

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة سعيدة مولاي الطاهر  
Université Saïda MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية العلوم  
Faculté des Sciences  
قسم البيولوجيا  
Département de Biologie

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

Thème

# **Effet des probiotiques sur quelques souches pathogènes isolées de l'environnement hospitalier potentiellement responsables des infections nosocomiales**

Présenté par :

- Mme : REMMAS Amel

Soutenu le : 22/06/2022

Devant le jury composé de :

Président	Mme. Hassani Maya	MCA Université UMTS
Examineur	Mr. Benrguieg Mokhtar	MCA Université UMTS
Encadrant	Mme. Amara Sabrina	MCB Université UMTS

**Année universitaire 2021/2022**





الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة مولاي الطاهر

Université Saïda MOULAY TAHAR



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

Thème

# **Effet des probiotiques sur quelques souches pathogènes isolées de l'environnement hospitalier potentiellement responsables des infections nosocomiales**

Présenté par :

- Mme : REMMAS Amel

Soutenu le : 22/06/2022

Devant le jury composé de :

Président

Mme. Hassani Maya

MCA Université UMTS

Examineur

Mr. Benrguieg Mokhtar

MCA Université UMTS

Encadrant

Mme. Amara Sabrina

MCB Université UMTS

Année universitaire 2021/2022

## Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

***L'âme de mon père rabi yerhmeh Aissa,*** La personne la plus chère à mon cœur qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie, Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour lui ; je vous dois ma réussite, mon éducation, ma fierté. Vous m'avez aimé très profondément et vous été toujours un père idéal. Vous été le seule qui comprend ma vie.

***Ma chère mère Orkia,*** Les mots me manquent pour exprimer toute ma fierté qui n'égale que l'accomplissement total de votre devoir de mère. Que se travail soit un récompense pour tout ce que vous avait fait pour moi. Que dieu te donne la santé et une longue vie.

***Mes chers frères Mohamed Amine et Sid Ahmed,*** Je ne peux **exprimer** à tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous.

***Mes chères sœurs Safaa, Kheira et Khadîdja.*** je vous aime beaucoup.

***Mes chers enfants Raki et Aissa,*** Qui sont ma source de vie.

***Mes chères copines Nadia, Mokhtaria et Habiba*** Merci pour les bons moments qu'on a passés ensemble

*Toute la promotion de Master2 Microbiologie appliquée.*  
**Toute ma famille**

---

### Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, qui ma a donner la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*En seconde lieu, je tiens à remercier mon encadreur **Dr Amara Sabrina**, d'avoir bien accepté de diriger ce travail, Pour sa disponibilité, pour la confiance qu'elle a su m'accorder et les conseils précieux qu'elle m'a prodigués tout au long de la réalisation de ce projet.*

*Mon vif remerciement pour les membres du jury à commencer par **Dr Hassani Maya** Qui m'a fait l'honneur de présider mon jury **Dr Benrguieg Mokhtar** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Je remercie infiniment mon mari **Mohamed** qui m'a été d'une aide précieuse et primordiale pour la réalisation de ce travail.*

*Ma gratitude s'adresse également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail : au personnel Du laboratoire d'hygiène (**Dr Abbou, Iméne, Karima et Hamada**), au personnel de l'hôpital et de l'université de Saida surtout **Ahmed**.*

**Liste des abréviations**

- ADH** : Arginine dihydrolase
- ADI** : Acide adipique
- AML** : Amoxicilline
- AMY** : Amygdaline
- API20 E** : Analytical profile index 20 Entérobactéries
- API20 NE** : Analytical profile index 20 Non Entérobactéries
- ARA** : L-arabinose
- ATB** : Antibiotique
- AUG** : Amoxicilline acide clavulanique
- BCP** : La gélose bromocrésol pourpre
- BGN** : Bacille Gram négatif
- BHIB** : Bouillon Cœur cerveau
- C** : Chlorophénicol
- C°** : Degrés Celsius
- CAP** : Acide caprique
- CGP** : Cocci Gram positif
- CIT** : Citrate de sodium
- GN** : Gentamicine
- ESC** : Esculine citrate de fer
- GEL** : Gélatine
- GLU** : Glucose
- GN** : Gélose nutritive
- GNT**: Potassium gluconate
- H2S**: Sulfate d'hydrogène
- HK**: Hektoen

**IN** : Infection Nosocomiale

**LND** : Indole

**LDC** : Lysine décarboxylase

**MAL**: D-maltose

**MAN**: D- mannitol

**MEL**: D-melibiose

---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1.</b> Les antibiotiques testés .....	32
<b>Tableau 2.</b> Les probiotiques testés pharmaceutiques .....	34
<b>Tableau 3.</b> Les probiotiques testés.....	37
<b>Tableau 4.</b> Les résultats des prélèvements bactériologiques. ....	37
<b>Tableau 5.</b> Aspect de culture des bactéries trouvées sur gélose bromocrésol pourpre (BCP), Hiktoen et Chapman (B : milieu BCP, H : Hiktoen, C : Chapman, h : Humide, S : sèche, MI : médecine interne , INF : infectieux, Bloc O : Bloc Opératoire, Réa M : Réa Médicale, CHF : Chirurgie femme, URG : urgence , Réa C : Réa Covid.....	39
<b>Tableau 6.</b> Les résultats des tests biochimique (catalase, oxydase et mannitol-mobilité) des isolats.....	45
<b>Tableau 7.</b> Répartition des CGP et BGN .....	46
<b>Tableau 8.</b> Résultat de la galerie API 20E de onze souches	48
<b>Tableau 9.</b> Résultat de la galerie API 20NE de quatre souches.....	50
<b>Tableau 10.</b> Résultat des tests biochimique classique de la souche (11). ....	52
<b>Tableau 11.</b> .. Résultat des souches identifiés au niveau des différents services de l'hôpital Ahmed Medegheri .....	52
<b>Tableau 12.</b> Résultat de l'antibiogramme des souches isolées. ....	53
<b>Tableau 13 :</b> Inhibition des entérobactéries par les bactéries lactiques (méthode des puits remplis de surnageant .....	57



---

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Mécanismes d'action des probiotiques .....	17
<b>Figure 2.</b> Mode d'action des acides organiques sur les pathogènes .....	18
<b>Figure 3.</b> Mode d'action du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés sur les pathogènes ...	18
<b>Figure 4.</b> Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu bromocrésol. ....	19
<b>Figure 5.</b> Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu Chapman. ....	40
<b>Figure 6.</b> Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu Hektoen .....	40
<b>Figure 7:</b> Aspect macroscopique des cultures bactérienne sur le milieu Chromagar . ....	40
<b>Figure 8:</b> Observation microscopique des Cocci à Gram positif .....	41
<b>Figure 9 :</b> Observation microscopique des bacilles à Gram négatif isolés à partir service de médecine interne .....	41
<b>Figure 10 :</b> Observation microscopique des bacilles à Gram négatif isolés à partir de service bloc chirurgicale .....	42
<b>Figure 11 :</b> Observation microscopique des bacilles à Gram négatif isolés à partir de service d'urgence.....	42
<b>Figure 12 :</b> Pourcentage des souches CGP et BGN isolés. ....	43
<b>Figure 13 :</b> La formation de bulles de gaz de test catalase de la souche (15). ....	43
<b>Figure 14 :</b> Observation du résultat positif de test oxydase de la souche (10). ....	44
<b>Figure 15 :</b> Résultats de test mannitol-mobilité. ....	44
<b>Figure 16 :</b> La répartition des souches dans l'environnement hospitalier. ....	46
<b>Figure 17 :</b> Résultat de la galerie API 20 E de la souche (22). ....	49
<b>Figure 18 :</b> Résultat de la galerie API 20 E de la souche (19). ....	49
<b>Figure 19 :</b> Résultat de la galerie API 20 E de la souche (25). ....	49
<b>Figure 20 :</b> Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (13). ....	51
<b>Figure 21 :</b> Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (24). ....	51
<b>Figure 22 :</b> Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (10). ....	51
<b>Figure 23 :</b> Résultats d'antibiogramme des souches (22) et (25) .....	54

**Figure 24** : Résultats d'antibiogramme des souches (10) et (15)... ..... 55

**Figure 25**: Inhibition de *Escherichia coli* par les bactéries lactiques ..... 55

**Figure 26** : Inhibition de *Shigella ssp* par les bactéries lactiques ..... 56

## Résumé

L'objectif de cette étude est la recherche et l'identification phénotypique des bactéries responsables de la contamination de l'environnement hospitalier présentes sur des surfaces sèches et humides. Trente souches ont été isolées de divers services de l'hôpital Ahmed Medeghri de Saida afin d'estimer l'abondance des bactéries dans cet environnement et pouvant engendrer des infections nosocomiales. Les résultats des analyses macroscopiques et microscopiques et les tests d'identification effectués pour les isolats obtenus ont permis d'identifier 14 souches y compris des Enterobacteriaceae appartenant aux espèces (*Escherichia coli*, *Shigella ssp*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*...etc.) et non Enterobacteriaceae de l'espèce *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* et des Staphylococcaceae. Les antibiogrammes des souches isolées ont montré une sensibilité variable aux antibiotiques testés.

Les tests d'antagonisme des probiotiques sur les souches multirésistantes ont révélé des résultats satisfaisants pour leur éventuelle utilisation contre les germes responsables des infections nosocomiales.

**Mots clés :** environnement hospitalier, infection nosocomiale, probiotique, la résistance aux antibiotiques, antagonisme

**Abstract**

The objective of this study is the research and the phenotypic identification of the bacteria responsible for the contamination of the hospital environment present on dry and humid surfaces. Thirty strains were isolated from various departments of the Ahmed Medeghri hospital in Saida in order to estimate the abundance of bacteria in this environment and which can cause nosocomial infections. The results of the macroscopic and microscopic analyzes and the identification tests carried out for the isolates obtained made it possible to identify 14 strains including Enterobacteriaceae belonging to the species (*Escherichia coli*, *Shigella ssp*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*...etc.) and not Enterobacteriaceae of the species *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa* and Staphylococcaceae. The antibiograms of the isolated strains showed variable sensitivity to the antibiotics tested. Probiotic antagonism tests on multirésistant strains revealed satisfactory results for their possible use against the germs responsible for nosocomial infections.

**Key words:** hospital environment, nosocomial infection, probiotic, antibiotic resistance, antagonism.



## ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو البحث والتعرف على النمط الظاهري للبكتيريا المسؤولة عن تلوث بيئة المستشفى الموجودة على الأسطح الجافة والرطبة. تم عزل ثلاثين سلالة من مختلف أقسام مستشفى أحمد مدغري في صيدا لتقدير انتشار البكتيريا في هذه البيئة والتي يمكن أن تسبب التهابات في المستشفيات. أتاحت نتائج التحليلات العيانية والميكروسكوبية واختبارات التعريف التي أجريت للعزلات التي تم الحصول عليها تحديد 14 سلالة بما في ذلك البكتيريا المعوية التي تنتمي إلى الأنواع (*Klebsiella* و *Serratia Liquefaciens* و *Shigella ssp* و *Escherichia coli*) وليس *Enterobacteriaceae* من الأنواع *Vibrio alginolyticus* و *pneumoniae... etc.* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas luteola* و *Staphylococcaceae*. أظهرت المضادات الحيوية للسلاسل المعزولة حساسية متغيرة للمضادات الحيوية المختبرة. أظهرت اختبارات مضادات البروبيوتيك على السلالات متعددة المقاومة نتائج مرضية لاستخدامها المحتمل ضد الجراثيم المسؤولة عن عدوى المستشفيات.

**الكلمات المفتاحية:** بيئة المستشفى ، عدوى المستشفيات ، الكائنات الحية المجهرية ، مقاومة المضادات الحيوية ، العداء.

---

**Table des matières**

<b>PARTIE I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>II.1. Définition de l'environnement hospitalier.....</b>	<b>5</b>
II.1.2. Principaux germes pouvant être trouvés dans l'environnement. ....	5
II.1.3. Les facteurs responsables de survie des bactéries dans l'environnement hospitalier.....	5
<b>II.2. Contamination de l'environnement par les bactéries .....</b>	<b>6</b>
II.2.1. La contamination des surfaces .....	6
II.2.2. La contamination de L'air .....	6
<b>II.3. D'origine de contamination de l'environnement hospitalier .....</b>	<b>6</b>
<b>II.4 LES BACTERIES RESPONSABLES DES INFECTIONS NOSOCOMIALES ...</b>	<b>7</b>
II.4.1. Définition des infections nosocomiales .....	7
II.4.2. Réservoirs et sources .....	7
II.4.3. Les infections d'origine « endogène » .....	7
II.4.4. Les infections d'origine « exogène », .....	7
II.4.5. Mécanismes de transmission .....	7
<b>II.5. Les bactéries responsables des infections nosocomiales .....</b>	<b>8</b>
<b>II.5.1 Les Cocci Gram positif .....</b>	<b>8</b>
II.5.1.1. Les <i>staphylocoques</i> .....	8
<b>II.5.2. Les bacilles Gram négative .....</b>	<b>9</b>
II.5.2.1. Les <i>entérobactéries</i> . ....	9
a. <i>Escherichia coli</i> .....	9
b. <i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i> . ....	10
<b>II.5.3. Bacilles Gram négatifs non fermentaires .....</b>	<b>11</b>
a. <i>Pseudomonas</i> .....	11
<b>II.6. LES BACTERIES LACTIQUES .....</b>	<b>12</b>
<b>II.6.1. Généralités .....</b>	<b>12</b>
<b>II.6.2. Origine et habitat .....</b>	<b>13</b>
<b>II.7. LES PROBIOTIQUES .....</b>	<b>14</b>
II.7.1 Historique et définition.....	14
<b>II.7.2 Effets bénéfiques des probiotiques .....</b>	<b>15</b>
<b>II.7.3 Mécanismes d'action des probiotiques .....</b>	<b>15</b>

---

II.7.3.1 Inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes .....	16
II.7.3.2 Amélioration de la fonction barrière.....	16
II.7.3.3 Critères fonctionnels .....	17
<b>II.7.4 Utilisation des probiotiques dans l'environnement hospitalier .....</b>	<b>20</b>
II.7.4.1 Allergies .....	20
II.7.4.2 Diarrhées infectieuses .....	21
II.7.4.3 Autres infections .....	21
<b>Partie III. Matériel et méthodes .....</b>	<b>23</b>
<b>III.1. Cadre d'étude .....</b>	<b>23</b>
III.3.1. Réalisation des prélèvements .....	23
III.3.2. L'enrichissement .....	23
III.3.3. Isolement et purification .....	24
<b>III. 4. Conservation des souches .....</b>	<b>24</b>
<b>III.5. Identification phénotypique .....</b>	<b>25</b>
<b>III.5.1. Caractère macroscopique .....</b>	<b>25</b>
<b>III.5.2. Examen microscopique.....</b>	<b>25</b>
a. Coloration de Gram .....	25
b. Teste oxydase .....	25
c. Recherche de catalase .....	26
d. Mannitol-mobilité .....	26
<b>III.5.3. Identification biochimique par la galerie API 20 .....</b>	<b>27</b>
a. Galerie API 20 E.....	27
b. Galerie API 20 NE .....	29
<b>III.5.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques. ....</b>	<b>31</b>
a. Définition et principe .....	31
b. Réalisation pratique de l'antibiogramme .....	31
c. Lecture .....	33
<b>III.5.5 Recherche de l'antagonisme des probiotiques vis-à-vis des</b>	
<b>entérobactéries.....</b>	<b>33</b>
a. Méthode des disques imprégnés.....	34
b. Méthode des puits .....	34
<b>III.5.6 LES PROBIOTIQUES UTILISES.....</b>	<b>34</b>
<b>PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>37</b>

---

---

<b>IV.1. Prélèvement</b> .....	37
<b>IV.2. Analyse des prélèvements au laboratoire</b> ..	37
<b>IV.2.1. Aspect macroscopique des isolats</b> .....	38
<b>IV.2.2. Examen microscopique</b> .....	41
<b>IV.2.2.1. Coloration de Gram</b> ..	41
<b>IV.2.2.2. Pourcentage des souches isolées</b> .....	42
<b>IV.2.3. Identification biochimique</b> .....	43
IV.2.3.1. Recherche de catalase .....	43
IV.2.3.2. Test oxydase.. .....	44
IV.2.3.3. Test mannitol-mobilité... .....	44
IV.2.3.4. Identification par la galerie API 20 .....	47
a. Galerie API 20 E .....	47
b. Galerie API 20 NE.....	50
IV.3.3. Etude de la sensibilité et la résistance des souches aux antibiotiques (L'antibiogramme) .....	53
IV.3.4 Recherche de l'antagonisme des probiotiques vis-à-vis des entérobactéries...	55
<b>PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>60</b>
<b>PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>62</b>
<b>PARTIE VII. ANNEXES</b> .....	<b>72</b>



# **PARTIE I. INTRODUCTION**

---

## Introduction

Les infections associées aux soins constituent un véritable enjeu de santé publique compte tenu de leurs conséquences en termes de morbidité, de mortalité, d'allongement des durées de séjours et incidemment de leur coût financier important. Si tous les patients hospitalisés en sont menacés, les patients critiques de réanimation sont considérés comme à très haut risque de développer de telles infections (**Isakow et al., 2007**). En raison de nombreux facteurs physiopathologiques, le patient critique est en effet une cible privilégiée, souvent après une colonisation précoce de ses voies aériennes et digestives par des bactéries multirésistantes (BMR) comme le *Pseudomonas aeruginosa*. Au premier rang de ces infections, avec en France une incidence aux alentours de 15 %, on retrouve la pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) (**McNabb et Isakow, 2008**). La prévention de la colonisation par des BMR représente un axe de lutte important contre ces infections. Des stratégies fondées sur la prescription prophylactique d'antibiotiques, comme la décontamination digestive sélective (DDS), ont pu être proposées dans ce contexte, avec des bénéfices discutés. Toutefois, à l'ère de l'augmentation des résistances bactériennes et de la relative faiblesse de l'innovation anti-biotique, l'émergence de nouvelles stratégies « non antibiotiques », comme l'utilisation de probiotiques, pourrait se révéler être un axe de travail intéressant.

Les observations princeps ; au début du xx<sup>e</sup> siècle ; d'Elie Metchnikoff d'une plus grande longévité de populations de paysans bulgares consommateurs de yaourts contenant certaines bactéries fermentantes (*Lactis acid bacteria*, LAB) ont constitué les bases du concept de l'utilisation des probiotiques, terme employé par la première fois par Lilly et Stillwell en 1965, par opposition aux antibiotiques (**Lilly et Stillwell, 1965**). Les probiotiques sont définis officiellement par l'OMS et la FAO comme des « micro-organismes viables qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé ». Ces produits font l'objet d'un commerce florissant et jusqu'à récemment relativement peu régulé dans de nombreux pays occidentaux. Ils sont disponibles pour le grand public sous différentes formes (compléments alimentaires, boissons fortifiées, etc.), avec des arguments commerciaux « d'amélioration de l'état de santé » ou de « bien-être » (**Morrow et Kollef, 2008**).

La reconnaissance ces dernières années de la place cruciale du tube digestif et de sa flore en physiologie et en physiopathologie a suscité un regain d'intérêt pour les

probiotiques en tant qu'alternative thérapeutique originale à part entière. Ils ont vu leur utilisation s'élargir à des pathologies très variées, comme les maladies inflammatoires chroniques intestinales, l'entérocolite ulcéronécrosante, la prévention et le traitement des diarrhées post antibiotiques, l'allergie au lactose, mais également dans des pathologies extradigestives comme la dermatite atopique, les allergies ou l'asthme (**Gareau et al., 2010**). Les données cliniques robustes concernant l'utilisation de ces produits dans le domaine de la réanimation, et en particulier dans la prévention des infections et des PAVM, restent cependant éparses et contradictoires.

# **PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



## **II. L'environnement hospitalier**

### **II.1. Définition de l'environnement hospitalier**

Le terme d'environnement hospitalier regroupe habituellement l'air, l'eau, les surfaces, le linge, les aliments, les dispositifs médicaux et les déchets (**Cavallo et al., 2002**), qui sont susceptibles d'entrer en contact avec le patient, les visiteurs et le personnel d'une structure d'hospitalisation (**Bouaziz et Ramdane, 2006**).

#### **II.1.2. Principaux germes pouvant être trouvés dans l'environnement hospitalier**

L'environnement hospitalier est largement contaminé par des micro-organismes d'origine humaine ou spécifiquement environnementaux (**Weber et Rutala, 1997**). Les microorganismes présents dans l'environnement hospitalier sont extrêmement variés (bactéries, levures, champignons filamenteux, virus et parasites) et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qui ne manifestent leur virulence que sur un organisme dont les défenses immunitaires sont affaiblies, qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme (**CTIN, 2002**).

Parmi ces microorganismes, les bactéries jouent un rôle potentiel dans les infections hospitalières (**Debabza, 2015**) :

□ Les saprophytes qui vivent naturellement dans le milieu extérieur comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Legionella*, *Bacillus* (**Lionel, 2003**).

□ Les commensaux de l'être humain, qui sont des " Parasites " facultatifs et appartiennent à la flore cutanée, digestive ou respiratoire, par exemple : *E. coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, ils peuvent d'ailleurs servir d'indicateurs de contamination dans l'environnement (**Lionel, 2003**).

□ Les pathogènes spontanés pour l'être humain, tels : *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* (**Lionel, 2003**).

#### **II.1.3. Les facteurs responsables de survie des bactéries dans l'environnement hospitalier**

La flore retrouvée sur les surfaces dépend de plusieurs facteurs comme l'activité humaine qui entraîne un apport de micro-organismes par le patient lui-même, par les soignants et par les visiteurs (**Barbut, 2003**).

La contamination des surfaces dépend, outre de la qualité du bionettoyage, de nombreux facteurs liés au microorganisme : sa durée de vie sur un support inerte (qui varie en fonction de la matière, de la température, de la dessiccation), de son adhérence à la surface, de sa capacité à produire un biofilm et de sa capacité à résister aux conditions défavorables (sporulation) (**Barbut, 2003**).

## **I1.2. Contamination de l'environnement par les bactéries**

### **I1.2.1. La contamination des surfaces**

Présence de microorganismes sur une des surfaces (corps humain ou objet) sans invasion des tissus ou sans réaction physiologique (**site web**).

### **I1.2.2. La contamination de L'air**

Les micro-organismes de l'air sont généralement véhiculés par des supports de taille variable : poussières (10 à 100 µm), gouttelettes et microgouttelettes émises par les voies respiratoires humaines ou par aérosolisation (10 à 1 000 µm) et noyaux de condensation (*droplet nuclei*) issus de l'évaporation des gouttelettes (2 à 5 µm) (**Hajjar et al ., 2000**).

## **I1.3. L'origine de contamination de l'environnement hospitalier**

Il s'agit de l'homme ou de son environnement :

### **□ L'homme**

Il est, soit le patient malade, soit le patient colonisé (sans signes de maladie ou porteur asymptomatique), mais le personnel et les visiteurs peuvent également être en cause. Les sites propices à jouer ce rôle de réservoir sont : la peau (mains, poignets, périnée, plaies cutanées..), les muqueuse (rhinopharynx ...), les cheveux et les sécrétions pathologiques (**Lionel H, 2003**).

### **□ L'environnement**

Il joue un rôle de gîte épidémiologique par le biais des surfaces (poignées – robinets - téléphones ...) des objets (matériel médicaux chirurgical), des zones humides (siphon des lavabos et douches, vases de fleurs ...) et parfois, paradoxalement, des désinfectants (**Lionel H, 2003**).

## **II. 4. Les Bactéries responsable des infections nosocomiales**

### **II.4.1. Définition des infections nosocomiales**

Le terme nosocomial, vient du grec « nosos » signifiant maladie et secondairement de « nosokomeone » qui signifie hôpital ; il qualifie ce qui se rapporte à ce milieu, ce qui se contracte lors d'un séjour hospitalier (**Margot et Chantal, 2009**).

L'infection nosocomiale est une Infection acquise dans le cadre d'une activité de soins, qu'elle soit ambulatoire ou hospitalière. Elle est généralement acquise plus de 48h après l'admission (**Menzinger et al ., 2008**)

### **II.4.2. Réservoirs et sources**

Le réservoir d'un agent infectieux est l'endroit où il maintient sa présence en se multipliant. Ce réservoir peut être humain, animal, environnemental ou mixte. La source est le lieu de contact entre l'agent infectieux et l'hôte (**SFAR et SRLF, 2009**).

### **II.4.3. Les infections d'origine « endogène »**

Il s'agit de la microflore saprophyte du malade lui-même, constituée des bacilles à Gram négatif et plus accessoirement les levures (candida) qui remplacent les Cocci à Gram positif ou les anaérobies. Les microflores saprophytes colonisent les sites préférentiels chez le malade entraînant une infection de l'appareil urinaire, des plaies opératoires, ou du parenchyme pulmonaire (**SFAR, 2002**).

### **II.4.4. Les infections d'origine « exogène » il s'agit :**

- Soit d'infections croisées, transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical
- Soit d'infections provoquées par les micro-organismes portés par le personnel soignant.
- Soit d'infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier, elle comprend les divers appareillages d'assistance respiratoire et de monitoring par voie intra vasculaire, les lavabos, les instruments (stéthoscope, tensiomètre...), les liquides et les tubulures, la nourriture et l'air ambiant (**SFAR, 2002**).

### **11.4.5. Mécanismes de transmission**

On peut citer quatre mécanismes de transmission :

#### **□ L'auto-infection**

Le patient s'infecte par ses propres germes de sa flore originale ou de sa microflore remaniée. Les malades auto-infectés constituent une source importante de germes et sont souvent à l'origine d'hétéro-infection (**Qassimi, 2010**).

#### **□ L'hétéro-infection**

Cette infection résulte de la contamination d'un malade par les germes d'un autre malade (**Qassimi, 2010**).

#### **□ La xéno-infection**

Elle est due à l'entrée dans la communauté hospitalière des nouveaux malades, plus rarement de personnel ou des visiteurs porteurs d'une maladie infectieuse (**Qassimi, 2010**).

#### **□ L'exo-infection**

Elle est liée à des erreurs ou à des insuffisances dans les techniques d'asepsie (**Qassimi, 2010**).

### **11.5. Les bactéries responsables des infections nosocomiales**

Les bactéries représentent la majorité des pathogènes responsables d'infections Nosocomiales (**allegranzi B et al ., 2011**)

#### **11.5.1. Les Cocci Gram positif**

##### **11.5.1.1. *Les staphylocoques***

#### **□ Habitat**

*Les staphylocoques* sont des bactéries fréquemment retrouvées dans l'environnement, l'eau, l'air, et l'aliment, ils sont commensaux des peaux, des muqueuses de l'homme et des animaux. Ils colonisent préférentiellement les fosses nasales mais aussi d'autres sites cutanés tels que les aisselles et la gorge (**Lowy, 1998**).

#### **□ Caractères bactériologiques**

*Les staphylocoques* appartiennent à la famille des *Staphylococcaceae* du phylum de Firmicutes, sont des bactéries Gram positif, aéro-anaérobie facultatif, disposées en diplocoques ou en grappe de raisins, immobiles, non sporulés, catalase-positif,

oxydase- négatif (**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009**). Ce genre regroupe plus d'une trentaine d'espèces dont : *S. aureus*, *S. epidemidis*, *S. haemolyticus*, sont les plus fréquemment rencontrées en bactériologie clinique (**Lowy, 1998**).

#### □ **Pouvoir pathogène**

Environ 30% de la population héberge le *staphylocoque* doré de manière permanente, il s'agit des porteurs asymptomatiques (**VandenBergh et al., 1999**). Cette espèce est un pathogène nosocomial important, elle est responsable d'infections cutanées et muqueuses ainsi que des septicémies, le plus souvent acquises au cours des hospitalisations (**Prescott et Pastey, 2010 ; Ghernaout, 2013**)

### **I1.5.2. Les bacilles Gram négative**

#### **I1.5.2.1. Les entérobactéries**

Les entérobactéries appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Sont des bactéries Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif de forme bacille, immobiles ou mobiles par ciliature péritriche (**Avril et al., 2000**). Elle regroupe 130 espèces dont les plus fréquemment rencontrés en bactériologie clinique sont : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Proteus sp*, *Serratia sp*, *Providencia sp* (**Cartier et al., 1996**).

##### **a. Escherichia coli**

*E. coli* est l'espèce type du groupe des entérobactéries. Elle est appelée communément « colibacille » (**Berche et al., 1988 ; Flandrois, 1997**).

#### □ **Habitat**

Bactérie commensale du tube digestif, *E. coli* est l'espèce la plus importante des anaérobies facultatifs de l'intestin.

#### **Caractère bactériologie**

*E. coli* ou colibacille est une bactérie asporulée, mobile grâce à une ciliature péritriche (**Avril et al., 2000**).

Elle se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang, elles peuvent être

hémolytiques (Avril et al., 2000). *E. coli* possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase (Avril et al., 2006 ; Flaudrois, 2004).

#### □ Pouvoir pathogène

L'*E. coli* est responsables d'infections extra-intestinales (Infections urinaires, Infections abdominales, infections méningées néonatales (*E. coli* k1), septicémies avec choc septique due à l'endotoxine O (Avril et al., 2000).

Il est également le germe préférentiel des infections urinaires. En milieu hospitalier, ces infections sont en rapport essentiellement avec l'utilisation fréquente des sondes urinaires (Isenberg, 1992 ; Eisenstein et Zaleznif, 2000).

#### **b. *Klebsiella-Enterobacter-Serratia***

Le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (K.E.S) rassemble plusieurs espèces bactériennes longtemps considérées comme commensales et actuellement responsables d'un grand nombre de complications infectieuses en milieu hospitalier. (Berche et al., 1988 ; Flandrois, 1997 ; Avril et al., 2000).

#### □ *Klebsiella*

##### **Habitat**

Les espèces du genre *Klebsiella* sont présentes dans le monde entier, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales. Elles sont ubiquistes, c'est-à-dire qu'on les rencontre partout, notamment dans les milieux forestiers, le sol, eaux de surface, eaux usées (Janda et Abbott, 2006).

##### **Caractère bactériologique**

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif (coloration bipolaire fréquente), toujours immobiles, très souvent encapsulées (Richard et Grimont, 1992). Sur les milieux classiques d'isolement pour les entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac Conkey) (Le Minor et Véron, 1989 ; Freney et Bollet, 2000). Les *Klebsiella* sont des bactéries immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies, ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive (Jarlier et Nordman, 2000 ; Nauciel, 2000).

□ *Enterobacter*

**Habitat**

Les *Enterobacter* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses (Avril et al., 2000).

**Caractère bactériologique**

Les espèces du genre *Enterobacter* sont des bacilles Gram négatif anaérobies facultatifs, ils se déplacent grâce à un flagelle péritriche et sont dotés de plus de classe 1 (Paterson et al., 2005 ; Hart et al., 2006). Elles se développent en aéro-anaérobiose aux températures mésophiles d'incubation (de 30°C à 37°C) (Lehner, 2011).

Les espèces de ce genre présentent les mêmes caractères biochimiques généraux des entérobactéries, elles fermentent le glucose avec production d'acide et de gaz, elles sont rouge méthyle négatives, oxydase négatives, catalase positives et Voges-Proskauer positives (Grimont F et Grimont P. A.D, 2002 ; Lehner, 2011).

□ *Serratia*

**Habitat**

Les *Serratia* sont des bactéries ubiquitaires qui se trouvent dans le sol, l'eau, et le tube digestif de l'homme et des animaux. Ce sont parmi les Entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques (Jean et al., 2002).

**Caractère bactériologique**

Bacille mobile, donne parfois des colonies pigmentées en rouge (prodigiosine) (Didier, 1998 ; Avril et al., 2000).

Les principaux caractères biochimiques : Lactose (-), ONPG (+), H<sub>2</sub>S (-) protéolyse intense et rapide (c'est la seule Entérobactérie hydrolysant facilement la gélatine en 24 heures), lipase (+), DNase (+) (Pilet et al., 1987).

**Pouvoir pathogène du groupe K. E. S**

Les bactéries K.E.S seraient responsables de près de 10 à 30 % des IN. Leur pathogénicité s'exprime habituellement chez des malades affaiblis. Elles peuvent donner lieu à divers types d'infections : infections broncho-pulmonaires, infections urinaires, infections localisées, septicémies (Berche et al., 1988).

### 11.5.3. Bacilles Gram négatifs non fermentaire

#### a. *Pseudomonas*

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes (Palleroni, 2008).

#### □ *Pseudomonas aeruginosa*

##### **Habitat**

*P. aeruginosa* est une espèce bactérienne ubiquitaire, comme toutes les espèces du genre *Pseudomonas* ou apparenté. Ces bactéries ont des exigences nutritives peu importantes et sont capables de survivre dans l'environnement (eaux, surface, air, aliments) et particulièrement en milieu humide (Lister *et al.* , 2009).

##### **Caractère bactériologique**

Ce sont des bacilles à Gram négatif, non capsulés, mobiles, son extrême mobilité est dû à une ciliature polaire en général monotriche, cytochrome-oxydase positive (C E A E Q, 2016). Ce sont des bactéries chimio-organotrophes, réduisant les nitrates en nitrites, elles possèdent deux pigments caractéristiques : la Pyoverdine et la Pyocyanine et aussi sont caractérisées par leur résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques (Avril *et al.* , 1992).

##### **Pouvoir pathogène**

Est une bactérie pathogène opportuniste, on la trouve dans le tube digestive (Fauchère, 2002). Produit plusieurs toxines cytotoxiques (Nauciel, 2000). Peut surinfecter des lésions cutanées, des plaies traumatiques ou post opératoire (Cattoir, 2005)

### 11.6. Les bactéries lactiques

#### 11.6.1 Généralités

Les bactéries lactiques, de très anciens micro-organismes, utilisés pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation (Dridier et Prevost, 2009). Ce n'est qu'à la fin du 19ème siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que le groupe des bactéries



lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini, plus précisément en 1919 par Orla-Jensen. Il a réuni plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Tredez, 2008**). Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries à Gram positives, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, dépourvues de catalase (certaines souches possèdent une pseudo catalase sur des milieux riches en hème) de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase (**Hélène, 2007 ; Atlan et al .,2008**). Ces bactéries forment un groupe relativement divers, ayant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes (**Schleifer et Ludwig, 1995; Stiles et Holzapfel, 1997; Mayra-Makinen et Bigret, 1998; Yang, 2000**). Leur forme peut être coccoïde, coccobacillaire ou bacillaire, elles sont généralement mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C ou thermophiles entre 40°C et 45°. La majorité des souches se développent à pH 4.0-4.5, certaines sont en activité à pH 9.6 et d'autres à pH 3.2 (**Jozala et al ., 2005 ; Carr et al 2002 ; Kotelnikova et Gelfand, 2002**) . Les bactéries lactiques sont caractérisées par un métabolisme exclusivement fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles tel le glucose, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique.) (**Raynaud, 2006**). Du point de vue nutritionnel, les bactéries lactiques caractérisent par des exigences assez complexes, en ce qui concerne les acides aminés, les acides gras, les peptides, les vitamines, les glucides fermentescibles et les sels. Ces bactéries servent à de très nombreux procédés, aussi bien dans la transformation du lait, que dans la fermentation des végétaux, dans l'œnologie et dans la production des produits carnés fermentés (**Guiraud, 1998**), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (**Generally Recognized As Safe**) (**Klaenhammer et al ., 2005**).

Elles sont considérées comme de bons probiotiques (**Ashraf et al ., 2009**).

### **II.6.2. Origine et habitat**

Les bactéries lactiques sont des germes ubiquistes, se trouvant dans différents environnements, aptes à se développer sur différents substrats autres que le lait (**Tailliez, 2001**). Leur présence est révélée dans plusieurs niches écologiques entre autres végétales (plantes, fruits, légumes, céréales), animales et humaines (tractus digestif, cavités buccales et urogénitales). A titre d'exemple, les espèces du genre

*Streptococcus*, *Lactococcus* sont présents chez l'homme et chez les animaux où elles sont isolées à partir de leurs peaux, de leurs matières fécales, et elles sont aussi isolées de l'ensilage du foin et des grains. (Dellaglio *et al.*, 1994; Mathara *et al.*, 2004). Par ailleurs, les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature; elles se trouvent sur les végétaux mais également dans l'intestin des animaux et de l'homme. Certaines espèces comme *Lb. acidophilus* entrent en composition au niveau de la flore commensale de l'intestin et du vagin, où sa présence empêche l'invasion par *Candida albicans*. Les espèces du genre *Pediococcus* ne se rencontrent pratiquement que sur les plantes (Guiraud, 1998). Même si elles se développent dans une variété d'habitats, les bactéries lactiques exigent des carbohydrates fermentescibles, des acides aminés, des acides gras, des sels et des vitamines pour leurs croissance (Shihata et Shah, 2000; Hammes et Hertel, 2003). D'une façon générale, les bactéries lactiques sont présentes partout où il y a de fortes concentrations de glucides, de produits de dégradation des protéines, de vitamines et peu d'oxygène (Marteau, 2007).

## **II.7. Les probiotiques**

### **II.7.1 Historique et définition**

La définition du terme probiotique a évolué dans le temps en fonction de la réflexion des chercheurs, des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Vasiljevic et Shah, 2008).

Au début des années 1900, le lauréat du prix Nobel, *Elie Metchnikoff* a associé la longévité accrue des ruraux bulgares à la consommation régulière de produits laitiers fermentés tels que le yaourt. Il a suggéré que les lactobacilles pourraient contrecarrer les effets putréfiants du métabolisme gastro-intestinal (Martirosyan et Leem, 2019).

En 1906, le pédiatre français *Henry Tissier* a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhées contenaient un faible nombre de bifidobactéries par rapport aux selles d'enfants en bonne santé. Il suggéra alors d'administrer ces bactéries aux patients diarrhéiques pour les aider à restaurer un microbiote intestinal sain (Liévin-Le Moal et Servin, 2014). En 1989, *Fuller* redéfinit les probiotiques comme des « compléments alimentaires qui ont un effet bénéfique sur l'animal hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal » (Burns et Rowland, 2000).

Le terme probiotique dérivé du grec « pro bios », qui signifie littéralement « en faveur de la vie ». En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) officialisaient la définition du terme probiotique afin d'éviter toute dérive. Les probiotiques sont donc définis comme « des organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (**Markowiak et Ślizewska, 2017**). L'histoire souligne donc que la définition actuelle pourrait encore évoluer, car les champs de recherche pour mieux connaître et comprendre l'action des probiotiques sont encore nombreux (**Yan et Goldman, 2020**).

### **II.7.2 Effets bénéfiques des probiotiques**

Les bactéries lactiques peuvent jouer un double rôle comme agents de fermentation alimentaire et potentiellement comme agents bénéfiques pour santé (**Gupta et al., 2018**).

Les effets des bactéries probiotiques sont multiples: la modification du pH, augmentation d'IgA sécrétoires et la synthèse des bactériocines conduisant à limiter l'implantation de micro-organismes pathogènes. Elles maintiennent la barrière physique qui représente l'épithélium intestinal et ont des effets sur l'immunité en conduisant à une diminution des cytokines pro-inflammatoires et une modulation de l'orientation de la réponse immunitaire adaptative (**Seksik, 2007**). Elles peuvent prévenir les maladies intestinales, atténuer l'intolérance au lactose, améliorer l'équilibre microbien intestinal, présentant des effets anti-hypercholestérolémies et antihypertenseurs, soulager des troubles post-ménopausiques et réduire la diarrhée du voyageur. Des études récentes ont également porté sur leurs utilisations dans le traitement des maladies de la peau et de la bouche (**Shi et al., 2016**).

En outre, ils peuvent améliorer la prévention du cancer par la réduction de la concentration des enzymes cancérogènes et des métabolites putréfiantes dans l'intestin, l'atténuation des allergies et des maladies atopiques chez les nourrissons. Ainsi que la prévention des infections des voies respiratoires (rhume, influenza) et le traitement des infections urogénitales et la thérapie des cardiopathies ischémiques (**Novik et al., 2014**).

Donc les probiotiques exercent des effets de régulation de la microflore intestinale, des effets nutritionnels (stimulation de la digestion du lactose par exemple) ou encore des

effets sur les fonctions immunitaires par le biais d'une stimulation de la production d'immunoglobulines ou d'interféron (**Bongaerts et Severijnen, 2001**).

### **I1.7.3 Mécanismes d'action des probiotiques**

Il existe différents mécanismes d'action par lesquels les probiotiques exercent un antagonisme vis-à-vis plusieurs microorganismes (**Yan et Polk, 2009**). Parmi ces mécanismes (**figure 1**):

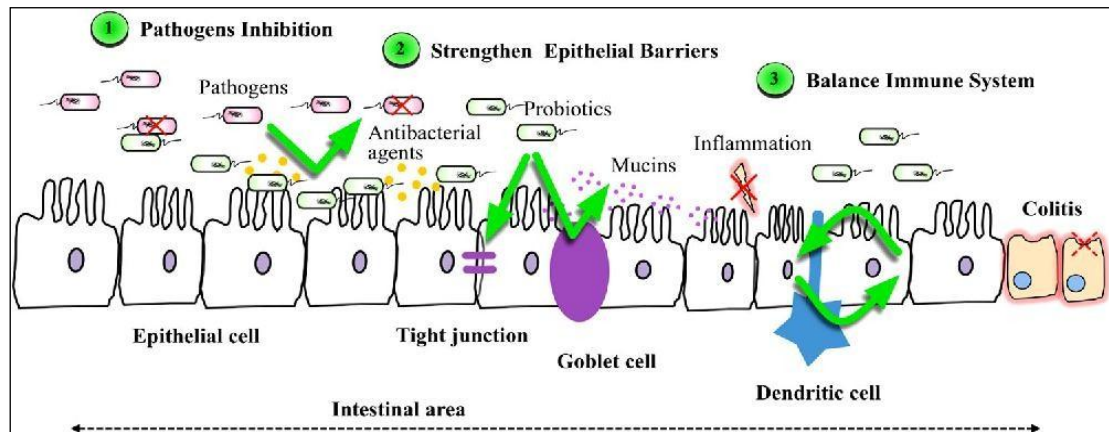
- Inhibition de la croissance des pathogènes.
- Amélioration de la fonction barrière.
- Modulation du système immunitaire (**Monteagudo-Mera et al., 2019**).

#### **I1.7.3.1 Inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes**

Les probiotiques exercent des effets antagonistes directs par la production de substances antimicrobiennes, notamment les bactériocines, l'acide, le peroxyde d'hydrogène, et les défensines. (**Yan et Polk, 2009**), ou des effets indirects, par la création d'un environnement défavorable à l'implantation et à la prolifération des bactéries pathogènes spécifiques par modification du pH intestinal. Les probiotiques conduisent à la formation d'acide gras à chaînes courtes, les acides organiques (acide lactique, acétique, propionique, acide succinique, etc.), qui acidifient le milieu intestinal empêchant ainsi la croissance des microorganismes acido-sensibles (**Faure et al., 2013**). L'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Les probiotiques entrent en compétition avec les pathogènes vis-à-vis des nutriments disponibles dans le milieu (**Coudeyras et Forestier, 2010**)

#### **I1.7.3.2 Amélioration de la fonction barrière**

Les probiotiques renforcent l'effet barrière anti pathogènes, ils s'opposent à l'implantation des micro-organismes pathogènes dans le tube digestif par compétition sur les sites d'adhésion grâce à leur potentiel d'adhésion à la muqueuse intestinale (**Faure et al., 2013**). Certains probiotiques participent à l'effet barrière des muqueuses et l'exclusion des agents pathogènes en stimulant la production des mucines et des peptides antimicrobiens mais aussi en améliorant l'intégrité de l'épithélium, notamment la formation des jonction serrées (**Coudeyras et Forestier, 2010**).



**Figure 1.** Mécanismes d'action des probiotiques (Kim *et al.*, 2016).

(1) Les probiotiques inhibent les pathogènes en se faisant concurrence pour la nutrition et le site de liaison, ou en sécrètent des agents antibactériens. (2) Les probiotiques améliorent la jonction serrée et favorisent la sécrétion de mucines. (3) Les probiotiques contribuent à l'homéostasie intestinale par un effet d'immun modulation.

### II.7.3.3 Critères fonctionnels

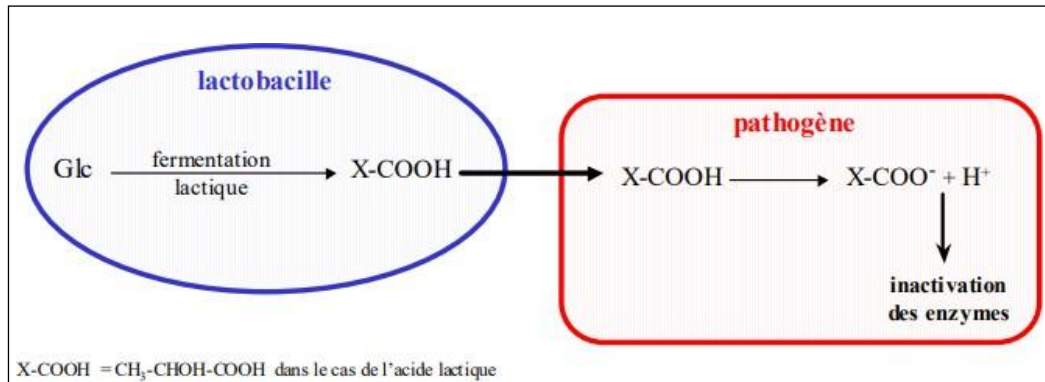
#### L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne vis-à-vis les germes pathogènes est l'un des critères fréquemment utilisés pour la sélection des souches probiotiques, ces organismes peuvent fonctionner comme des barrières microbiennes contre les pathogènes gastro-intestinaux grâce à l'exclusion compétitive de la liaison des pathogènes, la modulation du système immunitaire de l'hôte et la production des substances antimicrobiennes (Marianelli *et al.*, 2010).

Parmi ces métabolites antimicrobiens, nous citons ce qui suit:

#### a- Les acides organiques

L'acide lactique et l'acide acétique sont actifs contre les micro-organismes pathogènes de l'intestin impliqués dans les cas de diarrhées (Servin, 2004). L'effet inhibiteur des acides organiques est principalement causé par la forme non dissociée de la molécule, qui diffuse passivement à travers la membrane cellulaire vers le cytosol plus alcalin et interfère avec les fonctions métaboliques essentielles. Les effets toxiques de l'acide lactique et acétique comprennent la réduction du pH intracellulaire et la dissipation du potentiel membranaire (Šušković *et al.*, 2010). Le mode d'action est décrit dans la figure 2.

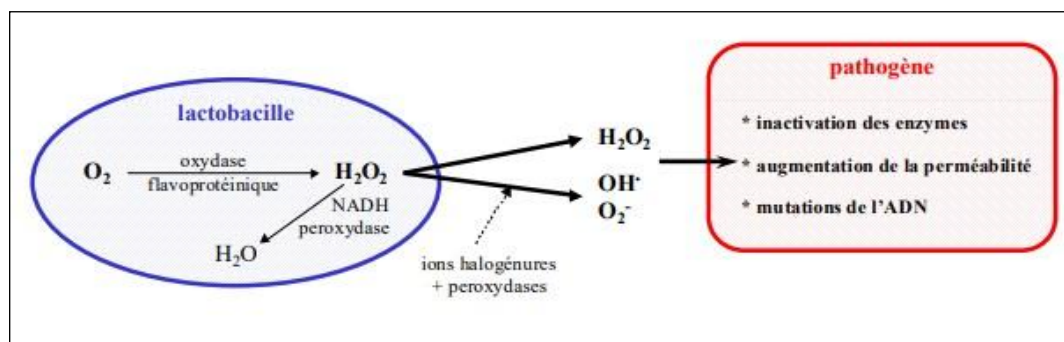


**Figure 2.** Mode d'action des acides organiques sur les pathogènes (Rousseau, 2004).

### b- Le peroxyde d'hydrogène

L'activité antimicrobienne du peroxyde d'hydrogène est attribuée à son fort effet oxydant sur la cellule bactérienne et à la destruction des protéines cellulaires (Šuško<sup>vi</sup>ć *et al.*, 2010).

La toxicité du peroxyde d'hydrogène est due au pouvoir oxydant de la molécule elle-même ou de ses métabolites OH<sup>•</sup> (radical hydroxyle) et O<sub>2</sub><sup>-</sup> (anion superoxyde) produits par des agents réducteurs et des enzymes peroxydases. Ces molécules peuvent agir sur les protéines (inactivation des enzymes cytoplasmiques). Les réactions sont décrites dans la **figure 3**. Cependant, l'autodestruction des lactobacilles et des lactocoques est évitée pour ceux possédant une NADH peroxydase qui transforme le peroxyde d'hydrogène (Migdal et Serres, 2011).

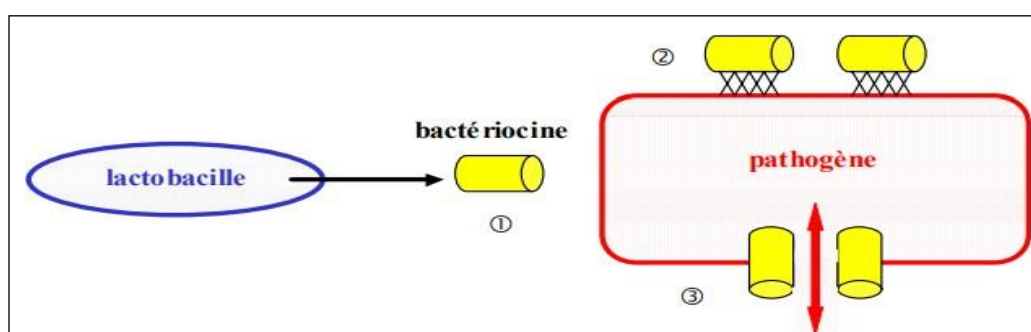


**Figure 3.** Mode d'action du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés sur les pathogènes (Rousseau, 2004).

### c- Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides de synthèse ribosomale produits par certaines bactéries. L'activité antimicrobienne soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (**Lagha et al ., 2017**). Ces molécules produites par les bactéries lactiques, définies comme des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Les plus connus sont: la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et le bulgarican (**Samedi et Charles, 2019**). Certains BAL produisent des bactériocines ayant une activité bactéricide contre des espèces apparentées (spectre étroit) ou contre des bactéries d'autres genres (large spectre) (**Šušković et al ., 2010**).

La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action. Elles agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores qui mènent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie affectée (**figure 4**) (**Samedi et Charles, 2019**). L'efficacité des bactériocines produites par les bactéries lactiques est principalement due aux interactions électrostatiques avec des groupes de phosphate chargés négativement sur les membranes cellulaires cibles par la liaison initiale, la formation des pores et la destruction des cellules entraîne des dommages mortels et l'activation de l'autolysine pour digérer la paroi cellulaire (**Singh, 2018**).



**Figure 4.** Mode d'action des bactériocines sur les pathogènes (**Rousseau, 2004**).

#### **d- Le dioxyde de carbone**

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire, par l'intermédiaire de fermentation de certains substrats. Son accumulation dans l'environnement crée des conditions anaérobies, pouvant conduire à l'élimination des bactéries aérobies strictes (**Samedi et Charles, 2019**).

L'activité antifongique du CO<sub>2</sub> est due à l'inhibition des décarboxylations enzymatiques et à son accumulation dans la bicouche lipidique membranaire entraînant un dysfonctionnement de la perméabilité (**Šušković et al., 2010**).

### **e-Le diacétyle**

Les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent de l'acétaldéhyde actif par décarboxylation du pyruvate. Ce produit se condense ensuite avec du pyruvate, formant un  $\alpha$ -acétolactate et il est converti par des  $\alpha$ -acétolactate synthases en diacétyle (**Šušković et al., 2010**).

Le diacétyle (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un des composants aromatiques essentiels. La formation maximale de diacétyle est observée sous un pH légèrement acide. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre certains microorganismes, ces derniers y sont néanmoins moins sensibles. Le diacétyle peut inhiber la croissance des bactéries Gram positives non lactiques et même les Gram négatives, des levures et des moisissures (**Stoyanova et al., 2012**).

## **11.7.4 Utilisation des probiotiques dans l'environnement hospitalier**

### **11.7.4.1. Allergies**

Une réduction des symptômes d'eczéma atopique a été montrée après l'administration de certains probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus GG* et *Bifidobacterium lactis* Bb-12) chez l'enfant à risque (**Langhendries, 2001**). Le risque d'eczéma atopique semble être diminué par l'ingestion de certains probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus GG*) par la mère avant l'accouchement et pendant la lactation. Ces effets ont été rapportés par une seule équipe et nécessitent confirmation par d'autres équipes dans d'autres pays. Les effets éventuels sur l'eczéma atopique d'autres souches probiotiques, ou des prébiotiques, ou d'ingrédients contenant des microorganismes tués, en traitement ou en prévention, ne sont pas connus. Les effets éventuels des probiotiques et prébiotiques sur d'autres types d'allergie ne sont pas établis (**Helin et al., 2002**).

### **11.7.4.2. Diarrhées infectieuses**



Certaines souches de *Lactobacillus* réduisent la durée et améliorent les symptômes des diarrhées infectieuses chez l'enfant. L'effet est modéré mais significatif. Il est toutefois à noter que ces probiotiques ont été administrés indépendamment de l'alimentation dans la majorité des études (**Brunser et al ., 1989**). L'importance de l'effet dépend de la dose de *Lactobacillus* et du type de diarrhée, l'effet semblant plus marqué lors des diarrhées à Rotavirus. Certains probiotiques (*Bifidobacterium lactis* Bb-12) ont un effet préventif. Les études sont néanmoins encore peu nombreuses, et ont été limitées à des populations de nourrissons vivants en centre de moyen ou long séjour. Des préparations à base de lait fermenté par des souches de bactéries lactiques ensuite tuées pourraient avoir des effets positifs sur l'incidence et la sévérité des diarrhées (**Goulet et al ., 2001**).

#### **II.7.4.3. Autres infections**

Certains probiotiques (L.GG) pourraient avoir un intérêt modeste mais néanmoins réel pour réduire le risque d'infections et l'utilisation d'antibiotiques chez le jeune enfant (**Saavedra & Tschernia, 2002**).

Toutefois, les données actuellement publiées sont insuffisantes pour établir cet intérêt. Certains prébiotiques (FOS) pourraient avoir des effets similaires. Là encore, d'autres données sont indispensables. Les effets éventuels des micro-organismes tués ne sont pas connus (**Hatakka et al ., 2001**)

##### **- Infection à *Helicobacter pylori***

Des données expérimentales in vitro et chez l'animal suggèrent que certaines bactéries lactiques pourraient inhiber la prolifération d'*Helicobacter pylori*. Les données chez l'homme sont encore peu nombreuses, mais encourageantes (**Michetti et al ., 1999 ; Felley et al ., 2001**). Le niveau de preuve est néanmoins considéré comme encore insuffisant pour toute recommandation nutritionnelle ou prescription médicale.

# **PARTIE III. MATERIEL ET METHODES**

---

### III.1. Cadre d'étude

. L'objectif de cette étude est de :

- Recherche et identification des bactéries de l'environnement hospitalier qui peuvent causer des infections.

-Recherche de la multirésistantes des entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques.

-Recherche de l'antagonisme des probiotiques vis-à-vis des entérobactéries.

Sont les principaux tests subis par les bactéries isolées.

Enfin l'évaluation de la qualité d'hygiène dans l'environnement hospitalier

### III.2. Matériels

L'ensemble des milieux de culture réactif et appareillages seront cités au fur et à mesure de leur utilisation.

### III.3. Méthodes

#### III.3.1. Réalisation des prélèvements

##### □ Prélèvement au niveau des surfaces

Les prélèvements des échantillons ont été effectués à partir de différents sites environnementaux ; des surface sèches (poignée de porte, paillasse, interrupteur, appareil d'anesthésie, table mayo, les appareils, lits), des surface humide (lavabo, le robinet ,abdomen et cuisse ) .

Les prélèvements ont été effectués en passant un écouvillon stérile sur les instruments selon les étapes suivantes (**Denis, 2011**) :

Humidifier l'écouvillon avec l'eau physiologique stérile et éliminer l'excès de liquide en pressant légèrement le coton sur la paroi du tube ; Frotter l'écouvillon sur la surface verticalement, horizontalement et en diagonale, pendant au moins 20 secondes. Une pression aussi forte que possible doit être appliquée et l'écouvillon doit être retourné.

Replacer délicatement l'écouvillon dans son tube .Les échantillons ainsi prélevés ont été rapidement transportés au laboratoire de microbiologie, ou ils sont incubés à 37C° pendant 24 à 48 heures (**Debabza, 2014**).

### III.3.2. L'enrichissement

L'enrichissement du nombre de microorganismes est réalisé en mettant chaque écouvillon dans un tube contenant le bouillant BHIB (**Chibi, 2015**) (voir annexe1)

Ils sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition de culture Bactérienne qui se manifeste sous forme de trouble (**Debabza, 2014**).

### III.3.3. Isolement et purification

L'isolement sont réalisé à partir des différents types de milieux de culture : la gélose nutritive (GN), la gélose bromocrésol pourpre (BCP), Hektoen, Chromagar et Chapman (voir annexe 1).

Les échantillons sont soumis à des dilutions décimales de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$  dans TSE.

A partir de chaque dilution nous avons prélevé 0,1ml de la

Suspension pour réaliser des ensemencements par étalement sur la gélose nutritive (GN) et BCP .Après incubation à 37°C, les boîtes contenant de 30 à 300 colonies sont retenues pour procéder à l'isolement des bactéries. Un nombre de 12 colonies est prélevé au hasard à partir des boîtes sélectionnées, qui correspondent majoritairement aux dilutions 10-5 et 10-6. Les colonies obtenues présentent différents aspects phénotypiques et ceci pour les cinq milieux ensemencés.

L'ensemencement sur les milieux (gélose nutritive, BCP, Hektoen, Chromagar et Chapman), a été fait comme suit :

La boîte a étéensemencée à l'aide de l'extrémité cotonnée de l'écouvillon imbibé dans le bouillon nutritif par la technique des 3 quadrants.

Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures jusqu'à l'apparition des colonies.

Après avoir relevé l'aspect macroscopique des colonies et s'être assuré de leur pureté, on a procédé à la coloration de Gram et au test de la catalase et d'oxydase. La dernière étape est l'identification des souches sélectionnées et purifiées en utilisant les galeries biochimiques API20E de Bio Mérieux ,antibiogramme ,etc. (**Debabza,2014**)

### III.4. Conservation des souches

La conservation de courte durée des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée par l'anse de platine. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

La conservation de longue durée des souches a été réalisée par ensemencement dans le bouillon nutritif. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, un volume de la suspension obtenue a été transféré dans des tubes Eppendorf, à l'aide d'une pipette Pasteur, avec 15 à 20 % du glycérol stérile. Chaque souche doit être conservée en plusieurs copies. Les tubes ont été stockés au congélateur à -20°C (**Debabza, 2014**).

### **III.5. Identification phénotypique**

L'identification comporte une série d'étape, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé ; les souches isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards (la coloration de Gram, test catalase et d'oxydase) et par le système API 20E et API 20NE.

Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures (**Chibi, 2015**).

#### **III.5.1. Caractère macroscopique**

L'étude des caractères visibles à l'œil nu : formes, taille, couleur et aspect (**Chibi, 2015**).

#### **III.5.2. Examen microscopique**

##### **a. Coloration de Gram**

###### **□ Principe et technique**

La coloration de Gram est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme et leur disposition, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liée à la structure de la paroi (**Lezzar et Abdelmalek, 2016**). (Voir annexe 3)

###### **□ Lecture**

Observer au microscope à l'objectif x 100 à immersion

Avec cette coloration double, les bactéries « Gram + » apparaissent en violet foncé

Tandis que les bactéries « Gram - » sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2014).

### **b. Test oxydase**

#### **□ Principe et technique**

L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O<sub>2</sub>) comme accepteur d'électrons (**Denis et al ., 2007**).

La mise en évidence de l'oxydase a été faite selon la méthode des disques d'oxydase qui consiste à :

- Déposer sur une lame un disque d'oxydase, et l'imbiber avec une goutte d'eau physiologique stérile.

- Prélever une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur et l'étaler sur le disque (**Denis et al ., 2007**).

#### **□ Lecture**

La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Denis et al ., 2007**). Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.

### **c. Recherche de catalase**

#### **□ Principe et technique**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec dégagements d'oxygène. La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif.

Le test est réalisé en mettant une colonie d'une culture jeune sur une lame contenant une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### **□ Lecture**

La formation de bulles d'oxygène indique que la bactérie possède une catalase, la réaction se fait selon l'équation suivante :  $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$

### **d. Mannitol-mobilité**

#### **□ Principe**

Le principe du milieu repose sur l'aptitude de certaines entérobactéries à fermenter le mannitol (Virage au jaune) et à éventuellement réduire les nitrates en nitrites (**bio-rad, 2011**).

#### □ **Technique**

Ce milieu étant faiblement gélosé, si avant ensemencement, le culot est disloqué, faire fondre le milieu au bain-marie bouillant et le laisser se solidifier en plaçant les tubes dans de l'eau froide, en position verticale. Ensemencer au moyen d'un fil de platine par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu. Incubation à 37 °C pendant 18 à 24 h (**bio-rad, 2011**).

#### □ **Lecture**

Ce milieu fournit trois réponses

- Le mannitol est fermenté : le milieu vire au jaune. Dans le cas contraire, il garde sa couleur initiale.

-Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, en créant un trouble du milieu.

-Les bacilles immobiles cultivent uniquement le long de la strie d'ensemencement.

• En ajoutant, à la surface du milieu, les réactifs de GRIESS (acide sulfanilique et  $\alpha$ -naphthylamine), il est possible de mettre en évidence les nitrites, si la bactérie possède une nitrate-réductase (**bio-rad, 2011**).

### **III.5.3. Identification biochimique par la galerie API 20**

#### **a. Galerie API 20 E**

##### □ **Principe et technique**

Le Système d'Identification API 20E est utilisé pour l'identification des entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif qui poussent facilement. Le système consiste en une galerie de 20 micro-tubes contenant les substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne (**koumba, 2007**).

##### □ **Préparation de la galerie**

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

-Sortir la galerie de son emballage.

-Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation (Bio Mérieux SA)

**(Debabza, 2014).**

**□ Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h sur GN **(Debabza, 2014).**

**□ Ensemencement de la galerie API 20 E**

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air.

- Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.

- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.

- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.

- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures **(BioMérieux SA) (Debabza, 2014).**

**□ Lecture de la galerie**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (voir annexe 4).

Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

**□ Test TDA** : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

**□ Test IND** : ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

**□ Test VP** : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.



□ **Note:** le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Ré-incuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (**BioMérieux SA**) (**Debabza, 2014**).

#### □ **Interprétation**

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne) (**Debabza, 2014**).

### **b. Galerie API 20 NE**

#### □ **Principe et technique**

L'API 20 N E est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium...*), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données.

La galerie API 20 NE comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline 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 d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

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

La préparation de la galerie et de l'inoculum a été effectuée comme précédemment décrits pour l'API20E (**Debabza, 2014**).

#### □ **Inoculation de la galerie**

-Remplir les tubules (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension bactérienne en utilisant une pipette Pasteur. Pour éviter la formation des bulles des fonds des tubules, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

-Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer environ 200µl de la suspension précédente.

- Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.

- Remplir les tubules et les cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.

- Remplir avec l'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.

- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 24 heures (Bio Mérieux SA) **(Debabza, 2014)**.

#### □ **Lecture de la galerie**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (voir annexe 4).

- Noter sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).

- La révélation des deux tests NO<sub>3</sub> et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO<sub>3</sub> et TRP **(Debabza, 2014)**.

#### □ **Test NO<sub>3</sub>**

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO<sub>3</sub>.

- Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Une réaction négative peut être due à la production d'azote ; ajouter 2-3 mg de poudre de zinc dans la cupule NO<sub>3</sub>.

- Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative, car les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le zinc (**Debabza, 2014**).

**Test TRP**

Ajouter 1 goutte de réactif de James. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive (**Debabza, 2014**).

**Tests d'assimilation**

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive. Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées +/- (Bio Mérieux SA). (**Debabza, 2014**).

**Interprétation**

L'identification a été réalisée à l'aide du logiciel d'identification. (Debabza, 2014).

### **III.5.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques**

#### **a. Définition et principe**

**Définition**

C'est l'étude de la concentration minimale inhibitrice en milieu gélosé (Roland, 2006).

**Principe**

La méthode de diffusion ou antibiogramme standard.

Des disques de papier buvard imprégnés d'antibiotiques à tester sont disposés à la surface d'une gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée avec une culture pure de la souche à étudier. Dans l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque (**Roland, 2006**).

#### **b. Réalisation pratique de l'antibiogramme**

**Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne (à partir d'une culture jeune de 18 heures), prélever au moins 03 colonies et émulsionner dans 05 ml d'eau physiologique stérile.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm soit 0,5 la valeur de Mac Ferland. Cela correspond à une culture pure à peine confluyente de 10<sup>6</sup> à 10<sup>8</sup> UFC/ml (CA-SFM, 1998).

#### □ Milieu de culture

Le milieu utilisé est le Muller-Hinton coulé dans une boîte de pétri de façon uniforme et jusqu'à une épaisseur de 4mm (Roland, 2006).

#### □ Ensemencement

L'ensemencement par écouvillonnage (méthode de Kirby-Bauer) :

-Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.

-Le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi.

-Ensemencer la boîte de Mueller-Hinton dont l'épaisseur de la gélose est de 22 mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.

-Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes (CA-SFM, 1998).

#### □ Application des disques et incubation

Appliquer les disques 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 ou bien utiliser directement porte disque d'antibiotiques. Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas (CA-SFM, 1998).

#### □ Les antibiotiques utilisés

**Tableau 1.** Les antibiotiques testés

Les antibiotiques	Charge du disque (µg)
Gentamycine (CN)	(CN-10µg)
Amoxicilline (AML)	(AML-2µg)
Chloramphénicol (C)	(C-30µg)
Amoxicilline acide clavulanique	(AUG-30 µg)

Streptomycine (S)	(S-10 $\mu$ g)
Acide nalidixique (NA)	(NA-30 $\mu$ g)

### **c. Lecture**

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 conformément aux normes CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie. 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 (**Roland, 2006**) (voir annexe 5 ).

### **III.1. 2.5.5. Recherche de l'antagonisme des probiotiques vis-à-vis des souches isolées (Fleming et al., 1975)**

A travers ce test nous avons voulu tester l'éventuel effet inhibiteur des probiotiques sur les entérobactéries. Pour cela des pré-cultures des souches de probiotiques sur bouillon MRS et des pré-cultures des souches d'entérobactéries sur bouillon LB sont préparées.

#### **Test d'inhibition par des substances présentes dans le surnageant**

#### **Préparation de l'inoculum**

Préparer une suspension bactérienne (à partir d'une culture jeune de 18 heures) des probiotiques et des souches entérobactéries.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm soit 0,5 la valeur de Mac Ferland. Cela correspond à une culture pure à peine confluyente de 10<sup>6</sup> à 10<sup>8</sup> UFC/ml (**CA-SFM, 1998**).

#### **Milieu de culture**

Le milieu utilisé est le LB, coulés 20 ml dans des tubes à vis de façon uniforme et ajouter 400micro litre de suspension bactériennes des souches utilisés.

#### **Ensemencement**

-Verser le mélange dans des boites de pétrie.

-Laisser solidifier les boites en position inverse pour éviter la formation des gouttelettes d'eau.

**a. Méthode des disques imprégnés (Savadoغو et al ., 2004 ; Tadesse et al ., 2004).**

Afin de préciser si l'inhibition observée nécessite un contact entre cellules lactiques et entérobactérie, ou si une éventuelle substance secrétée par la bactérie lactique pourrait diffuser dans le milieu et inhiber l'entérobactérie. Pour cela le milieu de culture des bactéries lactiques était centrifugé (10000 tours/min, 4°C, 10min) et le surnageant était récupéré stérilement. Chaque souche d'entérobactéries était ensemencée en masse dans la gélose molle LB en surfusion. Après solidification et séchage de la gélose, des disques de papier filtre stériles imbibés du surnageant de chaque souche de lactobacilles étaient déposés à la surface du milieu. Après 24h à 48h d'incubation à 37°C les diamètres des éventuelles zones d'inhibitions de croissance de l'entérobactérie sont mesurées.

**b. Méthode des puits**

Le même principe que la première méthode. Après solidification et séchage de la gélose, creuser des puits à l'aide d'une cloche stérile. Le surnageant de chaque souche de lactobacilles étaient déposés à la surface du milieu dans les puits. Après 24h à 48h d'incubation à 37°C dans la jarre, les diamètres des éventuelles zones d'inhibitions de croissance de l'entérobactérie sont mesurés.

**III.5.6 Les probiotiques utilisés:**

**Tableau 2.** Les probiotiques testés pharmaceutiques :

Souches	Genre et espèce	Origine
<b>Ultra biotique flore intestinale (A)</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	Commercial
<b>Ultra biotique infantile (I)</b>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Commercial

	<i>Bifidobacterium lactis</i>	
<b>Ultra levure (L)</b>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Commercial
<b>Smebiocta (S)</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Commercial

**Tableau 3.** Les probiotiques testés (Amara, 2020)

<b>Souches</b>	<b>Genre et espèce</b>	<b>Origine</b>
<i>NSC5C</i>	<i>Lactobacillus ssp</i>	Lait de chamelle, Naama
<i>JUMIII4</i>	<i>Lactobacillus ssp</i>	Lait de jument, Saïda



# **PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION**

---

L'objectif de cette étude est de :

- Recherche et identification des bactéries de l'environnement hospitalier qui peuvent causer des infections.
  - Recherche de la multirésistantes des entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques.
  - Recherche de l'antagonisme des probiotiques vis-à-vis des entérobactéries. Sont les principaux tests subis par les bactéries isolées.
- Enfin l'évaluation de la qualité d'hygiène dans l'environnement hospitalier

#### .IV.1. Prélèvement

30 prélèvements ont été prélevés de l'hôpital (Ahmed Medeghri) à partir des surfaces sèches et humides (voir annexe 2).

#### IV.2. Analyse des prélèvements au laboratoire

Après une période d'incubation à 37°C pendant 24h à 48h en bouillon BHIB pour les prélèvements de surface, nous avons obtenu les résultats dans le tableau (4).

**Tableau 4.** Les résultats des prélèvements bactériologiques.

Service	Nombre des prélèvements	Résultat positive	Résultat négative
Réa covid	4 (13, 33%)	4	0
Chirurgie Femme	5(16, 66%)	3	2
Médecine interne	5(16, 66%)	2	3
Bloc chirurgicale	4(13, 33%)	4	0
Réa médicale	3(10%)	2	1
Infectieux	6(20%)	4	2
Salle de soins urgence	3(10%)	2	1
Total	30 (100%)	21	09

Trente prélèvements de surface et air a été collecté à partir de sept services à l'hôpital AHMED MEDEGHERI.

Le résultat que nous avons obtenu (tableau 4) montre que à partir de nombre total des prélèvements obtenu, 21 des prélèvements sont noté comme résultats positives et 9 sont noté comme résultats négatives. Les échantillons des résultats positifs ont été ensemencés sur les milieux gélose nutritive, gélose bromocrésol pourpre (BCP), Hektoen, Chromagar et Chapman.

Dans cette étude, les résultats des analyses de contamination par les bactéries sont relativement faibles dans le service Médecine interne, service Réa médicale et service Infectieux par rapport les autres services. Les résultats les plus positifs après la période d'incubation ont été observés au niveau des services Réa covid, urgence, Chirurgie femme et Bloc chirurgicale.

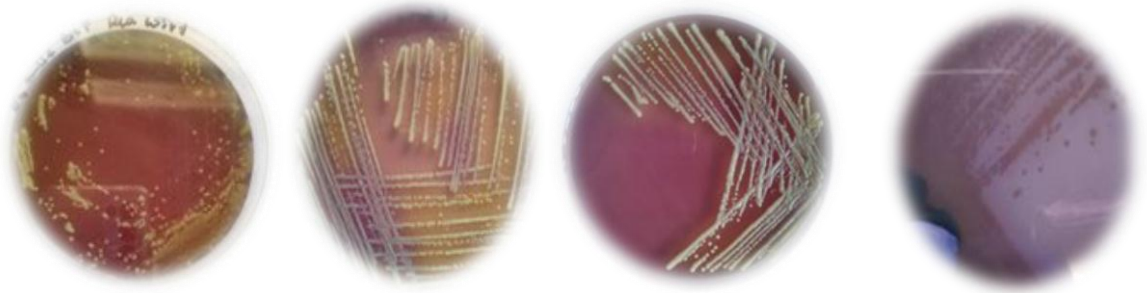
Les sites les plus contaminés étaient chariot, robinet, paillasse, interrupteur, et la poignée de porte Cela est dû à l'utilisation fréquente par les patients et les visiteurs sans oublier la flore intestinale humaine (prélèvement de l'abdomen et cuisse , bloc opératoire ).

#### **IV.2.1. Aspect macroscopique des isolats**

Les isolats bactériens ont montré divers aspects culturels, en fonction du milieu de culture, permettant de suspecter leur appartenance à un groupe bactérien ou à un autre (*entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et autre groupe bactérien). L'aspect des colonies sur le milieu solide permet de déterminer la forme, le relief, la taille, la consistance et la couleur (fermentation) sur boîte de Pétri. Sur la gélose nutritive : nous avons obtenir des colonies blanchâtres, rondes, bombées, de déférente taille.

**Tableau 5.** Aspect de culture des bactéries trouvées sur gélose bromocrésol pourpre (BCP), Hektoen et Chapman (B : milieu BCP, H : Hektoen, C : Chapman, h : Humide, S : sèche, MI : médecine interne, INF : infectieux, Bloc O : Bloc Opérateur, Réa M : Réa Médicale, CHF : Chirurgie femme, URG : urgence, Réa C : Réa Covid).

Souche	Services	Milieu de culture	Aspect macroscopique des colonies
h (6,20,19)	Bloc O Réa C	BCP	Colonies jaune, rondes, lisses, bombées à contour régulier avec virage de milieu du violet au jaune (lactose +).
S (10,13,25) h (15)	CHF INF Bloc O	BCP	Colonies pourpre, lisses, à contour irrégulier, de grande taille, ayant une tendance à la confluence, sans virage de couleur de milieu (lactose -).
S( 22,1,25,9)	URG MI Bloc O	BCP	Colonies pourpre ou bleu, à contour irrégulier, de grande taille, muqueuses ayant tendance à la confluence, sans virage de couleur de milieu (lactose -).
S 24 H 27	URG Réa M	BCP	Colonies bleus, à contour régulier, de petite taille, sans virage de couleur de milieu (lactose -).
S (6, 22,7)	INF URG	HK	Colonies jaune saumon, grosses, muqueuses, bombées, ayant une tendance à la confluence, avec virage de milieu du vert au jaune-oronge.
S(25,9,6)	URG Réa M CHF	HK	Colonie vertes ou bleuâtres, de déférente taille (petite, grosse), plat, sans virage de couleur de milieu.
S(21,22,7 )	INF MI	HK	Colonie bleue, de petites tailles, bombées, sans virage de couleur de milieu
S (26, 20, 10, 1,8) h (27, 15,17)	INF Réa M URG	Chapman	Colonies jaune, arrondies à bords régulier, avec virage au jaune du milieu (mannitol +)
S (27,22, 24, 30)	MI CHF	Chapman	Colonie blanchâtre, arrondies à bords régulier, sans virage de couleur de milieu (Mannitol -).



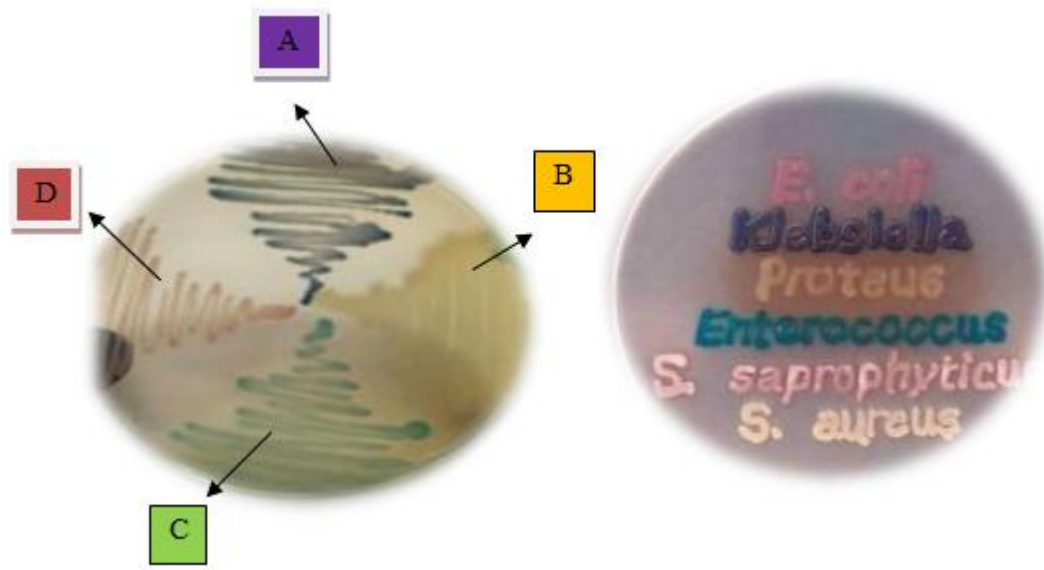
**Figure 5.** Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur le milieu bromocrésol



**Figure 6.** Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur le milieu Chapman



**Figure 7.** Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur le milieu Hektoen



**Figure 8.** Aspect macroscopique des cultures bactériennes sur le milieu Chromagar  
**A :** *klebsiella ssp*, **B :** *Staphylococcus ssp*, **C :** *Enterococcus ssp*, **D :** *Escherichia*

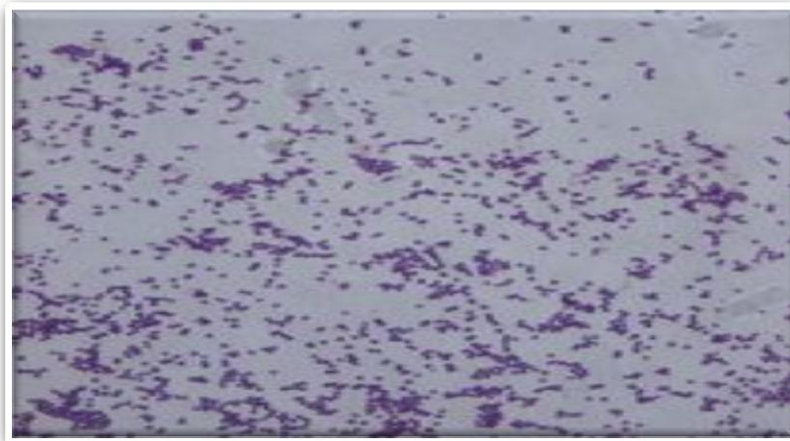
*Coli*

#### IV.2.2. Examen microscopique

##### IV.2.2.1. Coloration de Gram

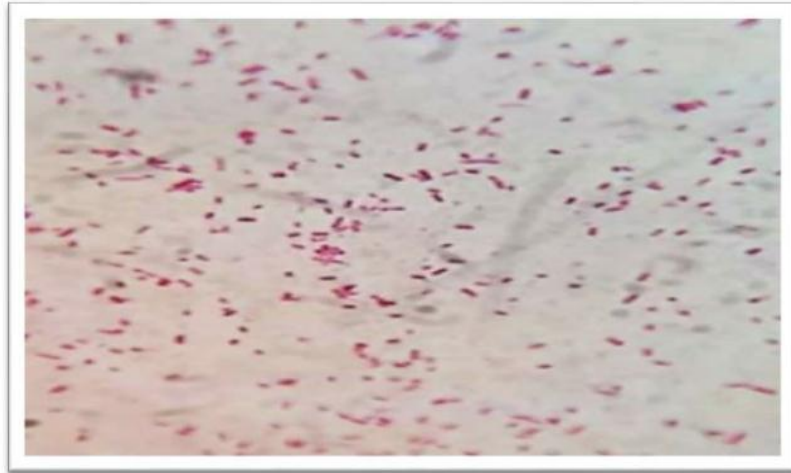
es résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram, montre que les souches se présentent sous forme :

□ Cocci coloré en violet, isolés ou regroupés en paires et la plupart en amas (grappe de raisin) sur le milieu Chapman.



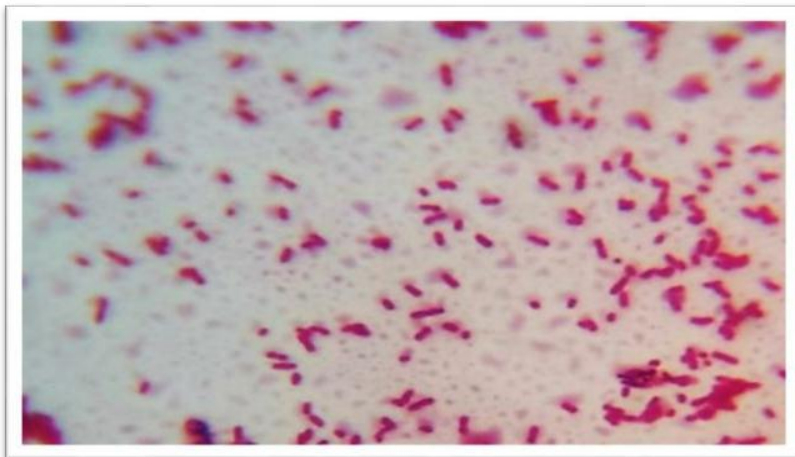
**Figure 9.** Observation microscopique des Cocci à Gram positif isolés à partir de service médecine interne.

Bacilles coloré en rose, isolés, diplobacille ou regroupés en amas.



**Figure 10.** Observation microscopique des bacilles à Gram négatif isolés à partir de service Bloc opératoire.

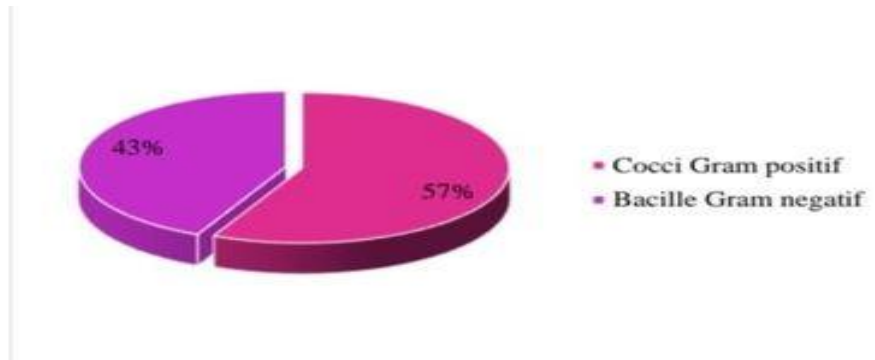
Bacilles coloré en rose, fins, isolés, diplobacille.



**Figure 11.** Observation microscopique des bacilles à Gram négatif isolés à partir de service d'urgence.

#### IV.2.2.2. Pourcentage des souches isolées

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure (8).



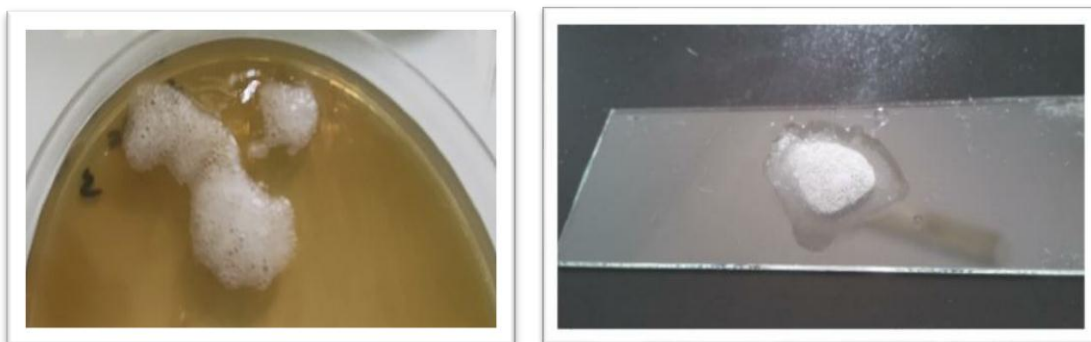
**Figure 12.** Pourcentage des souches CGP et BGN isolés.

Le résultat de La figure 8 montre que à partir de 30 souches isolées La plupart des souches sont des Cocci gram positif qui représente 18(57%) alors que 12(43%) représente des bacilles Gram négatif (BGN). Contrairement à nos résultats, Le résultat de Bouguenoun. (2017) indique que 87% (16/21) de BGN et 13% (5/21) des CGP, ont été trouvés dans les surfaces hospitalières.

#### IV.2.3. Identification biochimique

##### IV.2.3.1. Recherche de catalase

Toutes les bactéries isolées, testées pour la production d'une catalase, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure (9).



**Figure 13.** La formation de bulles de gaz de test catalase de la souche (15). Le résultat de la figure 9 montre que Les tests de catalase étaient positifs pour l'ensemble des bactéries (30 souches (100%)).



#### IV.2.3.2. Test oxydase

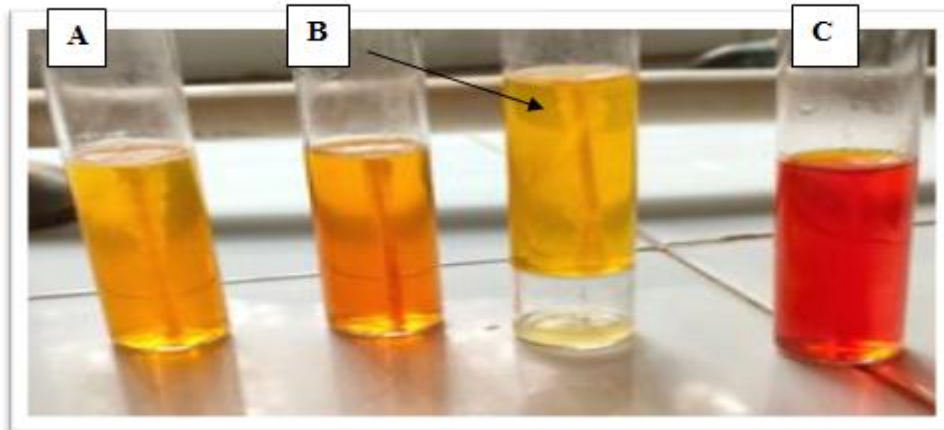
Si les bactéries oxydent le disque, le disque deviendra violet à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après, indiquant un test positif. Aucun changement de couleur, indique un test négatif. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure (10).



**Figure 14.** Observation du résultat positif de test oxydase de la souche (10).

Les résultats présentés dans la figure 10 montrent que 21 souches ont une oxydase positive avec pourcentage de 81,63% et 9 souches dépourvues d'oxydase avec taux de 18,36%.

#### IV.2.3.3. Test mannitol-mobilité



**Figure 15.** Résultats de test mannitol-mobilité.

A partir de résultat de la figure 15 le tube (A) a un mannitol positif, qui indique que les bactéries ont acidifié le milieu qui vire alors au jaune (grâce au rouge de phénol) avec ou sans dégagement de gaz. En ce qui concerne la mobilité. Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement (tube B), en créant un trouble du milieu.

Par contre le tube (C) indiqué un résultat négatif, les bactéries immobiles persistent le long de la piqûre centrale et le milieu garde sa couleur initiale. On note à partir de ce test 21 (61,22%) souche sont mannitol positif et 9 (38,77%) souches sont mannitol négatif, par contre on trouve que 12 (42,85%) souches sont des souches mobiles et 18 (57,14%) sont des souches immobiles.

**Tableau 6.** Les résultats des tests biochimiques (catalase, oxydase et mannitol- mobilité) des isolats.

tests biochimiques	Catalase	Mannitol-mobilité		Oxydase
		Mannitol	Mobilité	
Les souches				
(S.25), (S.9), (h.6)	+	+	+	-
(h.6), (h.20), (h.19)	+	+	+	-
(S.30), (S.22)	+	+	-	-
(S.22), (S.1), (S.25), (S.9)	+	+	+	-
(S.13), (S.23), (h.19)	+	-	+	+
(S.24), (H.26)	+	-	+	+
(S.27), (h.15), (S.13), (h.10)	+	-	+	+
(h.20), (S.29), (S.33), (S.10), (S.32), (S.9), (S.1), (S.13), (h.15), (S.8), (S.16), (S.27), (S.21), (S.25),	+	+	-	-
(S.27), (S.14), (S.22), (S.24), (S.28), (S.5),	+	-	-	-

A partir de (tableau 6) les résultats obtenus après vérification de certains tests d'identification (catalase, oxydase, mannitol mobilité) 30 souches ont été isolée des différentes surfaces de l'environnement hospitalier (paillasse, contacte, robinet, lavabo...).

**Tableau 7.** Répartition des CGP et BGN

Les souches		Répartition des souches
Cocci Gram +	<i>Staphylocoque</i>	<b>12</b>
Bacilles Gram -	<b>BGN</b>	<b>6</b>
	<b>BGNnf</b>	<b>3</b>
Total		<b>21</b>

Le résultat de (tableau7) montre que la majorité des Cocci Gram positifs sont les staphylocoques (12) avec pourcentage de 57,14%).

Ces résultats sont identiques avec **Amara** et **Khaldi (2015)** indique que l'identification de 82 souches bactériennes isolées montre la prédominance des Staphylocoques. Concernant les BGN isolés de l'environnement sont divisé en deux groupes, 6 (24,48%) appartiennent à la famille d'*Enterobacteriaceae* et 3 (18,36%) au groupe des non fermentant. Bouguenoun (2017) rapporte que les BGN ont été majoritairement des entérobactéries, suivies par les BGN-NF.

**Figure 16.** La répartition des souches dans l'environnement hospitalier.

#### **IV.2.3.4. Identification par galerie API 20**

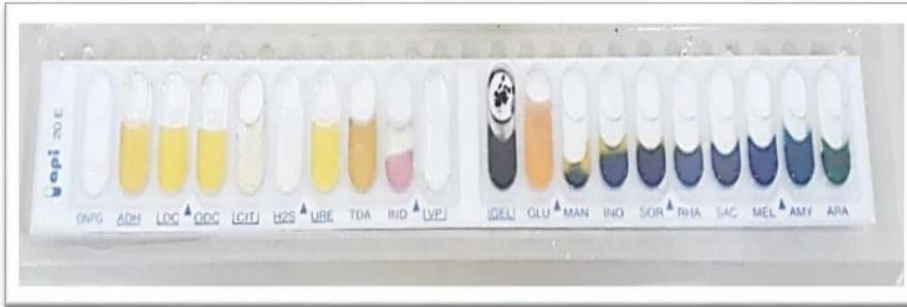
##### **a. Galerie API 20 E**

L'identification bactérienne réalisée par galerie API 20 E nous a permis de mettre en Évidence les principaux caractères biochimiques de onze souches. Nous avons identifiés les souches dans **le tableau 08** : Les résultats obtenus après incubation sont les suivants

**Tableau 8** Résultat de la galerie API 20E de dix souches.

N°	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	Identifiée à
30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Aeromonas salmonicida</i>
25	+	-	+	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia odorifera</i>
6	-	-	-	+	+	+	+	+	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis</i>
27	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>
9	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>Cedacea lapagei</i>
9*	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	V	-	-	+	-	+	-	-	<i>Cedacea davisae</i>
15	-	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>Shigilla ssp</i>
1	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Chromobacterium violaceum</i>
19	+	-	+	+	-	-	V	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	<i>Escherichia coli 1</i>
22	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

- À partir du catalogue analytique il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. (22)



**Figure 17.** Résultat de la galerie API 20 E de la souche (22).

- À partir du catalogue analytique il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Escherichia coli*. (19)



**Figure 18.** Résultat de la galerie API 20 E de la souche (19).

- À partir du catalogue analytique il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Serratia liquefaciens*. (25)



**Figure 19.** Résultat de la galerie API 20 E de la souche (25).

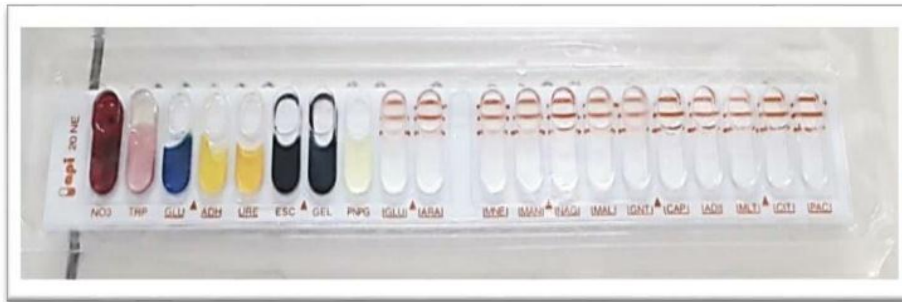
**b.galerie API 20 NE**

L'identification bactérienne réalisée par galerie API 20 NE nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des quatre souches. Les résultats obtenus après l'incubation sont les suivants :

**Tableau 9.** Résultat de la galerie API 20 NE de trois souches. Nous avons identifiés les souches dans le tableau 9

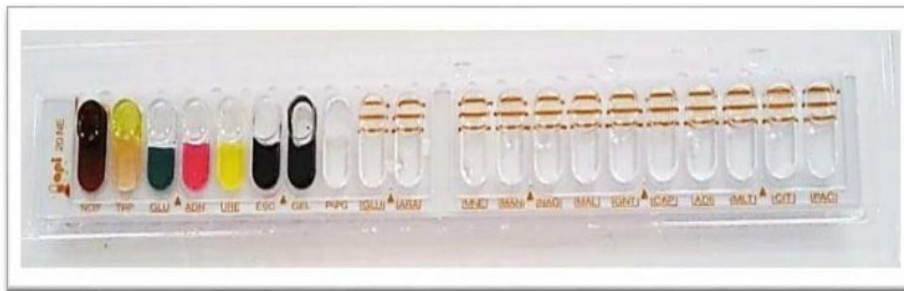
N <sup>0</sup>	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	Identifiée à
24	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	<i>Pseudomonas luteola</i>
10	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
13	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>

- A partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Vibrio alginolyticus*. (13)



**Figure 20.** Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (13).

- À partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche correspond à l'espèce *Pseudomonas luteola*. (24)



**Figure 21.** Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (24).

- À partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche est correspondue à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. (10)



**Figure 22.** Résultats de la galerie API 20 NE de la souche (10).



- A partir des tests biochimiques classiques, il s'avère que la souche est correspondue à l'espèce *Staphylococcus aureus*. (11)

Tests	NO 3	URE	GL U	ADH	GEL	Mannitol mobilité		oxydase	catalase
						mannitol	mobilité		
Résultats	+	+	+	+	-	+	-	-	+

**Tableau 10.** Résultat des tests biochimique classique de la souche (11).

### c. les souches identifiées.

Les résultats obtenus après purification sont les suivants

**Tableau 11.** Résultat de souches identifiées au niveau des différents services de l'hôpital Ahmed Medeghri

Les souches	N °de prélèvement	Lieu de prélèvement
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(27)	Infectieux –Réanimation Médicale
<i>hromabacterium violaceum</i>	(1)	Médecine Interne – Chirurgie Femme
<i>Serratia odorifera 1</i>	(25)	Urgence – Réanimation COVID
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(22)	Urgence – Infectieux – Chirurgie Femme
<i>Cedacea lapagei</i>	(9)	Urgence – Médecine Interne
<i>Cedacea davisae</i>	(9)	Urgence – Médecine Interne
<i>Aeromonas salmonicida</i>	(30)	Urgence– Réanimation Médicale
<i>Shigella ssp</i>	(15)	Infectieux – BLOC Opératoire
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	(10)	Infectieux – Urgence – Réanimation COVID
<i>Pseudomonas luteola</i>	(24)	Infectieux- Urgence – Réanimation COVID
<i>Proteus mirabilis</i>	(6)	Chirurgie Femme
<i>Vibrio alginolyticus</i>	(13)	Réanimation COVID
<i>Escherichia coli</i>	(19)	BLOC Opératoire – Urgence – Médecine Interne
<i>Staphylococcus aureus</i>	(11)	Urgence – BLOC Opératoire – Chirurgie Femme – Médecine Interne - Réanimation Médicale

### IV.3.3. Etude de la sensibilité et la résistance des souches aux antibiotiques

#### (L'antibiogramme)

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité ou la résistance des souches à étudiée à certains antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide.

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés, puis ils sont comparés au diamètre critique rassemblé (voir annexe 3).

Parmi les vingt une souches isolées nous avons choisir 10 isolats. Les résultats de l'antibiogramme des isolats sont reportés sur Le tableau (12).

**Tableau 12.** Résultat de l'antibiogramme des souches isolées.

<b>ATB</b> <b>Souches</b>	<b>AML</b>	<b>NA</b>	<b>S</b>	<b>GN</b>	<b>C</b>	<b>AUG</b>
<b>Souche (6)</b>	R	S	S	R	S	R
<b>Souche (24)</b>	R	S	S	S	S	S
<b>Souche (10)</b>	R	R	R	R	S	R
<b>Souche (11)</b>	R	S	S	R	S	R
<b>Souche (15)</b>	R	S	R	R	R	R
<b>Souche (13)</b>	R	S	S	S	S	S
<b>Souche (19)</b>	R	S	S	S	S	S
<b>Souche (22)</b>	R	S	S	S	S	R
<b>Souche (27)</b>	R	R	S	S	S	R
<b>Souche (25)</b>	S	S	S	S	S	S

(R) : résistante

(S) : sensible

La majorité des souches présentent des sensibilités à plusieurs antibiotiques (Acide nalidixique, Streptomycine, Gentamycine, Chloramphénicol, Amoxicilline acide clavulanique) Cependant aucune souche sensible à Amoxicilline.

D'après les résultats obtenus, nous notons :

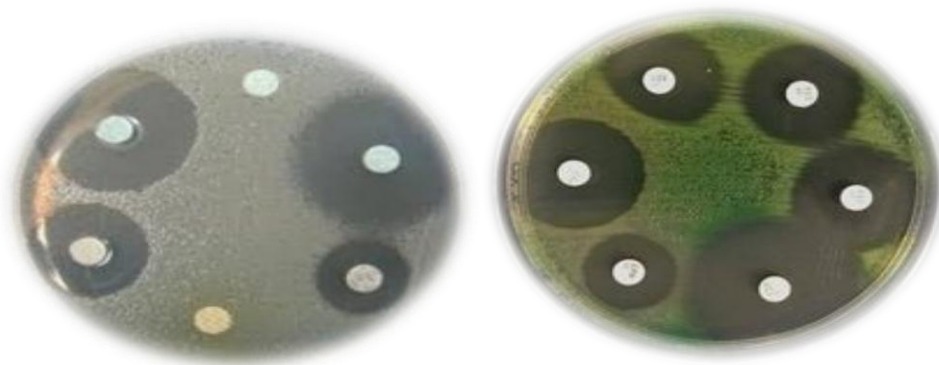
□ Une résistance importante à La famille de  $\beta$ -lactamines avec un taux de 60%, suivi par la famille de Quinolones.

□ La souche appartenant aux espèces: *Shigella ssp*, *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une multirésistance aux antibiotiques testés.

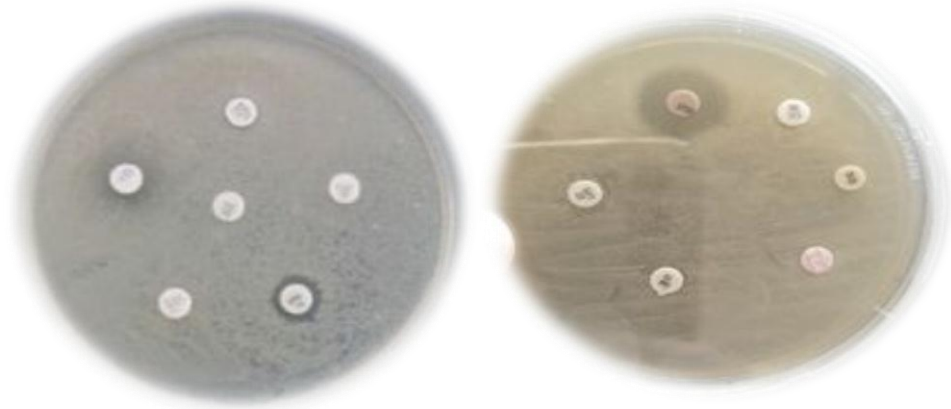
□ Les souches de *Staphylococcus* présentent une résistance aux familles de l'antibiotique suivant:

□ Les espèces (*Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas luteola*.) Représente taux de sensibilité les plus élevés.

□ Les espèces (*Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenosa*.) représente 50% de résistance et 50% de sensibilité. **Bouaziz et Ramadan (2006)** montre que la majorité des bactéries isolées du milieu hospitalier représente une résistance à la majorité des antibiotiques et que cette résistance est assez similaire d'une bactérie à une autre et elle est indépendante de pourcentage des germes isolé.



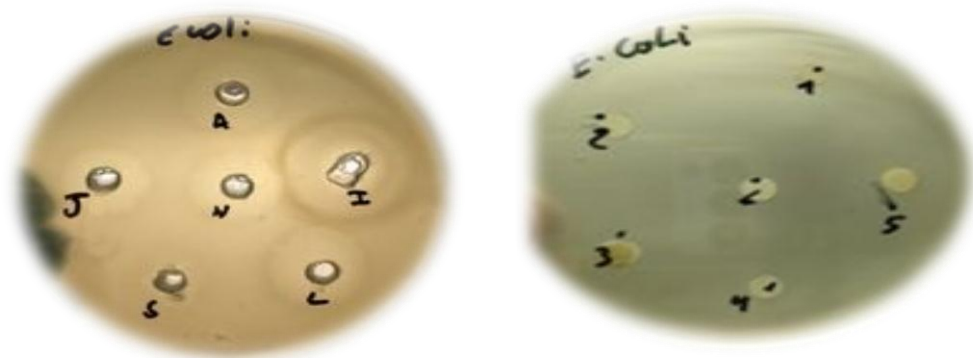
**Figure 23** : Résultats d'antibiogramme des souches (22) et (25).



**Figure 24** : Résultats d'antibiogramme des souches (10) et (15).

#### IV.3.4. Antagonisme des souches de lactobacilles vis-à-vis des souches isolées.

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques contre douze bactéries pathogènes a été évaluée afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagoniste par deux tests. Pour déterminer si l'inhibition est provoquée par un agent endocellulaire ou exocellulaire, un premier test utilisant des cellules entières de bactéries lactiques et un deuxième test utilisant le surnageant du milieu de culture des lactobacilles a été nécessaire. Des disques de papier filtre wattman étaient imprégnés dans des cultures jeunes des lactobacilles puis disposés à la surface d'une gélose LBensemencée en masse par l'entérobactérie. Par contre on creuse des puits dans la surface d'une gélose LBensemencée en masse par l'entérobactérie dans le second test. Dans les deux cas, la sensibilité éventuelle est détectée par la présence d'une zone d'inhibition (halo clair) provoquée par la souche inhibitrice (cellule ou surnageant). Des exemples de résultats sont présentés dans les **Figures 24et 25**.



**Figure 25:** Inhibition de *Escherichia coli* par les bactéries lactiques

A gauche : puits remplies de surnageant ; à droite : disques imbibés de cellules entières de bactéries lactiques.



**Figure 26:** Inhibition de *Shigella ssp* par les bactéries lactiques

A gauche : puits remplis de surnageant ; à droite : disques imbibés de cellules entières de bactéries lactiques.

Le test des disques imbibés de cellules entières de bactéries lactiques.

N'ayant pas conduit à des résultats concluants, ce test a été réitéré en utilisant la méthode des puits remplis de surnageant.

Les résultats globaux obtenus sont montrés dans le **Tableau 13**. Les souches à tous les lactobacilles testés, alors que les souches *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* et *Vibrio alginolyticus* sont peu inhibées. Aucune croissance n'a été remarquée pour *Serratia odorifera* et *Cedacea lapagei* : cela est vraisemblablement dû à leur croissance lente (phase de latence plus importante que les autres souches, démarrage plusieurs jours après l'ensemencement).

La souche de *Lactobacillus rhamnosus* et *Escherichia coli*, *Shigella ssp* et *Pseudomonas aerogenosa* sont fortement sensibles *Bifidobacterium lactis* (I) montre le plus grand impact sur la croissance de la majorité des souches isolées.

Les autres souches de bactéries lactiques provoquent des inhibitions variables selon les combinaisons considérées et la souche lactique .

La moins inhibitrice des entérobactéries est la souche de *Saccharomyces boulardii* (L) sauf vis-à-vis des souches isolées les plus sensibles (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aerogenosa*

**Tableau 13** : Inhibition des souches isolées par les bactéries lactiques (méthode des puits remplies de surnageant).

<i>LB ssp</i>	(A)	(I)	(L)	(S)	<i>JUMIII4</i>	<i>NSCSC</i>
<i>Enterobactéries</i>						
<i>Enterobacter aerogenes</i>	7	15	+/-	6	7	10
<i>Chromobacterium violaceum</i>	5	X	+/-	X	X	X
<i>Serratia odorifera 1</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	X	X	X	X	X
<i>Cedacea lapagei</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Shigella ssp</i>	13	29	7	7	9	10
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	11	30	12	7	5	11
<i>Proteus mirabilis</i>	10	21	9	X	9	7
<i>Vibrio alginolyticus</i>	14	21	X	+/-	6	9
<i>Escherichia coli</i>	15	19	16	7	11	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	31	11	13	+/-	+/-
<i>Aeromonas salmonicida</i>	X	19	+/-	X	X	X

Diamètre d'inhibition mesuré en millimètre (mm)

(+/-) : halo diffus

(X) : absence de croissance

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques, que ce soit en fermentation homolactique ou bien hétérolactique. Les principaux facteurs sont le pH et la production d'acides organiques, l'accumulation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (les lactobacilles en produisent entre 0,001 et 8mM, en fonction de l'espèce, de la souche et des conditions de cultures (**Sakamoto et al, 1998; Kullisaar et al ., 2002; Zalan et al ., 2005 ou Strus et al ., 2006**). Les autres produits qui rentrent en jeu dans le phénomène d'inhibition sont le dioxyde de carbone, le diacétyl, les bactériocines (**McAuliffe et Hill, 2001; Twomey et al ., 2002; Bauer et al ., 2005; Patton et al ., 2005 ; Merzoug 2010**) et la reutéline (métabolite intermédiaire de la fermentation, produit aussi bien par les bactéries lactiques que par d'autres groupes microbiens (**El-Ziney et al ., 1998**).

Dans notre étude, les résultats obtenus ne conduisent pas à la même conclusion (**Amara 2020**). Le surnageant inhibe les souches isolées, elles ne résistent

pas et montrent des inhibitions variables en fonction des différentes combinaisons réalisées. Contrairement aux cellules entières de bactéries lactiques qui résistent. Ceci indique que le (ou les) facteur(s) d'inhibition se trouve(nt) lié(s) à la cellule lactique, plutôt qu'être excrété(s) dans le milieu de culture.

# **PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---



## V. Conclusion

Les différentes surfaces d'un environnement hospitalier sont des sites favorables à l'émergence et au développement des microorganismes, leur propagation dépend d'une part des « réservoirs » et d'autre part de la transmission des germes. Les différents réservoirs potentiels de ces bactéries sont les patients eux-mêmes, le personnel soignant, le matériel médical et l'environnement.

Dans notre étude nous avons évalué la qualité hygiénique et le degré de contamination des surfaces au sein de l'hôpital de Saida. Notre travail a permis d'isoler 30 souches prélevées sur différents sites dans sept services de l'hôpital d'Ahmed Medeghri.

Les résultats obtenus suite à des analyses microbiologiques ont permis d'identifier les souches à partir de quatorze isolats, dont des souches appartenant majoritairement à la famille des *Enterobacteriaceae* ainsi que des souches appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*.

La plupart des souches isolées sont des Cocci Gram positif (57%) alors que 43% représentent des bacilles Gram négatif (BGN).

L'étude de la résistance aux antibiotiques a montré que la majorité des souches isolées expriment une sensibilité à des différentes familles d'antibiotiques. Les taux de résistance les plus élevés ont été marqués pour la famille des  $\beta$ -lactamines.

Nous avons ensuite recherché le pouvoir antagoniste des probiotiques vis-à-vis des entérobactéries isolées de l'environnement hospitalier ces dernière révèlent une sensibilité très importante aux différents probiotiques testés.

Ces résultats nous incitent à proposer l'utilisation des probiotiques en association des antibiotiques et leur recommandation au sein des structures sanitaires. Il s'agit particulièrement du renforcement de l'application des mesures générales d'hygiène, et plus précisément l'hygiène des malades et de l'environnement hospitalier, de la sensibilisation du personnel hospitalier concernant ce risque sous-estimé dans l'environnement des hôpitaux algériens.

# **PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

**VI .Références bibliographiques**

1. Avril J. L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 1992. Bactériologie clinique. 2<sup>ème</sup> édition, Ellipses, Paris, 511p
2. Amara. S, Effets probiotiques des bactéries lactiques sur le lapin de race local, 2009, LBMB, Oran, Es-Senia.
3. anghendries JP (2001) Prévention de l'allergie : Arch Pédiatr 8 : 1037-1041.  
Helin T, Haatela S, Haathtela T (2002) No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 57: 243-246
4. Ashraf M, Arshad M, Siddique M ET muhammad G.(2009).In vitro screening of locally isolated *Lctobacillus* species for probiotic properties. *Pakistan Vet.J.*,2009.
5. Avril J. L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 2000. Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition, Ellipses, Paris, 602 p.
6. Avril J. L., Monteil H., Dobernat H., Denis F. 2006. Bactériologie clinique. Edition ELLIPSE.
7. Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. 2000. Bactériologie clinique. 2<sup>ème</sup> édition Marketing, paris, pp. 148-280
8. Barbut R., Getty S., Neyme D., Magne S., Bernardon Y., Ribadeau Dumas R., Petit J.C. 2003. *Clostridium difficile* : hygiène des mains et environnement. *Hygiènes* 6, 449-45510-
9. Berche P., Gaillard J. L., Simonet M. 1988. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1<sup>ère</sup> édition, Médecine-sciences Flammarion, 660p.
10. Bio-red. 2011. Mannitol-Mobilité-Nitrate/Gélose. V4. 355-5514/356-4874.
11. Bongaerts, G. P. A., & Severijnen, R. S. V. M. (2001). The beneficial, antimicrobial effect of probiotics. *Medical Hypotheses*, 56(2), 174-177.
12. Bouaziz S., Ramande A. 2006. Contrôle de l'état général d'hygiène Au niveau de service des urgences de l'hôpital de Mohamed Boudiaf. Thèse de magistère Université kasdi Merbah -Ouargla, pp 39-58-60-62.
13. Bouaziz S., Ramande A. 2006. Contrôle de l'état général d'hygiène Au niveau de service des urgences de l'hôpital de Mohamed Boudiaf. Thèse de magistère Université kasdi Merbah -Ouargla, pp 39-58-60-62.
14. Bouguenoun W. 2017. Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries

- incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar-Annaba, 176 p
15. Brunser O, Araya M, Espinoza J, Guesry PR, Secretin MC, Pacheco I (1989) Effect of acidified milk on diarrhea and the carrier state in infants of low socio-economic status. *Acta Paediatr Scand* 78: 259-64.
  16. Burns, A. J., & Rowland, I. R. (2000). Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics.
  17. Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria : A littérature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28 :4,281-370.
  18. Cartier F., Beaucaire G., Perrone C., Vilde J. L. 1996. APPIT (Association des professeurs de pathologie infectieuse et tropicale destinée au formateur de santé sur le thème nosocomiale et leur prévention. NOSOCO-ROM-Base Multimédia DocPédagogique.
  19. CA-SFM. 1998. Antibiogramme en diffusion. Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué 1998 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sanofi Diagnostics Pasteur, 12p
  20. Cavallo J. D., Antoniotti G., Baffoy N., Guignement C. S., Hajjar J., Horn C., Le Gouhir C., Le Guyader A., Lejeune B., Mounier M., Salomon V. 2002. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé Air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN.
  21. Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec. 2016. Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* : méthode par filtration sur membrane. MA. 700 PSE 1.0, Rév. 4, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 18 p.
  22. Chibi A. 2015. Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Thèse de master, université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 60 p
  23. Coudeyras, S., & Forestier, C (2010). Microbiote et probiotiques: impact en humaine *Canadian Journal of Microbiology*, 56(8), 611-650.
  24. CTIN : Comité Technique national des Infections Nosocomiales. 2002. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, 78p. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(1), 13-24.

25. Debabza M. 2015. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de doctorat d'état, Université Badji Mokhtar-Annaba, pp. 5-60-61-62-63-64-65
26. Delarras C. 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire. Lavoisier, France, pp.66-67.
27. Denis F., Ploy M. C., Martine C., Bingen E., Quentin R. 2007. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris, Elsevier Masson SAS, 640p
28. Denis F. 2011. Bactériologie médicale : technique usuelles Elsevier Masson, pp. 430-524
29. El-Ziney M.G., Uyttendaele M., Debevere J. and Jakobsen M. (1998) Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20(10): 913-916
30. England, UK: John Wiley and Sons Ltd Hélène C .C carnobactérium maltaromaticum : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse présentée en vue d'obtenir les grades de docteur de l' INPL et Docteur/PhD en procédés Biotechnologiques et Alimentaire. Université de Ngaoundere, Cameroun. P5.
31. enzinger S., Schneider A., Tschopp C. 2008. Immersion en communauté Infections nosocomiales.
32. Fauchere J. L., Avril J. L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris.
33. Faure, S., Pubert, C., Rabiller, J., Taillez, J., & Yvain, A. L. (2013). Que savons-nous des probiotiques?. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(528), 18-21.
34. Flaudrois J. P. 2004. BactérioGéné/croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médical DCEMI, UFR Médecine Lyon Sud-laboratoire de Biométrie, p. 1-3-10.
35. Freney J. R. F., Hansen W., Bollet T. C. 2000. Précis de bactériologie clinique.
36. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA (2010) Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastro- enterol Hepatol* 7:503–14
37. Goulet O, Thibault H, Gontier C, Blareau JP (2001) less severe diarrhoeic episodes with consumption of a new fermented infant formula, FFC50: a double blind randomised study in 968 French infants. *Ann Nutr Metabol* 45 (Suppl 1): 557 (résumé)

38. Grimont F., Grimont P. A. D. 2002. Enterobacter In : Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>ème</sup> édition, Vol 2, The Proteobacteria, Partie B : The Gammaproteobacteria, USA, Springer, pp 661-671. 213217.
39. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)
40. Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
41. Gupta, R., Jeevaratnam, K., & Fatima, A. (2018). Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health: a review. *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 5(10), 411-424.
42. Hajjar H., Hartemann P., Luu-Duc D., Nicolle M. C., Perraud M., Bertrou A., Centre J. C., Chapuis C., Guignement S., Fabry J. 2000.
43. Hart C. A. 2006. Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter and Serratia spp. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), Principles and practice of Clinical Bacteriology. 2<sup>ème</sup> édition, pp. 377- 386.
44. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Ko R (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending care centres : double-blind, randomised trial. *Br Med J* 322: 1327-1329.
45. Isakow W, Morrow LE, Kollef MH (2007) Probiotics for preventing and treating nosocomial infections: review of current evidence and recommendations. *Chest* 132:286-94
46. Isenberg H. 1992. Enterobacteriaceae, In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR: Infectious Diseases. Saunders, pp 1463-1478.
47. Janda J. M., Abbott S. L. 2006. The Genera Klebsiella and Raoultella. The Enterobacteria, 2nd edition. Washington, USA: ASM Press, pp. 115-129.
48. Jarlier V., Nordmann P. 2000. Entérobactéries et bêta-lactamines. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Botler C. Précis de bactériologie clinique. Paris, ESKA, pp 649-665.

- 
49. Jean Louis F., Jaen L., Avril. 2002. Bactériologie générale et médicale, pp :199,214-239,244-249-252-260-298-306-307.
  50. Jozala AF, de lencastre Novaes LC, c holewo O, Moras D, et penna TCV. 2005, Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *Afr J Biotechnol*, 4:3:262-2-
  51. Kotelnikava EA, et Gelfand MS. 2002, Bacteriocin production by Gram positif bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation, *Russian J, Genetics*, 38(6):628-641, translated from *genetika*, 38(6):758-772.
  52. Koumba k. 2010. Fréquence d'isolement des *Klebsiella* au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel tour de 2002 à 2007. these de pharmacie université de Bamako, Mali, p53
  53. Lagha, A. B., Haas, B., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*, 48(1), 22.
  54. Lehner A., Roger S., Fanning, S., Iversen C. 2011. Enterobacter In : Molecular detection of human bacterial pathogens. USA, CRC, pp 853-863.
  55. Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2014). Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 167-199
  56. Lilly DM, Stillwell RH (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147:747-8
  57. Lionel H. 2003. Hygiène et soins infirmiers. 2ème édition, pp 6-10-11-16- 18,21-32-37-40-41-46
  58. Lister P. D., Wolter D. J., Hanson N. D. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22 : 582-610.
  59. Margot P., Chantal G. 2009. Les infections nosocomiales - Agir ensemble pour des milieux cliniques sains et sécuritaires, La gestion des risques 1re partie, pp 1-19.
  60. Marianelli, C., Cifani, N., & Pasquali, P. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*, 161(8), 673-680.

- 
61. Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021
62. Marteau P. et Seksik P., 2005. Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées postantibiotiques. *Re. Fran. Lab.* 73-76.
63. Martirosyan, D. M., & Leem, C. (2019). The bioactive compounds of probiotic foods/supplements and their application in managing mental disorders. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 2(10), 206-220.
64. McAuliffe et Hill., 2001; Twomey et al. 2002 ; Bauer et al., 2005 ; Patton et al., 2005).
65. McNabb B, Isakow W (2008) Probiotics for the prevention of nosocomial pneumonia: current evidence and opinions. *Curr Opin Pulm Med* 14:168–75
66. Merzoug. M, Etude biochimique et génétique de bactériocines de bactéries lactiques solées à partir de pâte de dattes «Ghars» de Biskra, 2010. LBMB, Es-Senia. Oran.
67. Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine Sciences*, 27(4), 405-412.
68. Morrow LE, Kollef MH (2008) Probiotics in the intensive care unit: why controversies and confusion abound. *Crit Care* 12:160
69. Nauciel C. 2000. Bactériologie médicale, Masson, Paris, pp 47, 128, 152,148.
70. Nauciel C. 2000. Bctériologie médicale. Masson, Paris, pp 55-64
71. Novik, G., Sidarenka, A., Kiseleva, E., Kolomiets, E., & Dey, E. S. (2014). Probiotics. In: Brar, S. K., Dhillon, G. S., & Soccol, C. R. (Eds.). *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals* (pp. 199-205). London, New York: Springer.
72. Palleroni N. J. 2008. The road to the taxonomy of Pseudomonas. In: Cornelis, P. (Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp 1–18.
73. Paterson D. L., Rossi F., Baquero F., Hsueh P. R., Woods G. L., Satishchandran V., Snyder T. A., Harvey C. M., Teppler H., DiNubile M. J. 2005. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (6), 965



- 
74. Pilet C. H., Bourdon J. L., Toma B., Marchal N., Balbastre C., Person, J. 1987. Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne, pp: 38-53-55-152-166-167- 190-170-171-230-248.
75. Prescott M. A., Pastey M. K. 2010. Identification of Unique Blood and Urine Biomarkers in Influenza Virus and Staphylococcus aureus Co-infection: A Preliminary Study. *Biomark Insights*, 5 :145-151
76. Qassimi L. 2010. Épidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation (A propos de 147 cas). Thèse, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc, 148p
77. Raynaud. S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse N° d.ordre : 826 pages : 309
78. Richard C. I., Grimont F. 1992. Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia. In : LE MINOR (L). Bactériologie médicale, Paris : Flammarion, 427-31p. LECLERC H., Microbiologie générale, 2e édition, 1983, 95p.
79. Roland Y. 2006. Profile antibiotique des bactéries responsables d'infection urinaire communautaire. Diplôme d'état de doctorat université Bamako-Mali, pp73-75.
80. Rousseau, V. (2004). *Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale*. Thèse de Doctoral dissertation, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp.33.
81. Saavedra JM, Tschernia A (2002) Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *Br J Nutr* 87 (Suppl 2) : S241-46.
82. Samedi, L., & Charles, A. L. (2019). Evaluation of Technological and Probiotic Abilities of Local Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 7(1), 9-19.
83. Seksik, P. (2007). Probiotiques et maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42(2), 51-59.
84. Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440.

- 
85. SFAR : Société française d'anesthésie et de réanimation. 2002. Recommandations des experts de la SRLF : Prévention de la transmission croisée en réanimation. *J. Réanim.* 11 : 250–256
  86. SFAR-SRLF : Société française d'anesthésie et de réanimation et Société de réanimation de langue française. 2009. 5<sup>ème</sup> Conférence de consensus. Prévention des infections nosocomiales en réanimation – Transmission croisée et nouveau-né exclus. *J. Ann. Fr. Anesth.*, 28 : 912–920.
  87. Shi, L. H., Balakrishnan, K., Thiagarajah, K., Ismail, N. I. M., & Yin, O. S. (2016). Beneficial properties of probiotics. *Tropical Life Sciences Research*, 27(2), 73-90.
  88. Stiles et al; 1997. ME, Biopreservation by lactic acid bacteria Antonie Van Leeuwenhoek 1997 ;70 :33-345.
  89. Stoyanova, L. G., Ustyugova, E. A., & Netrusov, A. I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3), 229-243.
  90. Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., LebošPavunc, A., Habjanič, K., & Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.
  91. Teagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463-6472.
  92. Vanden B. M., Yzerman E., Belkum A. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 37, 31333– 3140.
  93. Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728
  94. Vigilance environnementale : Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. *Hygiènes*, VIII (3) : 139-179.
  95. Weber DJ, Rutala W. A. 1997. Environmental issues and nosocomial infections. In: Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections (3rd ed). Williams & Wilkins, Baltimore, pp 491-514

96. y F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 339, 520–532.
- Madjmaa O. Boulmaize, H. (2015). Isolement et caractérisation des souches d'entérocoques multirésistantes en clinique en niveau de CHU Khelil Amrane
97. Yan, F., & Polk, D. B. (2009). Mechanisms of Probiotic Regulation of Host Homeostasis. In: Michail S., Sherman P.M. (Eds). *Probiotics in Pediatric Medicine* (pp. 55-56)HumanaPress.

# **PARTIE VII. ANNEXES**

---

**VII.1. Annexe1 : les milieux de culture (composition en g/l d'eau distillée)****Les milieux gélosés****Gélose nutritive**

Extrait levure.....	2g
Extrait de viande. ....	1g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	15g

PH = 7,4

**Gélose bromocrésol pourpre (BCP)**

Extrait de viande de bœuf .....	03g
Bio-polytone .....	..05g
Lactose .....	10g
Agar... ..	10g
Bromocrésol pourpre .....	0.025g
Eau distillée .....	1 L

PH = 7

**Hektoen**

Peptone. ....	12g
Extrait de levure. ....	03g
chlorure de sodium.....	..05g
Sels biliaires. ....	09g
Thiosulfate de sodium. ....	05g
Citrate de fer ammoniacal. ....	1,5g
Lactose. ....	..12g
Salicine.....	..02g
Saccharose. ....	12g
BBT. ....	.0, 002g

**Fuchsine**

Acide .....	0,1g
Agar .....	.14g

Eau distillée ..... 1L

PH = 7,5

### **Chapman**

Peptone. .... 11g

Extrait de viande... .. 1g

Chlorure de sodium ... .. 75g

Mannitol. .... 10g

Rouge de phénol ..... 0,025g

Agar... .. 15g

Eau distillée..... 1L

PH = 7,5

### **Mannitol -mobilité-nitrate**

Peptone tryptique de viande ..... 20g

Mannitol..... 02g

Rouge de phénol. .... 0.04g

Nitrate de potassium..... 01g

Agar... .. 04g

pH = 7,6-7,8

### **Gélose Muller Hinton**

Infusion de viande de bœuf..... 300 ml

Peptone de caséine. .... 17, 5g

Amidon de maïs ... .. 1,5g

Agar... .. 17g

PH = 7,4±0.2

### **Chromagar**

Chromopeptone ..... 16,1g

Mélange chrogène..... 1,3

Gélose ..... 15,0

PH = 6,9± 0,2

### **Milieu MRS (De Man; Rogosa et Sharpe)**

Peptone... .. 10,0g

Extrait de viande... .. 8,0 g

Extrait de levure ..... 4,0 g

Glucose .....	.20,0 g
Acétate de sodium trihydraté... ..	...5,0 g
Citrate d'ammonium .....	...2,0 g
Tween 80 .....	.....1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium( $K_2HPO_4$ ) .....	...2,0 g
Sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) .....	0,2 g
Sulfate de manganèse ( $MnSO_4$ )... ..	0,05 g
Agar-Agar (gélose .....	18 g
Eau distillée. ....	.1000 ml

PH = 6,2

#### **Les milieux liquide Bouillon nutritif**

Peptone .....	10g
Extrait de levure.....	5,0g
Chlorure de sodium... ..	.5,0g
Eau distillée .....	1000ml

PH = 7,2

#### **Milieu LB (Luria –Bertani )**

Tryptone ... ..	.10 g
Extrait de levures .....	.5 g
NaCl .....	10 g

Verser le tout dans ~800 ml d'eau distillée ou déminéralisée

Ajouter de manière précise avec une éprouvette graduée de l'eau distillé pour atteindre un total de 1 litre.

Autoclave à 121°C.

Après refroidissement, agiter le flacon pour s'assurer du mélange et le milieu LB est prêt à l'emploi.

**VII.2 Annexe 2 :** Les 30 prélèvements provenant à partir de l'hôpital (Ahmed Medeghri) et les sites des prélèvements de deux types de surface (surface sèche et surface humide)

Services	Sites des Prélèvements	Numéro de prélèvement	Surface	Technique de prélèvement
Salle de soins Urgence	Poignée de porte	1	Sèche	Frotter légèrement et rapidement avec l'écouvillon stérile mouillé préalablement avec l'eau physiologie stérile
	Paillasse	2		
Chariot	3			
Lit	4			
	Robinet	5	Humide	
	Lavabo	6		
Infectieux	Chariot	7	Sèche	
	Lit	8		
	Interrupteur	9		
Médecine interne	Poignée de porte	10	Sèche	
	Paillasse	11		
	Interrupteur	12		
	Plaie infectée	13	Humide	
Pince	14			
Chirurgie femme	Interrupteur	15	Sèche	
	Poignée de porte	16		
	Lit	17		
	Brulure de Instrument chirurgie	18	Humide	
		19		
Réanimation Covid	Poignée de porte	21	Sèche	
	Paillasse	22		



	Masque d'oxygène Tube de Manomètre	23 24	Humide	
Réanimation Médicale	Filtre de respiration Poignée de Lit Intubateur	5 26 27	Sèche	
Bloc Opératoires	Respirateur d'anesthésie	28		Frotter légèrement et rapidement avec l'écouvillon stérile mouillé préalablement avec l'eau physiologie stérile
	Cuisse Abdomen	29 30		

**VII .3 Annexe 3 :****Technique américaine dite « Gram Hucker »**

C'est la technique de la coloration de Gram, modifiée par **Hucker en 1902**, Gram Hucker, qui fait l'objet d'une présentation normalisée en microbiologie aliments (**norme NF EN ISO 7218, octobre 2007**). Le protocole est le suivant :

- Préparer un frottis d'un produit pathologique ou d'une culture Bactérienne.
- Recouvrir le frottis de violet cristal oxalate ; laisser agir 1 minute rincée à L'eau distillée.
- Verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 minute ; rincer à l'eau Distillée.
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes (selon les auteurs).
- Rincé à l'eau distillée.
- Recolorer avec de la safranine pendant 10 à 30 secondes : rincer à l'eau distillée.
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

La safranine peut être remplacée par de la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 pendant 1 minute (**Delarras, 2014**).

**VII.4 Annexe 4 : liste des antibiotiques testés**

Famille	Nom de l'antibiotique	Code	Charge de disque	Diamètre critiques (mm)	
				S	R
<b>β-lactamines</b>	Amoxicilline Amoxicilline	AML	2 µg	≥15	<15
	acide clavulanique	AUG	30 µg		
<b>Quinolones</b>	Acide Nalidixique	NA	30 µg		
<b>Aminosides</b>	Gentamicine	CN	10 µg		
<b>Aminoglycoside</b>	Streptomycine	S	10 µg		
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol	C	30 µg		

**VII.5 Annexe 5:** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E (Bio Mérieux SA)

Test	Substrat	Caractère recherché	Résultat	
			Négatifs	Positifs
ONPG	Ortho-nitro-phényle-Galactoside	Béta- 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
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	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 mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
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
MEC	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

**VII.6 Annexe 6 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20NE (Bio Mérieux SA)**

Test	Composant actif	Réaction/enzyme	Résultats	
			Positive	Négative
NO3	Potassium nitrate	Réduction des nitrates en Nitrites	NIT 1 +NIT 2/ 5 min	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en Azote	Zn/ 5min	
			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 a	Arginine Dihydrolase	Jaune	Orange/ rose/ rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/
ESC	Esculine Citrate de fer	Hydrolyse ( $\beta$ -	Jaune	Gris/ marron/ noir
GEL	Gélatine (origine Bovine)	Hydrolyse de la gélatine (protéase)	Non diffusion	Diffusion du Pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- $\beta$ Dgalactopyranoside	$\beta$ -galactosidase (Para-NitroPhényl- $\beta$ DGalactopyranosid	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-acétyl-glucosam	Assimilation	Transparente	Trouble
MAL	D-maltose	Assimilation	Transparente	Trouble
GNT	Potassium	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

