN fait du test de DNase un outil fiable de confirmer l'identification de *S. aureus*. Le colorant vert de méthyle et ADN polymérisé forment un complexe qui donne la gélose une couleur bleu-vert. La capacité de produire cette enzyme peut être déterminé en cultivant un inoculum par l'ensemencement d'une ligne de 3 à 4 cm de long du bord de boîte au centre et en observant un organisme sur une boîte contient gélose de test DNase et incubée 24 h à 37 °C (**Connie et Donald, 2019**).

Lors de l'utilisation de la gélose DNase sans l'indicateur, inonder la boîte avec l'acide chlorhydrique (HCl) (**annexe 02**). Laisser reposer la boîte pendant quelques minutes pour permettre au réactif d'absorber dans la gélose. Décanter l'excès d'acide chlorhydrique puis examiner la boîte dans les 5 minutes sur un fond sombre.

d. Test d'agglutination

Des réactifs d'agglutination ont été développés, permettant une détection plus rapide et plus fiable de *Staphylococcus aureus*. Ces tests d'agglutination sont constitués de latex sensibilisé par du fibrinogène et des IgG afin de détecter le facteur d'affinité pour le fibrinogène et la protéine A, qui sont des protéines caractéristiques de *S. aureus*. Une étude de ces souches a montré qu'elles possédaient toutes des polysaccharides capsulaires. Les particules de latex sensibilisées uniquement par le fibrinogène et les IgG.

- Homogénéiser le réactif latex à l'aide d'un vortex.
- Déposé une goutte de réactif latex dans un des cercles de la carte d'agglutination.
- Prélever une colonie de CGP et catalase⁺ avec une anse de platine stérile, puis les émulsionner avec une goutte de latex pendant 10 seconds.
- Homogénéiser en effectuant un mouvement rotatif de la carte. La lecture doit se faire pendant les 30 secondes qui suivent le début des mouvements rotatifs de la carte.
- Effectuer la lecture, puis jeter la carte dans un récipient désinfectant, ne pas réutiliser.

Une réaction est positive lorsqu'il y a formation d'agrégats uniquement avec le latex test, visibles à l'œil nu sous un éclairage normal, en moins de 30 secondes.

e. Test bile esculine

La gélose bile esculine (BEA) est un milieu de culture sélective et différentielle en tube contenant extrait de bœuf et la gélatine qui fournit des nutriments et de l'énergie (**annexe 02**). La bile est l'agent sélectif ajouté pour séparer le groupe d'entérocoques d'autres streptocoques, du citrate ferrique est ajouté comme source de fer oxydé pour indiquer un test positif de bile esculine (**Connie et Donald, 2019**). Dans ce test et après 24 h à 37 °C, lorsque les molécules d'esculine sont scindées, l'esculétine réagit avec le Fe³⁺ du citrate ferrique et forme un précipité brun foncé dans ce cas est la bile esculine positive par contre les bactéries qui ne s'assombrit pas le milieu est considéré comme bile esculine négatif.

f. Test de pousse en NaCl

On teste la croissance des bactéries dans un milieu de culture en tube contenant bouillon BHIB avec 6.5 % de NaCl (**annexe 02**), les entérocoques sont tous capables de se développer en milieu hypersalé contrairement aux streptocoques. Les organismes tolérants au sel produiront une forte croissance dans les 24 h. Des colonies bactériennes ont été prélevées et inoculées dans des tubes de BHIB hypersalé avec ou sans l'indicateur BCP et incubées 24 h à 37 °C. Si le milieu sans indicateur, un trouble indique une croissance bactérienne et un changement de couleur du violet au jaune si on utilise l'indicateur (**Bailey et Scott's, 2014**).

5.3.1.2. Tests biochimiques classique pour les BGN

a. Test oxydase

Une oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction. Le test de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries à Gram négative qui produisent cette enzyme. Les Disques oxydase sont des disques de papier absorbant imprégnés de N, N, N', N'-tetraméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride. En présence de cytochrome oxydase, le N,N,N',N'-tetraméthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (incolore) forme un composé coloré en bleu (**Bailey et Scott's, 2014**).

- Placer un disque d'oxydase sur une lame à l'aide un pince stérile.
- Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester.
- Prélever la colonie choisie à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration.

Si la réaction est positive, la coloration bleu foncé à violet apparaissant dans une 30 secondes tandis qu'en la réaction négatif n'observe aucun changement de coloration.

5.3.2. Galeries biochimiques miniaturisés

Les galeries API ou également appelées galeries biochimiques miniaturisés se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tubule contient un substrat défini et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment (**Brown et Smith, 2015**). On a plusieurs types:

5.3.2.1. Galerie API 20 Staph

Galerie API 20 Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* comprenant des tests biochimiques miniaturisés et comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne et les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**annexe 05**).

5.3.2.2. Galerie API 20 Strep

Galerie API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des *streptocoques*, *entérocoques* et pour les germes apparentés les plus courants. La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré (**annexe 06**).

5.3.2.3. Galerie API 20 E

Galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* comprennent un bon nombre des agents pathogènes les plus connus tels que *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* et *Shigella* et autres bacilles à Gram négatif. La galerie API 20 E comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, la lecture des résultats positifs et négatifs se réalise par l'observation de changement de couleurs des tubules qui traduit l'occurrence ou l'absence de la réaction (**annexe 07**).

5.3.2.4. Galerie API 20 NE

Galerie API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux comme *pseudomonas*, comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. La lecture des résultats positifs et négatifs se réalise par l'observation des 8 tests conventionnels par le virage de couleurs et 12 tests d'assimilation par le présent de trouble ou non sur les tubules, où les bactéries cultivent seulement capable d'utiliser le substrat correspondant (**annexe 08**).

5.3.2.5. Manipulation sur galerie API 20

La technique de manipulation et de remplir des galeries API 20 selon son type nécessite un champ stérile autour de bec benzène (**annexe 09**), comme suit (**Brown et Smith, 2015**):

- A l'avance, préparer l'inoculum ou le standard de McFarland 0.5 à l'aide d'une anse de platine stérile, retirer une seule colonie bien isolée de la boîte et émulsionner complètement dans un tube de suspension moyenne ou une solution saline stérile NaCl à 0.85 % de 5 ml et on mélange par vortex.
- Premièrement, Remplir le support de la galerie par quelques gouttes d'eau pour créer une atmosphère humide et met le couvercle par-dessus.
- Deuxièmement, à l'aide d'une anse de platine stérile déposer une suspension bactérienne dans chacun des tubules de la galerie. Pour éviter la formation des bulles d'air au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

- Ensuite, remplir les tubules des caractères encadrés CIT, VP et GEL ... etc par la suspension bactérienne jusqu'à la cupule on former un ménisque convexe.
- De plus, crée un microenvironnement anaérobie on remplir les cupules des caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE ... etc par l'huile de paraffine.

Après 24 h à 37 °C, mettre une goutte des réactifs suivants dans le tubule correspondant selon le type de la galerie et les tests qui y sont présentés (**tableau 02**).

Les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun par ordre. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives ou négatives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique, en collectant les résultats positifs pour chaque triple (**Leboffe et Pierce, 2011**).

L'identification a été réalisée à l'aide d'une liste des profils d'identification de galerie ou logiciel d'identification *apiweb*TM, on entré le profil numérique à 7 chiffres.

Tableau 02. Liste des tests qui nécessitent des réactifs en galerie API 20.

Tests	Réactifs de révélation
NIT	NIT 1 et NIT 2
NO ₃	
TRP	Kovacs (JAMES)
IND	
VP	VP 1 et VP 2
PAL	
LAP	
PYRA	ZYM A et ZYM B
αGAL	
βGAL	
βGUR	
TDA	TDA
HIB	NIN

6. Protocole générale d'identification

La coloration de Gram, les tests biochimiques spéciaux et les milieux illustrés permettent à un microbiologiste de détecter les différences entre les bactéries. Ces procédures spécifiquement pour isoler les BGN pathogènes et les CGP à partir d'échantillons de secteurs médicaux environnementaux contenant un mélange de micro-organismes (**figure 11**).



Figure 11. Protocole d'identification des CGP et BGN.

7. Technique de formation et détection de biofilm *in vitro*

Les approches expérimentales classiques pour étudier les micro-organismes ne conviennent pas pour étudier leur mode de vie complexe de biofilm. Ces dernières années, les chercheurs ont donc développé différents modèles expérimentaux combinant analyse moléculaire et microscopie. Plusieurs tests qualitatifs et quantitatifs pour la détection de biofilms, parmi eux:

7.1. Méthode de gélose rouge Congo

La méthode du rouge Congo agar (RCA) a été proposée par Freeman en 1998 pour former et détecter le biofilm de manière qualitative par l'observation phénotypique de différent biofilm formé. La méthode rouge Congo agar était rapide, plus sensible, reproductible et qu'il avait l'avantage des colonies restant viable sur le milieu.

7.1.1. Réalisation de méthode RCA

La formation de biofilm *in vitro* nécessite l'utilisation d'un milieu enrichi, dans ce cas la gélose de rouge Congo est un milieu contenant 1l de gélose cœur cervelle (BHI) qui a été complété avec 5 % saccharose et rouge Congo. Le médium était composé de BHI (37 g / l), saccharose (50 g / l), le rouge du Congo (0.8 g / l) et gélose n°1 (10 g / l). Le rouge Congo a été préparé comme solution aqueuse concentrée et autoclave à 121 °C pendant 15 minutes, séparément des autres constituants moyens et il a ensuite été ajouté lorsque la gélose avait refroidi à 55 °C. Les boîtes de pétri ont été inoculées avec une anse de platine, d'une suspension à tester et incubées en aérobie pendant 24 h à 37 °C (Niveditha *et al.*, 2012), l'expérience a été répétée trois fois.

7.1.2. Interprétation sur RCA

L'interprétation repose sur la détection de la production de slime. La détection des productions de biofilm par la méthode de rouge Congo agar étaient basées sur amélioration de la production d'exopolysaccharides (Niveditha *et al.*, 2012). On a différents aspects qui expliquent le degré de formation de biofilm (figure 12).



Figure 12. Quelques différents aspects de biofilm par méthode RCA (Rózańska *et al.*, 2017).

Une souche à un biofilm positif a été indiquée par des colonies noires avec une consistance cristalline sèche et l'absence de morphologie coloniale. Les souches à faibles productions de slime sont généralement restés rose ou rouge avec un aspect lisse et considéré comme biofilm négatif (Bellifa *et al.*, 2016).

7.2. Technique de plaque de culture de tissu

La technique de plaque de culture de tissu a pour but d'évaluer semi quantitativement la formation de biofilm. La technique de TCP présente une forte corrélation et a été très satisfaisant termes de détection de phénotypes positifs au biofilm, avec une discrimination aisée entre producteurs et non producteurs forts, modérés ou faibles, mais les producteurs faibles étaient difficiles à distinguer des isolats à biofilm négatif (Oliveira et Cunha, 2008).

7.2.1. Condition et choix de technique TCP

Les plaques pour la culture du biofilm doivent être des plaques stériles de microtitrage en tissu de polystyrène à 96 puits à fond plat avec couvercle. Le processus de formation du biofilm commence par la fixation initiale des bactéries à une surface, qui est affecté par un certain nombre de facteurs, y compris les caractéristiques de la surface à laquelle adhèrent les bactéries. Il existe différents types de plaques de microtitration conçus à des fins différentes. La plaque de microtitration préparée pour la culture tissulaire implique que sa surface était spécialement traitée pour permettre une excellente fixation cellulaire et prolifération. Certaines souches produisent uniquement du biofilm sur des plaques de culture tissulaire, et de nombreuses souches présentent une positivité du biofilm plus faible sur des plaques de microtitration de culture non tissulaire. De plus, les perturbations et les chutes dans les morceaux de la couche de biofilm pendant la procédure de lavage est plus faible dans le microtitrage traité par culture tissulaire assiettes (Stepanovic *et al.*, 2007).

7.2.2. Démarche de technique TCP

Des souches ont été cultivées pendant 18 h à 37 °C dans bouillon BHIB supplémenté avec 5 % de saccharose. La culture a été diluée 1: 100 dans un milieu frais de BHIB supplémenté aussi avec 5 % de saccharose. Des puits individuels de plaques de culture tissulaire stériles en polystyrène à 96 puits à fond plat ont été inoculés par 200 µl de BHIB diluée et ensuite incubés. Les puits de contrôle négatifs (témoin) contiennent 200 µl du BHIB seulement et supplémenté avec 5 % de saccharose par puits (Ngongang *et al.*, 2019).

Après 24 h d'incubation à 37 °C, le contenu de chaque puits a été retiré par décantation et lavé 4 fois par l'eau physiologique stérile pour éliminer le flottement de bactérie libre «planctonique». Les cellules adhérentes attachées «sessiles» à chaque puits ont été teint avec 0.1 % de cristal violet pendant 10 min. La plaque a été lavée deux fois par l'eau physiologique

stérile pour éliminer l'excès de colorant, puis on ajout l'éthanol. La densité optique du biofilm adhérent a été lue par un lecteur de microplaque ELISA (Kord *et al.*, 2018). On résume cette démarche comme suit (figure 13):

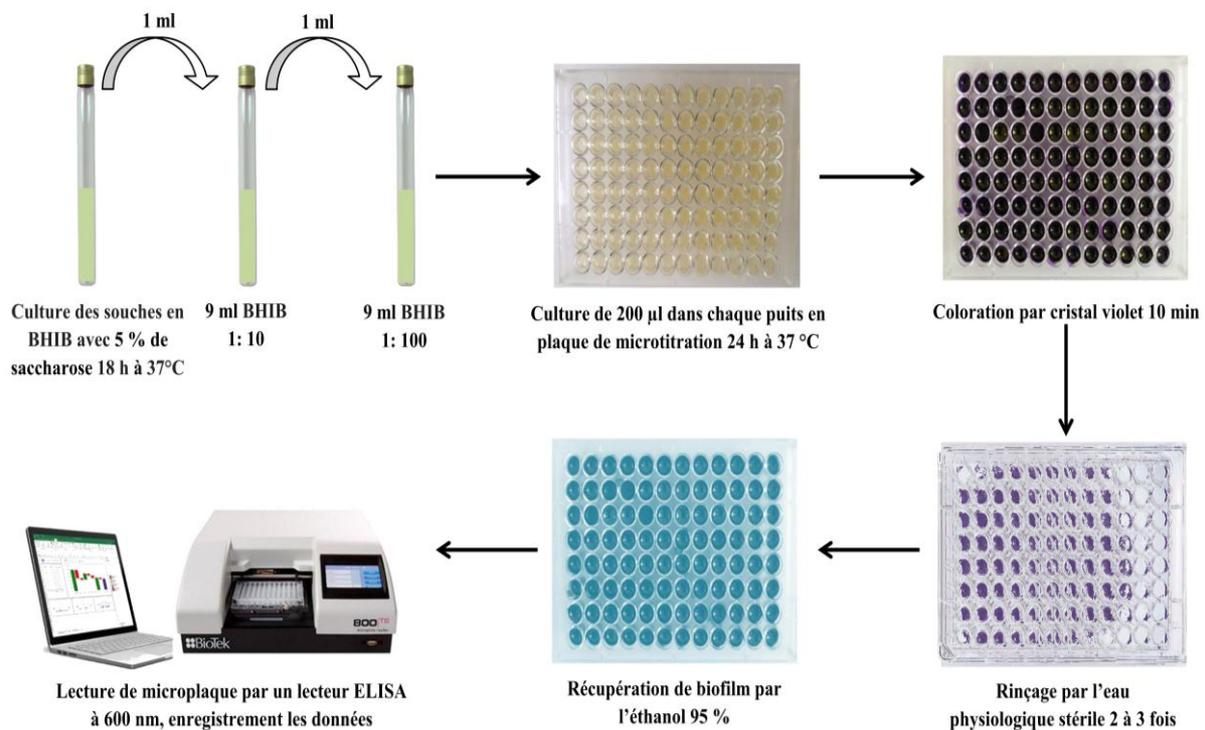


Figure 13. Démarche de technique de plaque de culture tissulaire.

7.2.3. Principe de lecture sur TCP

L'estimation quantitative du biofilm a été réalisée par dosage sur plaque de microtitration, environ 200 µl d'éthanol à 95 % ont été ajoutés pour chacun de puits. Les plaques ont été lues à une longueur d'onde de 600 nm en utilisant un lecteur ELISA, basé sur valeur de densité optique (Prasanth et Saravanakumari, 2017), l'adhérence de l'organisme a été classée comme suit (tableau 03):

Tableau 03. Les catégories de biofilms en fonction de densité optique (Kord *et al.*, 2018).

Valeurs moyennes de DO	Estimation de biofilm
$DO_t < DO \leq 2 \times DO_t$	Faible
$2 \times DO_t < DO \leq 4 \times DO_t$	Moyen
$4 \times DO_t < DO$	Fort

DO: densité optique, DO_t : densité optique du témoin.

Ces intervalles sont standards grâce à la valeur de la densité optique du témoin, il est possible de trouver les limites des différentes catégories de biofilm dans cette étude, ce qui permet de le classer comme faible, moyen ou fort.

8. Méthode de comparaison biostatistique de biofilm clinique

Dans cette étude, les espèces bactériennes qui ont été sélectionnés sont deux cocci à Gram positives et deux bacilles à Gram négatif. Une comparaison a été faite entre les souches bactériennes où les informations nécessaires ont été collectées pour chacune des techniques de formation de biofilm et un test biostatistique spécial a été appliqué par un logiciel statistique, tout cela afin de contribuer au diagnostic du biofilm clinique.

8.1. Logiciel statistique IBM SPSS 20

Le logiciel statistique IBM SPSS fournit une analyse statistique avancée qui est facile à utiliser, car il s'agit d'une large plate-forme d'algorithmes d'apprentissage qui peuvent être étendus et intégrés avec les mégadonnées. Le programme IBM SPSS est utilisé dans tous les projets de tailles différentes et de niveaux complexes grâce à sa flexibilité, ce qui nous permet d'améliorer l'efficacité et de réduire les risques grâce à sa prise en charge des approches de test d'hypothèses et à sa présentation avec une grande précision.

8.2. Collection de données de RCA

En lisant les résultats sur la gélose de rouge Congo, nous pouvons les classer qualitativement les fréquences de chaque souche dans un tableau facile à lire au moyen du programme IBM SPSS, où nous sélectionnons le test lisible logique des données du tableau à un seuil de risque $\alpha = 0.05$.

8.3. Rassemblement des valeurs densité optique de TCP

Après avoir obtenu les différentes valeurs de la densité optique des souches étudiées, nous les organisons en un tableau bref et les classons en fonction de l'intensité de la formation du biofilm où chaque bactérie compte des valeurs différentes. Ensuite, nous entrons les données dans le programme IBM SPSS et choisissons le test approprié en fonction des données du tableau à un seuil de risque $\alpha = 0.05$.

9. Application de quelques moyens de lutte

Les bactéries qui forment des biofilms et qui causent une infection hospitalière se caractérisent par leur résistance qui a en partie gagné en stress environnementale. Les études ont donc développé de nombreuses façons de les éliminer, notamment:

9.1. Antibiogramme

L'antibiogramme est une technique de laboratoire qui vise à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de plusieurs antibiotiques. L'antibiogramme permet au médecin de choisir le meilleur traitement antibiotique individualisé contre la souche bactérienne responsable de l'infection. Il est notamment réalisé en cas (Nauciel et Vildé, 2007):

- Des infections graves, récidivantes.
- En cas d'échec thérapeutique avec un premier antibiotique.
- Infection chez une personne immunodéprimée ou d'infection nosocomiale.

L'antibiogramme est également utilisé pour connaître l'épidémiologie des résistances (surveillance faite par les autorités de santé) et pour lutter contre les infections nosocomiales.

8.1.2. Réalisation d'antibiogramme

A partir d'une culture pure de 24 h à 37 °C sur milieu d'isolement approprié, prenez à l'aide d'une anse de platine stérile quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, placez-les dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique stérile de 5 ml et homogénéiser par le vortex. On place la culture de bactéries isolées sur gélose de Muller-Hinton par ensemencement en nappe avec un râteau de pipette pasteur et laissez-le quelques minutes, puis on décante l'excès de solution à la boîte si il est présentes.

Appliquer les disques imprégnés par des antibiotiques à dose connue (**tableau 04**) à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement, les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Incuber les boîtes pendant 24 h à 37 °C, le couvercle toujours en bas.

Tableau 04. Liste des antibiotiques testés.

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques	Charge des disques
β-lactamines	Oxacillin (OX)	1 µg
	Cefazoline (CZ)	30 µg
	Penicillin (P)	10 UI
	Amoxicillin (AMX)	25 µg
Aminosides	Gentamicine (CN)	10 µg
	Amikacine (AK)	30 µg
Phénicolés	Chloramphenicol (C)	30 µg

Après l'incubation 24 h à 37 °C, on observe des conséquences sur le développement et la survie des souches. De manière générale si l'antibiotique est inefficace, les bactéries pourront tout de même croître. Au contraire, si l'antibiotique est efficace, on apercevra autour du disque une forme des cercles « zones d'inhibition », où la croissance bactérienne a été inhibée. Il existe ensuite trois interprétions différentes d'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé. Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à

coulisse, puis ils sont comparés aux diamètres critiques rassemblés dans les abaques de lecture. Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante" après consultation des abaques de lecture, on a (Walsh et Wencewicz, 2016):

- a. **Bactérie sensible à l'antibiotique (S):** il suffit d'une faible concentration de l'antibiotique en question pour tuer les bactéries et la dose nécessaire est administrable chez l'homme.
- b. **Bactérie résistante à l'antibiotique (R):** la dose nécessaire pour tuer les bactéries est beaucoup trop élevée pour être supportée chez l'homme sans effets secondaires majeurs. Un tel antibiotique ne peut donc être utilisé pour traiter l'infection.
- c. **Bactérie intermédiaire à l'antibiotique (I):** la dose nécessaire pour tuer les bactéries est tantôt administrable chez l'homme, tantôt dangereuse. Il faut donc considérer que la bactérie est résistante *in vivo*, c'est-à-dire dans l'organisme.

9.2. Rayonnement de l'ultraviolet

L'ultraviolet (UV) est une forme de rayonnement électromagnétique, plus courte que celle de la lumière visible mais plus longue que les rayons X. Contrairement aux méthodes de désinfection par les produits chimiques, la lumière UV inactive rapidement et efficacement les microorganismes par un processus physique. Lorsque les bactéries sont exposées aux longueurs d'onde germicides de la lumière UV, ils deviennent incapables de se reproduire et perdent leur pouvoir d'infection (Vatansever *et al.*, 2013).

9.2.1. Procédure d'exposition à l'ultraviolet

Pour les échantillons qui ont suivie chronologiquement en précédente, le même protocole a été appliqué pour tester la réponse des bactéries à l'exposition aux différentes doses d'ultraviolet par unité de seconde pendant une minute.

Un volume de 200 µl de chaque temps irradié a été ajouté aux puits de la plaque de microtitration. Après incubation 24 h à 37 °C, l'excès de bouillon a été coloré par cristal violet. Les puits ont été décantés et rincés avec l'eau physiologie stérile trois fois pour éliminer les cellules non liées aux fourmis. La formation de biofilms était en suspension avec l'addition de 200 µl d'éthanol à 95 % et l'absorbance a été mesurée à une densité optique de 600 nm (Ben Said *et al.*, 2011). L'ultraviolet a été délivré par une ampoule germicide avec une émission maximale à 253.7 nm dans une hotte microbiologique. Après avoir obtenu des valeurs variables pour les temps de formation du biofilm, nous les organisons chronologiquement dans un tableau, puis créons une courbe pour l'effet des rayons UV dans le développement du biofilm.

Résultats et discussion

1. Résultats d'identifications macroscopiques

1.1. Aspect préliminaire sur gélose nutritive

Les résultats sur la gélose nutritive sont préliminaires en termes d'isolement des échantillons des milieux hospitaliers. Les microorganismes sur le bouillon nutritif semblent être mélangés et trouble tandis que dans la gélose nutritive, ils sont isolés sous forme des colonies différentes de couleur, de taille et de forme (**figure 14**). Les premiers échantillons sur la gélose nutritive se distinguent toujours par une diversité des colonies, ce qui indique la richesse de l'environnement hospitalier avec différents organismes causé des infections nosocomial. Parmi les obstacles au diagnostic d'une variété des maladies, il y a la caractéristique de multiples microorganismes en milieu hospitalier.



Figure 14. Aspect de culture mixte sur gélose nutritive.

Leboffe et Pierce (2011) ont montré qu'une culture microbienne composée de deux ou plusieurs espèces est dit être une culture mixte, alors qu'une culture pure ne contient qu'une seule espèce. L'obtention de l'isolement des espèces individuelles d'un échantillon mixte sont généralement première étape dans l'identification d'un organisme. Pendant l'ensemencement, la densité cellulaire diminue, conduisant finalement à cellules individuelles déposées séparément sur la surface de gélose. Les cellules suffisamment isolées vont se développer en colonies constituées uniquement du type de cellule d'origine, parce que certaines colonies se forment à partir de cellules individuelles et d'autres à partir de paires, de chaînes ou d'amas de cellules, le terme unité formatrices des colonies (UFC) est une description plus correcte d'origine de la colonie. **Ducel et al. (2008)** ont dit que les établissements de santé constituent un environnement dans lequel se trouvent rassemblées des personnes infectées et des personnes chez lesquelles le risque d'infection est accru. Les patients atteints d'infections ou porteurs de micro-organismes pathogènes, lorsqu'ils sont hospitalisés, sont des sources potentielles d'infection pour les autres patients et pour le personnel. Les germes présents dans

la flore microbienne peuvent contaminer des objets, des dispositifs médicaux et des substances qui entrent ensuite en contact avec des sites anatomiques vulnérables.

1.2. Résultats de recherche des cocci à Gram positif

1.2.1. Aspect des staphylocoques

Il s'agit d'une pathogène ubiquitaire peut survivre dans l'environnement hospitalier et provoque des infections nosocomial. *Staphylococcus aureus* est une bactérie aéro-anaérobie facultatif et se développe facilement sur les milieux usuels et hypersalé notamment le Chapman. La température optimale de croissance est de 37 °C, le pH optimal est 7.5 mais de grandes variations sont tolérées. En bouillon nutritif, la culture est trouble homogène puis un dépôt est observé. Sur gélose Chapman, les colonies sont lisses, rondes à bord net, bombées et leur diamètre de 1 et 3 mm. La plupart des souches élaborent un pigment jaune doré dans le milieu. Cette coloration sur milieu Chapman donné le nom aureus car la pigmentation est souvent de couleur or (**figure 15**).



Figure 15. Aspect de *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman.

D'après **Bailey et Scott's (2014)**, la gélose au sel de mannitol (Chapman) contient une forte concentration en sel, le sucre mannitol et le rouge de phénol comme indicateur de pH. Le *Staphylococcus aureus* fermente le mannitol et produit un halo jaune autour des colonies sur ce support en raison de la production d'acide modifiant le pH de milieu. Les *S. aureus* produisent une capsule polysaccharidique qui rend les colonies ont un aspect muqueux et lisse. La capsule est produits par des isolats cliniques et peuvent apparaître sous la forme d'une couche visqueuse ou à adhérer à des surfaces inorganiques.

Contrairement au phénotype *Staphylococcus aureus* normal ou sauvage de l'environnement hospitalier qui représente des colonies typiquement grand, les variantes de petites colonies de *Staphylococcus aureus* (SCV) ont des croissances exigeantes. Les SCV

peuvent être identifiés comme des colonies petites et ponctuelles de morphologie coloniale atypique (**figure 16**), après 24 h d'incubation sur gélose au sang frais (**Proctor *et al.*, 2006**).

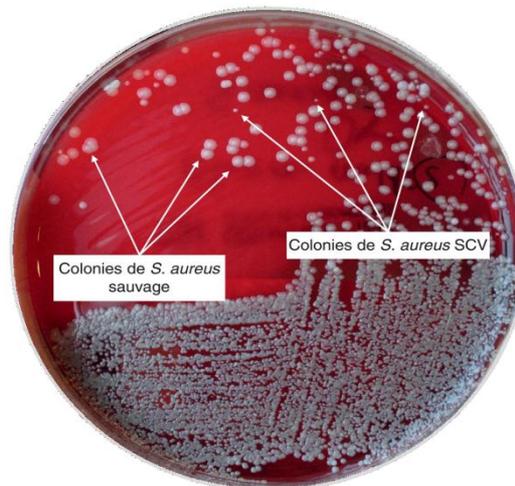


Figure 16. Aspect de *S. aureus* sauvage et SCV sur gélose au sang frais (**Denis *et al.*, 2016**).

Il convient de noter que les SCV de *S. aureus* sont rapidement envahis et sont facilement manquée en présence de *S. aureus* normal, car les SCV se divisent à environ un 9^{ème} du taux de *S. aureus* qui ont un phénotype normal (**Proctor *et al.*, 2006**).

Certains types des staphylocoques peuvent apparaître au milieu de Chapman sans virage de couleur du milieu et caractérise par la présence de colonies rose rougeâtre de mannitol négatif, cette description distingue la bactérie *Staphylococcus epidermidis*. Dans l'ensemble des propriétés de ces bactéries sont généralement inverses des *S. aureus* (**Figure 17**).

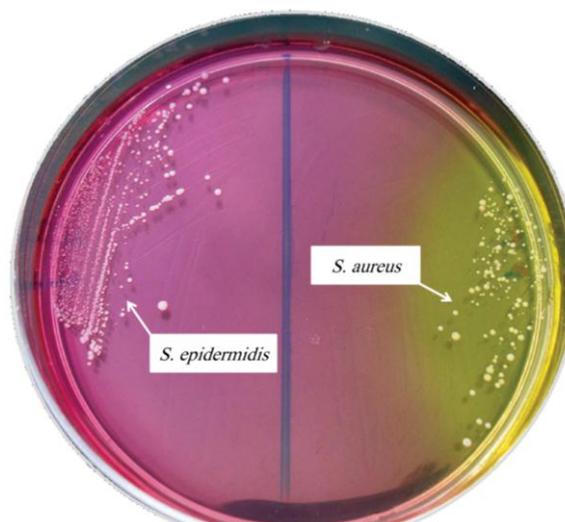


Figure 17. *S. epidermidis* et *S. aureus* sur gélose Chapman (**Brown et Smith, 2015**).

Le milieu Chapman est un milieu sélectif et différentiel, la plupart des staphylocoques sont capables de se développer sur ce support, mais ne fermentent pas le mannitol, donc la croissance apparaît rose ou rouge et le milieu reste inchangé un cas d'exemple *S. epidermidis*

qui une pathogène opportuniste. L'espèce *Staphylococcus aureus* fermente le mannitol, qui produit acides et abaisse le pH du milieu (Leboffe et Pierce, 2011).

1.2.2. Aspect des entérocoques

La bactérie *Enterococcus faecalis* est une pathogène opportuniste à un métabolisme aérobie-anaérobie qui persiste dans l'environnement hospitalier. Il représente un trouble sur bouillon nutritif et des colonies légèrement opalescentes sur géloses nutritives de 1 à 2 mm. Son culture est plus abondante que celle des streptocoques. Il représente sur des géloses au sang frais par des petites colonies blanches et circulaires caractérisées par l'absence d'hémolyse qui le classent sous un type γ hémolytique (figure 18).



Figure 18. Aspect d'*Enterococcus faecalis* sur gélose au sang frais.

Enterococcus faecalis est une bactérie classé comme des streptocoques du groupe D et un cause important des infections nosocomial (Bailey et Scott's, 2014).

D'après Gillespie et Hawkey (2006), les entérocoques se développent bien sur des milieux à base de gélose au sang frais contenant 5 % de sang animal et sur de nombreux autres supports comme gélose BHI. Des souches d'*E. faecalis* produire une γ hémolyse sur gélose au sang frais de mouton mais certain produire β hémolyse sur des milieux contenant du sang de lapin, de l'homme ou du cheval. Elle représente plus de 80 % des isolats cliniques et sont principalement isolés de sources non humaines, suivi par *E. faecium* puis par d'autres espèces d'entérocoques tels que *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. casseliflavus* et *E. raffinosus*. La différenciation des entérocoques non fécaux peut être utile dans les cas graves infections à des fins épidémiologiques et à visée thérapeutique à cause des différences de sensibilité aux antibiotiques existent. Les facteurs des virulences associés à la pathogénèse des entérocoques font actuellement l'objet d'une enquête active. Ces facteurs des virulences peuvent être divisés en facteurs sécrétés cytolysine, gélatinase et sérine protéase, des protéines situées à la surface

des cellules ou adhésines d'agrégation, protéine de surface entérococcique (ESP) et l'adhésine du collagène d'*E. faecalis* (ACE) et de la paroi cellulaire polysaccharidiques.

Nous avons organisé les informations relatives aux bactéries *S. aureus* et d'*E. faecalis* en fonction des facteurs de virulences et des maladies qui les causent et leur mode de transmission (**tableau 05**).

Tableau 05. Facteurs des virulences des cocci à Gram positif et leurs maladies.

La bactérie	Facteur de virulence	Maladie causé	Mode de transmission
<i>S. aureus</i>	Capsule polysaccharidique	Bactériémie	Personne contaminé
	Exotoxines et enterotoxines	Endocardite	Aérosol et matériel
	Protéine A	Ostéomyélite	Plaie chirurgicale
	Acide téichoïques	Pyélonéphrite	
<i>E. faecalis</i>	Cytolysine	Bactériémie	Equipement médical
	Adhésine du collagène	Endocardite	Personne contaminé
	Protéine de surface	Infection urinaire	

1.3. Résultats de recherche des bacilles à Gram négatif

1.3.1. Aspect des entérobactéries

Il s'agit l'espèce bactérienne *Escherichia coli* anaérobie facultative de la famille des *Enterobacteriaceae*. Il peut pousser dans un bouillon nutritif et BHIB en plus de croître au milieu Hektoen sous forme de colonies orange, à MacConkey sous forme de colonies roses et au BCP sous forme de colonies jaune verdâtre. Les colonies sont de petite taille circulaire convexe et ont des bordures régulières dont la taille varie de 1 à 2 mm (**figure 19**).

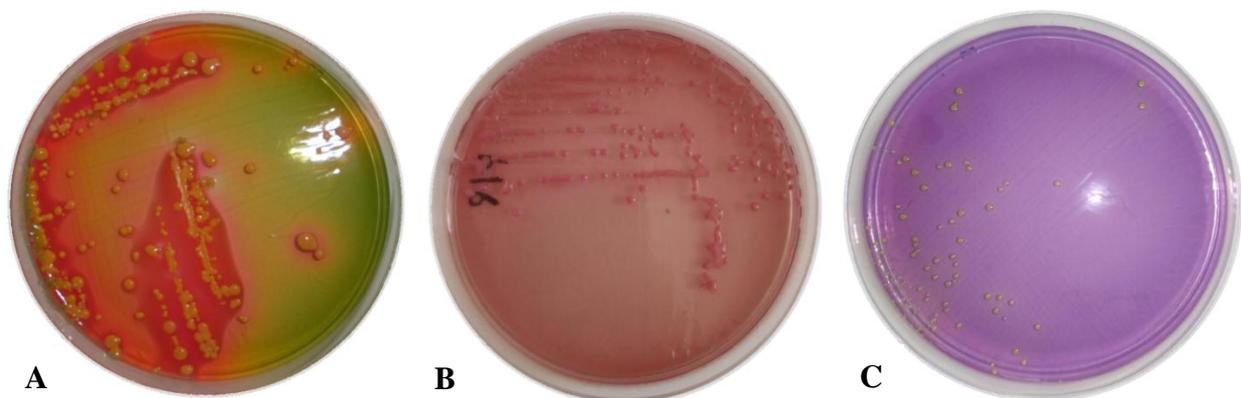


Figure 19. Aspect d'*E. coli* sur différents milieux de culture.

A: Hektoen, **B:** MacConkey, **C:** BCP

Escherichia coli existe dans l'environnement hospitalier et provoque des infections urinaires, la cholécystite, la bactériémie, la cholangite et d'autres infections cliniques telles que la méningite néonatale, la pneumonie et diarrhée aigüe.

La plupart des souches d'*E. coli* se développent bien sur une gamme des milieux de culture, la croissance et l'isolement de certaines souches pathogènes nécessite une méthodologie spécifique. Des souches d'*E. coli* pathogènes peuvent être phénotypiquement identiques aux souches commensales d'*E. coli*. La fermentation rapide du lactose reste une caractéristique de diagnostic clé des milieux utilisés pour l'isolement initial ou confirmation ultérieure d'*E. coli*, le bouillon nutritif et la gélose MacConkey sont largement utilisés pour l'isolement initial et la confirmation du suspect d'*E. coli* (Gillespie et Hawkey, 2006).

Denis *et al.* (2016) ont montré qu'au sein du genre *Escherichia*, l'espèce *E. coli* représente la quasi-totalité des isolats humains dans le laboratoire de bactériologie et une grande diversité sur le plan génétique et sur le plan du pouvoir pathogène. Les infections à *E. coli* sont de deux types, infections intestinales à type de diarrhées et infections extra-intestinales. Le typage des séquences multilocus (MLST) et ribotypage ont montré que l'espèce *E. coli* pouvait être divisée en plusieurs groupes phylogénétiques dont quatre principaux A, B1, B2 et D regroupant la majorité des souches. Les souches d'*E. coli* commensales et celles responsables de diarrhées appartiennent majoritairement aux groupes A et B1 à des sérotypes particuliers et possèdent des facteurs de virulence spécifiques de support plasmidique, chromosomique, ou portés par des phages. On distingue six pathovars entérovirulents:

- Les *E. coli* entéropathogènes (ECEP).
- Les *E. coli* entéro-invasifs (ECEI).
- Les *E. coli* entérotoxinogènes (ECET).
- Les *E. coli* entérohémorragiques (ECEH).
- Les *E. coli* entéroaggrégatifs (ECEA).
- Les *E. coli* à adhésion diffuse (ECAD).

Les groupes D et B2 regroupent certaines souches d'*E. coli* sont responsables de pathologies extra-intestinales de syndromes classiques tels que les infections urinaires, la bactériémie et méningite néonatale (Denis *et al.*, 2016). Cela a donné naissance à des souches particulières, souvent caractérisées par des sérotypes O, K et H spécifiques classés comme uropathogènes (UPEC) et *E. coli* associée à la méningite (MAEC). Quelques souches diffèrent d'*E. coli* commensal caractérisées par la présence de gènes associés à la pathogénicité (Gillespie et Hawkey, 2006).

1.3.2. Aspect de *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *P. aeruginosa* est membre de la classe des bactéries γ *Proteobacteria* à la famille bactérienne *Pseudomonadaceae* du genre *Pseudomonas*, elle est un bacille aérobie peut se développer dans un bouillon nutritif et BHIB. Elle croître à la gélose d'Hektoen en petites colonies apparaissent par couleur vert, et au milieu de MacConkey, elles apparaissent des cercles concaves sec en couleur pâle et s'accumulent parfois sous forme de nuages comme elles apparaissent dans la gélose BCP avec des colonies blanches individuelles et accumulées en forme circulaire. Cette bactérie se caractérise par l'absence de fermentation du lactose dans tous les milieux de culture (**figure 20**). Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* est de plus en plus reconnu comme un pathogène opportuniste émergent de pertinence clinique. Les études épidémiologiques différentes suivent sa présence en tant qu'agent pathogène nosocomial et indiquent que la résistance aux antibiotiques augmente dans les isolats cliniques.

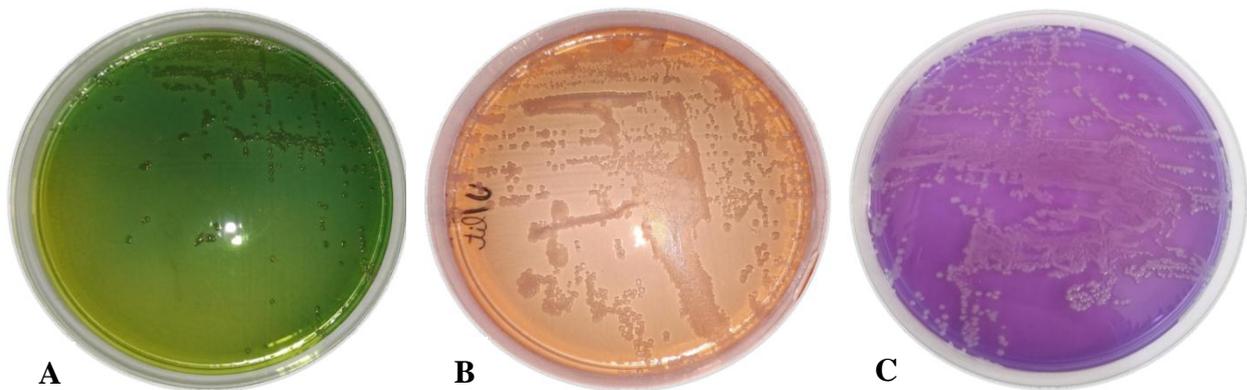


Figure 20. Aspect de *P. aeruginosa* sur différents milieux de culture.

A: Hektoen, **B:** MacConkey, **C:** BCP

Bhatia et Lal Ichhpujani (2008) ont dit que *Pseudomonas aeruginosa* est une espèce bactérienne non fermentaires, ce sont des bacilles largement distribués dans la nature sous forme de saprophytes ou de commensaux et d'agents pathogènes pour l'homme. Elle est capable de croître dans une large gamme mais la croissance optimale se produit à 28 °C. Cet organisme peut se développer même à 41 °C. Un pH inférieur à 4.5 n'aide pas à sa croissance, c'est une espèce aérobie obligatoire et un organisme extrêmement adaptable qui peut utiliser plus de 80 composés organiques différents pour croissance. Il peut facilement se développer sur divers supports utilisés pour la culture d'entérobactéries ainsi que sur des supports recommandé en raison de sa capacité tolérer l'environnement alcalin. Les isolats cliniques cultivés sur gélose au sang sont souvent hémolytiques. Sur gélose nutritive *P.aeruginosa* peut produire des colonies de 2 à 3 mm de diamètre et ne fermentant pas le lactose, des petites

colonies de couleur pâle sont produits sur gélose MacConkey. La gélose cétrimide est un milieu sélectif pour *P.aeruginosa* et la croissance de tous les autres bactéries sont inhibées. Le bouillon nutritif montre le *P.aeruginosa* comme une croissance trouble uniforme. Les souches isolées dans des cas de fibrose kystique sont de nature mucoïde et produisent de grandes quantités du polysaccharide extracellulaire sur la gélose nutritive. Quatre types des pigments peuvent être produits par des souches de *P.aeruginosa* (pyocyanine, pyoverdin, pyorubine, pyomélanine), le pigment le plus couramment produit est le bleu-vert appelé pyocyanine qui diffuse dans le milieu environnant. Ce pigment n'est pas produit par d'autres espèces de ce genre et donc sa détection devient diagnostique pour *P.aeruginosa*. De nombreuses souches produisent un vert pigment fluorescent appelé pyoverdine alors que certains les souches produisent du pigment rouge appelé pyorubine et peu produire du pigment de pyomélanine de couleur noir. La plupart des souches des cultures de *P. aeruginosa* donnent une odeur fruitée caractéristique due à la production d'acétylphénol du tryptophane.

D'après **Gillespie et Hawkey (2006)**, la plupart des isolats forment des colonies diffuses plates avec un bord irrégulier du type 1, et certains sont d'apparence coliforme du type 2. Ils comprennent le sec, maïs poivre du type 3, mucoïde du type 4, rugueux du type 5 et colonies naines caractéristiques du type 6. *Pseudomonas aeruginosa* produit un large éventail de cellules associées et les facteurs sécrétés, dont certains ont été étroitement liés à potentiel de production de maladies. Ceux-ci comprennent, la phospholipase, les protéases, la pyocyanine. Néanmoins, pour causer les maladies doit être introduite dans les tissus, en nombre suffisant pour submerger les défenses de l'hôte. Cette fonctionnalité explique le rôle des différents facteurs de virulence comme les pili, les flagelles et les lipopolysaccharides (LPS).

Les souches qui colonisent les bronches des enfants atteints de mucoviscidose sont entourées d'une pseudo-capsule polysaccharidique qui donne un aspect muqueux aux colonies bactériennes. Ce constituant augmente l'adhésion de la bactérie et exerce une action antiphagocytaire. La bactérie produit plusieurs toxines cytotoxiques, deux hémolysines et l'exotoxine A dont le mode d'action est similaire à celui de la toxine diphtérique. Elle peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques en particulier chez les sujets atteints de mucoviscidose, pulmonaires chez les immunodéprimés ou les malades ventilés, oculaires kératite ou endophtalmie, ostéo-articulaires. Elle peut aussi surinfecter des lésions cutanées brûlures, des plaies traumatiques ou postopératoires, provoquer des otites externes pouvant évoluer de manière invasive chez les sujets âgés et diabétiques, des septicémies, des endocardites chez les toxicomanes (**Nauciel et Vildé, 2007**).

2. Résultats d'identifications microscopiques

2.1. Observation des mouvements bactériens

La mise en évidence des mouvements bactériens par l'examen de l'état frais entre la lame et la lamelle à l'objectif x40 montre des bactéries ont un mouvement rapide. Par contre des suspensions bactériennes en même état ne représentent aucuns mouvements. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a un seul flagelle polaire dit monotriche, tandis que l'espèce *Escherichia coli* a des flagelles péritriche entourant la bactérie. Les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* restent constantes et ne bougent pas. Toutes les activités menées par les bactéries telles que la mobilité, nécessitent de l'énergie et des mécanismes spéciaux pour atteindre les milieux vivants préférés ou pour fuir un milieu qui n'est pas disponible pour les nécessités de sa vie.

Selon **Willey et al. (2008)** le filament à la forme d'une hélice rigide et la cellule se déplace lorsque cette hélice tourne. Les bactéries mutantes avec des flagelles droits ou des régions de crochet anormalement longues ne peuvent pas nager. Le moteur flagellaire peut tourner très rapidement selon les bactéries, chez l'*E. coli* le moteur tourne à 270 tours par seconde. Le sens de rotation flagellaire détermine la nature du mouvement bactérien. Les flagelles polaires monotriches tournent dans le sens antihoraire vu de l'extérieur de la cellule pendant le mouvement normal vers l'avant, tandis que la cellule elle-même tourne lentement dans le sens horaire. Le filament flagellaire hélicoïdal rotatif pousse la cellule vers l'avant dans une course avec le flagelle derrière. Les bactéries monotriches s'arrêtent et tombent au hasard en inversant le sens de rotation flagellaire. Tandis que les bactéries flagellées péritrichement fonctionnent d'une manière quelque peu similaire. Pour avancer, le flagelle tourné dans le sens antihoraire. Ce faisant, ils se plient à leurs crochets pour former un faisceau rotatif qui propulse la cellule vers l'avant. La rotation des flagelles dans le sens horaire perturbe le faisceau et la cellule tombe.

2.2. Coloration différentiel de Gram

La coloration de Gram permet non seulement de déterminer la taille, la morphologie et la disposition des cellules mais aussi des informations sur d'autres fonctionnalités. L'observation microscopique à objectif x100 montre la présence de différents groupes de micro-organismes bactériens. Des bactéries de l'espèce *S. aureus* a été observé de taille environ 0.5 à 1 µm de diamètre en couleur violette sous forme de cocci combinées en grappes ou amas, les bactéries *E. faecalis* apparaissent également en couleur violette et sous forme de cocci mais la morphologie varie avec elles, car elles apparaissent sous forme des diplocoques et en quelques courtes chaînettes de taille 0.5 à 1 µm de diamètre, qui sont des cocci à Gram positif.

Contrairement, les bactéries d'*E. coli* ont été observées de taille environ 2 à 4 μm de long pour 0.8 μm de large en couleur rose qui sont en forme bacilles et quelques diplobacilles dispersé et placés les uns sur les autres. L'espèce *P. aeruginosa* sont de taille 1 à 2 μm de long pour 0.5 μm de large, elle semble plus petite que l'*E. coli* où dispersé séparément mais elle est semblable à lui en couleur et en morphologie qui sont des bacilles à Gram négatif. Ces différences de couleur sont dues aux propriétés de la paroi cellulaire bactérienne qui proviennent de la différence de sa composition (**figure 21**).

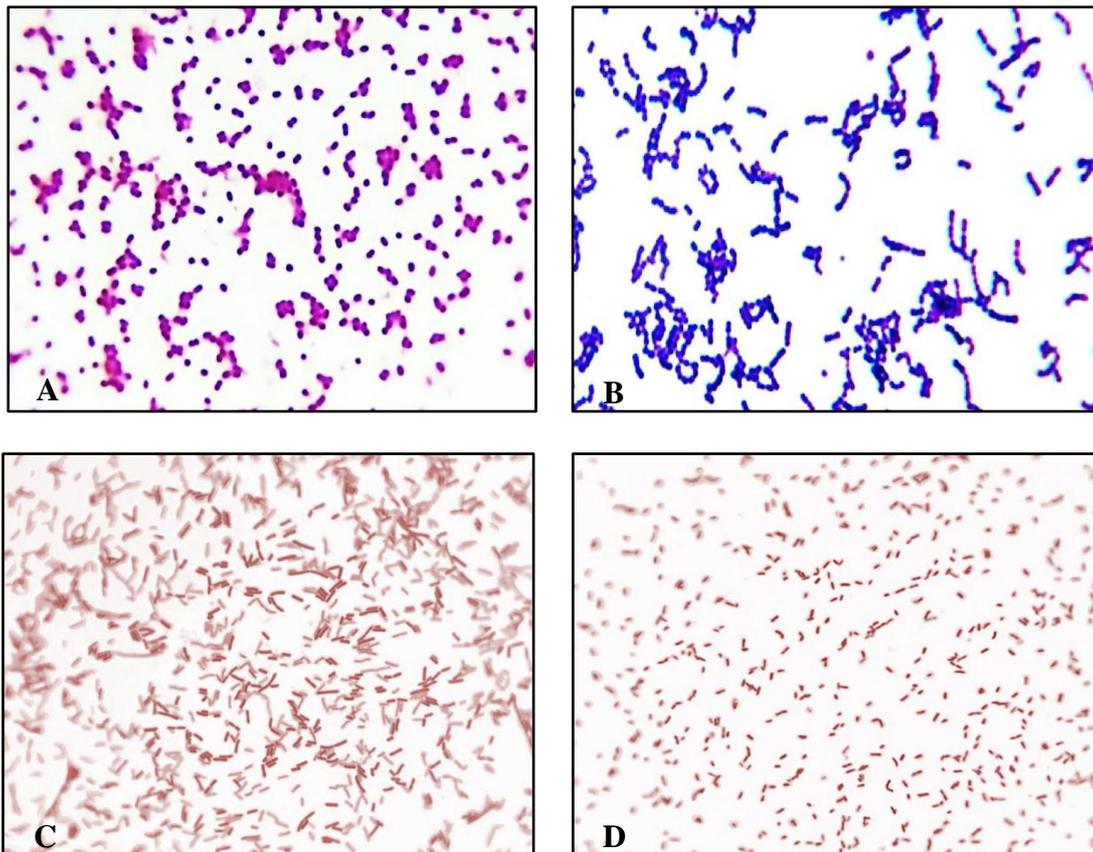


Figure 21. Observation microscopique de quelques bactéries.

A: *S. aureus*, **B:** *E. faecalis*, **C:** *E. coli*, **D:** *P. aeruginosa*

Selon **Nauciel et Vildé (2007)**, la paroi c'est une structure rigide, responsable de la forme des bactéries, et leur permettant de résister à la lyse osmotique. Elle est présente chez toutes les bactéries, à l'exception des mycoplasmes. Sa structure varie selon les bactéries et conditionne leur aspect après la coloration de Gram. Au cours de cette coloration, les bactéries sont traitées dans un premier temps par du violet de gentiane et du lugol, puis de l'alcool et enfin de la fuchsine. Les bactéries dont la paroi résiste à l'alcool restent colorées par le violet de gentiane et sont dites à Gram positif. Les bactéries dont la paroi est perméable à l'alcool perdent leur coloration par le violet de gentiane et sont colorées en rouge ou rose par la fuchsine, ce sont les bactéries à Gram négatif. Un élément constant de la paroi

bactérienne est le peptidoglycane. C'est lui qui assure la rigidité de la paroi. C'est une énorme macromolécule réticulée faite de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par de courts peptides. Les chaînes polysaccharidiques sont faites de l'alternance de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique. Sur les résidus d'acide N-acétyl-muramique sont fixés des tétrapeptides faits de l'alternance d'acides aminés de la série D et de la série L. Chez les bactéries à Gram négatif, la séquence habituelle est L-alanine-acide, D-glutamique-acide, acide diaminopimélique-D-alanine. Quelques variations dans cette séquence se rencontrent chez les bactéries à Gram positif, la L-lysine remplace souvent l'acide diaminopimélique. Les tétrapeptides sont reliés entre eux soit par une liaison directe, soit par des acides aminés supplémentaires constituant le pont interpeptidique (**figure 22**). Chez les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane est le principal composant de la paroi. Il peut être recouvert par différents constituants parmi lequel les acides teichoïques. Ces derniers sont des polymères faits de glycérol ou de ribitol-phosphate substitués par différents composés. Ils sont liés de manière covalente au peptidoglycane. On trouve également des acides lipoteichoïques dont la partie lipidique est liée à la membrane cytoplasmique. Chez les bactéries à Gram négatif, la couche de peptidoglycane est mince et la paroi a une structure plus complexe.

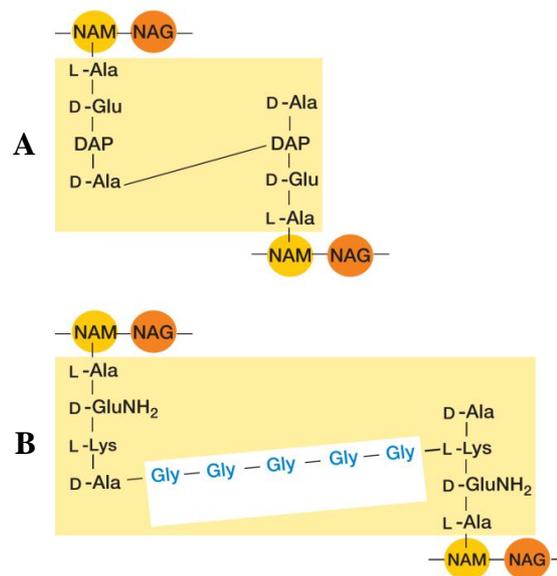


Figure 22. Structure de peptidoglycane. **A:** *E. coli*, **B:** *S. aureus* (Willey *et al.*, 2008).

Chez *E. coli*, il est d'environ 2 nm d'épaisseur et ne contient qu'une ou deux feuilles de peptidoglycane. L'espace périplasmique des bactéries à Gram négatives est également très différent de celui des bactéries à Gram positives. Il varie en taille de 1 nm à 71 nm. Certaines études indiquent qu'il peut constituer environ 20 à 40 % du volume cellulaire total, et il a généralement une largeur de 30 à 70 nm (Willey *et al.*, 2008).

3. Résultats des tests biochimiques

3.1. Différenciation des tests biochimiques classique pour les CGP

3.1.1. Décomposition du peroxyde d'hydrogène

On remarque des bulles d'air formant d'oxygène (O_2) dès qu'une partie des bactéries entre en contact avec une goutte d'eau oxygénée, une preuve que le peroxyde d'hydrogène se décompose en l'eau et l'oxygène par l'enzyme catalase de sécrétion bactérienne. Par contre en l'absence de cette enzyme, aucunes bulles d'air ne se forment (**figure 23**).

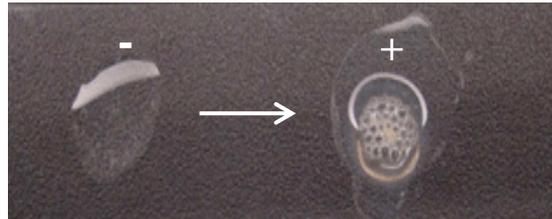


Figure 23. Catalase positive par décomposition de H_2O_2 et formation O_2 .

Leboffe et Pierce (2011) ont dit que Les chaînes de transport d'électrons des bactéries aérobies, anaérobies facultatives et microaérophile sont composées de molécules capables d'accepter et donner d'électrons selon les conditions. En tant que telles, ces molécules alternent entre les oxydés et des formes réduites, passant des électrons le long de la chaîne pour l'accepteur d'électrons final. Énergie perdue par d'électrons dans ce transfert séquentiel est utilisé pour effectuer la phosphorylation oxydative c'est-à-dire produire de l'ATP à partir d'ADP. Une molécule dans la chaîne de transport d'électrons (ETC) appelée flavoprotéine peut contourner le prochain transporteur de la chaîne et transférer d'électrons directement dans l'oxygène. Cette voie alternative produit deux toxines cellulaires très puissantes peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical superoxyde (O_2^-). Les organismes qui produisent ces toxines produisent également des enzymes capables de les décomposer. Superoxyde dismutase catalyse la conversion des radicaux superoxydes, le plus létal des deux composés à peroxyde d'hydrogène. La catalase convertit le H_2O_2 en l'eau et l'oxygène gazeux.

3.1.2. Coagulation de plasma

Pendant les premières heures de l'expérience, la coagulation du plasma sanguin est formée dans le tube qui contient des colonies de *Staphylococcus aureus*, indiquant la sécrétion de l'enzyme coagulase par cette dernière alors nous disons coagulase positif, par contre nous notons l'absence de formation de coagulation sanguine dans le tube de la bactérie d'*Enterococcus faecalis*. La coagulase fonctionne en conjonction avec un composant plasma pour former des barrières de fibrine protectrices autour des cellules bactériennes individuelles, contre la phagocytose et d'autres types d'attaque. Le test de la coagulase en tube est un moyen

valable pour identifier *Staphylococcus aureus*, à condition que seul un caillot ferme qui ne bouge pas lorsque le tube est incliné soit considéré comme une réaction positive, l'interprétation largement promulguée selon laquelle tous les degrés de coagulation dans le plasma de coagulase sont une identification positive de *S. aureus* (**figure 24**).

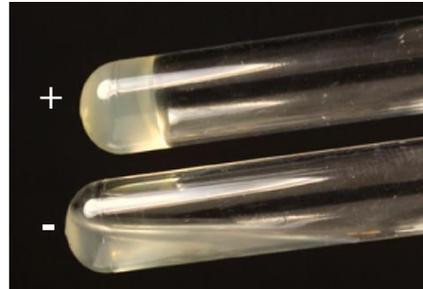


Figure 24. Coagulation positive de plasma par *S. aureus*.

Leboffe et Pierce (2011) montrent que les enzymes coagulases se présentent sous deux formes, coagulase liées et coagulase libre. Coagulase liée, également appelée facteur d'agglutination, est attaché à la paroi cellulaire bactérienne et réagit directement avec le fibrinogène dans le plasma. Le fibrinogène puis précipite, provoquant le regroupement des cellules dans une masse visible. La coagulase libre est une enzyme extracellulaire libérée de la cellule qui réagit avec un composant plasmatique appelé facteur de réaction à la coagulase (CRF). Le résultat de la réaction est similaire à la conversion de la prothrombine et fibrinogène dans le mécanisme normal de coagulation. Le test en tube détecte la présence de liant ou libre coagulase. Coagulation du plasma y compris tout épaissement ou formation de fibrine threads dans les 24 h indique une réaction positive. Le plasma est généralement examiné pour la coagulation sans secouer périodiquement pendant environ 4 h.

Selon **Rakotovao-Ravahatra et al. (2019)** le test de la coagulase est un test clé pour la détection de *Staphylococcus aureus*. Les caractéristiques bactériologiques et les facteurs associés aux infections à staphylocoques peuvent être utiles dans le diagnostic des infections de *Staphylococcus aureus*. La possibilité d'utiliser uniquement test de la coagulase dans l'identification des souches *Staphylococcus aureus*. En effet, ce test a montré un bon résultat du point de vue de la sensibilité et de la spécificité. De même, les techniciens de laboratoire peuvent comparer les résultats bactériologiques avec des facteurs associés à l'infection bactérienne présentée par le patient. Le test de coagulase est un test facile à utiliser et ne nécessite pas beaucoup de réactifs et consommables. L'utilisation du test de coagulase permettra de réduire les dépenses dans les laboratoires des pays en développement et réduire le coût d'examen bactériologique. Ainsi, le patient sera traité correctement et son espérance de vie sera améliorée.

3.1.3. Dépolymérisation d'ADN

L'hydrolyse de l'ADN est révélée par *Staphylococcus aureus* qu'en ajoutant l'acide chlorhydrique (HCl) comme indicateurs. On remarque après 5 min, un halo clair visible autour de la strie colonial (**figure 25**). Les colonies bactériennes qui sécrètent la DNase hydrolyseront l'ADN du milieu en petits fragments non liés, sous l'action d'acide HCl à l'origine du précipité blanchâtre qui entraîne un dégagement autour des croissances bactériennes. Les nucléotides peuvent ensuite se déplacer à travers la membrane cellulaire via des protéines de transport à utiliser. La cellule peut utiliser des nucléotides pour fabriquer des acides nucléiques et utiliser comme source d'azote, de phosphate et de carbone.



Figure 25. Dépolymérisation d'ADN par enzyme DNase de *S. aureus*.

Gerceker et al. (2009) ont dit que le test DNase est une méthode simple et économique qui a traditionnellement été utilisée comme test supplémentaire pour identifier les staphylocoques pathogènes. Ce test facilite également la différenciation des genres étroitement liés au sein de la division d'*Enterobacteriaceae* et plusieurs autres agents pathogènes, y compris le dépistage de *C. diphtheriae*. Ces tests présentent certains inconvénients y compris la nécessité de la longue période pour voir les résultats de l'activité DNase des bactéries.

3.1.4. Agglutination dus à protéine A

Staphylococcus aureus à une protéine A sur sa paroi qui se lie aux IgG. Il s'agglutiner et former un caillot lorsqu'il est exposé au latex bleu particules recouvertes d'IgG, à la fois des IgG et du fibrinogène à la surface des particules de latex. Les échantillons qui fait ne exprimer pas la coagulase et /ou les IgG ne s'agglutineront pas. La coagulase et la protéine A sont des caractéristiques distinctes de *Staphylococcus aureus* par rapport aux autres souches de *Staphylococcus*, de sorte que la présence de *Staphylococcus aureus* peut être présumée par un test d'agglutination positif (**figure 26**). En tant qu'agent pathogène, *Staphylococcus aureus*

utilise la protéine A, ainsi qu'une multitude d'autres protéines et facteurs de surface, pour favoriser sa survie et sa virulence. La protéine A favorise la formation de biofilms à la fois lorsque la protéine est liée de manière covalente à la paroi cellulaire bactérienne.

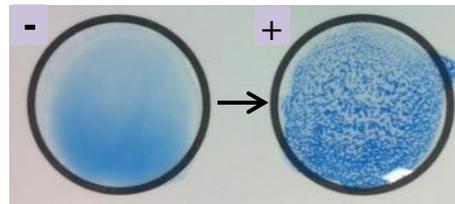


Figure 26. Détection de protéine A chez *S. aureus* par l'agglutination.

Les molécules d'anticorps peuvent être liées dans un alignement aléatoire à la surface des particules de latex polystyrène. Le nombre de molécules d'anticorps liées à chaque particule de latex est grand, ce qui entraîne un nombre élevé de sites potentiels de liaison à l'antigène. Ce dernier présent dans un l'échantillon se lie aux sites de combinaison de l'anticorps exposés sur les surfaces des particules de latex, formant agrégats réticulés des particules de latex et d'antigène. La taille de la particule de latex est 0.8 μm ou plus qui améliore la facilité avec laquelle la réaction d'agglutination est visualisée (**Bailey et Scott's, 2014**).

Dans le (**tableau 06**), nous résumons les propriétés biochimiques de *Staphylococcus aureus* par rapport au reste des espèces de staphylocoques.

Tableau 06. Principaux tests de différenciations entre les staphylocoques.

Caractéristiques	<i>Staphylococcus aureus</i>	Autre staphylocoques
Pigment	Doré	Variable (blanc, rose)
D-Mannitol	+	-
Test coagulase	+	-
Protéine A	+	-
DNase thermostable	+	-

3.1.5. Hydrolyse de l'esculine biliaire

Après 24 heures d'incubation, les bactéries *Enterococcus faecalis* ont hydraté la bile esculine et changé la couleur du milieu en brun foncé, ils se présentent sous forme de petites colonies translucides entourées d'un halo brun ou noir. L'esculine est un hétéroside formé d'un glucide complexe. L'esculine biliaire est basée sur l'hydrolyse de l'esculine en glucose et en esculétine (dihydroxy-6,7-coumarine) par un micro-organisme qui produit une enzyme esculinase. L'esculétine réagit avec un sel de fer le citrate ferrique dans le milieu pour former un complexe de fer phénolique qui produit une couleur brun foncé (**figure 27**). La présence

d'azoture de sodium inhibe les bactéries à Gram négatif et la bile de bœuf qui inhibe de la plupart des bactéries à Gram positif à l'exception des streptocoques du groupe D.

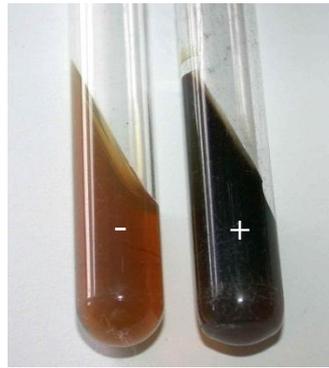


Figure 27. Hydrolyse de l'esculine biliaire par *Enterococcus faecalis*.

Les entérocoques sont des commensaux du tube digestif, chez l'homme et chez l'animal et leur place dans les infections nosocomiales tend à augmenter (Nauciel et Vildé, 2007). Les entérocoques sont des habitants communs de la peau, voies respiratoires supérieure, gastro-intestinales et génito-urinaires. La transmission d'homme à homme a été notée et la maladie résulte de l'invasion de ces bactéries de la flore normale. Ces bactéries sont fréquemment associées à l'urine et infections des voies biliaires, infection des plaies et abcès intra-abdominaux...etc. Ils provoquent également une endocardite bactérienne en particulier chez ceux qui ont une maladie valvulaire sous-jacente (Bhatia et Lal Ichhpujani, 2008).

3.1.6. Tolérance au milieu hypersalé

Les bactéries *Enterococcus faecalis* ont des caractéristiques uniques par rapport aux streptocoques dus à leur tolérance à un milieu hypersalé de NaCl 6.5 %. Après 24 h, un milieu turbulent a été observé indiquant sa croissance (figure 28). Les entérocoques sont adaptés à des niveaux de salinité élevés et à d'autres caractéristiques qui les décrivent comme des bactéries d'origine intestinale qui ont envahi les milieux hospitaliers, ce qui leur a valu une résistance supérieure à la salinité grâce à un contrôle des phénomènes membranaires et osmotiques qui est lié par des gènes spécialisés et des facteurs de pathogénicité qui les caractérisent, pour provoquer des infections.

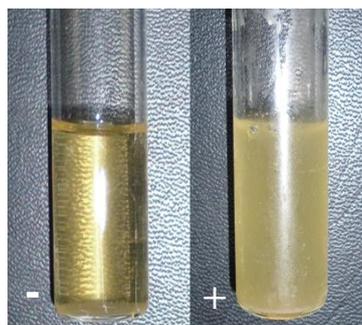


Figure 28. Tolérance au milieu hypersalé chez *E. faecalis*.

D'après **Gillespie et Hawkey (2006)**, la plupart des souches d'entérocoques ont la capacité de croître en présence de 6.5% de chlorure de sodium, à 10 °C et à 45 °C et à pH 9.6 et peut survivre à 60 °C pendant 30 min.

Les microbes ont plusieurs mécanismes pour répondre aux changements pression osmotique. Cette pression survient lorsque la concentration des solutés à l'intérieur de la cellule diffère de ceux à l'extérieur, et les réponses adaptatives fonctionnent pour égaliser les concentrations de soluté. Dans certaines situations, la pression osmotique peut dépasser la capacité d'adaptation de la cellule. Dans ces cas, une protection supplémentaire est fournie par la paroi cellulaire (**Willey et al., 2008**).

Les caractéristiques importantes des bactéries *E. faecalis* peuvent être régulées par rapport aux bactéries streptocoques en termes de plusieurs tests (**tableau 07**).

Tableau 07. Principaux tests de différenciation entre *E. faecalis* et autre streptocoques.

Caractéristiques	<i>Enterococcus faecalis</i>	Autre streptocoques
Group sérologique	D	Variable
Test d'hémolyse	γ	α ou β
Test esculine biliaire	+	-
Test NaCl	+	-

3.2. Différenciation des tests biochimiques classique pour les BGN

3.2.1. Détection de cytochrome oxydase

Dans les premières secondes, les colonies distinctives isolées du milieu MacConkey qui en contact avec le disque d'oxydase entrant un changement de la couleur passée directement de blanc au violet qui indique que les bactéries testées ont une oxydase positive et appartenait au genre de *Pseudomonas*. Tandis que, les autre types des bactéries isolées des même milieux ont une oxydase négative ce qui indique des souches appartenait à famille d'*Enterobacteriaceae* (**figure 29**). La différence dans la détection du cytochrome oxydase entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* indique qu'il ya une différence dans le type du dernier transporteur d'électrons dans leur chaîne de transport d'électrons.

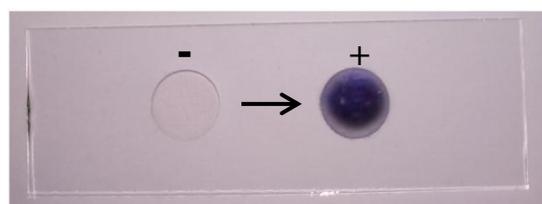


Figure 29. Détection de cytochrome oxydase chez *P. aeruginosa*.

Selon **Leboffe et Pierce (2011)**, il existe de nombreux types de chaînes de transport d'électrons (ETC). Certains organismes utilisent plus d'un type d'ETC en fonction de la disponibilité de l'oxygène ou d'autres produits préférés accepteur terminal d'électrons. *Escherichia coli* par exemple, à deux voies pour respiration aérobie et au moins un voie pour respiration anaérobie. De nombreuses bactéries ont d'ETC ressemblant aux ETC mitochondriaux chez les eucaryotes. Les chaînes d'ETC contiennent une série de quatre grandes enzymes largement appelées complexes I, II, III et IV, chacune contenant plusieurs molécules capables de transférer conjointement des électrons et utiliser l'énergie libre dans les réactions. Le dernier enzyme dans la chaîne est appelée cytochrome oxydase C (complexe IV), car il rend le transfert final d'électrons de la chaîne du cytochrome C résidant dans le périplasme, à l'oxygène au l'intérieur de la cellule. Le test de l'oxydase est conçu pour identifier la présence du cytochrome oxydase C. Il est capable de le faire car le cytochrome oxydase C à la capacité unique non seulement pour oxyder le cytochrome C, mais pour catalyser la réduction de le cytochrome C par un réducteur chromogène appelé tétraméthyl-p-phénylènediamine. Les agents réducteurs chromogènes sont des produits chimiques qui développent la couleur oxydé. Un changement de couleur spectaculaire se produit en quelques secondes si la réduction d'agent s'oxyde, indiquant ainsi que le cytochrome oxydase C est présente. Absence de changement de couleur dans le temps imparti signifie que le cytochrome oxydase C n'est pas présent et signifie un résultat négatif.

Les propriétés sélectives de *Pseudomonas aeruginosa* de genre *Pseudomonas* et d'*Escherichia coli* de famille *Enterobacteriaceae* peuvent être résumées en termes de fermentation du lactose et de test d'oxydase comme suit (**tableau 08**).

Tableau 08. Caractéristiques générales de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*E. coli*.

La bactérie	Oxydase	Lactose	Aspect des colonies		
			Milieux	Couleur	Forme
<i>E. coli</i>	Négative	Positive	Hecktoen	Orange	Petite, circulaire, convexe, régulière
			MacConkey	Roses	
			BCP	Jaune verdâtre	
<i>P. aeruginosa</i>	Positive	Négative	Hecktoen	Vert	Petite, circulaire, convexe, régulière
			MacConkey	Pâle	Cercles, concaves, sec, en nuage
			BCP	Blanches	Circulaire

3.3. Identifications biochimiques par le profil numérique

3.3.1. Profil numérique de galerie API 20 Staph

Les résultats de galerie d'identification des staphylocoques montrent ces bactéries qui ont été testées fermentent la plupart des sucres, en particulier le mannitol, tandis que nous constatons le contraire par rapport au xylitol et à la mélibiose et aussi le raffinose et xylose. Ils réduisent également les nitrates aux nitrites et produisent l'enzyme phosphatase alcaline et l'acétyl méthyl-carbinol de Voges Proskauer (**figure 30**).

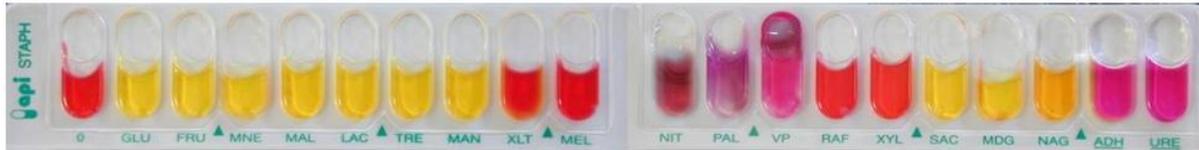


Figure 30. Identification biochimique de *Staphylococcus aureus*.

L'identification biochimique par le profil numérique de sept chiffres 6736173 extraite de la galerie représente une similitude de 96.1 % de la somme des pourcentages des tests positifs sur leur nombre total, ce qui indique que la bactérie est *Staphylococcus aureus* (**tableau 09**).

Tableau 09. Etablir de profil numérique à la galerie API 20 Staph.

Galerie API 20 Staph	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
		1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	6		7			3			6			1		7			3			
	Profil numérique: 6736173																			

3.3.2. Profil numérique de galerie API 20 Strep

Les résultats de galerie d'identification des streptocoques montrent ces bactéries qui ont été testées hydrolysent spécifiquement l'esculine citrate de fer et aussi l'acide hippurique avec production d'acétoïne de Voges Proskauer. Ils se caractérisent par l'absence de la plupart des enzymes mais la présence de pyrrolidonyl arylamidase et leucine aminopeptidase avec arginine dihydrolase. Ils fermentent la plupart des sucres comme le mannitol et le lactose d'origine bovine et l'amidon, sauf l'arabinose et le raffinose (**figure 31**).



Figure 31. Identification biochimique d'*Enterococcus faecalis*.

L'identification biochimique par le profil numérique de sept chiffres 7143711 extraite de la galerie représente une similitude de 99.3 % de la somme des pourcentages des tests positifs sur leur nombre total, ce qui indique que la bactérie est *Enterococcus faecalis* (**tableau 10**).

Tableau 10. Etablir de profil numérique à la galerie API 20 Strep.

Galerie API 20 Strep	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
	7			1			4			3			7			1			1	
Profil numérique: 7143711																				

3.3.3. Profil numérique de galerie API 20 E

Les résultats de galerie d'identification d'*Enterobacteriaceae* montrent ces bactéries que a été testé produisent β -galactosidase, lysine décarboxylase et ornithine décarboxylase et ne produit pas de tryptophane désaminase et d'uréase avec la production d'indole. Ils n'utilisent pas le citrate comme seul source de carbone et ne réduit pas le soufre c'est-à-dire H₂S négatif. De plus, ils fermentent la plupart des sucres comme glucose, mannitol et arabinose sauf l'inositol, saccharose et amygdaline (**figure 32**).



Figure 32. Identification biochimique d'*Escherichia coli*.

L'identification biochimique par le profil numérique de sept chiffres 5144552 extraite de la galerie représente une similitude total de 100 % de la somme des pourcentages des tests positifs sur leur nombre total, ce qui indique que la bactérie est *Escherichia coli* (**tableau 11**).

Tableau 11. Etablir de profil numérique à la galerie API 20 E.

Galerie API 20 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
	5		1			4			4			5			5			2		
Profil numérique: 5144552																				

3.3.4. Profil numérique de galerie API 20 NE

Les résultats de galerie d'identification des bactéries à Gram négatif non entérobactéries montrent ces bactéries que a été testé réduisent des nitrates en nitrites, ils ne produisent pas d'uréase et aucun formation d'indole. Ils faites également l'hydrolyse de la gélatine d'origine bovine et l'esculine. Parmi les tests qu'ils n'ont n'assimile pas l'arabinose, mannose, maltose et l'acide phénylacétique, tandis que tous les autres substances sont assimilées (**figure 33**).



Figure 33. Identification biochimique de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'identification biochimique par le profile numérique de sept chiffres 1454571 si l'on ne prend pas en compte le test oxydase, et le chiffres 1454575 si l'on prend en compte le test oxydase, extraite de la galerie représente une similitude de 99.7 % et 99.9 % respectivement de la somme des pourcentages des tests positifs sur leur nombre total, ce qui indique que la bactérie est *Pseudomonas aeruginosa* (**tableau 12**).

Tableau 12. Etablir de profil numérique à la galerie API 20 NE.

Galerie API 20 NE	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	1		4			5			4			5			7			1		
Profil numérique: 1454571																				

Toute l'incertitude persistante peut généralement être résolue à l'aide d'une galerie d'identification comme API Staph ou bien kit rapide. Il y a également une gamme de systèmes d'identification entièrement automatisés actuellement disponible. Plusieurs dispositifs dans le commerce sont disponibles pour identifier l'espèce *Enterococcus*, les systèmes API 20 Strep et API Rapid ID 32 semblent fonctionner relativement bien pour *E. faecalis*. Des souches d'*E. coli* pathogènes peuvent être phénotypiquement identiques aux souches commensales d'*E. coli*, tandis que d'autres peut donner lieu à des réactions atypiques avec des tests biochimiques particuliers qui facilitent l'identification d'*E. coli*. La diversité de genre *pseudomonase* rend difficile à considérer leurs propriétés en tant que groupe unique et l'espèce type majoritaire sont spécifiquement *P. aeruginosa* (**Gillespie et Hawkey, 2006**).

4. Taux des prélèvements

4.1. Pyramide d'infection nosocomiale

En prélevant des échantillons dans l'environnement hospitalier pour détecter les infections nosocomiales bactériennes, où nous avons modélisé une pyramide de distribution de ces infections (**figure 34**), cette pyramide se compose de trois parties principales. Premièrement la base de pyramide, elle représente la circonférence d'environnement hospitalier en général avec ses composantes matérielles et humaines, où le pourcentage des prélèvements positifs exprime les microorganismes vivants spécifiques et prévus, tout en exprimant également le taux d'infection qui peut être causé par circonférence d'environnement hospitalier. Les fréquences et les ratios d'échantillonnage positifs que nous recherchons dans des endroits spécifiques, facultativement ou aléatoirement, ne représente pas catégoriquement l'infection dans son ensemble à l'hôpital, dans la mesure où elle inclut également un aspect permettant d'estimer les ratios des espèces qui n'ont pas été détectés. Deuxièmement le centre de pyramide, exprime un secteur médical de sorte qu'il s'incarne comme un environnement d'hospitalisation de petite taille et plus spécifiquement, notamment en termes de colonisation par des microorganismes. La somme des taux d'infection de chaque secteur médical représente le pourcentage d'infection en l'hôpital dans son ensemble, et ceci dans les limites des secteurs médicaux dans lesquels les échantillons ont été prélevés. Où le taux d'infection exprime la diversité quantitative et qualitative entre des microorganismes isolés ou non isolés. Troisièmement le sommet de pyramide, elle représente le site contaminé à partir duquel l'échantillon a été prélevé avec précision, car il est considéré comme la première source de danger à laquelle une personne peut être exposée, directement ou indirectement. D'autre part, il est considéré comme un réservoir ou un microenvironnement pour la multiplication et la colonisation des microorganismes. Enfin dans ses dimensions, la pyramide des infections garantit qu'il est facile de diagnostiquer les zones touchées et de révéler l'infection dans les moindres détails afin de le combattre.

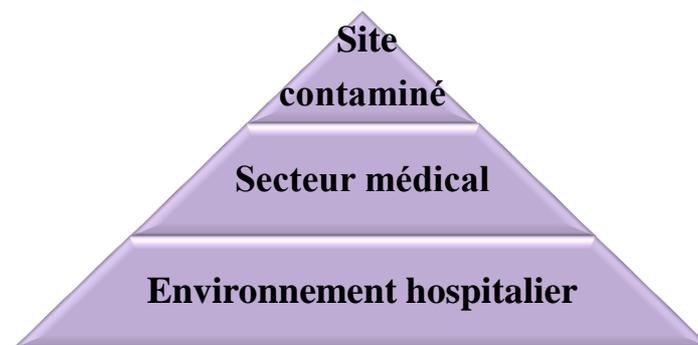


Figure 34. Pyramide évolutive et distributaire d'infection nosocomiale.

4.2. Fréquences des prélèvements positifs d'hôpital

Sur un total de 18 échantillons prélevés des 6 secteurs médicaux de 3 échantillons pour chacun, d'hôpital El-Meghaier en l'Algérie. 72 prélèvements positifs ont été trouvés, dont 40 échantillons représentant les espèces bactériennes *Staphylococcus aureus* (S.a), *Enterococcus faecalis* (E.f), *Escherichia coli* (E.c) et *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) (**figure 35**).

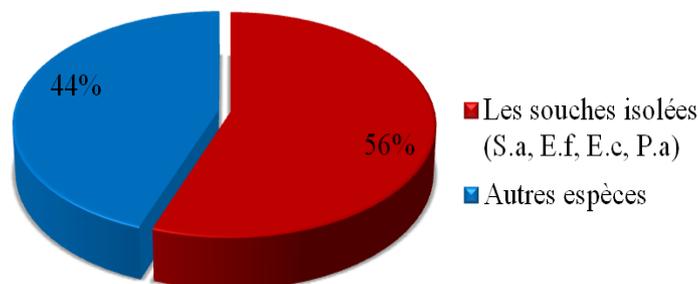


Figure 35. Fréquences des souches isolées indiquées par prélèvements positifs.

Le rapport de 56 % représenté par les souches bactériennes isolées est très important, nous concluons à partir de ces pourcentages que les quatre types bactériens sélectionnés occupent plus de la moitié des infections nosocomiales, indiquant leur prévalence globale dans des nombreux secteurs hospitaliers et préservant leur statut environnemental (**tableau 13**), alors que les autres organismes représentent un pourcentage de 44 %, mais nous n'excluons pas les infections et les maladies qui peuvent les provoquer.

Tableau 13. Fréquence des souches en termes de secteur médicale et site de prélèvement.

Secteur médicale	Site de prélèvement	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	Σ
Médecine femme	Poigné de porte	1	0	0	0	1
	Lavabo	0	0	0	0	0
	Sol	0	1	1	1	3
Médecine homme	Poigné de porte	1	1	1	1	4
	Lavabo	1	1	0	0	2
	Sol	1	1	1	1	4
Pédiatrie	Paillasse	1	1	0	1	3
	Chariot	1	0	0	1	2
	Lit	0	0	0	1	1
Bloc opératoire	Instrument opératoire	1	0	0	1	2
	Lavabo	0	0	0	0	0
	Lit	1	0	0	0	1
Maternité	Sol	1	1	1	1	4
	Lit	1	1	1	1	4
	Lavabo	0	1	0	0	1
Urgence	Sol	1	0	1	0	2
	Lit	1	1	1	1	4
	Table fixe	1	0	0	1	2
Σ		13	9	7	11	40

D'après **Méité *et al.* (2010)**, la présence des bactéries multirésistantes d'origine humaine au niveau des surfaces de l'environnement hospitalier est le témoin d'une mauvaise hygiène dans les structures de soins. Les ratios de colonisation des sites gérés par la santé, les soins personnels ou les visiteurs peuvent être un réel risque d'infection pour les patients. La surveillance microbiologique des surfaces semble être une stratégie efficace de l'hôpital pour lutter contre les infections nosocomiales, dans le cadre de la démarche qualité de notre établissement de soins. **Ducel *et al.* (2008)** ont dit que les infections nosocomiales sont connues dans le monde entier et touchent aussi bien les pays développés que les pays pauvres en ressources. Les infections contractées en milieu médical figurent parmi les causes majeures de décès et de morbidité accrue parmi les patients. Elles représentent une charge importante pour le patient comme pour la santé publique. Une enquête de prévalence réalisée pour l'OMS dans 55 hôpitaux de 14 pays représentant quatre régions l'Europe, Méditerranée orientale, Asie du sud-est et Pacifique occidental a montré qu'en moyenne 8.7 % des patients hospitalisés étaient touchés par une infection nosocomiale.

4.3. Fréquences des prélèvements positifs de chaque secteur médical

Les prélèvements positifs qui expriment la prévalence de l'infection est répartie dans les secteurs médicaux d'hôpital El-Meghaier en l'Algérie, où la grande fréquence pour la médecine homme 83.33 %, la maternité 75 % et l'urgence 66.66 %, où le secteur d'urgence est le premier à recevoir des différents cas des maladies avant de réintégrer les patients dans leur propres secteurs médicaux. Alors que les bactéries isolées représentent la moitié de l'infection complètement dans le secteur de la pédiatrie par 50 %, tandis qu'elle se situe entre 25 à 33.33 % dans le bloc opératoire et la médecine femme respectivement (**figure 36**). Les conditions de soins contrôlent la réduction de l'infection, par contre les facteurs de mouvement d'un secteur à l'autre cause une transmission permanente de l'infection d'un endroit infecté à un endroit pur.

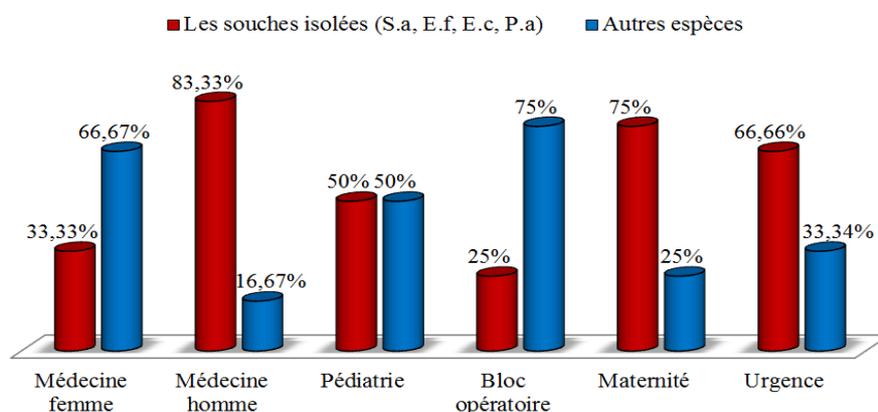


Figure 36. Fréquences des prélèvements positifs de chaque secteur médical.

L'OMS dit selon **Ducel *et al.* (2008)** que plus nous abordons l'étude de la prévalence des infections nosocomiales dans un secteur médical spécifique, plus que le taux est fiables et nous permet de faire des comparaisons statistiques significatif. Bien que la surveillance est essentiellement axée sur les secteurs à haut risque, des activités de surveillance doit être aussi exercées dans le reste de l'hôpital. D'après **Bercion *et al.* (2007)** les infections du site opératoire (ISO) sont la première cause d'infections nosocomiales parmi les patients opérés et la troisième cause sur l'ensemble des patients hospitalisés, après les infections urinaires et les infections respiratoires, en Europe et aux États-Unis. Par convention, on considère comme une ISO une infection survenant dans les 30 jours suivant le geste chirurgical ou au cours de l'année, en cas de pose de matériel. La fréquence des ISO est liée à un grand nombre de facteurs, comme les facteurs propres au patient (âge, terrain, immunodépression), des facteurs liés à l'acte chirurgical, comme la durée et le type de l'intervention, mais aussi des facteurs liés au contexte hospitalier, comme le niveau d'hygiène et les conditions d'intervention. Depuis de nombreuses années, la surveillance de l'ISO fait partie intégrante de la politique de maîtrise des infections nosocomiales dans les pays du nord. **Ngaroua *et al.* (2016)** ont dit que les infections des sites opératoires (ISO) sont à l'origine de morbi-mortalité et des dépenses supplémentaires en santé. Les pays en développement en sont les plus touchés. L'incidence des ISO est élevée en l'Afrique. **Ducel *et al.* (2008)** montrent que les systèmes de filtration à haute efficacité à la salle d'opération éliminent les bactéries de 0.5 μm à 5 μm et produisent un flux descendant d'air exempt de bactéries. La salle d'opération est maintenue en pression positive par rapport aux couloirs voisins de façon à réduire au minimum la pénétration d'air.

Le taux d'infection bactérienne néonatale était de 52.4 % (**Andrianarivelo *et al.*, 2010**), les infections nosocomiales sont fréquentes en néonatalogie, en particulier chez les prématurés qui cumulent plusieurs facteurs de risque tel que l'immaturation du système immunitaire, absence ou faible concentration d'anticorps, organisme initialement axénique soumis en quelque jours à une contamination massive en provenance de l'environnement et du personnel, durée prolongée des cathéters veineux centraux (CVC) et de la ventilation artificielle (**Doit *et al.*, 2015**). Parmi les infections lors de l'accouchement est la fièvre puerpérale au secteur de maternité, l'une des causes les plus courantes de mortalité dans les pays en développement. Les infections peuvent être contractées lors de l'accouchement dans la communauté ou dans les établissements de santé (**Hussein *et al.*, 2011**).

L'écologie bactérienne du service réanimation de l'urgence a été décrite comme aussi l'antibiotique, la population affectée par une infection hospitalière était majoritairement masculins par rapport les féminines (**Siah *et al.*, 2009**).

4.4. Fréquences des prélèvements positifs de chaque site de prélèvement

Les fréquences d'infection sont répartir sur plusieurs sites dans différents secteurs médicaux d'environnement hospitalier (**figure 37**). Le sol sur la surface de terre représente un grand réservoir pour contenir l'infection, à un taux de 81.25 %. Les paillasses de travail représentent le deuxième réservoir à contenir l'infection de 75 % à cause de plusieurs travaux médicaux variés qui s'y appliquent. En outre, les sites les plus utilisés et directement exposés à l'infection par les patients et les personnels de santé ou bien les visiteurs sont les poignées de porte et les lits, qui représentent un taux d'infection de 62.5%. Aussi, des tables fixes sur lequel la plupart des équipements y compris les médicaments et les appareils supportent ont elle un taux d'infection moyenne de 50 %, ainsi que les chariots sont des tables mobiles représentent le même taux de celle-ci malgré le mouvement permanent qui devrait lui faire acquérir un taux d'infection plus élevé. De plus, les échantillons prélevés d'instruments opératoires dans la salle de stérilisation de bloc opératoire expriment la moitié de l'infection de 50 %, la stérilisation des instruments opératoires nécessite des précautions adéquates et d'autres méthodes comme l'autoclavage peut éliminer l'infection totalement, ces méthodes de stérilisation dépendent du type de matériel à stériliser. Un cas exceptionnel et particulier lavabo, est un évier existe dans chaque secteur médicale représente un faible taux d'infection de 18.75 % par rapport au reste des sites, il convient de noter que certains lavabos, tels que ceux présents dans la salle d'opération d'où les échantillons ont été prélevés, étaient complètement exempts d'infection en raison de la coulée fréquente des solutions de désinfection comme l'eau de Javel, qui à son tour a complètement éliminé l'infection sur ce site, cela est montre que les désinfectants sont des éléments clés pour réduire l'infection nosocomiale au l'environnement hospitalier.

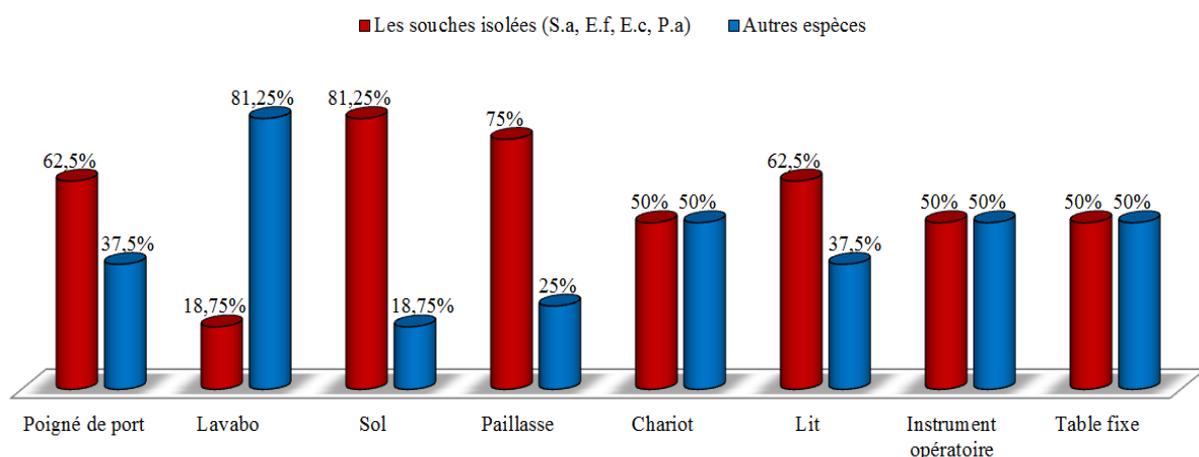


Figure 37. Fréquences des prélèvements positifs de chaque site de prélèvement.

Selon **Ducel et al. (2008)** parmi les flores présente dans l'environnement des soins de santé (infections environnementales exogènes endémiques ou épidémiques) sont des plusieurs types de microorganismes survivent bien dans l'environnement hospitalier. Ils présents dans l'eau, les milieux humides et parfois dans des produits stériles ou des désinfectants comme les bactéries de genre *Pseudomonas*. Ainsi dans le linge, le matériel médical et les fournitures utilisés pendant les soins. Un nettoyage approprié des locaux limite normalement le risque de survie de bactéries car la plupart nécessitent un environnement chaud ou humide et des éléments nutritifs pour survivre et aussi dans les poussières fines et les noyaux des gouttelettes émises en toussant ou en parlant (des bactéries de moins de 10 µm de diamètre restent en suspension dans l'air pendant plusieurs heures et peuvent être inhalées de la même façon que les poussières fines) et en plus dans les aliments. Les sites les plus contaminées étaient les robinets, les respirateurs, les poignées de portes, les lavabos et les lits, cette situation est liée au faite que ces matériels sont fréquemment manipulés par le personnel soignant ou les visiteurs (**Méité et al., 2010**). L'environnement hospitalier ainsi que le matériel réutilisable du bloc opératoire peuvent être source d'infections associées aux soins (**Dossim et al., 2017**). Les patients atteints doivent être transférés d'un secteur à l'autre dans les meilleures conditions possibles et de bien gérer le secteur d'accueil afin éviter les infections hétérogènes ou croisées. D'autres facteurs de risque ne font pas l'objet de notre étude mais nécessitent une attention particulière. Il s'agit notamment de la stérilisation, du lavage des mains et de la gestion des déchets hospitaliers (**Kasongo Kakupa et al., 2016**).

4.5. Ratios des souches bactériennes isolées

4.5.1. Réparties en l'environnement hospitalier

L'environnement hospitalier est très riche en espèces bactériennes (**figure 38**), *Staphylococcus aureus* est très fréquent dans les hôpitaux qui représentant 32 %, il est considéré parmi les isolats faciles à identifier tout en enquêtant sur la présence d'une infection à un site de contamination, suivi par l'*Escherichia coli* qui exprime un taux de 27 %, et elle est considérée comme la plus courante parmi les infections incurables qui recours au diagnostic de laboratoire des personnes atteintes d'infections des voies urinaires. En troisièmes place, on trouve l'*Enterococcus faecalis* avec 23 % et caractérisées par une transmission permanente et peut provoquer une infection à tout moment bien qu'ils soient très sensible dans des conditions environnemental changeantes. La quatrième place est occupée par *Pseudomonas aeruginosa*, qui représente 18 % et décrite comme des bacilles d'environnement hospitaliers en général, bien qu'en dépit de sa diminution dans les secteurs médicale par rapport au reste des bactéries. Parmi ces isolats, *P. aeruginosa* est le plus

dangereux en termes d'infection et elle est propre à l'environnement hospitalier par rapport à la plupart des milieux dans lesquels il peut être trouvé.

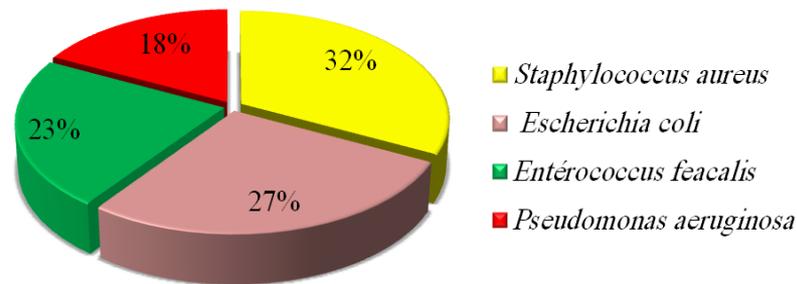


Figure 38. Ratios de chaque souche bactérienne isolée à l'hôpital d'El-Meghaier.

Ducel *et al.* (2008) ont dit que pendant le séjour à l'hôpital, le patient est exposé à divers agents microbiens. Le contact avec un micro-organisme ne signifie pas nécessairement que le patient développera une maladie clinique, car d'autres facteurs influents sur la nature et la fréquence des infections nosocomiales. La probabilité qu'une exposition conduise à la maladie dépend en partie des caractéristiques du microorganisme en cause, y compris sa résistance aux anti-infectieux, de sa virulence intrinsèque et de la quantité de matériel infectieux (inoculum). Ces microorganismes peuvent provenir d'une autre personne présente dans l'hôpital (infection croisée) ou de la propre flore du patient (infection endogène). Il peut aussi s'agir de germes présents sur un objet ou dans une substance récemment contaminés par une autre source humaine d'infection (infection environnementale). Les agents infectieux varient selon les populations de patients et les types d'établissements de santé, d'un établissement à l'autre et d'un pays à l'autre. Les bactéries sont les plus courants des agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales.

L'étude de **Boyce (2007)** concernant la contamination environnementale montre que le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont capables de survivre pendant des jours ou des semaines sur les surfaces environnementales dans les établissements de santé. Les surfaces environnementales fréquemment touchés par les travailleurs de la santé sont généralement contaminés les chambres des patients colonisés ou infectés par le SARM ou l'ERV. Un numéro des études ont démontré que les professionnels de la santé peuvent contaminer leur des mains ou des gants en touchant des surfaces environnementales contaminées, et les mains ou les gants sont contaminés par un nombre d'organismes qui sont susceptibles d'entraîner une transmission aux patients. Les agents pathogènes peuvent également être transférés directement des surfaces contaminées aux patients sensibles. Il existe de plus en plus de preuves que le nettoyage ou la désinfection de l'environnement peut réduire la transmission d'agents

pathogènes associés aux soins de santé. **Oliveira et Damasceno (2010)** aussi ont dit que la formation permanente des travailleurs et orientation des patients, parents et visiteurs sur les mesures de contrôle d'infection associé aux soins de santé sont un aspect important à traiter dans les services de santé.

4.5.2. Réparties en chaque secteur médical

Les proportions des bactéries isolées varient selon le secteur médical, car elles peuvent être élevées en milieu et faible ou presque absentes dans d'autres milieux, cela est dû au fait qu'il a des besoins de subsistance particuliers, des milieux préférés et de nombreux autres facteurs de présence (**figure 39**). La bactérie *Staphylococcus aureus* occupe un quart du taux d'infection ou plus, variant entre 25 et 38 %, ce qui est dans le secteur de la médecine femme, de la médecine homme, de la pédiatrie, et en particulier dans l'urgence, qui traite le plus grand nombre de blessés et d'autres accidents multiples. Le *S. aureus* balaie le bloc opératoire à un taux significatif de 67 % en raison du fait que toutes les chirurgies laissent une fuite de sang qui provoque la multiplication de ces bactéries et sont quelque peu faibles dans le service maternité et sont estimées à 22 %. L'*Enterococcus faecalis* balaie également le quart de l'infection, mais dans certains secteurs seulement entre 25 et 33%, notamment en médecine homme, médecine femme et maternité. La raison de cette large prévalence au secteur de la maternité est le résultat de sécrétions vaginales pendant l'accouchement qui sont riches en organismes bactériens entériques qui accompagné à une fuite de sang, ce qui lui confère un niche environnemental permanent. Les salles de soins infirmiers et de soins aux patients pendant leur séjour dans ces secteurs contiennent des toilettes, ce qui conduit à favoriser la propagation des entérocoques en cas de non-respect des conditions de nettoyage nécessaires. Par contre, elle est des proportions faibles de 13 à 17 % dans le secteur de la pédiatrie et d'urgence, et quelque peu absente dans le bloc opératoire. *Escherichia coli* constitue la moitié de l'infection en pédiatrie, où elle est estimée à 50 %, provoquant une infection des voies urinaires chez les enfants et une dysurie. Elle est variée entre 20-33 % dans le reste des secteurs, en particulier le secteur des urgences et de bloc opératoire, provoquant de nombreuses infections urinaires de la prostate et de la vésicule urinaire, diarrhée sévère et semblable de la dysenterie. La prévalence de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* a été estimée à 20-25 % dans la plupart des secteurs, alors qu'elle était absente en pédiatrie et en bloc opératoire. Ces bactéries se caractérisent par leur opportuniste, c'est-à-dire qu'elles sont susceptibles de provoquer un danger compte tenu de la disponibilité de facteurs qui y contribuent. Son absence dans certains secteurs n'exclut aucun cas de son retour, ce qui se fait par transfert direct ou indirect.

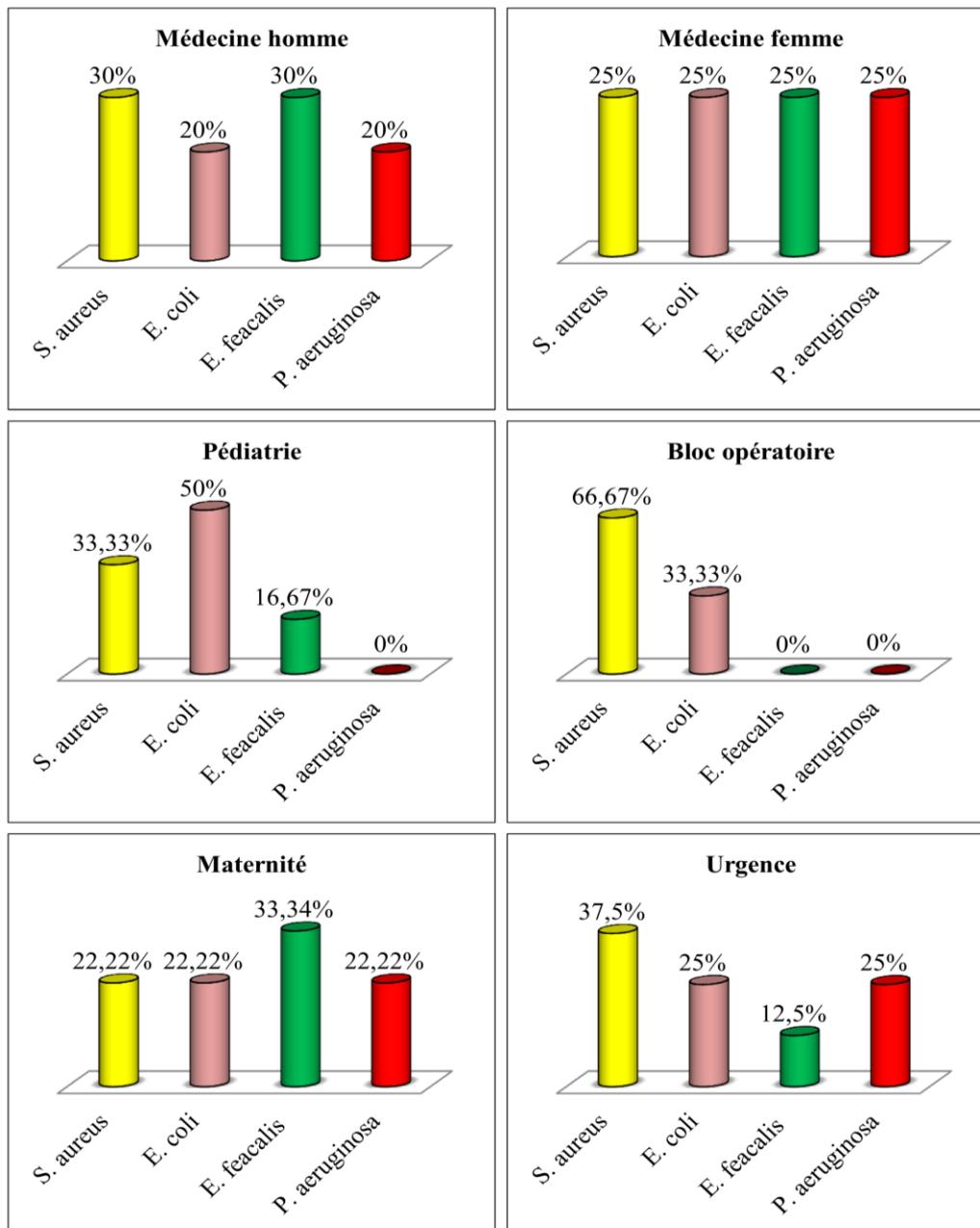


Figure 39. Ratios des souches bactériennes isolées selon le secteur médical.

D'après **Boyce (2007)**, le nettoyage de routine des équipements et autres surfaces à contact élevé n'élimine pas toujours les agents pathogènes des surfaces contaminées, amélioré des méthodes de désinfection de l'environnement hospitalier sont nécessaires. Préliminaire des études suggèrent que la technologie de la vapeur de peroxyde d'hydrogène mérite davantage l'évaluation comme méthode de décontamination de l'environnement milieu de soins. **Kasongo Kakupa et al. (2016)** ont dit que les infections du site opératoire étaient dominantes et les germes responsables d'une infection nosocomiale chez les patients étaient l'*Escherichia coli*, le *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*...etc.

L'incidence cumulative de service réanimation en l'urgence pour ce qui est des caractéristiques des infections bactériennes, les principaux germes étaient *Staphylococcus* 33.3 %, *Pseudomonas aeruginosa* 23 % et *Enterococcus faecalis* 8 % étant l'une des principales causes de morbidité et de mortalité chez le brûlé (Siah *et al.*, 2009). Les infections bactériennes nosocomiales dans l'unité néonatale et pédiatrique ont une incidence comparable à celle observée dans les pays développés, elles sont dominées par les bactériémies et sont principalement dues aux bacilles à Gram négatif (Ben Jaballah *et al.*, 2006).

4.5.3. Réparties en chaque site de prélèvement

De nombreux sites de l'hôpital sont directement exposés à l'infection en raison des utilisations répétées sur eux, les bactéries qui causent l'infection sont distribuées selon les principales sources et leurs conditions d'adaptation (figure 40). Le *S. aureus* constitue 40 % des poignées de porte sur lesquelles les mains sont échangées, tandis que les portes qui restent ouvertes expriment inévitablement une valeur d'infection inférieure. Elle représente des proportions égales de 50 % dans chacun des chariots, les instruments opératoires et les tables fixes, elle varie entre 30 et 33.33 % dans les lits, les lavabos et les paillasse. Dans le sol, elle représente 23.07 %. En revanche, l'*Enterococcus faecalis* se situe entre 20 et 23.07 % dans les lits, les poignées de porte et le sol. Elle a un ratio élevé de 66.67 % dans le lavabo, qui est une preuve de la résistance de ce dernier aux différents antiseptiques déversés dans lavabo. Par contre, il est absent dans les chariots, tables fixes et les instruments opératoires. Ce qui a été remarqué était la présence de bactéries l'*E. faecalis* dans les endroits humides plus que dans les endroits secs. De plus, l'*Escherichia coli* se situe entre 20-23.07 % sur les poignées de porte et le sol. Aussi elle situe entre 30-33.34 % dans les lits et les paillasse. Elle représente la moitié de l'infection est à 50 % dans les chariots, les instruments opératoires et les tables fixes, tandis que elle est nulle dans les lavabos. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* se caractérise par son absence dans la plupart des endroits, sauf dans d'autres, où il représente une grande proportion dans le sol de 30.79 % et 20 % dans les lits et les poignées de porte, la présence de cette dernière à certains endroits ne fait qu'indiquer le comportement opportuniste qui le caractérise.

Oie *et al.* (2002) ont dit que la contamination des poignées de porte de la chambre d'hôpital est due par *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), tandis que dans le lit elle est due par *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (SASM). Le taux de transmission du SARM était de 0,36 cas d'infection nosocomial pour 100 hôpitaux les admissions. Cette colonisation importante des sites constituent un risque réel de transmission manuportée des bactéries pouvant être à l'origine d'infection. Selon Dossim *et al.* (2017)

parmi les bactéries qui sont à la fois des cocci à Gram positif et des bacilles à Gram négatif retrouvées sur le matériel chirurgical ainsi que l'environnement opératoire les *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*. La présence de quelques résistances aux antibiotiques fait craindre une épidémie potentielle en cas d'inoculation à un patient.

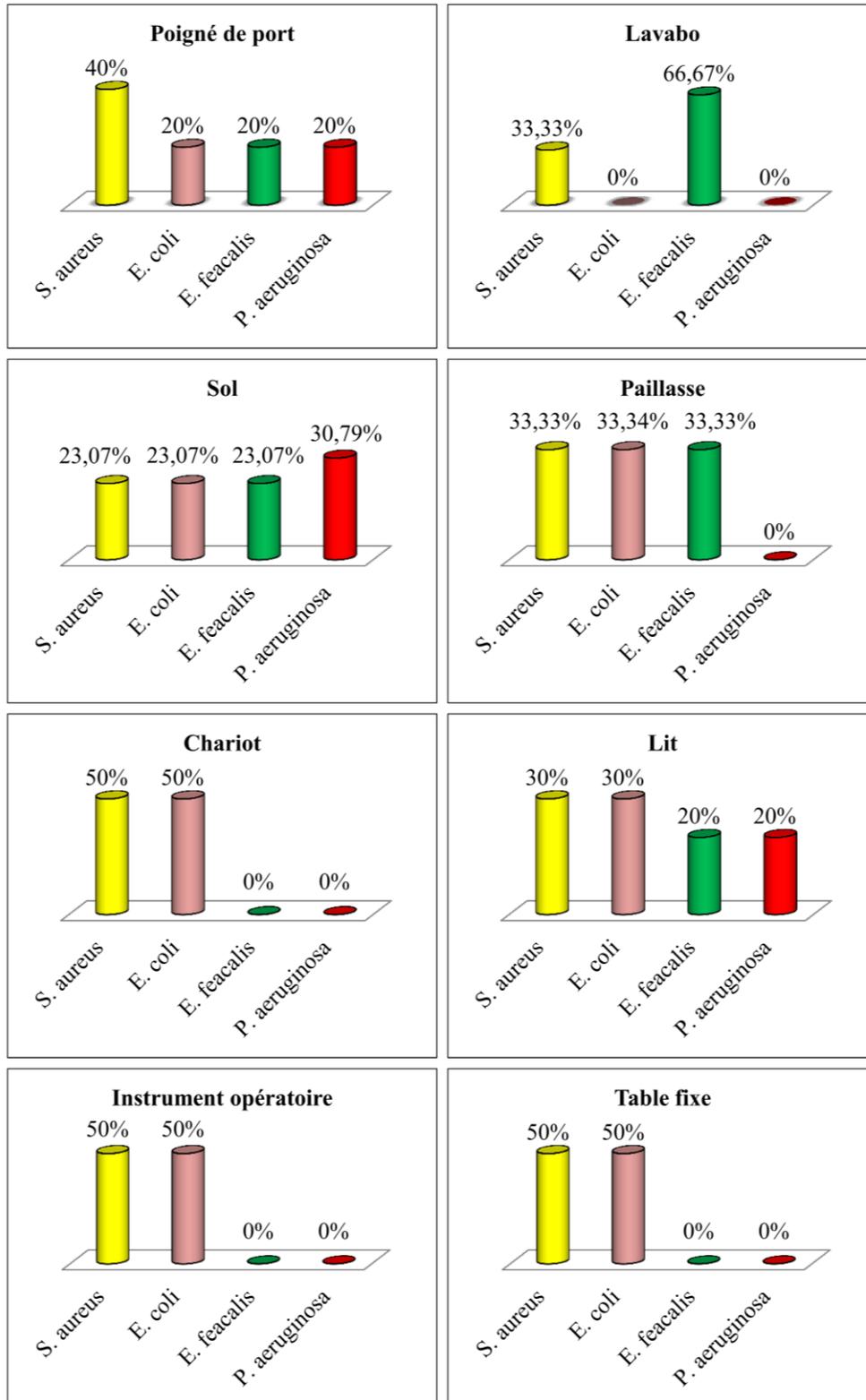


Figure 40. Ratios des souches bactériennes isolées dans chaque site de prélèvement.

5. Résultats de détection de biofilm *in vitro*

5.1. Biofilm par méthode gélose rouge Congo

5.1.1. Aspect de biofilm sur RCA

La gélose rouge du Congo révèle le pouvoir sécrétoire de la slime, qui est une substance polysaccharidique distingue les bactéries qui forment des biofilms et apparaît noire au milieu. À travers le milieu, les colonies bactériennes apparaissent à peine autant que la sécrétion de slime malgré que nous ayons encemencé les bactéries avec la même technique des stries serées, et cela n'apparaît que dans certaines cas. Nous avons remarqué une différence phénotypique en termes de formation de biofilm après 24 h à 37 °C entre les isolats de la même espèce et entre les différentes genres de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (**figure 41**).

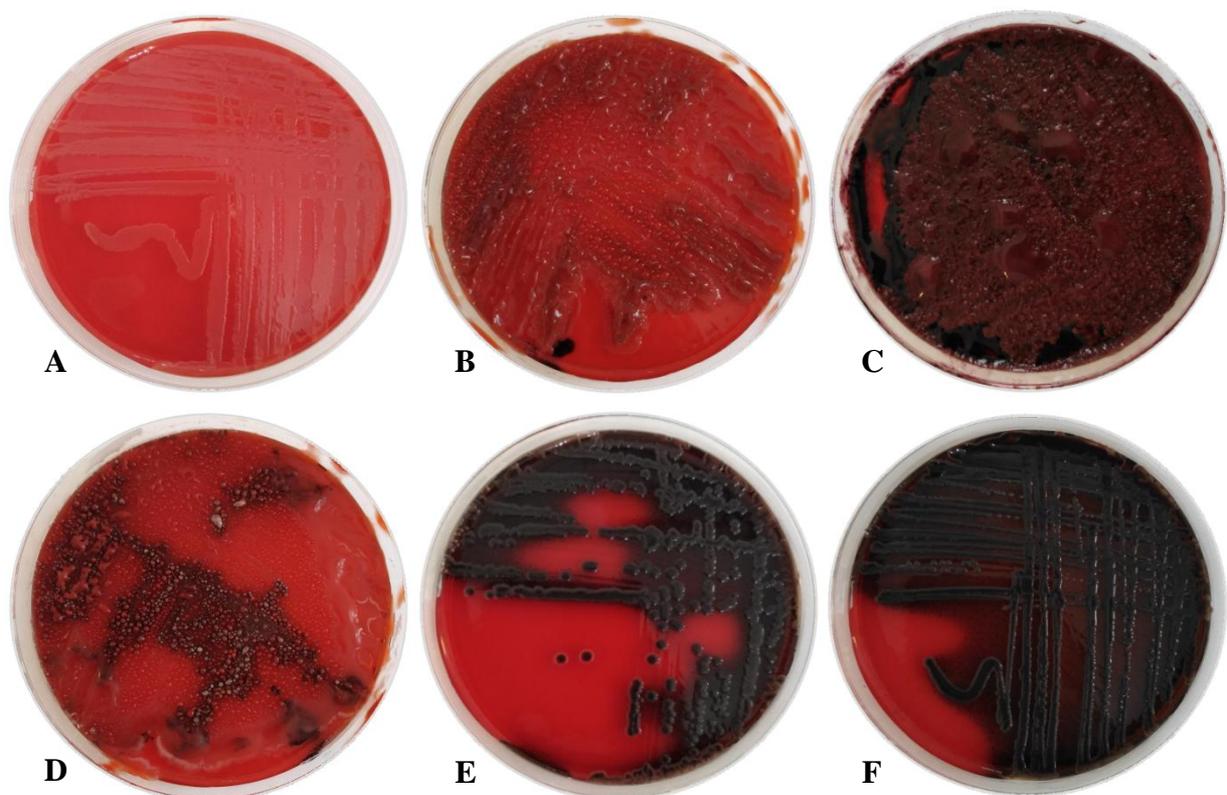


Figure 41. Détection de la production de slime et formation de biofilm sur RCA.

A: Rouge (faible), **B:** Très rouge (faible), **C:** Couleur bordeaux (moyen),

D: Presque noir (fort), **E:** Noir (fort), **F:** Très noir (fort)

Nous avons trouvé différents modèles pour l'expression du biofilm qualitativement en utilisant la méthode de la gélose rouge Congo. La capacité de formation du biofilm varie d'une bactérie à l'autre entre un biofilm fort, moyen ou faible (**tableau 14**). Le biofilm est produit en abondance, parfois au degré de gonflement moide, avec des gouttelettes d'eau et

une odeur désagréable. D'autre part, le biofilm est parfois produit à sec et la slime est dispersée dans le milieu de manière diffusible ou bien autour des colonies elle-même.

Tableau 14. Capacité formatrice de biofilm en termes d'aspect chromatique sur RCA.

Capacité formatrice de biofilm	Aspect chromatique sur gélose rouge Congo
Fort	Noir, presque noir, très noir
Moyen	Couleur bordeaux
Faible	Rouge, très rouge

Les boîtes étaient inspectées pour la couleur des colonies. Le résultat de biofilm positif a été indiqué par les colonies noires alors que la souche non productrice de biofilm développe des colonies rouges (**Karki et al., 2019**). L'utilisation des méthodes fiables pour détecter spécifiquement les biofilms peut être utile pour traiter les patients affectés par ces bactéries problématiques (**Kord et al., 2018**).

Arciola et al. (2002), en utilisant la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), démontrent la présence de gènes *ica* responsables de la synthèse de slime et la méthode RCA fait partie de capacité à production de slime *in vitro*. La méthode originale RCA a été optimisée et adopter une échelle de référence à six couleurs pour une classification fine des couleurs des colonies. La comparaison de la classification des couleurs avec les informations sur les gènes *ica* ont confirmé la validité de l'échelle adoptée, étayant les critères utilisés pour une interprétation correcte des colonies colorées lors de l'exécution la méthode RCA. Globalement, ces résultats indiquent une bonne cohérence entre les deux méthodes expérimentales RCA et PCR avec une bonne fiabilité de la méthode RCA, en particulier lorsque cela est soutenu par une échelle colorimétrique. **Francolini et Donelli (2010)** ont dit qu'un processus de communication appelée la détection du quorum (QS) entre les cellules joue un rôle important dans la modulation non seulement l'expression de gènes associés à la production d'enzymes spécifiques, de facteurs de virulence et de métabolites mais aussi le développement de communautés microbiennes biofilms.

Les biofilms sont un groupe de microorganismes enfermés dans une couche d'exopolysaccharides appelée slime. Ils ont été associés à une variété d'infections persistantes qui répondent mal aux traitements conventionnels antibiotiques (**Bose et al., 2009**).

Rewatkar et Wadher (2013) ont dit que les méthodes de diagnostic identifiant les souches bactériennes virulentes, c'est-à-dire les souches ayant une capacité de production de slime sont nécessaires pour développer des stratégies efficaces de contrôle contre le biofilm et amélioration des soins aux patients.

5.1.2. Ratios des biofilms formés sur RCA

À propos de cocci à Gram positif, les 13 isolats de *Staphylococcus aureus* ont montré que 53.86 % d'entre eux sont capables de former un biofilm fort, alors qu'ils varient de biofilms moyens à faibles de 23.07 %. De plus, 9 isolats d'*Enterococcus faecalis* ont révélé 66.67 % du biofilm fort, 22.22 % du biofilm moyen et 11.11 % du biofilm faible. D'un autre côté concernant des bacilles à Gram négatifs, les 7 isolats de *Pseudomonas aeruginosa* ont démontré une forte composition de biofilm de 71.42 % et un biofilm moyen de 14.29 % et la même proportion pour un biofilm faible. Parmi les 11 isolats d'*Escherichia coli*, un biofilm fort s'est formé avec 81.82 % et un biofilm moyen et faible de 9.09 % (**figure 42**).

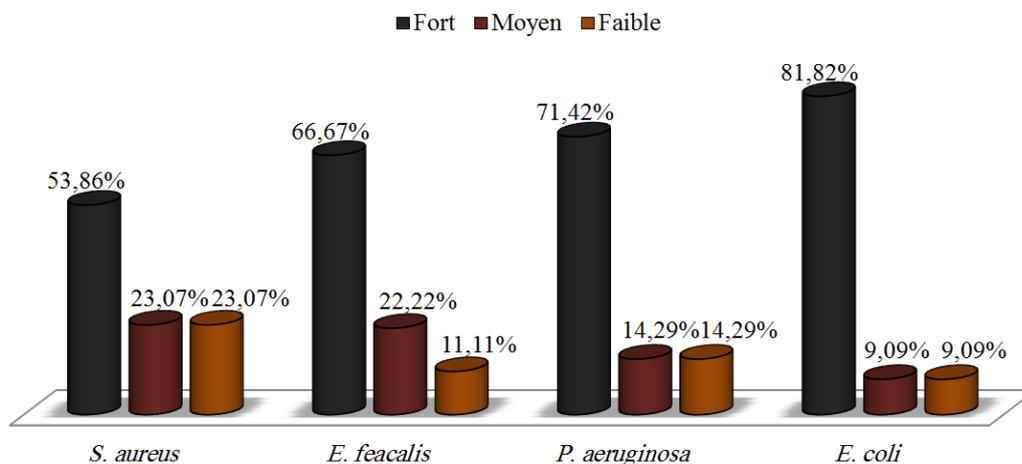


Figure 42. Ratios de formation de biofilm entre les souches bactériennes isolées.

D'après **Bose et al. (2009)**, le taux de positivité de production de biofilm était supérieur par méthode de gélose rouge Congo grâce à des paramètres comme la sensibilité de 8.25 %, la spécificité 96.34 %, la valeur prédictive négative (NPV) de 47.02 % et une valeur prédictive positive (PPV) de 72.72 %, comparé à d'autres méthodes qui permettent la production de biofilm *in vitro*. **Abdel Halim et al. (2018)** ont dit que les isolats de *S. aureus* étaient les producteurs de biofilms de 53.2 % et considérer les plus courants par rapport aux *Staphylococcus* à coagulase négatif (SCN). **O'Neill et al. (2007)** ont montré que l'association entre la sensibilité à la méthicilline chez *S. aureus* et la formation de biofilms est dépendant des gènes *ica* et la production de l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) essentielle pour la formation de biofilms et nous trouvons cela à le SASM mais pas pour le SARM. De plus, les biofilms SASM sont induit de manière significative dans les milieux de croissance complété par NaCl, qui est connu pour activer l'expression de l'opéron *ica*. Selon **Vickery et al. (2013)** l'EPS est sécrétée par les microorganismes qui suivent l'attachement à la surface. Il se compose principalement de polysaccharides, nucléiques acides, protéines et lipides et comprend entre 50 et 90 % de la masse du biofilm.

5.1.3. Comparaison biostatistique de biofilm sur RCA

Afin de comparer l'action de quatre type des bactéries cocci à Gram positive et bacille à Gram négative sur l'aptitude formatrice de biofilm qualitativement en trois différents catégories fort, moyen ou faible par le logiciel statistique IBM SPSS 20. On a trouvé les fréquences des souches ci-dessous par la méthode de gélose rouge Congo (**tableau 15**).

Tableau 15. Fréquence des souches formatrice de biofilm sur RCA.

Les souches	Biofilm par RCA			Total
	Fort	Moyen	Faible	
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	3	13
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	2	1	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	1	1	7
<i>Escherichia coli</i>	9	1	1	11
Total	27	7	6	40

Sur la base des données relatives à la fréquence des souches bactériennes produisant du biofilm, le test statistique adéquat pour déterminer s'il y a une différence ou non est le test d'indépendance Khi-deux (χ^2) après avoir entré les données dans le logiciel pour obtenir le résultat répertorié dans le (**tableau 16**).

Tableau 16. Croisement biofilm-souches par le test statistique Khi-deux.

		Les souches					
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	Σ	
Biofilm par RCA	Fort	Effectif	7	6	5	9	27
		Effectif théorique	8.8	6.1	4.7	7.4	27
		Résiduelle	-1.8	-0.1	0.3	1.6	
	Moyen	Effectif	3	2	1	1	7
		Effectif théorique	2.3	1.6	1.2	1.9	7
		Résiduelle	0.7	0.4	-0.2	-0.9	
	Faible	Effectif	3	1	1	1	6
		Effectif théorique	2	1.4	1.1	1.7	6
		Résiduelle	1.1	-0.4	-0.1	-0.6	
	Σ	Effectif	13	9	7	11	40
		Effectif théorique	13	9	7	11	40

Pour répondre à notre objectif, il suffit de comparé la valeur du test statistique Khi-deux de Pearson (k_n^2) avec la valeur critique d'une loi (χ^2) (**annexe 09**), qui est le fractile d'ordre $\alpha = 0.05$ avec un degré de liberté est $(b - 1)(s - 1)$ où $b = 3$ biofilms et $s = 4$ souches. La valeur critique du test est donnée par $\chi^2_{(ddl, \alpha)} = \chi^2_{((3-1)(4-1), 0.05)} = \chi^2_{(6, 0.05)} = 12.592$ (**tableau 17**).

Tableau 17. Comparaison de biofilm formé sur RCA par Khi-deux de Pearson.

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson (k_n^2)	2.456 ^a	6	0.873
Rapport de vraisemblance	2.500	6	0.868
Association linéaire par linéaire	1.780	1	0.182
Nombre d'observations valides	40		

a. 9 cellules (75 %) ont un effectif théorique inférieur à 5. L'effectif théorique minimum est de 1.1

Nous concluons de ce qui précède qu'il n'y a pas de différence dans la formation de biofilm entre les souches bactériennes le fait que $k_n^2 < \chi^2_{(6,0.05)}$ c'est-à-dire $2.456 < 12.592$, le biofilm se développe qualitativement sur RCA *in vitro* avec un cycle de phases fixes et généralement similaires, le biofilm peut se former en tant que fort, moyen ou faible par toutes les espèces bactériennes.

Tous les microbes comme les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ont la capacité de synthétiser le biofilm. Les bactéries communément impliquées comprennent *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* et de nombreuses autres bactéries. Celles-ci les organismes peuvent provenir de la peau des patients ou des travailleurs de la santé, de l'eau du robinet à laquelle les ports d'entrée sont exposés, ou d'autres sources dans l'environnement. Les biofilms microbiens peuvent poser un problème de santé publique pour les personnes nécessitant des dispositifs médicaux à demeure. Les micro-organismes contenus dans les biofilms sont difficiles, voire impossibles à traiter avec des agents antimicrobiens. Une image plus claire dans la résistance de biofilm et le lien établi entre la contamination par biofilm et infection du patient (**Donlan, 2001**).

Donlan et Costerton (2002) affirment que les données sur lesquelles la théorie générale de prédominance du biofilm est fondée provenaient principalement des écosystèmes aquatiques naturels, dans lesquels des observations microscopiques directes et des techniques de récupération quantitative directe ont montré sans équivoque que plus de 99.9 % des bactéries se développent dans des biofilms sur une grande variété de surfaces. Cette prédominance des biofilms a été créée dans tous les écosystèmes naturels, sauf les eaux souterraines et les océans abyssaux, et nous réalisons maintenant que ces les populations sessiles représentent la plupart des processus physiologiques ces écosystèmes.

5.2. Biofilm par technique de plaque de culture tissulaire

5.2.1. Quantification de biofilm par TCP

En fait, la technique de plaque de culture tissulaire comprend une lecture semi-qualitative et en particulier quantitativement de formation du biofilm. Dans un premier temps se trouve la lecture semi-qualitativement de la plupart des puits dans lesquels le biofilm est formé, nous le classons en un biofilm fort, moyen ou faible grâce au degré de la couleur du cristal violet récupérée par l'alcool (**figure 43**).

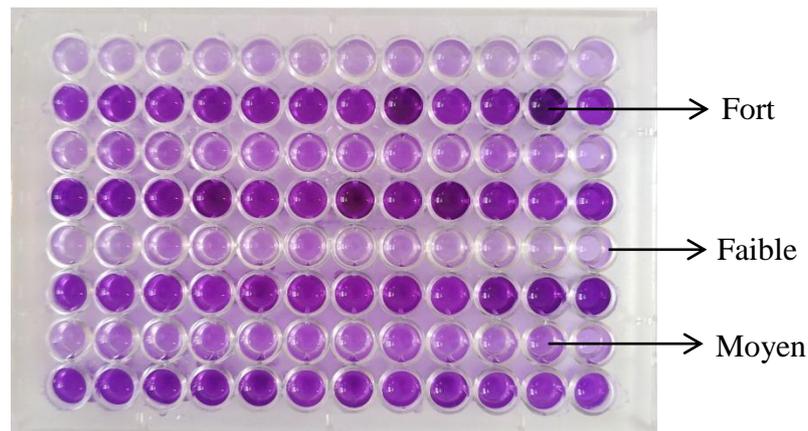


Figure 43. Formation de biofilm *in vitro* par technique TCP.

De manière quantitative, les degrés de densité optique de biofilm formé dans chaque puits ont été lus à une longueur d'onde égale à 600 nm. Les catégories de biofilm sont ajustées selon l'adhérence de la bactérie à la plaque tissulaire de polystyrène grâce à la valeur de DO de témoin qui est égal 0.065 (**tableau 18**).

Tableau 18. Lecture quantitative de la densité optique estimée du biofilm formé.

Valeurs moyennes de DO	Estimation de biofilm
$0.065 < DO \leq 0.13$	Faible
$0.13 < DO \leq 0.26$	Moyen
$0.26 < DO$	Fort

Stepanovic et al. (2007) ont dit que la méthode de Christensen 1985 ou TCP comprend la solubilisation homogène du colorant et mesure précise de biofilm formé à la fois sur le fond et les parois du puits. Le cristal violet est un colorant acceptable qui colore les cellules bactériennes mais pas la matière visqueuse de biofilm.

D'après (**Nasr et al., 2012 ; Kord et al., 2018**) la méthode des plaques de microtitrage ou TCP reste généralement un meilleur outil pour la production et le criblage de biofilms. **Francolini et Donelli (2010)** ont dit que l'adhésion microbienne dépend fortement des

propriétés physico-chimiques des matériaux constituant les dispositifs médicaux, leur charge hydrophile et superficielle étant les plus importants.

Seneviratne (2017) affirme que la formation de biofilms sur les dispositifs médicaux est influencée par des facteurs liés aux microorganismes, aux propriétés des dispositifs et au microenvironnement de l'hôte. Celles-ci comprennent particulièrement les caractéristiques physico-chimiques de la surface. Il a été démontré que l'adhésion de *P. aeruginosa* dépend de la surface du carbone pyrolytique, de l'énergie libre et de la rugosité. Au contraire, l'adhésion de *S. aureus* est indépendante des facteurs précédents. Ainsi, un modèle *in vitro* ne peut pas imiter la composition et la structure des biofilms formés *in vivo*. Pour cette raison, les résultats dérivés des modèles de biofilm *in vitro* doivent être interprétés avec prudence pour des résultats plus pertinents sur le plan clinique.

Selon **Haras (2005)** l'association organisée de bactéries au sein de leurs exoproduits conduit à la création d'une micro-niche conférant une protection en conditions environnementales défavorables. Parmi lesquels un plus grand accès aux nutriments circulants entre les colonies dans l'EPS, la coordination favorable aux échanges et aux communications inter-espèces et aussi le transfert d'éléments génétiques transposables. La biofilm est une structure de résistance aux agents antibactériens (biocides et antibiotiques) en établissant une barrière de diffusion concentrant par des enzymes sécrétées (lactamases, protéases...).

5.2.2. Comparaison biostatistique de biofilm sur TCP

Pour tester s'il y a une différence entre les bactéries formatrices de biofilm dans un examen *in vitro* par technique TCP, on dispose trois types de biofilm formé fort, moyen et faible avec quatre bactéries compte des valeurs de densité optique différente estimé de chaque biofilm, on obtient les résultats suivants (**tableau 19**).

Tableau 19. Densité optique de biofilm formé pour chaque souche bactérienne isolée.

DO de Biofilm	Les souches			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Fort	0.371 ; 0.402	0.327 ; 0.344	0.336 ; 0.318	0.341 ; 0.276
	0.298 ; 0.302			0.282 ; 0.293
	0.291 ; 0.336	0.398 ; 0.401	0.371 ; 0.401	0.361 ; 0.364
	0.321	0.327 ; 0.338	0.321	0.318 ; 0.335 0.324
Moyen	0.174 ; 0.176 0.189	0.214 ; 0.201	0.178	0.173
Faible	0.086 ; 0.078 0.083	0.076	0.087	0.091

La réponse à l'objectif nécessite à réaliser test supplémentaire spécialisé qui est le test Tukey ou test de différence significative honnête (DSH) à deux facteurs en raison de l'existence d'un plan d'expérience avec des mesures répétées et non équilibrées, l'analyse de la variance correspondant au problème pour $\alpha = 0.05$ (**tableau 20**).

Tableau 20. Comparaison multiple de test Tukey entre les différentes souches.

Souches (I)	Souches (J)	Différence des moyennes (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95%	
					Borne inférieure	Limite supérieure
<i>S.aureus</i>	<i>E.feacalis</i>	-0.05278*	0.014188	0.005	-0.09151	-0.01404
	<i>P.aeruginosa</i>	-0.04843*	0.015339	0.019	-0.09031	-0.00655
	<i>E.coli</i>	-0.04809*	0.013404	0.006	-0.08469	-0.01149
<i>E.feacalis</i>	<i>S.aureus</i>	-0.05278*	0.014188	0.005	-0.01404	-0.09151
	<i>P.aeruginosa</i>	-0.00435	0.016489	0.993	-0.04067	-0.04937
	<i>E.coli</i>	-0.00469	0.014706	0.989	-0.03546	-0.04484
<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	-0.04843*	0.015339	0.019	-0.00655	-0.09031
	<i>E.feacalis</i>	-0.00435	0.016489	0.993	-0.04937	-0.04067
	<i>E.coli</i>	-0.00034	0.015819	1.000	-0.04285	-0.04353
<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	-0.04809*	0.013404	0.006	-0.01149	-0.08469
	<i>E.feacalis</i>	-0.00469	0.014706	0.989	-0.04484	-0.03546
	<i>P.aeruginosa</i>	-0.00034	0.015819	1.000	-0.04353	-0.04285

Variable dépendante: densité optique.

Carré moyen (Erreur) = 0.001

* La différence des moyennes est significative au niveau 0.05

Les résultats de la comparaison multiple du test Tukey entre les quatre souches ont prouvé leur capacité à produire des biofilms en détectant le facteur variable de la densité optique au cours du temps, où toutes les souches sont capables de produire un biofilm avec des catégories fort, moyen et faible. Par contre, les bactéries *Staphylococcus aureus* ont démontré leurs différences mutuelles avec les trois autres souches d'*E. coli*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa* le fait que la différence des moyennes est significative au niveau de 0.05 et aussi la valeur de signification est inférieure à 0.05 pour la souche de *S. aureus*.

L'infection à l'hôpital par un biofilm est généralement liée au temps, comme toute autre infection. Pour découvrir la raison de la différence que nous avons observée par *S. aureus* lors

de la formation de biofilms par rapport au reste des souches, nous avons arrangé les valeurs de densité optique chronologiquement pour les sept isolats premiers des quatre souches dans les 24 h suivant la formation du biofilm (**figure 44**).

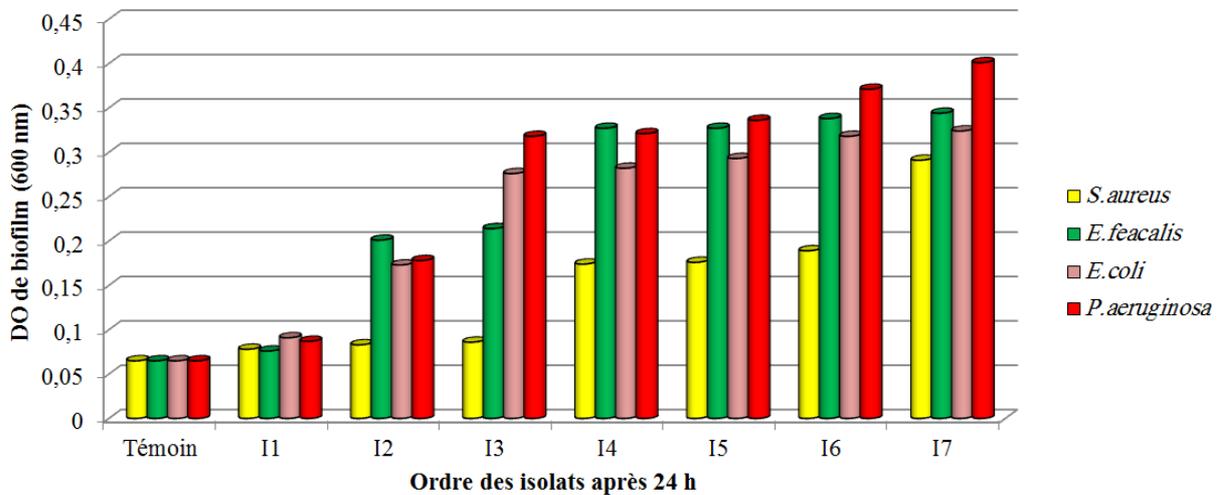


Figure 44. Ordre des isolats formateurs de biofilm en termes de DO dans les 24 h.

À travers ce qui précède, nous concluons que la bactérie *Staphylococcus aureus* varie avec le reste des souches dans la durée de formation du biofilm, où nous constatons un retard marqué au cours de temps c'est à dire une croissance lent par rapport au reste des souches.

Alors que le suivi chronologique du développement de biofilm lui-même entre les souches chaque 2 heures a montré que le biofilm a évolué avec des mêmes phases et caractéristiques à l'exception de la durée de sa formation et cela était précédemment démontré par la méthode gélose rouge Congo (**figure 45**).

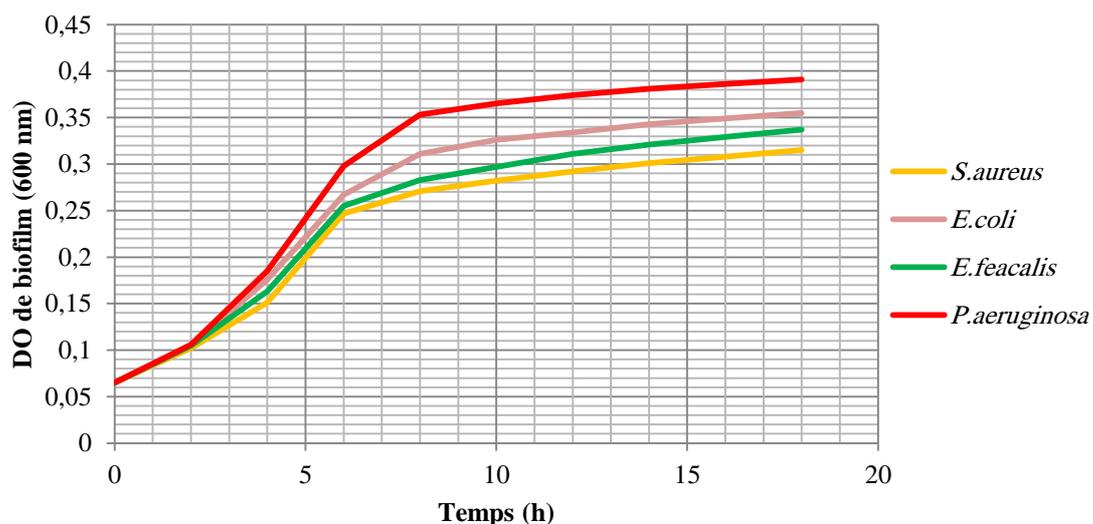


Figure 45. Evaluation des biofilms cliniques formés au cours du temps.

Francolini et Donelli (2010) ont dit que l'adhésion microbienne est un processus dynamique et biphasique impliquant un stade précoce au cours duquel les microorganismes

sont réversibles interagir avec la surface de l'appareil par les forces de van der Waals et liaisons H, et une deuxième étape avec des microbes irréversibles d'adhérence méditée par des adhésines spécifiques capables de reconnaître les protéines hôtes (fibronectine, fibrine, etc...) en couches de biofilm conditionnement sur la surface de l'appareil. Une fois adhérent, les micro-organismes se dupliquent et se développent sous forme de microcolonies sur toute la surface, ceux-ci représentant le «bâtiment blocs» du biofilm.

Un cas d'exemple d'adhérence de cette bactérie les tissus *in vivo* au cours de la mucoviscidose motionné par **Vu-Thien (2003)** qui montre que les infections broncho-pulmonaires sont principalement liées à *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. En France, la colonisation bronchique par *S. aureus* atteint plus de la moitié des patients, liée à l'adhérence de *S. aureus* au mucus et au défaut de la clairance muco-ciliaire. L'examen bactériologique détermine que *S. aureus* à croissance lente et résistants au cotrimoxazole avec acquisition précoce et fréquente du fait de la réceptivité des patients. Aussi le portage nasal est plus fréquent que chez les sujets sains et peut constituer une source de contamination endogène. La colonisation par des souches résistant à la méticilline ne semble pas corrélée avec une détérioration de la fonction respiratoire.

Selon l'étude de **Karki et al. (2019)** concernant la formation de biofilms et détection du gène *icaD* chez *Staphylococcus aureus* isolé à partir d'échantillons cliniques, montre que tous les isolats qui étaient des producteurs de biofilm phénotypiquement n'ont pas montré la présence du gène *icaD* qui peut être due à la mutation ponctuelle ou peut-être dû au fait que l'expression *ica* est soumise à condition environnementale.

Nasr et al. (2012) ont dit que malgré la présence du gène *icaA* et *icaD*, il n'est pas toujours en corrélation avec la formation de biofilm. La capacité de formation de biofilm de certains isolats en l'absence de ces gènes met en évidence l'importance de recherches génétiques supplémentaires sur les mécanismes de formation de biofilm indépendants de l'*ica*.

Concernant l'adaptation de bactéries *E. coli* uropathogène, **Adamus-Bialek et al. (2015)** ont montré que la possibilité de bactéries à former différents types de biofilm permet la survivre dans un environnement difficile ou toxique. Les différentes structures de biofilms sont liées aux différentes surfaces et à l'environnement de croissance bactérienne.

Sharma et al. (2016) ont dit que la diversité des composantes structurales de biofilm s'aggrave en raison du développement d'une résistance aux antibiotiques, entravant son éradication. Les agents antimicrobiens conventionnellement utilisés ont une gamme restreinte de cibles cellulaires et efficacité limitée sur les biofilms. Les anti-adhésions, les phytochimies et les nanomatériaux peuvent limiter le développement des biofilms.

6. Résultats d'antibiogrammes

Après 24 h d'incubation, les boîtes de Pétri montrent la diffusion des antibiotiques dans le milieu de culture de forme cercle à propos les disques imprégnés, proportionnellement à certaines bactéries, à l'exception d'autres (**figure 46**).

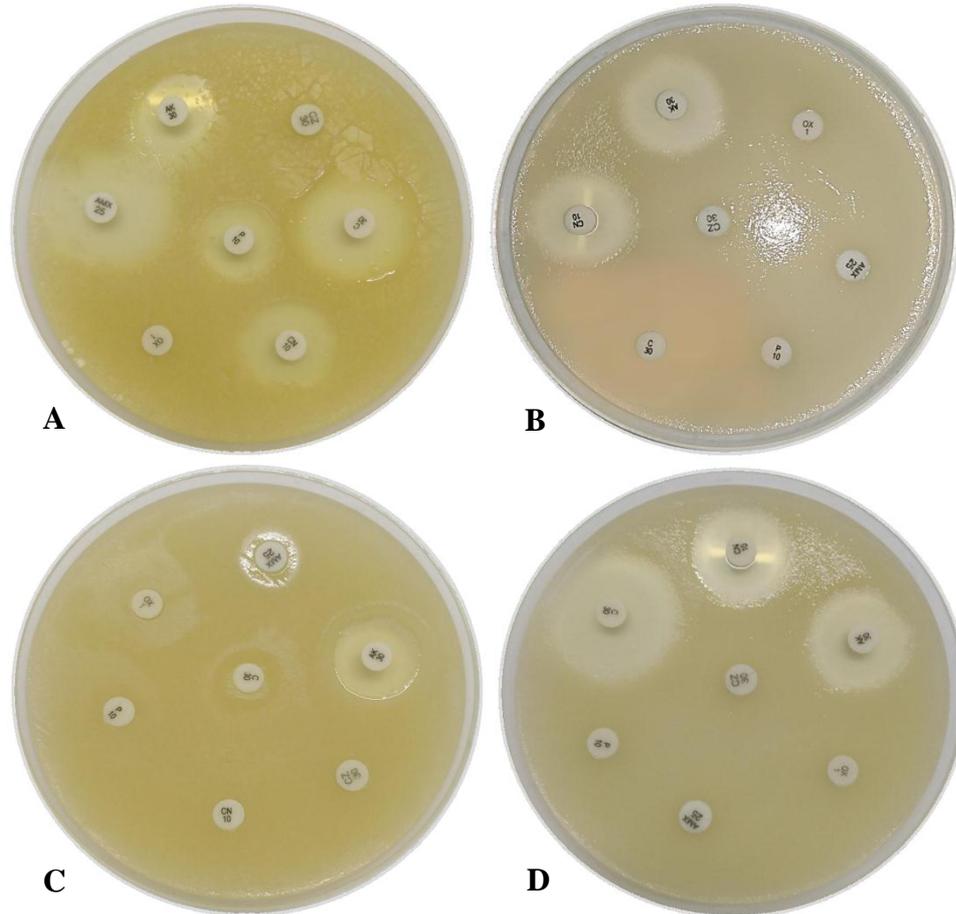


Figure 46. AntibioGramme des souches isolées de l'environnement hospitalier.

A: *E. coli*, **B:** *S. aureus*, **C:** *P. aeruginosa*, **D:** *E. faecalis*

Après avoir mesuré les diamètres des zones d'inhibition physiologique par un pied à coulisse et comparé-les aux diamètres critique (**annexe 10**), on trouve l'action des bactéries aux antibiotiques divisé en trois catégories résistance, intermédiaire ou sensible (**tableau 21**).

Tableau 21. Résultats de sensibilisation des bactéries isolées aux antibiotiques.

La bactérie	Les antibiotiques						
	AK	AMX	P	CZ	OX	CN	C
<i>E. coli</i>	R	S	S	R	R	I	I
<i>E. faecalis</i>	I	R	R	R	R	S	S
<i>S. aureus</i>	S	R	R	R	R	S	R
<i>P. aeruginosa</i>	I	R	R	R	R	R	R

L'*Escherichia coli* s'est révélée faible contre la plupart des antibiotiques, en particulier les familles de β -lactamines telle que pénicilline, l'amoxicilline et aussi le chloramphénicol mais le dernier nécessite une dose importante dans les limites autorisées de concentration minimal inhibitrice (CMI). Tandis que *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* se sont révélés très résistants, en particulier *Pseudomonas aeruginosa*. Le *S. aureus* étant sensible à la famille des aminosides dont l'amikacine et la gentamicine. Le chloramphénicol affecte sur les bactéries d'*E. faecalis*, en plus de certains antibiotiques de la famille aminoside dont l'impact est également apparu.

Généralement, les bactéries hospitalières associées aux soins de santé sont des bactéries multi-résistantes à la plupart des antibiotiques de 64 %, alors qu'elles sont rarement sensibles ou intermédiaires aux antibiotiques, c'est cette caractéristique qui leur permet de garantir un statut environnemental dans les différents secteurs médicaux hospitaliers (**figure 47**).

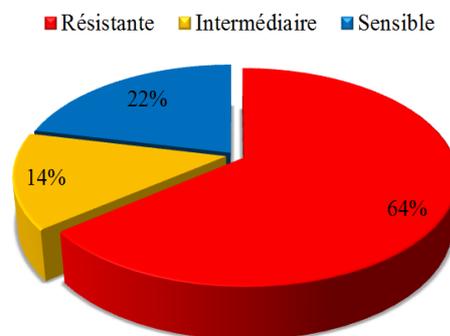


Figure 47. Dominance des bactéries multi-résistantes en l'environnement hospitalier.

Karki et al. (2019) ont montré que la résistance aux antibiotiques peut être due à des difficultés de pénétration d'antibiotiques la couche de biofilm, une croissance lente des bactéries et la présence de mécanismes de dégradation des antibiotiques. En outre, la formation de biofilms donne une plate-forme pour le transfert horizontal de gènes parmi les bactéries, provoquant une propagation facile des marqueurs de résistance aux médicaments et d'autres facteurs de virulence.

La prévalence de la résistance aux antibiotiques fait partie des caractéristiques des agents pathogènes dans les hôpitaux en augmentant les taux de mutation et en échangeant les gènes responsables de la résistance aux antibiotiques. Le traitement par l'antibiotique échoue souvent contre les bactéries de biofilm qui l'accompagnent sans se débarrasser de l'implant affecté. Une autre caractéristique importante observée dans les bactéries du biofilm est l'hétérogénéité physiologique. Ce phénomène affecte le taux de croissance et le métabolisme des bactéries et se reflète dans les signaux de quorum entre les bactéries, l'accumulation de produits toxiques et les changements dans le microenvironnement local. C'est ce qu'on appelle

des cellules persistantes qui ne résistent pas aux antibiotiques en soi, mais deviennent résistantes lorsqu'elles sont associées à un biofilm (**Lynch et Robertson, 2008**).

Weigelt (2007) dit que le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est un organisme multirésistant, bien que la «résistance à la méthicilline» signifie en fait résistance aux antibiotiques β -lactamines, il existe plusieurs autres antibiotiques qui sont généralement inefficace contre le SARM, particulièrement qui sont associé aux soins de santé. Des plusieurs de facteurs de risque ont été liés à l'acquisition et transmission du SARM en milieu hospitalier; celles-ci inclure une hospitalisation prolongée ou l'admission dans un établissement de soins de longue durée et un contact étroit avec les individus colonisés. En outre, plusieurs rapports ont indiqué que les infections à SARM sont associées à une augmentation de la durée de vie et utilisation accrue de ressources hospitalières.

Ramos et Filloux (2010) ont dit que les analyses génomiques confirment l'évolution des stratégies enzymatiques complexes par le *Pseudomonas aeruginosa*, délicats commutateurs de régulation génétique et systèmes de transport, pour suivre le rythme dans des environnements en constante évolution. Ces mécanismes adaptatifs comprennent ceux conférant une résistance aux composés toxiques tels que les antibiotiques et les ions dérivés des métaux lourds et des métalloïdes. Des systèmes de transport capables efflux actif d'ions métalliques hors du cytoplasme ou de l'espace périplasmique sont une stratégie clé pour résister à la toxicité des métaux lourds. Comme pour les autres bactéries, les gènes de résistance dans le *P. aeruginosa* peuvent résider soit dans le chromosome ou soit dans plasmides. **Hauser et Rello (2003)** affirment que dans la plupart des cas, le principal mécanisme de résistance par *P. aeruginosa* aux β -lactamines implique à la production de β -lactamase où il peut modifier par voie enzymatique la structure des aminosides. La gentamicine est particulièrement sensible aux cette modification et donc plus susceptible d'être associée à des bactéries résistantes.

L'*Enterococcus faecalis* ont une capacité remarquable d'adaptation à leur environnement. Les facteurs de risque de colonisation et d'infection sont nombreux, notamment la difficulté du traitement par les antibiotiques, en raison de leur résistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques et de l'augmentation de la résistance acquise à la pénicilline, notamment à la vancomycine (**Stucki et al., 2014**).

Fabre et al. (2010) ont montré que les céphalosporines de troisième génération, la gentamicine, la fosfomycine et les furanes ont une excellente activité sur l'*E. coli* isolées et provoquées d'infection urinaire. Les fluoroquinolones ont une meilleure activité dans les infections urinaires de la femme comparés aux infections de l'homme. Les résistances acquises sont liées aussi au niveau de prescription des antibiotiques lié au sexe et à l'âge.

7. Effet de l'ultraviolet

Après 24 h, la densité optique du biofilm formé et exposé au rayonnement UV a été mesurée pendant une durée 60 s (**figure 48**). Les rayons ultraviolets affectent généralement les bactéries qui composent le biofilm *in vitro*, où les bactéries *S. aureus* peuvent se former lors de l'exposition aux rayons UV avec une valeur de 0.119 et elles sont les plus élevées par rapport au reste des autres espèces. Les bactéries d'*Escherichia coli* sont également affectées rapidement et leur non-formation de biofilm correspond à une valeur équivalente au témoin 0.065 et donc les bactéries de BGN sont plus sensibles à UV que les bactéries CGP.

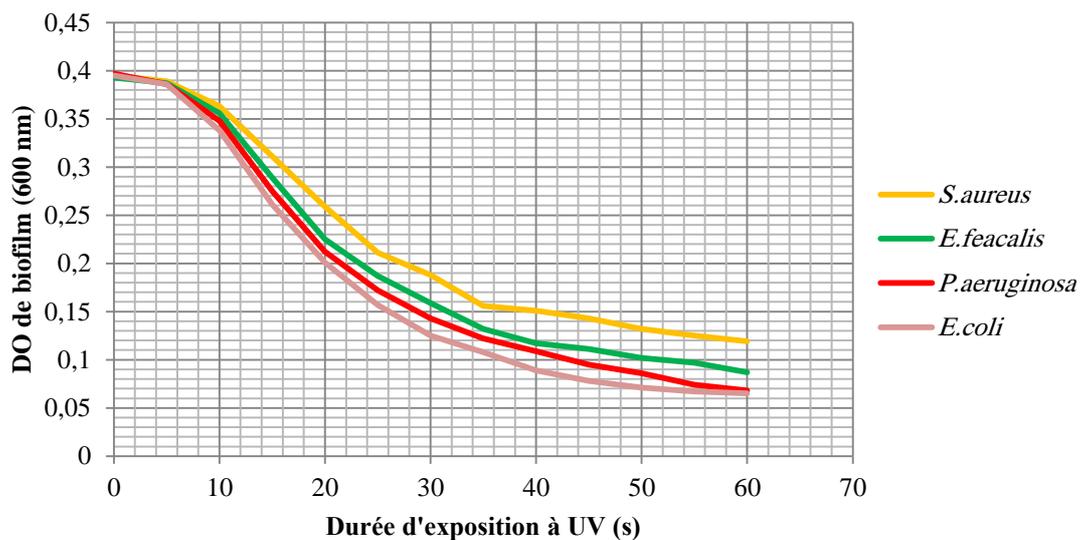


Figure 48. Effet d'ultraviolet sur la formation de biofilm clinique *in vitro*.

Selon **Vatansver et al. (2013)** une gamme des technologies basées sur la lumière joué un rôle dans la biodéfense contre-mesures. L'UV germicide (UVC) est exceptionnellement actif en détruisant un large éventail de cellules microbiennes, et des données récentes suggèrent qu'UVC a une sélectivité élevée par rapport aux cellules et des tissus hôtes. Bien que l'on sache depuis 100 ans que l'irradiation UVC est hautement germicide, l'utilisation de l'irradiation UVC pour la prévention et le traitement des infections localisées est toujours au tout début du développement. Ils disent que leur laboratoire l'a également montré que l'irradiation UVC peut être utilisée *in vivo* pour traiter des modèles d'infections causées par des microorganismes virulents et pathogènes.

Leboffe et Pierce (2011) ont dit que des longueurs d'onde de 100 à 280 nm d'UVC sont les plus préjudiciables aux bactéries pour plus que quelques minutes se traduit généralement par irréparable dommages à l'ADN et mort des bactéries dus à des effets mutagènes. L'UVC donc augmente la fréquence des mutations dans des populations de cellules.



Conclusion

Conclusion

Dans cette étude laquelle le biofilm clinique formé *in vitro* a été comparée entre des souches bactériennes isolées de secteurs médicaux pour la première fois au établissement publique hospitalier DEBAKH Saïd d'El-Meghaier en l'Algérie. La formation de biofilms est associée à une propagation permanente de l'infection, l'étude du biofilm nécessite une connaissance des mécanismes adaptatifs des microorganismes et de leurs surfaces de localisation à l'hôpital.

Pour cela, nous avons modélisé l'infection sous la forme d'une pyramide composée de trois parties principales la circonférence d'environnement hospitalier à la base, le secteur médical au centre et le site contaminé au sommet de pyramide. La pyramide d'infection permet de diagnostiquer plus facilement les zones touchées et de détecter l'infection de manière détaillée afin de la combattre. La détection de l'infection dans cet hôpital montre qu'il existe quatre souches, qui représentent plus de la moitié 56 % des infections nosocomiale. Elles sont les *Staphylococcus aureus* de 32 %, suivi par l'*Escherichia coli* avec 27 %, la troisième place est occupée par l'*Enterococcus faecalis* de 23 % et la dernière est *Pseudomonas aeruginosa* de 18 %. Les fréquences d'infection sont répartir sur plusieurs sites dans différents secteurs médicaux surtout l'urgence, la médecine homme et la maternité dans environnement hospitalier où le poigné de port, les lits, les paillasse et le sol représentent un grand réservoir pour contenir l'infection. Les conditions de soins contrôlent la réduction de l'infection comme les désinfectants qui sont des éléments clés pour la prévention, en particulier le cas de bloc opératoire. Par contre, les mouvements d'un secteur à l'autre cause une transmission permanente de l'infection d'un endroit infecté à endroit pur.

L'utilisation des méthodes fiables pour détecter spécifiquement les biofilms peut être utile pour traiter les patients affectés par ces bactéries problématiques. La gélose rouge du Congo est une méthode qualitative révèle le pouvoir sécrétoire de la slime, qui est une substance polysaccharidique distingue les bactéries qui forment des biofilms clinique *in vitro*. Nous avons trouvé différents modèles pour l'expression du biofilm qualitativement par cette méthode où il y a un biofilm fort, moyen ou faible. La capacité de formation du biofilm varie d'une bactérie à une autre et aussi chez les isolats de la même souche. La formation de biofilms par les bactéries au l'environnement hospitalisé est estimée à 85 % dans une gamme des biofilms forts et moyens. L'étude biostatistique par le test khi-deux des résultats, de la méthode RCA, a montré qu'il n'y a pas de différence entre les souches bactériennes afin que le biofilm être formé à des phases fixes.

D'autre côté, la technique de plaque de culture tissulaire reste généralement un meilleur outil pour la production et le criblage de biofilms le fait que les catégories de biofilm sont ajustées selon l'adhérence de la bactérie à la plaque tissulaire de polystyrène basé sur la valeur de densité optique de témoin qui est égal à 0.065 dans cette étude. La comparaison biostatistique multiple du test Tukey entre les quatre souches a prouvé leur capacité à produire du biofilm en détectant le facteur variable de densité optique au cours de temps, les bactéries *Staphylococcus aureus* ont démontré leurs différences mutuelles avec les trois autres souches d'*E. coli*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa*. L'infection à l'hôpital par un biofilm est généralement liée au temps, comme toute autre infection. La bactérie *Staphylococcus aureus* varie avec le reste des souches dans la durée de formation du biofilm, où nous constatons un retard marqué au cours de temps c'est à dire une croissance lent par rapport au reste des souches. De même, l'adhésion bactérienne est un processus dynamique, biphasique et aussi similaire, alors qu'il existe une différence de biofilm dans la durée de son développement et le mécanisme de sa formation. Par conséquent, l'infection à *Staphylococcus aureus* inclure une hospitalisation prolongée plus de 24 h ou l'admission dans un établissement de soins de longue durée et un contact étroit avec les individus colonisé.

Généralement, les bactéries hospitalières associées aux soins de santé sont des bactéries multi-résistantes à la plupart des antibiotiques de 64 %, alors qu'elles sont rarement sensibles ou intermédiaires aux antibiotiques non seulement pour les β -lactamines, mais pour de nombreuses autres familles d'antibiotiques, c'est cette caractéristique qui leur permet de garantir un statut environnemental dans les différents secteurs médicaux hospitaliers. Le traitement par l'antibiotique échoue souvent contre les bactéries de biofilm qui l'accompagnent. Les rayons ultraviolets affectent généralement les bactéries qui composent le biofilm *in vitro*, et montre que les bactéries de bacille à Gram négatif sont plus sensibles à UV que les bactéries cocci à Gram positif. L'irradiation UV peut être utilisée *in vivo* pour traiter des modèles d'infections causées par des bactéries virulents et pathogènes grâce à son effet hautement germicide.

A la fin, nous suggérons une variété de recherches *in vitro* et *in vivo* pour lutter contre le développement des infections nosocomiale en général et des biofilms en particulier, en expérimentant les technologies physico-chimiques et biologiques comme les produits phytochimiques et les nanomatériaux. Nous suggérons également une étude approfondie du biofilm à l'aide de techniques de biologie moléculaire et de génie génétique.

Liste des références

Liste des références

A

Abdel Halim R.M, Kassem N.N, Mahmoud B.S (2018) *Detection of biofilm producing Staphylococci among different clinical isolates and relation to methicillin susceptibility*. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 6(8): 1335-1341. DOI: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.246>.

Adamus-Bialek W, Kubiak A, Czerwonka G (2015) Analysis of uropathogenic Escherichia coli biofilm formation under different growth conditions. Acta Biochim Pol, 62(4): 765-771. DOI: http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1127.

Allaouchiche B, Boselli E (2005) *Traitement des pneumopathies nosocomiales en réanimation chirurgicale : un choix raisonné*. MAPAR, 184-193.

Allison D. G, Gilbert P, Lappin-Scott H. M and Wilson M (2000) *Community structure and co-operation in biofilms*. Society for General Microbiology. New York: Cambridge University Press, 59 Symposium. ISBN-10: 0521793025.

Amazian K, Rossello J, Castella A, Sekkat S, Terzaki S, Dhidah L, Abdelmoumène T, Fabry J, les membres du réseau NosoMed (2010) *Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne*. Eastern Mediterranean Health Journal (EMHJ).16(10): 1070-1078.

Andrianarivelo A.M, Rafaravavy N.E, Rafalimanana C, Andriantahiana T.N, Robinson A.L (2010) *Profil bactériologique des infections néonatales à l'unité de réanimation néonatale de la Maternité de Befelatanana*. Revue d'Anesthésie-Réanimation et de Médecine d'Urgence, 2(2): 1-4.

Arciola C.R, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L (2002) *Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in Staphylococcus epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus*. Biomaterials, 23: 4233-4239.

B

Bailey, Scott's (2014) *Diagnostic Microbiology*. China: Elsevier, 13th ed. ISBN: 978-0-323-08330-0.

Bearman G.M.L, Stevens M, Edmond M.B, Wenzel R.P (2014) *A guide to infection control in the hospital*. Boston: ISID, 5th ed. ISBN: 0-9749031-0-8.

Behlou I, Gilmore M.S (2008) *Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases*. Arch Ophthalmol, 126: 1572-1581. DOI: 10.1001/archophth.126.11.1572

Bellifa S, Hassaine H, Kara Terki I, Didi W, M'hamedi I, Lachachi M, Benamar I, Morghad T, Gaouar S (2016) *Study of biofilm production and antimicrobial resistance pattern of Klebsiella Pneumoniae isolated from urinary catheter at the university hospital of Tlemcen*. American Journal of Microbiology and Biotechnology, 3(2): 13-17.

Ben Jaballah N, Bouziri A, Kchaou W, Hamdi A, Mnif K, Belhadj S, Khaldi A, Kazdaghli K (2006) *Épidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne*. Médecine et maladies infectieuses, 36: 379-385. DOI: 10.1016/j.medmal.2006.05.004.

Ben Said M, Khefacha S, Maalej L, Daly I, Hassen A (2011) *Effect of ultraviolet, electromagnetic radiation subtype C (UV-C) dose on biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa*. Afr. J. Microbiol. Res, 5(25): 4353-4358.

Bercion R, Gaudeuille A, Mapouka P.A, Behoude T, Guetahoun Y (2007) *Infections du site opératoire dans le service de chirurgie orthopédique de l'hôpital communautaire de Bangui, République centrafricaine*. Bull Soc Pathol Exot, 100(3): 197-200.

Bhatia R, Lal Ichhpujani R (2008) *Essentials of Medical Microbiology*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 4th Ed. ISBN 81-8448-154-3.

Bose S, Khodke M, Basak S, Mallick S.K (2009) *Detection of biofilm producing Staphylococci: need of the hour*. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 3: 1915-1920.

Boyce J.M (2007) *Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection*. Journal of Hospital Infection, 65(S2): 50-54.

Brown A, Smith H (2015) *Benson's microbiological applications: laboratory manual in general microbiology*. New York: McGraw-Hill, short version, 13th edition. ISBN: 978-0-07-340241-3.

C

Caron F (2003) *Physiopathologie des infections urinaires nosocomiales*. Médecine et maladies infectieuses, 33 (9): 438-446. DOI: 10.1016/S0399-077X(03)00148-3.

Chastre J, Fagon J.Y (2002) *Ventilator-associated Pneumonia*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 165: 867-903. DOI: 10.1164/rccm.2105078.

Connie R.M, Donald C.L (2019) *Textbook of diagnostic microbiology*. Elsevier Saunders, 6th ed. ISBN: 978-0-323-48218-9.

Costerton J.W (2001) *Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection*. Trends Microbiol, 9: 50-52.

D

Denis F, Ploy M.C, Martin C, Cattoir V (2016) *Bactériologie médicale techniques usuelles*. Elsevier Masson, 3^{éd}. ISBN: 978-2-294-74616-1.

Doit C, Biran V, Aujard Y (2015) *Infections nosocomiales en néonatalogie*. Elsevier Masson SAS, 9: 92-106. DOI: 10.1016/B978-2-294-74135-7.00009-7.

Donlan R.M (2001) *Biofilms and device-associated infections*. Emerging Infectious Diseases, 7(2): 277-281. DOI: 10.3201/eid0702.010226.

Donlan R.M, Costerton J.W (2002) *Relevant microorganisms biofilms: survival mechanisms of clinically*. Clin. Microbiol. Rev, 15(2): 167. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

Donlan RM (2002) *Biofilms: Microbial life on surfaces*. Emerging Infectious Disease journal, 8(9): 881-890.

Dossim S, Gozo A, Teko-agbeble K, Salou M, Ekouevi D.K , Dosseh D, Godonou V, Akakpo-Numado, Tekou H, Prince-David M, Dagnra A (2017) *Ecologie bactérienne de l'environnement et du matériel lors des différentes étapes de stérilisation au bloc opératoire du CHU Sylvanus Olympio à Lomé au Togo*. Rev. CAMES SANTE, 5(2): 4-10.

Ducel G, Fabry J, Nicolle L, Girard R, Perraud M, Prüss A, Savey A, Tikhomirov E, Thuriaux M, Vanhems P (2008) *Prévention des infections nosocomiales guide pratique*. La Suisse: Organisation mondiale de la santé, 2^{ème} éd.

Dunne W.M (2002) *Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately?*. Clin. Microbiol. Rev, 15: 155-166.

E

Ebert T, Smith S, Pancari G, Wu X, Zorman J, Clark D, Cook J, Burns C, Antonello M.J, Cope L, Nagy E, Meinke A, McNeely T (2011) *Development of a rat central venous catheter model for evaluation of vaccines to prevent Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus early biofilms*, Human Vaccines, 7(6): 630-638. DOI: 10.4161/hv.7.6.15407.

F

Fabre R, Mérens A, Lefebvre F, Epifanoff G, Cerutti F, Pupin H, Tardif D, Cavallo J.D, Ternois I (2010) *Sensibilité aux antibiotiques des Escherichia coli isolés d'infections urinaires communautaires*. Médecine et maladies infectieuses, 40: 555-559. DOI: 10.1016/j.medmal.2010.03.002.

Filloux A, Vallet I (2003) *Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne*. M/S : médecine sciences, 19: 77-83.

Francolini I, Donelli G (2010) *Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections*. FEMS Immunol Med Microbiol, 59: 227-238. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x.

G

Gerceker D, Karasartova D, Elyürek E, Barkar S, Kıyan M, Özsan T.M, Calgin M.K, Sahin F (2009) *A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms DNase tube test.* J. Gen. Appl. Microbiol, 55: 291-294.

Gillespie S.H, Bamford K.B (2012) *Medical Microbiology and Infection at a Glance.* UK: Wiley-Blackwell, 4th ed. ISBN: 978-0-470-65571-9.

Gillespie S.H, Hawkey P.M (2006) *Principles and Practice of Clinical Bacteriology.* England: John Wiley & Sons Ltd, 2nd ed. ISBN-13 978-0-470-84976-7.

Goller CC, Romeo T (2008) *Environmental influences on biofilm development.* Current Topics in Microbiology and Immunology, 322: 37-66. DOI: 10.1007/978-3-540-75418-3-3.

H

Haras D (2005) *Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention.* Matériaux & Techniques, 93: 27-41. DOI: 10.1051/mattech:2006003.

Hauser A.R, Rello J (2003) *Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa.* New York: Springer Science and Business Media, 1st ed. ISBN: 978-1-4615-0433-7.

Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi G.L, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Holá V, Imbert C, Kirketerp-Møller K, Lebeaux D, Oliver A, Ullmann A.J, Williams C for the ESCMID Study Group for Biofilms (ESGB), Consulting External Expert Werner Zimmerli (2014) *ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections.* Clin Microbiol Infect, 21: S1–S25.

Hussein J, Mavalankar D.V, Sharma S, D'Ambruoso L (2011) *A review of health system infection control measures in developing countries: what can be learned to reduce maternal mortality.* Globalization and Health, 7: 14. DOI:10.1186/1744-8603-7-14.

J

Jass J, Surman S, Walker J (2003) *Medical biofilms detection, prevention and control*. England: John Wiley & Sons. ISBN: 0-471-98867-7.

K

Karki S, Sah A.K, Lamichhane J, Maharjan A, Sharma L, Rajbhandari R, Parajuli S, Acharya S, Khanal S (2019) *Biofilm formation and detection of icaD gene in Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens*. The Open Microbiology Journal, 13: 230-235. DOI: 10.2174/1874285801913010230.

Kasongo K.D, Kalenga M.P, Byl B, Dramaix W.M (2016) *Etude de la prévalence des infections nosocomiales et des facteurs associés dans les deux hopitaux universitaires de Lubumbashi, République Démocratique du Congo: cas des Cliniques Universitaires de Lubumbashi et l'Hôpital Janson Sendwe*. PAMJ, 24: 275. DOI: 10.11604/pamj.2016.24.275.7626.

Kord M, Ardebili A, Jamalan M, Jahanbakhsh R, Behnampour N, Ghaemi E.A (2018) *Evaluation of biofilm formation and presence of ica genes in Staphylococcus epidermidis clinical isolates*. Osong Public Health Res Perspect, 9(4): 160-166.

L

Lebeaux D, Ghigo J.M (2012) *Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale*. médecine/sciences, 28(8-9): 727-39. DOI: 10.1051/medsci/2012288015.

Lebeaux D, Ghigo J.M, Lucet J.C (2014) *Physiopathologie et prévention des infections liées aux dispositifs médicaux implantés*. La revue du praticien, 64: 620-625.

Leboffe M.J, Pierce B.E (2011) *Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. United States of America: Morton, 4th ed. ISBN: 978-089582-872-9.

Lynch A.S, Robertson G.T (2008) *Bacterial and fungal biofilm infections*. Annu Rev Med, 59: 415-428. DOI: 10.1146/annurev.med.59.110106.132000.

M

Méité S, Boni-Cissé C, Monemo P, Mlan Tanoa Ap, Faye-Ketté H, Dosso H (2010) *Surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire: CHU de Yopougon, Abidjan, Côte Ivoire.* J. sci. pharm. Biol, 11(1): 73-81.

Miquel S, Lagrafeuille R, Souweine B, Forestier C (2016) *Anti-biofilm Activity as a Health Issue.* Front. Microbiol, 7: 592. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00592.

N

Nasr R.A, AbuShady H.M, Hussein S.H (2012) *Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of Staphylococci.* The Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 13: 269-274.

Nauciel C, Vildé J.L (2007) *Bactériologie médicale.* Elsevier Masson SAS, 2^{ème} éd. ISBN: 978-2-294-08994-7.

Ngaroua, Eloundou N.J, Bénet T, Djibrilla Y (2016) *Incidence des infections du site opératoire en Afrique sub-saharienne: revue systématique et méta-analyse.* PAMJ, 24: 171. DOI:10.11604/pamj.2016.24.171.9754.

Niveditha S, Pramodhini S, Umadevi S, Shailesh K, Selvaraj S (2012) *The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs).* Journal of Clinical and Diagnostic Research, 6(9): 1478-1482. DOI: 10.7860/JCDR/2012/4367.2537.

O

O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson D.A, O'Gara J.P (2007) *Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in Staphylococcus aureus isolates from device-related infections.* Journal of Clinical Microbiology, 45(5): 1379-1388. DOI:10.1128/JCM.02280-06.

Oie S, Hosokawa I, Kamiya A (2002) *Contamination of room door handles by methicillin-sensitive/methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Hospital Infection, 51: 140-143. DOI:10.1053/jhin.2002.1221.

Oliveira A, Cunha M.L.R.S (2008) *Bacterial biofilms with emphasis on coagulase-negative Staphylococci*. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, 14 (4): 572-596.

Oliveira A.C, Damasceno Q.S (2010) *Surfaces of the hospital environment as possible deposits of resistant bacteria: a review*. Rev Esc Enferm USP, 44(4): 1112-1117.

O'Toole G.A, Kaplan H.B, Kolter R (2000) *Biofilm formation as microbial development*. Annu. Rev. Microbiology, 54: 49-79.

P

Parize P, Mainardi J.L (2011) *Les actualités dans l'endocardite infectieuse*. La Revue de Médecine Interne, 32(10): 612-621.

Pflumm M (2011) *Caught on film*. Nat Med, 17(6): 650-653. DOI: 10.1038/nm0611-650.

Prasanth P, Saravanakumari P (2017) *Detection of intercellular adhesion genes (ica) in Staphylococcus aureus causing implant associated infections*. Int J Pharm Pharm Sci, 9(11): 76-80.

Proctor R.A, Eiff C.V, Kahl B.C, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G (2006) *Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections*. Nature Reviews Microbiology, 4: 295-305.

R

Rakotovoao-Ravahatra Z.D, Randriatsarafara F.M, Milasoanjara R.N, Ranaivosoa M.K, Luc R.A, Rasamindrakotroka A (2019) *Assessment of the Coagulase Test in the Identification of Staphylococcus Aureus Strains*. Journal of Biotechnology and Biomedicine, 2: 105-111. DOI: 10.26502/jbb.2642-91280014.

Ramos J.L, Filloux A (2010) *Pseudomonas: molecular microbiology, infection and biodiversity*. New York: Springer Science and Business Media. ISBN: 978-90-481-3908-8.

Rewatkar A.R, Wadher B.J (2013) *Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa-biofilm formation methods*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 8(5): 36-40. DOI: 10.9790/3008-0853640.

Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Høiby N, Givskov M, Molin S, Eberl L (2001) *N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in mixed biofilms*. Microbiology, 147: 3249-3262.

Róžańska A, Chmielarczyk A, Romaniszyn D, Bulanda M, Walkowicz M, Osuch P, Knych T (2017) *Antibiotic resistance, ability to form biofilm and susceptibility to copper alloys of selected staphylococcal strains isolated from touch surfaces in Polish hospital wards*. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 6: 80.

S

Seneviratne C.J (2017) *Microbial Biofilms: Omics Biology, Antimicrobials and Clinical Implications*. Boca Raton: CRC Press. ISBN-13:978-1-4987-2219-3.

Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, Gabrani R (2016) *Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies*. Journal of Applied Microbiology, 121: 309-319.

Siah S, Belefqih R, Elouennass M, Fouadi F.E, Ihrari I (2009) *L'infection nosocomiale en réanimation des brûlés*. Annals of Burns and Fire Disasters, 22(2): 72-78.

Song F, Koo H, Ren D (2015) *Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation*. Journal of Dental Research, 94(8): 1027-1034. DOI: 10.1177/0022034515587690

Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Irkovic I, Ruzicka F (2007) *Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci*. APMIS, 115: 891-899.

Stucki K, Harbarth S, Nendaz M (2014) *Infections à entérocoques : du plus simple au plus complexe*. Rev Med Suisse, 10: 1918-1923.

Sutherland I.W (2001) *The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment*. Trends in Microbiology, 9: 222-227. DOI: 10.1016/s0966 842x(01)02012-1.

V

Vatansever F, Ferraresi C, De Sousa M.V.P, Yin R, Rineh A, Sharma S.K, Hamblin M.R (2013) *Can biowarfare agents be defeated with light?*. Virulence journal, 4(8): 1-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/viru.26475>.

Vickery K, Hu H, Jacombs A.S, Bradshaw D.A, Deva A.K (2013) *A review of bacterial biofilms and their role in device-associated infection*. Healthcare Infection, 18: 61-66. DOI: 10.1071/HI12059.

Vu-Thien H (2003) *Infection à Staphylococcus aureus au cours de la mucoviscidose*. Antibiotiques, 5(4): 218-220. DOI: ANTI-09-2003-5-4-1294-5501-101019-ART08.

W

Wai-Leung Ng, Bassler B.L (2009) *Bacterial quorum-sensing network architectures*. Annu Rev Genet, 43: 197-222. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134304.

Walsh C.T, Wencewicz T.A (2016) *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*. Washington DC: ASM Press. ISBN: 9781555819309.

Weigelt J.A (2007) *MRSA*. USA: Informa Healthcare. ISBN: 13 9781420045499.

Willey J.M, Sherwood L.M, Woolverton C.J (2008) *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. New York: McGraw-Hill, 7th ed. ISBN: 0-07-299291-3.



Annexes

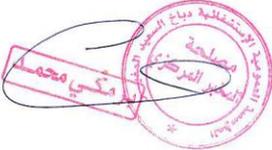
- **Annexe 01:** Attestation de stage au niveau de l'EPH DEBAKH Saïd d'El-Meghaier.



République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Mohamed Khider de Biskra (Algérie)

Attestation de stage

Responsable de stage atteste: *M. BRAMKI Mohamed*
 Que l'étudiant: *LAMOURI Abdelmouman* Né le: *23 décembre 1993 à Oum thieur, El Meghaier*
 Inscrit à: *l'université Mohamed Khider de Biskra*
 Sous le numéro: *14/39073398* au niveau académique: *Master 2 spécialité: Microbiologie appliquée*
 Il a fait le stage de fin d'étude de master 2 à: *L'établissement publique hospitalier DEBAKH Saïd d'El Meghaier*
 Dans la période de: *10 juillet 2019 à 20 août 2019*
 Édité à: *El meghaier* le: *2019... 21...*
 Responsable de l'administration ou d'établissement réceptrice



Cette attestation a été soumise pour une utilisation autorisée par la loi

- **Annexe 02:** Quelques matériels pour une étude microbiologique.



1.Anse de platine 2.Ecouvillon stérile 3.Boit de pétrie 4.Tube à essai 5.Pipette Pasteur 6.Bec benzène 7.Microscope optique 8.Etuve 9.Bain marré 10.Eau distillé 11.Vortex 12.Porteuse 13.Autoclave 14.Distributeur des antibiotiques 15.Micropipette 16.Microplaque de 96 puits 17.Coloration de Gram (Violet de Gentien, Lugol, Alcool, Fuschine) 18.Gallerie API 20 19.Huile à immersion 20.Milieux de culture.

- **Annexe 02:** Compositions des milieux de culture dans un litre d'eau distillé.

Bouillon cœur-cervelle (BHIB)	
Extrait de cœur	5.00 g
Extrait de cervelle	12.50 g
Peptone *	10.00 g
Glucose	2.00 g
Chlorure de sodium	5.00 g
Phosphate disodique	2.50 g
pH final à 25 °C: 7.4 ± 0.2	

Milieu Chapman	
Extrait de viande de bœuf	1.00 g
Peptone *	10.00 g
Chlorure de sodium	75.00 g
Mannitol	10.00 g
Rouge de phénol	0.025 g
Agar	15.00 g
pH final à 25 °C: 7.4 ± 0.2	
* Digestion enzymatique de protéines.	

Milieu Hektoen	
Protéose peptone	12.00 g
Extrait de levure	3.00 g
Chlorure de sodium	5.00 g
Thiosulfate de sodium	5.00 g
Sels biliaires	9.00 g
Citrate de fer ammoniacal	1.50 g
Salicine	2.00 g
Lactose	12.00 g
Saccharose	12.00 g
Fuchsine acide	0.1 g
Bleu de bromothymol	0.065 g
Agar	14.00 g
pH final à 25 °C: 7.5 ± 0.2	
* Digestion enzymatique pancréatique de la caséine, riche en acides aminés.	

Gélose et bouillon nutritif	
Extrait de viande de bœuf	5.00 g
Peptone *	5.00 g
Chlorure de sodium	5.00 g
Agar	10.00 g
pH final à 25 °C: 7.3 ± 0.2	
Pour le bouillon nutritif on utilise la peptone et l'extrait de viande seulement	

Gélose MacConkey	
Peptone *	20.00 g
Sels biliaires	1.50 g
Chlorure de sodium	5.00 g
Lactose	10.00 g
Rouge neutre	0.03 g
Cristal violet	0.001 g
Agar	15.00 g
pH final à 25 °C: 7.1 ± 0.2	

Milieu BCP	
Casitone *	7.5 g
Extrait de levure	2.00 g
Lactose	10.00 g
Pourpre de bromocrésol	0.02 g
Agar	25.00 g
pH final à 25 °C: 6.8 ± 0.2	

Gélose au sang frais	
Peptone	15.00 g
Digestat de foie	2.5 g
Extrait de levure	5.00 g
Chlorure de sodium	5.00 g
Sang de mouton stérile	50 ml
Agar	12.00 g
pH final à 25 °C: 7.2 ± 0.3	

Gélose Muller-Hinton *	
Peptone	17.5 g
Extrait de viande	2.00 g
Amidon	1.5 g
Agar	17.00 g
pH final à 25 °C: 7.3 ± 0.1	
* Milieu utilisé pour l'antibiogramme	

Milieu NaCl	
Digestat de cœur	10.00 g
Digestat enzymatique animal	10.00 g
NaCl	65.00 g
Dextrose	1.00 g
Pourpre de bromocrésol	0.016 g
pH final à 25 °C: 6.9 ± 0.2	

Gélose bile esculine	
Extrait de viande de bœuf	11.00 g
Digestat enzymo-gélatine *	34.5 g
Esculine	1.00 g
Bile de bœuf	2.00 g
Citrate d'ammonium ferrique	0.5 g
Agar	15.00 g
pH final à 25 °C: 6.6 ± 0.2	
* Digestat enzymatique de gélatine comme source des protéines.	

Milieu DNase	
Casitone *	10.00 g
Extrait de levure	10.00 g
Acide désoxyribonucléique	2.00 g
Chlorure de sodium	5.00 g
Vert de méthyle	0.5 g
pH final à 25 °C: 7.5 ± 0.2	
* Digestion enzymatique pancréatique de la caséine, riche en acides aminés.	

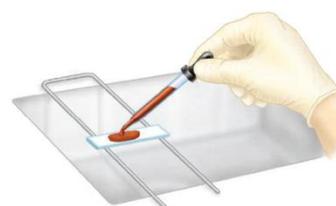
- **Annexe 03:** Etapes de coloration de Gram.



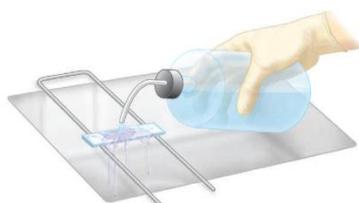
(1) Violet de Gentien 30 secondes



(2) Lavage par l'eau distillée



(3) Lugol 1 minute



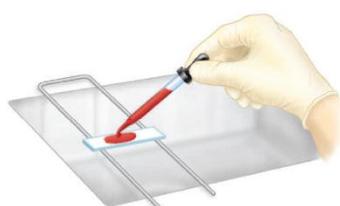
(4) Lavage par l'eau distillée



(5) Décoloration par l'alcool 15 secondes



(6) Lavage par l'eau distillée



(7) Fuschine 1 minute



(8) Lavage par l'eau distillée



(9) Séchez

- **Annexe 04:** Tableau de lecture des résultats de galerie API 20 Staph.

Test	Composant actif	Réaction/ Enzyme	Résultats	
			Négatifs	Positifs
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	Acidification	Rouge	Jaune
MNE	D-mannose	Acidification	Rouge *	Jaune
MAL	D-maltose	Acidification	Rouge	Jaune
LAC	D-lactose	Acidification	Rouge	Jaune
TRE	D-tréhalose	Acidification	Rouge	Jaune
MAN	D-mannitol	Acidification	Rouge	Jaune
XLT	Xylitol	Acidification	Rouge *	Jaune
MEL	D-mélibiose	Acidification	Rouge	Jaune
NIT	Nitrate de potassium	Réduction	NIT 1 + NIT 2 / 10 minutes	
			Incolore-rose pâle	Rouge
PAL	β -naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 minutes	
			Incolore, beige-rosé, violet pâle	Violet
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétyl méthyl-carbinol (VP)	VP 1 + VP 2 / 10 minutes	
			Incolore-rose pâle	Violet-rose
RAF	D-raffinose	Acidification	Rouge	Jaune
XYL	D-xylose	Acidification	Rouge	Jaune
SAC	D-saccharose	Acidification	Rouge	Jaune
MDG	Méthyl- α -D- glucopyranoside	Acidification	Rouge	Jaune
NAG	N-acétyl-glucosamine	Acidification	Rouge	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange- rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge- violet

* Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs. Les tests d'acidification doivent être lus comparativement au témoin négatif (0) et positif (GLU).

- **Annexe 05:** Tableau de lecture des résultats de galerie API 20 Strep.

Test	Composant actif	Réaction/ Enzyme	Résultats	
			Négatifs	Positifs
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 minutes	
			Incolore	Rose-rouge
HIP	Acide hippurique	Hydrolyse	NIN / 10 minutes	
			Incolore/ Bleu pâle Gris-bleuté	Bleu/Violet
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse β - glucosidase	Incolore	Noir
			Jaune pâle Gris clair	
PYRA	Acide pyroglutamique- β -naphtylamide	Pyrrolidonyl arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 minutes	
			Incolore ou orange très pâle	Orange
α GAL	6-bromo-2-naphtyl-D-galactopyranoside	α -galactosidase	Incolore	Violet
β GUR	Acide naphthol-asbiglucuronique	β -glucuronidase	Incolore	bleu
β GAL	2-naphtyl- β -D-galactopyranoside	β -galactosidase	Incolore ou violet très pâle	Violet
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline	Incolore ou Violet très pâle	Violet
LAP	L-leucine- β -naphtylamide	Leucine aminopeptidase	Incolore	Orange
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge
RIB	D-ribose	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
ARA	L-arabinose	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
MAN	D-mannitol	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
SOR	D-sorbitol	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
LAC	D-lactose	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
TRE	D-tréhalose	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
INU	Inuline	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
RAF	D-raffinose	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
AMD	Amidon	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
GLYG	Glycogène	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune franc

- **Annexe 06:** Tableau de lecture des résultats de galerie API 20 E.

Test	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatifs	Positifs
ONPG	Orthonitrophényl galactoside	β -galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate Vert	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James / 2 minutes	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 minutes	
			Incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune

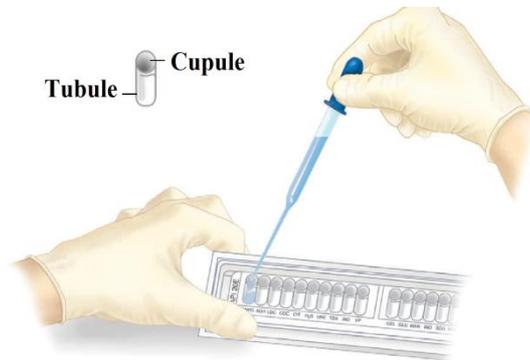
- **Annexe 07:** Tableau de lecture des résultats de galerie API 20 NE.

Test	Composant actif	Réaction/ Enzyme	Résultats	
			Négatifs	Positifs
NO ₃	Potassium nitrate	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 +NIT 2 / 5 minutes Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	Zinc / 5 minutes Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	Formation d'indole	Kovacs / immédiat Colore Vert pâle/ jaune	Rose
GLU	D-glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/ rose/ rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/ rose/ rouge
ESC	Esculine Citrate de fer	Hydrolyse β- glucosidase	Jaune	Gris/marron / noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse de la gélatine	Non diffusion	Diffusion
PNPG	4-nitrophényle β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Assimilation	Transparente	Trouble
ARA	L-arabinose	Assimilation	Transparente	Trouble
MNE	D-mannose	Assimilation	Transparente	Trouble
MAN	D-mannitol	Assimilation	Transparente	Trouble
NAG	N-acétylglucosamine	Assimilation	Transparente	Trouble
MAL	D-maltose	Assimilation	Transparente	Trouble
GNT	Potassium gluconate	Assimilation	Transparente	Trouble
CAP	Acide caprique	Assimilation	Transparente	Trouble
ADI	Acide adipique	Assimilation	Transparente	Trouble
MLT	Acide malique	Assimilation	Transparente	Trouble
CIT	Trisodium citrate	Assimilation	Transparente	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	Assimilation	Transparente	Trouble

• **Annexe 08:** Technique de manipulation et remplir de galerie API 20.



(1) Sélectionnez une colonie bien isolée pour faire une suspension saline de l'organisme inconnu. La suspension doit être bien dispersé avec un mélangeur Vortex



(2) Déposé une suspension bactérienne dans chaque des tubules de la galerie, remplissez les tubules CIT, VP et GEL par la suspension bactérienne jusqu'à la cupule



(3) Distribuer environ 5 ml d'eau du robinet au fond du plateau



(4) Placer la galerie API 20 dans le fond humidifié



(5) Crée un microenvironnement anaérobie on remplir les cupules des caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE par l'huile de paraffine

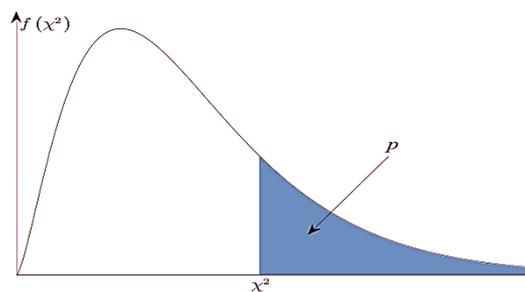
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
5				1								



(6) Après 24 h à 37 ° C, ajouté des réactifs et enregistré un code à 7 chiffres pour l'identification de l'organisme à l'aide d'un catalogue ou d'un logiciel *apweb*TM

- **Annexe 09:** Table de la loi du Khi-Deux (χ^2).

Fournit les quantiles χ^2 tels que
 $P(X \geq \chi^2) = p$ pour $X \rightarrow \chi_n^2$



n \ p	0.995	0.99	0.975	0.95	0.9	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.00004	0.0002	0.001	0.0039	0.0158	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879
2	0.010	0.020	0.051	0.103	0.211	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597
3	0.072	0.115	0.216	0.352	0.584	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838
4	0.207	0.297	0.484	0.711	1.064	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860
5	0.412	0.554	0.831	1.145	1.610	9.236	11.070	12.833	15.086	16.750
6	0.676	0.872	1.237	1.635	2.204	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548
7	0.989	1.239	1.690	2.167	2.833	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278
8	1.344	1.646	2.180	2.733	3.490	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955
9	1.735	2.088	2.700	3.325	4.168	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589
10	2.156	2.558	3.247	3.940	4.865	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188
11	2.603	3.053	3.816	4.575	5.578	17.275	19.675	21.920	24.725	26.757
12	3.074	3.571	4.404	5.226	6.304	18.549	21.026	23.337	26.217	28.300
13	3.565	4.107	5.009	5.892	7.042	19.812	22.362	24.736	27.688	29.819
14	4.075	4.660	5.629	6.571	7.790	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319
15	4.601	5.229	6.262	7.261	8.547	22.307	24.996	27.488	30.578	32.801
16	5.142	5.812	6.908	7.962	9.312	23.542	26.296	28.845	32.000	34.267
17	5.697	6.408	7.564	8.672	10.085	24.769	27.587	30.191	33.409	35.718
18	6.265	7.015	8.231	9.390	10.865	25.989	28.869	31.526	34.805	37.156
19	6.844	7.633	8.907	10.117	11.651	27.204	30.144	32.852	36.191	38.582
20	7.434	8.260	9.591	10.851	12.443	28.412	31.410	34.170	37.566	39.997
21	8.034	8.897	10.283	11.591	13.240	29.615	32.671	35.479	38.932	41.401
22	8.643	9.542	10.982	12.338	14.041	30.813	33.924	36.781	40.289	42.796
23	9.260	10.196	11.689	13.091	14.848	32.007	35.172	38.076	41.638	44.181
24	9.886	10.856	12.401	13.848	15.659	33.196	36.415	39.364	42.980	45.559
25	10.520	11.524	13.120	14.611	16.473	34.382	37.652	40.646	44.314	46.928
26	11.160	12.198	13.844	15.379	17.292	35.563	38.885	41.923	45.642	48.290
27	11.808	12.879	14.573	16.151	18.114	36.741	40.113	43.195	46.963	49.645
28	12.461	13.565	15.308	16.928	18.939	37.916	41.337	44.461	48.278	50.993
29	13.121	14.256	16.047	17.708	19.768	39.087	42.557	45.722	49.588	52.336
30	13.787	14.953	16.791	18.493	20.599	40.256	43.773	46.979	50.892	53.672

- n est le nombre de degrés de liberté (ddl).
- Pour $n > 30$, on peut admettre que la quantité $\sqrt{2\chi^2} - \sqrt{2n - 1}$ suit la loi normale centrée réduite.

- **Annexe 10:** Diamètres critiques et mesurés des antibiotiques selon les souches.

1. *Staphylococcus aureus*

Antibiotiques	Charge des disques	Diamètres critiques			Diamètres mesurés
		R	I	S	
Oxacillin	1 µg	≤ 19	20-24	≥ 25	-
Cefazoline	30 µg	≤ 19	22-20	≥ 23	-
Gentamicine	10 µg	≤ 19	20-24	≥ 25	26
Penicillin	10 UI	≤ 12	13-17	≥ 18	-
Chloramphenicol	30 µg	≤ 20	21-27	≥ 28	-
Amikacine	30 µg	≤ 18	19-23	≥ 24	24
Amoxicillin	25 µg	≤ 14	15-20	≥ 21	-

2. *Enterococcus faecalis*

Antibiotiques	Charge des disques	Diamètres critiques			Diamètres mesurés
		R	I	S	
Oxacillin	1 µg	≤ 19	20-24	≥ 25	-
Cefazoline	30 µg	≤ 19	22-20	≥ 23	-
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13-17	≥ 18	22
Penicillin	10 UI	≤ 12	13-17	≥ 18	-
Chloramphenicol	30 µg	≤ 20	21-27	≥ 28	28
Amikacine	30 µg	≤ 18	19-23	≥ 24	23
Amoxicillin	25 µg	≤ 14	15-20	≥ 21	-

3. *Escherichia coli*

Antibiotiques	Charge des disques	Diamètres critiques			Diamètres mesurés
		R	I	S	
Oxacillin	1 µg	≤ 19	20-24	≥ 25	-
Cefazoline	30 µg	≤ 19	22-20	≥ 23	-
Gentamicine	10 µg	≤ 19	20-25	≥ 26	21
Penicillin	10 UI	≤ 12	13-17	≥ 18	19
Chloramphenicol	30 µg	≤ 21	22-26	≥ 27	23
Amikacine	30 µg	≤ 19	20-25	≥ 26	19
Amoxicillin	25 µg	≤ 18	19-23	≥ 24	25

4. *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotiques	Charge des disques	Diamètres critiques			Diamètres mesurés
		R	I	S	
Oxacillin	1 µg	≤ 19	20-24	≥ 25	-
Cefazoline	30 µg	≤ 19	22-20	≥ 23	-
Gentamicine	10 µg	≤ 17	18-22	≥ 23	-
Penicillin	10 UI	≤ 12	13-17	≥ 18	-
Chloramphenicol	30 µg	≤ 21	22-26	≥ 27	-
Amikacine	30 µg	≤ 18	17-25	≥ 26	19
Amoxicillin	25 µg	≤ 18	19-23	≥ 24	10

ملخص

المستشفيات، فيالرغم من توفيرها للوقاية و العلاج إلا أنها قد تتسبب في إنتقال دائم لمختلف أنواع العدوى، خلال العشرين سنة الأخيرة أضحت عدوى المستشفيات مشكلا هاما يؤرق الصحة العامة على المستوى العالمي. تم في هذه الدراسة مقارنة تشكل البيوفيلم السريري في المختبر المعزول من القطاعات الطبية بين مجموعة من السلالات البكتيرية بمستشفى المغير في الجزائر، كل هذا بهدف المتابعة الصحية للأوساط الإستشفائية و توفير شروط الرعاية الصحية بها عن طريق تشخيص عدوى البكتيريا المكونة للبيوفيلم، كما يعد بعدا لإصلاح المستشفيات و هو الشعار الرئيسي لوزارة الصحة الجزائرية. قمنا بنمذجة هرم عدوى يتكون من قاعدة و التي تمثل البيئة الإستشفائية، مركز الهرم و يمثل القطاعات الطبية و قمة الهرم التي تمثل الموقع المصاب. أفاد هرم توزع العدوى من عزل أربع سلالات بكتيرية تعبر عن نصف عدوى المستشفيات بنسبة 56 % و هي المكورات العنقودية الذهبية 32 %، الإشريشية القولونية 27 %، المعوية البرازية 23 % و الزانفة الزنجارية 18 %. بينت طريقة جيلوز أحمر الكونغو النوعية عن القوة الإفرازية لمادة عديد السكريات التي تكشف عن إمكانية تشكيل بيوفيلم قوي، متوسط أو ضعيف حيث قدر تشكيل البكتيريا للبيوفيلم بـ 85 % في نطاق قوي و متوسط. بالمقابل، أظهرت المقارنة الإحصائية الحيوية بين السلالات عدم وجود أي فرق فيما بينهم حيث يتطور البيوفيلم بمراحل ديناميكية ثابتة. أوضحت تقنية لوح زراعة الأنسجة دقتها الكمية في قياس البيوفيلم المتشكل بمرور الوقت إستنادا لقيم الكثافة الضوئية، في حين أثبتت المقارنة الإحصائية الحيوية وجود إختلاف متبادل في مدة تشكيل البيوفيلم بين بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية بطينة التكوين و بقية السلالات. من حيث الوقاية، البكتيريا المرتبطة بالرعاية الصحية تبدي مقاومة متعددة لمعظم المضادات الحيوية بنسبة 64 %، ليس فقط لعائلة البيتاكتامين و لكن للعديد من العائلات الأخرى في حين نادرا ما تكون حساسة أو متوسطة الحساسية لها. من ناحية أخرى، الأشعة فوق بنفسجية لها تأثير حاد في القضاء على البكتيريا الممرضة و الخبيثة. في الأخير، نقترح الدراسة المعمقة للبيوفيلم بتقنيات البيولوجيا الجزيئية و الهندسة الوراثية، أيضا تطوير مضادات فيزيوكيميائية و بيولوجية ضد البيوفيلم.

الكلمات المفتاحية: البيوفيلم، القطاعات الطبية، عدوى المستشفيات، البكتيريا، الوقاية.

Résumé

Les hôpitaux, en dépit de leurs dispositions en matière de prévention et de traitement, ils sont parfois la cause d'une transmission permanente de divers types d'infections. Au cours des vingt dernières années, l'infection nosocomiale est devenue un problème important qui affecte la santé publique dans le monde. Dans cette étude, la formation du biofilm clinique *in vitro* isolé des secteurs médicaux a été comparée entre des souches bactériennes à l'hôpital d'El-Meghaier en l'Algérie, tout cela dans le but de surveiller les conditions sanitaires dans les hôpitaux et en diagnostiquant l'infection des bactéries formant le biofilm, c'est aussi une dimension de la réforme hospitalière, qui est l'emblème principal du ministère algérien de la santé.

Nous avons modélisé une pyramide d'infection composée de la base, qui représente l'environnement hospitalier, le centre de la pyramide qui représente le secteur médical et le sommet de la pyramide, qui représente le site contaminé. La pyramide de distribution des infections a rapporté avoir isolé quatre souches bactériennes qui expriment la moitié des infections nosocomiales de 56 %, à savoir *Staphylococcus aureus* 32 %, *Escherichia coli* 27 %, *Enterococcus faecalis* 23 % et *Pseudomonas aeruginosa* 18 %. La méthode de la gélose rouge du Congo a montré le pouvoir sécrétoire de la slime qui révèle la possibilité de former un biofilm fort, moyen ou faible où la formation de biofilm bactérienne a été estimée à 85 % dans une gamme forte et moyenne. D'autre part, la comparaison biostatistique entre les souches a montré qu'il n'y a pas de différence entre elles, de sorte que le biofilm se développe avec des étapes dynamiques fixes. La technique de la plaque de culture tissulaire a démontré sa précision quantitative dans la mesure du biofilm formé au cours du temps sur la base des valeurs de densité optique, tandis que la comparaison biostatistique a démontré une différence mutuelle dans la durée de formation du biofilm entre la bactérie *Staphylococcus aureus* à ralentissement et d'autres souches. En termes de prévention, les bactéries associées aux soins de santé sont multi-résistance à la plupart des antibiotiques de vaut 64 % , non seulement pour la famille des β -lactamines, mais pour de nombreuses autres familles. Bien qu'ils soient rarement sensibles ou intermédiaires. Par contre, les rayons UV ont un effet hautement germicide sur les bactéries pathogènes et virulentes.

Enfin, nous suggérons une étude approfondie du biofilm avec des techniques de biologie moléculaire et génie génétique, aussi le développement d'antagonistes physico-chimiques et biologiques contre le biofilm.

Mots clés: Biofilm, Secteurs médicaux, Infections nosocomiales, Bactéries, Prévention.

Abstract

Hospitals, despite their prevention and treatment provisions, they are sometimes the cause of permanent transmission of various types of infections. Over the past twenty years, nosocomial infection has become a major problem affecting public health worldwide. In this study, the formation of *in vitro* clinical biofilm isolated from the medical sectors was compared between bacterial strains at the hospital of El-Meghaier in Algeria, all with the aim of monitoring sanitary conditions in hospitals and in diagnosing the infection of bacteria forming the biofilm, it is also a dimension of hospitals reform, which is the main emblem of the Algerian ministry of health.

We modeled an infection pyramid made up of the base, which represents the hospital environment, the center of the pyramid which represents the medical sector and the top of the pyramid, which represents the contaminated site. The infection distribution pyramid reported having isolated four bacterial strains that express half of the 56 % nosocomial infections, namely a *Staphylococcus aureus* 32 %, *Escherichia coli* 27 %, *Enterococcus faecalis* 23 % and *Pseudomonas aeruginosa* 18 %. The red Congo agar method has shown the secretory power of slime which reveals the possibility of forming a strong, medium or weak biofilm where the formation of bacterial biofilm has been estimated at 85 % in a strong and medium range. On the other hand, the biostatistical comparison between the strains has shown that there is no difference between them, so that the biofilm develops with fixed dynamic stages. The tissue culture plate technique has demonstrated its quantitative accuracy in measuring the biofilm formed over time based on optical density values, while the biostatistical comparison has demonstrated a mutual difference in the duration of biofilm formation between the slowing bacteria *Staphylococcus aureus* and other strains. In terms of prevention, bacteria associated with healthcare are multi-resistant to most antibiotics by 64 % , not only for the β -lactam family, but for many other families. Although they are rarely sensitive or intermediate. On the other hand, UV rays have a highly germicidal effect on pathogenic and virulent bacteria.

Finally, we suggest an in-depth study of the biofilm with molecular biology and genetic engineering techniques, also the development of physico-chemical and biological antagonists against the biofilm.

Keywords: Biofilm, Medical sectors, Nosocomial infections, Bacteria, Prevention.